

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

Grado: 2º Farmacia
Módulo:
Materia: Química analítica II
Facultad: Farmacia
Curso: 2019/2020
Asignatura: Química analítica II
TAPA: Tapa N.º 9 (pasión y sabor)

TAREA 1. Elección de la técnica instrumental

Esta tapa posee aceite de oliva, berenjena y miel. De entre todos estos alimentos, destaca en la composición nutricional de la tapa la vitamina K, que se encuentra en mayor medida en el aceite de oliva, en especial la vitamina K1. Esta es una vitamina liposoluble. Las vitaminas, por regla general, son sensibles a la luz y se oxidan rápidamente. Por ello, debe evitarse la exposición directa a la luz solar. El calor también afecta a la muestra, ya que contribuye a la isomerización del compuesto. Debido a ello, debe mantenerse una temperatura constante y no muy elevada.

La vitamina K1 es liposoluble y posee una consistencia de aceite viscoso y un color amarillo dorado, con una absorción máxima a 269 nm.

La **cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)** se caracteriza por el empleo de una fase estacionaria constituida por partículas de tamaño muy pequeño, del orden de los μm . Esto hace que la eficacia del sistema sea muy elevada proporcionando columnas con un número muy grande de platos teóricos.

Este compuesto se determina mediante la técnica de HPLC, ya que permite separar los compuestos de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones entre las sustancias analizadas en la columna cromatográfica. La elección de esta técnica se debe también a que algunos tipos de HPLC son técnicas eficientes en la detección de compuestos no polares de bajo peso molecular, (**cromatografía de partición en fase reversa**) por ello, es una buena idea la elección de la HPLC para la detección de la vitamina K, que es una vitamina liposoluble, apolar y de bajo peso molecular. Además, esta técnica se realiza en una columna cromatográfica que puede aislar de la luz y permite mantener constante la temperatura, con ello, podemos mantener nuestra muestra intacta sin que sufra ningún tipo de alteración y se pueda realizar adecuadamente su detección.

El HPLC permite la detección continua de los analitos conforme son eluidos, es decir, conforme van saliendo de la fase estacionaria.

TAREA 2.

Descripción del fundamento de la técnica

La cromatografía líquida de alta eficacia pertenece a la cromatografía de elución. Esta técnica se fundamenta en el recorrido de una fase móvil que circula en contacto con un sólido u otro líquido inmiscible, la fase estacionaria. Al introducir una mezcla de analitos en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto hace que al recorrer los analitos la columna lleguen a distintas velocidades, con lo que finalmente quedarán separadas.

- Cromatografía de fase normal: La fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano, amino, etc).

- Cromatografía de fase reversa (inversa): La fase estacionaria tiene una naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilo) y las interacciones que se producen son inespecíficas (efecto solvóforo). Se basa en las interacciones hidrofóbicas que resultan de la repulsión entre un disolvente relativamente polar y una fase estacionaria apolar. En general esta técnica es relativamente eficaz cuanto menor número de grupos alquilo de la cadena del analito a determinar, ya que estos grupos aumentan la hidrofobicidad de la molécula. La fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. En esta modalidad se emplea una fase estacionaria apolar, C18, junto con una fase estacionaria polar, como hidrocarburos de cadena larga unidos a un soporte de sílice.

En esta cromatografía se retienen en la columna en virtud a las interacciones hidrofóbicas que establecen con la fase estacionaria, aunque las interacciones son generalmente débiles pero numerosas, por lo que suele ser necesario disminuir la polaridad del disolvente, con lo que se sustituye el agua de la fase móvil por un solvente orgánico cuya concentración va aumentando conforme se desarrolla la técnica. Cuanto mayor sea la proporción de agua menor será el poder eluyente de la fase móvil, y por tanto, mayores los tiempos de retención.

Para la detección de la vitamina K, se recomienda la HPLC fase normal semipreparativa seguida por HPLC analítica de fase reversa. Debería utilizarse fenilacetato de colesterol como estándar interno, los estándares y soluciones estándares deberían controlarse espectrométricamente en cuanto a la pureza y utilizar la concentración corregida para el cálculo. Es importante mencionar claramente las unidades utilizadas para informar los resultados, por ejemplo, en μg vitamina K1/100 g de alimento. La vitamina es extraída con hexano.

La detección de la vitamina K se realiza mediante UV a 269 nm y se logra la identificación del pico sobre la base de tiempos de retención. La cuantificación se realiza mediante el método de estándar interno utilizando las áreas o alturas del pico.

Para vencer la enorme resistencia que ofrece la fase estacionaria al paso de la fase móvil es necesario emplear un sistema de bombeo a alta presión. Los métodos desarrollados en años recientes para la determinación de la vitamina K se basan principalmente en procedimientos HPLC. Los problemas relacionados a la cuantificación son las bajas concentraciones e interferencias con las matrices de

los alimentos. Por lo tanto, se necesita una prepurificación con HPLC semipreparativo seguida por HPLC analítico para la cuantificación

Sistema semipreparativo

Un estándar de vitamina K es cromatografiado en el sistema HPLC semipreparativo y las condiciones optimizadas de tal manera de obtener un tiempo de retención reproducible para el pico de vitamina K₁ y el pico de fenilacetato de colesterol en el rango de 2,0-4,5 minutos.

Sistema HPLC analítico

Una mezcla de estándar de vitamina K₁ y fenilacetato de colesterol debe ser cromatografiada en el sistema HPLC analítico y las condiciones cromatográficas ajustadas hasta que se obtenga una resolución completa de los compuestos de interés.

Condiciones y cuantificación de HPLC

Una alícuota del extracto concentrado de la muestra se inyecta dentro del sistema HPLC semipreparativo y la fracción que contiene la vitamina K₁ es recolectada vía corte de bandas. La ventana de tiempo para el corte de bandas debe haber sido previamente determinada utilizando una mezcla estándar de vitamina K₁ y deberá ser lo más angosta posible.

La fracción de corte de banda del HPLC semipreparativo debe llevarse a sequedad y redisolverse en 500 µl de 2-propanol. Las alícuotas de la solución obtenida se inyectan en el HPLC analítico y se identifican los picos de la vitamina K₁ y fenilacetato de colesterol como estándar interno.

TAREA 3.

Esquema del equipo instrumental empleado

El sistema de HPLC usado, con C₁₈ como fase estacionaria polar requiere una mezcladora de solventes, un inyector, y una bomba que inyecta líquido a la columna. La fase móvil suele estar constituida por metanol (95%) y etanol (5%).

La función del **inyector** es introducir la muestra en la corriente de fase móvil bajo alta presión. El método de introducción de la muestra es de importancia capital, pues un mal sistema de inyección puede dar lugar a ensanchamientos de la banda cromatográfica que deterioren la eficacia del sistema cromatográfico.

La **bomba** debe permitir la separación en tiempos razonables, soportando presiones de hasta 400 bar. Como las bombas HPLC son casi exclusivamente de pistón, un dispositivo eléctrico actúa sobre el pistón que entra en una cámara donde se halla la fase móvil, para comprimirlo y enviarlo a presión al resto del sistema. La misión de la bomba es la de suministrar un caudal constante y libre de pulsos de la fase móvil a través de la columna, sin que el flujo sea influido por la presión en cabeza de columna, ya que ésta puede variar por obstrucción de las líneas de conducción, del filtro de la cabeza de la columna, etc.

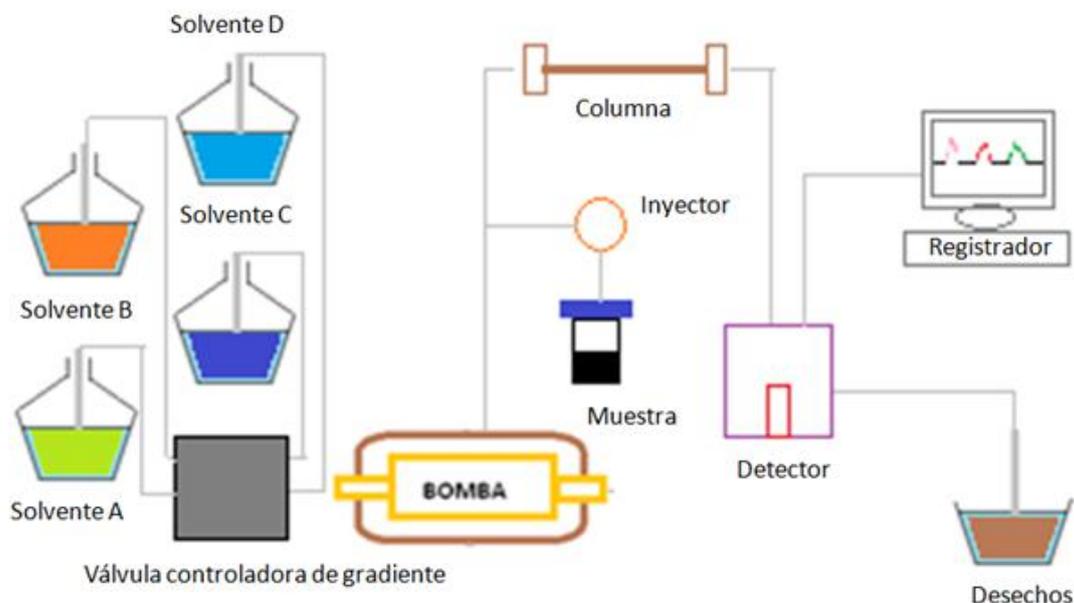
La composición de la fase móvil se irá modificando durante el análisis para ir aumentando su poder de elución, con lo que se utilizará un sistema de **bombeo de gradiente**, ya que cuanto mayor sea la proporción de agua menor será el poder eluyente de la fase móvil, y, por tanto, mayores los tiempos de retención. Para trabajar en la modalidad de gradiente, es necesario que el equipo cromatográfico tenga un dispositivo capaz de realizar mezclas de disolventes con un control preciso y reproducible.

La **columna** es el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquidos, puesto que es en ella donde tiene lugar la separación; por lo tanto, resulta fundamental una correcta elección de la columna adecuada para cada separación, ya que con una columna inadecuada o de mala calidad se nunca se obtendrán buenos resultados, aunque se disponga del mejor instrumental. En la columna, lo que ocurre es que la fase móvil pasa a través de una columna cromatográfica, que contiene la fase estacionaria a un flujo especificado. La separación de los compuestos ocurre en base a la interacción de éstos con la fase móvil y la fase estacionaria.

A la salida de la columna se coloca un detector (en este caso, de absorción ultravioleta) y si se desea recuperar las moléculas que eluyen de la columna, se requiere un colector. 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. La detección en cromatografía se realiza, habitualmente, en continuo, aunque es posible la utilización de colectores de fracciones para la identificación y cuantificación de pequeñas fracciones del eluyente.

Tras los detectores encontramos un **sistema de registro** cuyo objetivo principal es representar en un registro gráfico una señal eléctrica emitida por el detector para cada sustancia separada. El **integrador** suministra además del tiempo de retención para cada sustancia, el área de cada una de las señales, la cual constituye una información importante para la determinación cuantitativa de las sustancias. En un equipo moderno estas funciones son realizadas por un **microcomputador**. Este microcomputador además de procesar los datos obtenidos por el detector controla la fase móvil para las separaciones con elución en gradiente o isocrática y monitorea además el flujo de la bomba, supervisando continuamente todos los parámetros de la separación.

En los sistemas modernos la formación del gradiente de acetonitrilo y el análisis de la información obtenida se realizan mediante una computadora acoplada al equipo; lo que permite estandarizar la cromatografía, identificar la naturaleza los picos eluidos y cuantificar su contenido.



TAREA 4.	Descripción teórica de la realización del análisis cuantitativo
-----------------	--

La razón por la cual empleamos esta técnica cromatográfica es debido a que permite corregir los problemas de cuantificación que presenta; bajas concentraciones e interferencias con las matrices de los alimentos.

Primero se realiza una digestión enzimática. Puede hacerse mediante la adición de fenilacetato de colesterol como patrón estándar interno para ser extraída con hexano.

La determinación de la vitamina K, en especial de la vitamina K1 se hace mediante la técnica de **HPLC semi-preparativo de fase normal** (fase móvil apolar y estacionaria polar) y después una **HPLC de fase reversa** (fase móvil polar y estacionaria apolar) a una longitud de onda de 269nm, que es donde se alcanza el mayor pico. La cuantificación se realiza mediante el método de estándar interno utilizando las áreas y la altura del pico.

	Sistema de fase normal Sistema	Sistema de fase reversa Sistema analítico
--	-----------------------------------	--

	semipreparativo	
Columna	Módulo de compresión radial 8x10	Módulo de compresión radial 8x10
Fase estacionaria	Resuelve Silica; 5µm	Resuelve C18; 5 nm
Fase móvil	Metanol y etanol (95:5)	Metanol y etanol (95:5)
Flujo	2,0 ml/min	2,0 ml/min
Volumen de inyección	100-150 µl	20-50 µl
Detección	UV: 269 nm	UV: 269/277 nm
Tiempo de retención (aprox. en min.)	2,0 - 4,5	Vitamina K ₁ 26 Estándar interno: 42
Estándar		aprox. 2,5 ug/ml
Cálculo		Método estándar interno; Recuento de área o altura

Procedimiento:

Se toman 3 gramos de la muestra o 15,0 g de fórmula "lista para usar" y se suspende en agua con un buffer para evitar cambios drásticos en el pH y se añade **lipasa** (enzima que cataliza la hidrólisis de triacilglicerol a glicerol y ácidos grasos, disgregando así las grasas para que puedan ser absorbidas). Se deja incubar la muestra a 37°C durante 120 minutos.

Después se agregan 10mL de etanol, el estándar interno (fenilacetato) y se extrae la vitamina realizando 2 extracciones con 15mL de hexano.

1. Los extractos se concentran para poder tener una muestra que dé buenos resultados. Esto se logra con un evaporador rotatorio bajo vacío parcial y a una temperatura no excesivamente elevada (no más de 40°C). Se debe quitar el agua para evitar posibles interferencias con una destilación azeotrópica (técnica específica de agregar otro componente para generar un nuevo azeótropo de bajo punto de ebullición que es heterogéneo) con etanol, tolueno o usando un filtro de separación de fases. El residuo se redisolverá en un 2mL de n-hexano.
2. A continuación, se realiza un HPLC semipreparativo.

Para ello, una alícuota del extracto concentrado de la muestra se inyecta dentro del sistema HPLC semipreparativo y la fracción que contiene la vitamina K1 es recolectada mediante la técnica de corte de bandas.

La fracción de corte de banda del HPLC semipreparativo debe llevarse a sequedad y redisolverse en 500 µl de metanol/etanol (95:5).

3. Por último, se realiza el HPLC analítico, en este caso de fase reversa. Una mezcla de estándar de vitamina K1 y fenilacetato de colesterol debe ser cromatografiada en el sistema HPLC analítico y las condiciones cromatográficas ajustadas hasta que se obtenga una resolución completa de los compuestos de interés.

Las alícuotas de la solución obtenida se inyectan en el HPLC analítico y se identifican los picos de la vitamina K1 y fenilacetato de colesterol como estándar interno. La cuantificación se realiza utilizando el método de estándar interno.

BIBLIOGRAFÍA/WEBGRAFÍA

Ods.od.nih.gov. (2019). Office of Dietary Supplements - Vitamina K. [online] Available at: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminK-DatosEnEspañol/> [Accessed 3 Dec. 2019].

Laboratoriotecnicasinstrumentales.es. (2019). Cromatografía de líquidos HPLC. [online] Available at: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-liquidos-hplc> [Accessed 4 Dec. 2019].

Fao.org. (2019). [online] Available at: <http://www.fao.org/3/AH833S19.htm> [Accessed 4 Dec. 2019].

Mncn.csic.es. (2019). [online] Available at: https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf [Accessed 4 Dec. 2019].

Laboratoriotecnicasinstrumentales.es. (2019). Cromatografía de líquidos HPLC. [online] Available at: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-liquidos-hplc> [Accessed 4 Dec. 2019].

Pérez Calderón, R. (2019). Estudio de validación de la Metodología para la determinación de Vitamina A en Alimentos infantiles instantáneos por Cromatografía Líquida de alto rendimiento (HPLC). [online] Scielo.org.pe. Available at: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-4634200000100006 [Accessed 4 Dec. 2019].

Anon, (2019). [online] Available at:
https://www.researchgate.net/publication/271830643_Validacion_de_un_metodo_cromatografico_para_la_determinacion_de_vitamina_A_en_muestras_de_leche_Validation_of_a_chromatographic_method_for_the_determination_of_vitamin_A_in_milk_samples [Accessed 4 Dec. 2019].

Tauja.ujaen.es. (2019). [online] Available at:
http://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/2415/1/TFG_Alcántara%20Durán%2C%20Jaime.pdf [Accessed 4 Dec. 2019].