

Raquel Córdoba Sánchez

Desenvolupament de diferents metodiques d'anàlisi mitjançant la tècnica cromatogràfica HPLC

TREBALL DE FI DE GRAU

dirigit per la Dra. Marta Calull Blanch

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2016

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

Agraïments

La realització d'aquest treball ha estat possible gràcies a l'ajuda aportada pels Laboratoris ISBO. Donar les gràcies a Gerard Isern per donar-me la oportunitat de poder realitzar el treball en el seu laboratori i així poder obtenir una gran experiència dintre del laboratori d'una empresa.

Estic molt agraïda amb Hèctor Rodríguez per tota l'ajuda aportada durant tot el treball, per compartir els seus coneixements, pel suport i confiança en mi. També he de donar les gràcies a Francesc Xavier Samarra per l'ajuda durant aquest període.

Finalment, a Marta Calull per l'ajuda durant les tutories, per revisar el meu treball durant aquest període i pels consells aportats.

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

Abstract

This document explains the development of different analytical methods for the determination and quantification of different analytes using the HPLC chromatographic technique. Vitamins, lactose and hydroxymethylfurfural compound are determined on actual samples provided by the customers. To carry out these determinations different techniques of sample extraction, reactions and analytical conditions are used. Finally, optimizations of the methods already established in the laboratory are also made.

From these optimizations, it will be possible to give final results of the quantifications of the analytes to be determined.

There are several objectives within this document, which are fulfilled during the realization of the different stages of which it is composed. The final aim is to learn the HPLC chromatographic technique, and this aim is successfully achieved.

Índex

	Agraïments	2
	Abstract	3
1.	Objectiu	6
2.	Introducció	
	2.1 Antecedents	6
	2.2 Cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC)	7-9
3.	Part experimental	
	3.1 Instrumentació	10
	3.2 Aparells	10-12
	3.3 Reactius emprats en les diferents determinacions	12-13
	3.4 Determinació de vitamines liposolubles en mostres reals	
	3.4.1 Objectiu	13
	3.4.2 Les vitamines liposolubles	14-15
	3.4.3 Preparació de reactius i solucions	16
	3.4.3.1 Preparació solució d'hidròxid de potassi (KOH) al 50%	16
	3.4.4 Extracció de les vitamines	16
	3.4.5 Determinació cromatogràfica	16-18
	3.4.5.1 Rectes de calibratge de cada vitamina	18-19
	3.4.6 Resultats i discussió	19-22
	3.4.7 Conclusions	22
	3.5 Determinació de vitamina D₃ en aliments	
	3.5.1 Objectiu	23
	3.5.2 Preparació de reactius i solucions	23
	3.5.2.1 Preparació solució d'hidròxid de potassi (KOH) saturada	23
	3.5.2.2 Preparació del patró de 10 ppm de vitamina D ₂	23
	3.5.3 Optimització de l'extracció de la vitamina D ₃ en aliments	23-24
	3.5.4 Determinació cromatogràfica	24
	3.5.5 Resultats i discussió	25-29
	3.5.6 Conclusions	29-30
	3.6 Determinació d'hidroximetilfurfural (HMF) en mel.	
	3.6.1 Objectiu	30
	3.6.2 L'hidroximetilfurfural en la mel	30-31
	3.6.3 Preparació dels reactius i solucions	32
	3.6.3.1 Preparació patró 1000 ppm HMF	32
	3.6.3.2 Preparació dels patrons estàndard	32
	3.6.3.3 Preparació de la solució d'elusió	32
	3.6.3.4 Preparació de la solució de la fase mòbil	32

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

3.6.4	Preparació de la mostra	32
3.6.5	Extracció SPE	32
3.6.6	Determinació cromatogràfica	33-34
3.6.7	Resultats i discussió	34-36
3.6.8	Conclusions	36
3.7 Determinació de lactosa en mostres reals		
3.7.1	Objectiu	37
3.7.2	La Lactosa	37
3.7.3	Determinació de la lactosa	38
3.7.4	Preparació de reactius	38-39
3.7.4.1	Preparació solució NaOH 0,25 M	38
3.7.4.2	Preparació solució de PMP (3-metil-1-pentil-2-pirazolina-5-ona)	38
3.7.4.3	Preparació patró 1000 ppm lactosa	38
3.7.4.4	Preparació dels patrons estàndards	39
3.7.4.5	Preparació solució HCL 2N	39
3.7.5	Preparació de la mostra	39
3.7.6	Reacció de derivatització de la lactosa	40
3.7.7	Mètodes per determinar la lactosa	40
3.7.7.1	Derivatització de la lactosa amb PMP	41
3.7.7.2	Determinació cromatogràfica	41
3.7.7.3	Resultats i discussió	41-42
3.7.7.4	Conclusions	42
3.7.7.5	Derivatització de la lactosa amb PMPA	42
3.7.7.6	Determinació cromatogràfica	43
3.7.7.7	Càlculs de les fases mòbils i els reactius	43-44
3.7.7.8	Resultats i discussió	44-45
3.7.7.9	Conclusions	46
4.	Conclusions	46
5.	Bibliografia	46
6.	Autoavaluació assoliment competències Grau en Química	47-49

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

1. Objectiu

El principal objectiu d'aquest treball és desenvolupar diferents mètodes d'anàlisi amb la tècnica cromatogràfica HPLC per a la determinació dels analits indicats pel laboratori. Dintre d'aquestes determinacions tenim:

- Determinació de les vitamines A,E,D₂,D₃ i K d'unes mostres reals per tal de determinar la seva presència en aquestes mostres.
- Determinació de la vitamina D₃ i optimització de l'extracció de la vitamina D₃
- Determinació del compost hidroximetilfurfural (HMF) en una mostra real de mel, per tal de poder determinar si l'emmagatzematge és correcte o no.
- Determinació de la lactosa en mostres reals.

2. Introducció

2.1 Antecedents

La cromatografia líquida d'alta eficàcia o High Performance Líquid Chromatography (HPLC) és una tècnica cromatogràfica molt emprada en bioquímica i en química analítica.

Les determinacions analítiques mitjançant tècniques cromatogràfiques HPLC es troben en expansió dintre del món de la química i és per aquest motiu pel qual hem vaig plantejar fer un projecte relacionat amb aquest tipus de determinacions.

La meua experiència en aquest camp era a nivell teòric i pràctic en els laboratoris de la universitat i volia ampliar els meus coneixements. Per això vaig buscar una empresa que es dediqués a realitzar totes aquestes determinacions.

Laboratoris ISBO SL és un laboratori amb més de 15 anys d'experiència en els camps de control de qualitat de: aigües, aliments, productes industrials, sòls, etc. També aporten solucions a les incidències productives, les necessitats i controls mediambientals i sanitaris del sector agrari, ramader, de producció i de l'hostaleria fent complir la legislació vigent. Es troba ubicat a Salou.

Les activitats que realitzen estan orientades a la realització d'analítiques d'aigua i d'aliments, seguiment i control de la legionel·la en instal·lacions de risc i l'assessorament en sistemes de qualitat i control de punts crítics en establiments destinats a l'alimentació.

És un laboratori certificat amb la norma UNE-EN-ISO 9001:2008 de qualitat, per l'entitat TÜV Internacional grup TÜV Rheiland SL, amb el número de registre: 0.04.12072

2.2 Cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC)

La cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) és una tècnica utilitzada per a separar els components d'una barreja basant-se en diferents tipus d'interaccions químiques entre les substàncies analitzades, la fase mòbil i la fase estacionària que es troba dins de la columna cromatogràfica. A la Figura 1 es mostra una fotografia d'un instrument de cromatografia de líquids.



Figura 1: Equip HPLC

La fase estacionària es sílica que s'ha tractat amb RMe_2SiCl . La fase mòbil actua de portadora de la mostra.

Aquesta tècnica és molt emprada en la separació de compostos orgànics semi-volàtils, com per exemple Hidrocarburs Poli-aromàtics (PAHs), aminoàcids, etc. [6]

Existeixen dos modes de treball en HPLC:

- Isocràtic
- Gradient

En les dues formes el compost passa per la columna cromatogràfica (com la que es mostra a la Figura 2) a través de la fase estacionària mitjançant el bombeig de líquid (fase mòbil) a alta pressió. La mostra a analitzar s'introdueix en petites quantitats i els seus components van sortint segons la seva interacció química amb la fase estacionària i la fase mòbil.



Figura 2: Columna cromatogràfica

El grau de retenció dels components de la mostra depèn de la naturalesa del compost, de la composició, de la fase mòbil i de la fase estacionària.

El temps que triga un analit un compost en ser eluït de la columna s'anomena temps de retenció, i es considera una propietat característica de cada component en una determinada fase mòbil i estacionària. Els dissolvents més emprats són l'aigua, el

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

metanol i l'acetonitril. L'aigua pot contindre tampons o sals que ajuden a la separació dels compostos.

En la forma isocràtica la composició de la fase mòbil es manté constant durant tot l'anàlisi.

En canvi, en el gradient hi ha una variació en la composició de la fase mòbil durant l'anàlisi. Un gradient normal en una cromatografia de fase inversa pot començar amb un 5% d'acetonitril i progressar de forma lineal fins a un 50% en 25 minuts. El gradient emprat varia en funció de la hidrofobicitat del compost. D'aquesta manera separa els components de la mostra segons la seva afinitat amb la fase mòbil o la fase estacionària. Per exemple en aigua/acetonitril els compostos més hidrofílics s'elueixen a major concentració d'aigua, mentre que els compostos més hidrofòbics s'elueixen a concentracions elevades d'acetonitril.

Dintre de la cromatografia HPLC de partició podem trobar dos tipus:

- Cromatografia de fase normal
- Cromatografia de fase reversa

La cromatografia de fase normal va ser el primer tipus de sistema HPLC emprat en el camp de la química i es caracteritza per separar els compostos mitjançant la seva polaritat. Aquesta tècnica utilitza una fase estacionària polar i una fase mòbil apolar. Es fa servir quan el compost d'interès és bastant polar, ja que així queda retingut amb la fase estacionària.

La força d'adsorció augmenta a mida que augmenta la polaritat del compost. Això provoca que augmenti el temps de retenció. Aquesta força d'interacció no només depèn dels grups funcionals del compost, sinó que també dels factors estèrics, de forma que els isòmers estructurals es podrien diferenciar.

La cromatografia de fase reversa consisteix en una fase estacionària apolar i una fase mòbil de polaritat moderada. Una de les fase estacionàries més comunes és la sílica tractada amb RMe_2SiCl on la R és una cadena alquil tal com $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ o C_8H_{17} .

El temps de retenció és major per a les molècules de naturalesa apolar, mentre que les molècules amb caràcter polar s'elueixen més ràpidament. Aquest temps de retenció augmenta amb l'addició de dissolvent polar a la fase mòbil i disminueix amb la introducció de dissolvents més hidrofòbics.

Aquest tipus de cromatografia es basa en les interaccions hidrofòbiques que resulten de les forces de repulsió entre un dissolvent relativament polar, un compost relativament apolar i una fase estacionària apolar.

Hi ha diverses variables que poden afectar al temps de retenció:

- Compost amb cadena alquil llarga s'associa a un temps major perquè augmenta la hidrofobicitat de la molècula

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

- El àrea de superfície hidrofòbica que sol ser inversament proporcional a la mida del compost.
- Els compostos ramificats s'elueixen més ràpidament que els seus isòmers lineals perquè la superfície que tenen es veu reduïda.

El pH també té un paper molt important ja que aquest pot modificar la hidrofobicitat del compost. Per aquest motiu la majoria dels mètodes utilitzen tampons, com per exemple el fosfat de sodi, per a poder controlar el pH i neutralitzar la càrrega o qualsevol resta de sílica que hagi quedat de la fase estacionària. Els tampons en general milloren la separació cromatogràfica.

A la Figura 3 tenim un exemple d'un cromatograma obtingut amb la tècnica cromatogràfica HPLC-UV d'una mostra on hi havia una mescla d'àcids benzoics.

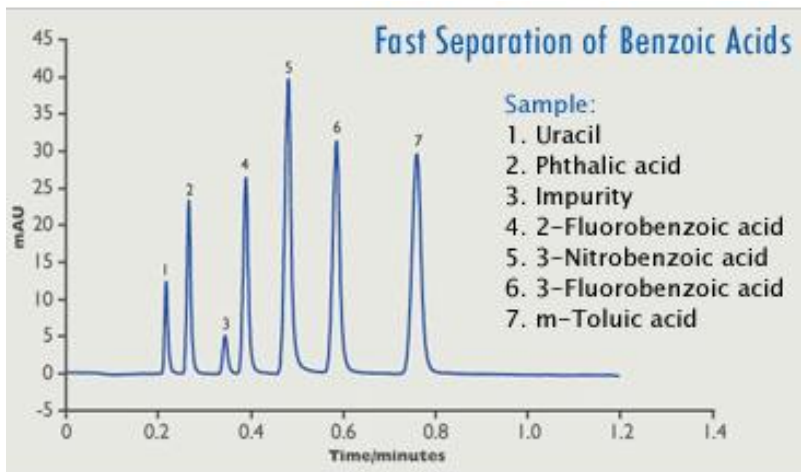


Figura 3: Exemple d'un cromatograma obtingut amb la tècnica cromatogràfica HPLC-UV

A l'esquema de la Figura 4 tenim representades les parts internes de les quals consta un equip HPLC. D'aquesta manera podem saber quin és el camí que fa el nostre analit abans d'obtenir el cromatograma corresponent.

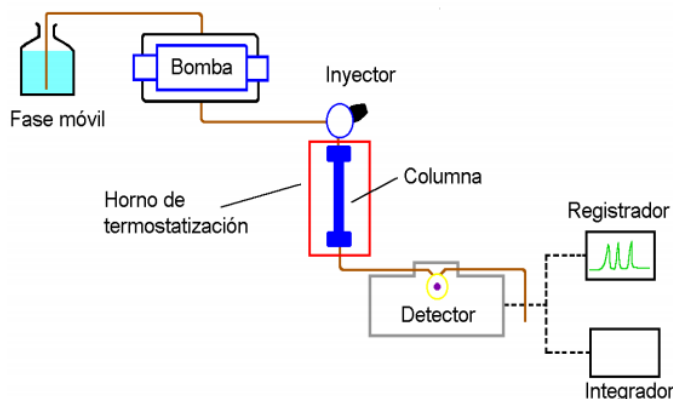


Figura 4: Esquema general de la part interna d'un equip HPLC.

3. Part experimental

3.1 Instrumentació

L'equip emprat en aquest treball és un equip de cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) amb un detector UV. És el model Flexar de la marca Perkin Elmer. Es tracta del mateix equip mostrat a la Figura 1.

3.2 Aparells

3.2.1 Extracció en fase sòlida (SPE)

L'extracció en fase sòlida (SPE) és una tècnica preparativa que s'utilitza per netejar la mostra abans de la seva quantificació o per concentrar els analits presents en la mostra abans del seu anàlisi. El suport del material emprat es un sòlid a través del qual passa el líquid. [5]

Els analits són absorbits en el suport i després s'elueixen segons les seves diferents afinitats entre el material absorbent i la fase mòbil emprada.



Figura 5: Col·lector de buit per SPE

Els avantatges que presenta aquesta tècnica són:

- Molta quantitat de mostra o poca quantitat
- El volum d'elució és petit
- Poc consum de dissolvents i poca possibilitat de contaminació
- Ús de gran varietat de dissolvents

A la Figura 5 es mostra un col·lector de buit. En aquest col·lector es realitza l'extracció, filtració i elució simultània de mostra utilitzant xeringues d'extracció SPE. Damunt de la cambra de buit hi ha una coberta amb tots els connectors on es col·loca la xeringa i que permeten regular el pas de les mostres o dissolvents d'elució cap a l'interior de la cambra.

En l'esquema de la Figura 6 es pot observar les etapes que es realitzen durant l'extracció en fase sòlida (SPE).

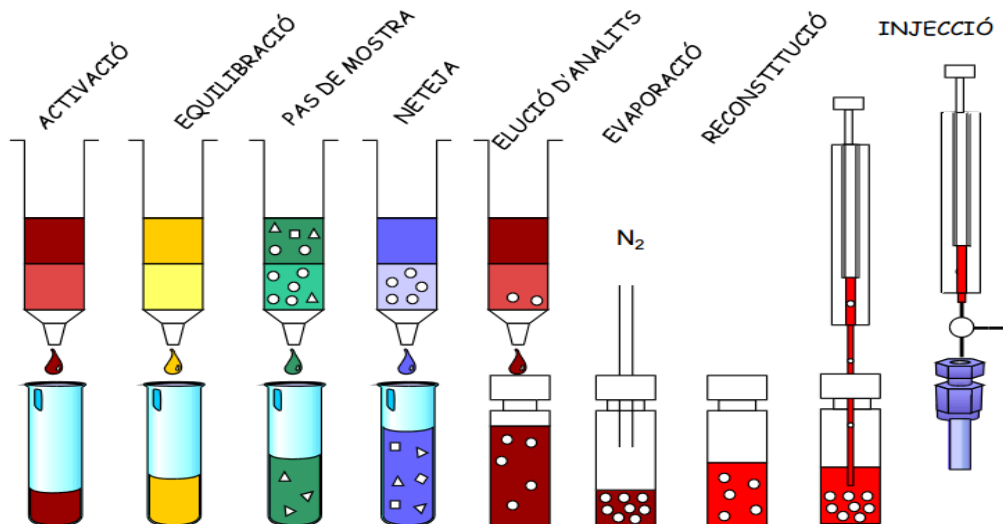


Figura 6: Etapes que es realitzen durant l'extracció SPE

3.2.2 Equip rotavapor o evaporador rotatori

El rotavapor és un equip que mitjançant una destil·lació al buit, permet la evaporació ràpida d'un dissolvent d'una dissolució, recuperant el solut.

S'utilitza per separar mitjançant la evaporació a pressió reduïda i suau del solvent que acompanya al solut d'interès o bé per realitzar destil·lacions fraccionades.



Figura 7: Equip rotavapor

A la Figura 7 es mostra una fotografia d'un equip de rotavapor. L'analit d'interès es col·loca en un matràs d'evaporació que es troba semi submergit en aigua, ja que es troba en un bany maria i es connecta el sistema de rotació del matràs d'evaporació. Es redueix la pressió atmosfèrica mitjançant l'aplicació d'una bomba de buit. El sistema de rotació serveix per evitar que el dissolvent surti violentament durant l'aplicació del buit i així la evaporació es realitza de manera controlada. D'aquesta manera els solvents són separats del solut i destil·lats en el tub de condensació a baixa temperatura i són recollits en el matràs col·lector.

A la Figura 8 es mostra un esquema general de les parts de les quals consta un rotavapor.

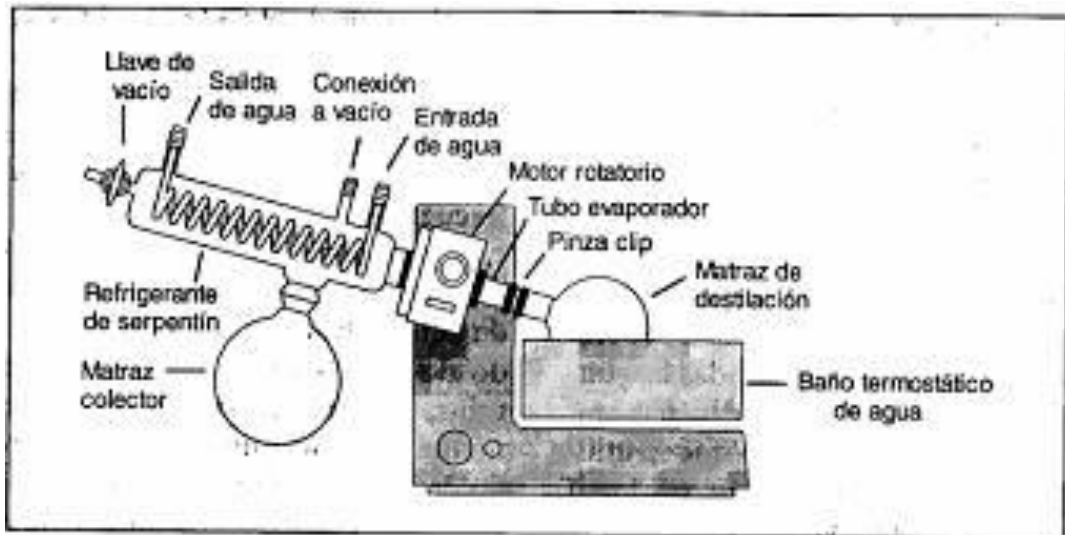


Figura 8: Esquema de les parts d'un equip de rotavapor

Existeixen diverses aplicacions que es fan servir mitjançant el rotavapor. Algunes d'aquestes aplicacions són:

- Separació i purificació de soluts
- Destil·lacions fraccionades de mescles de solvents
- Quantificació de mescles sòlid-sòlid o líquid-líquid
- Síntesis orgànica
- Evaporació de dissolvents...

3.3 Reactius emprats en les diferents determinacions

Durant les diferents determinacions realitzades en aquest treball es fan servir diversos tipus de reactius. Els reactius emprats són:

3.4.1 Reactius generals

- Acetonitril (ACN)
- Aigua ultrapura
- Metanol
- Antioxidants : BHT(butilhidròxidtoluè), àcid ascòrbic
- Solució hidròxid de potassi (KOH) al 50%
- Solució hidròxid de potassi (KOH) saturada
- Hexà
- Solució NaOH 0.25 M
- Solució HCl 2M
- Solució tampó d'acetat amoni 0.1M
- Reactiu de PMP (3-metil-1-pentil-2-pirazolina-5-ona)
- Reactiu de PMPA (4-(3-metil-5-oxo-2-pirazolina-1-il) àcid benzoic)

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

3.4.2 Patrons

- Patró del compost HMF
- Patró de lactosa
- Patrons de vitamines A, D i E

3.4 Determinació de vitamines liposolubles en mostres reals

3.4.1 Objectiu

En aquesta determinació un client ens va enviar unes matèries primes de cada vitamina per a que les analitzem i comprovem la presència d'aquestes vitamines. A les Taules 1-2 es mostren les quantitats que teòricament hi han de vitamines en les matèries primes.

Taula 1: Quantitats teòriques esperades per a la vitamina A i D

Compost	Quantitat (UI/kg)
Vitamina A	1134000000
Vitamina D	505600000

Taula 2: Quantitat teòrica esperada per a la vitamina E

Compost	Quantitat (mg)
Vitamina E	500000

A la Taula 3 es mostra les 4 mostres reals tractades de diferent manera, on s'ha d'analitzar si aquestes mostres contenen les vitamines (A, D, E i K) en la seva composició. A la Taula 4 es mostra la quantitat esperada per aquestes vitamines.

Taula 3: Tractaments rebuts per a cada mostra i la seva referència

Referència	Mostra
2882	Prova pot Premium
2883	Prova pot bàsica
2884	Prova pot llavors
2885	Prova pot EMX

Taula 4: Quantitat esperada per a les vitamines A, D i E

Referència	2882	2883	2884	2885
Vitamina A (UI/kg)	206871	277357	486997	421273
Vitamina D (UI/kg)	63216	61904	140159	129194
Vitamina E (UI/kg)	61	67	134	120

3.4.2 Les vitamines liposolubles

Es defineix com vitamines a un grup de substàncies orgàniques que en quantitats mínimes són vitals per la funció de totes les cèl·lules i han de estar en la dieta d'algunes espècies.[7] Aquestes es classifiquen en :

- Vitamines hidrosolubles
- Vitamines liposolubles

Les vitamines liposolubles són aquelles vitamines que es poden dissoldre en greixos i olis a diferència de les vitamines hidrosolubles que es dissolen en aigua. Aquestes vitamines no s'absorbeixen ni s'excreten fàcilment i el seu excés en el organisme pot resultar tòxic. Normalment s'absorbeixen per les lipoproteïnes conegudes com quilomicrons. Les vitamines A i E s'emmagatzemen en els teixits del nostre organisme.

Són vitamines liposolubles la vitamina D, la vitamina E, la vitamina A i la vitamina K.

La vitamina A que es mostra a la Figura 9 és un nombre genèric que engloba tots els compostos que presenten activitat biològica de vitamina A. La forma activa de la vitamina A és el retinol.

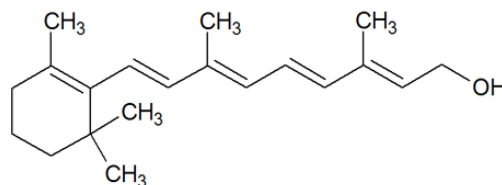


Figura 9: Vitamina A

El retinol és un alcohol primari derivat de l'associació de quatre unitats d'isoprè. S'oxida fàcilment de la seva forma enzimàtica per donar lloc a altres compostos metabòlicament actius com el 11-cis retinal i l'àcid retinoic.

El contingut de vitamina A s'expressa en Unitats Internacionals (UI). En aliments s'expressa en equivalent de retinol que són micrograms d'aquest compost multiplicat per un factor en el que es té en compte l'absorció i la conversió a retinol.

La vitamina A és essencial en la resposta immunitària, participa en la formació i manteniment de la pell, membranes mucoses, dents... També té activitat antioxidant, en especial el seu precursor β -carotè.

La vitamina E que es mostra a la Figura 10 s'emmagatzema en el teixit adipós i en el fetge. La forma activa és el tocoferol i els corresponents tocotrienols.

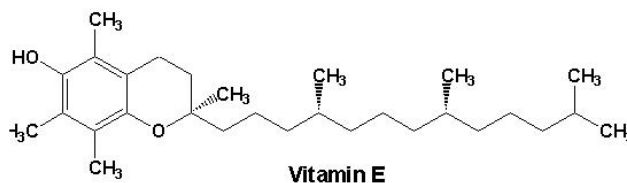


Figura 10: Vitamina E

Les fonts més importants són els vegetals, olis i fruits secs. La forma predominant es α -tocoferol.

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

És un antioxidant ja que s'encarrega d'eliminar els radicals lliures presents en el plasma humà. El contingut de vitamina E s'expressa en mg d'acetat de DL-tocoferol. Ajuda a mantenir el sistema immunitari fort davant de virus i bacteries. També ajuda a dilatar els vasos sanguinis per impedir que la sang es coaguli dintre d'ells.

La vitamina D que es mostra a la Figura 11 s'hidrolitza enzimàticament per a formar substàncies de tipus hormonal. S'encarrega de la correcta absorció de calci i fòsfor necessaris per al manteniment dels ossos i dents. Es troba present en l'oli de fetge de bacallà, tonyina, fetge, llet i clara d'ou. La quantitat de vitamina D present en els aliments és molt petita.

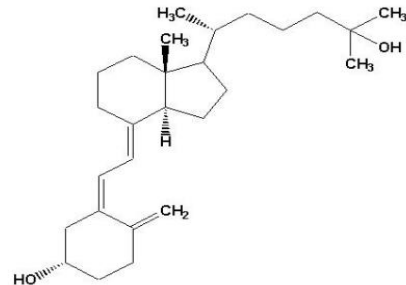


Figura 11: Vitamina D

Aquesta vitamina s'expressa en μg que equival a 40 UI. Tenim dos tipus de vitamina D. La deficiència de vitamina D pot provocar osteoporosis en adults i raquitisme en nens.

Es pot obtenir de dues maneres:

1. Mitjançant l'exposició dels raigs solars (UV)
2. Pel consum d'aliments rics en aquesta vitamina (llet, ou)

Existeixen dos tipus de vitamina D: la vitamina D₃ i la vitamina D₂.

La vitamina D₃ és una prehormona que primer es metabolitza en el fetge i després en el ronyó. És l'anomenat colecalciferol.

La vitamina D₂ es coneguda com ergocalciferol.

La vitamina K que es mostra a la Figura 12 es coneguda com la vitamina de la coagulació perquè sense ella la sang no es podria coagular. Es sintetitza pels vegetals i pels microorganismes intestinals dels animals.

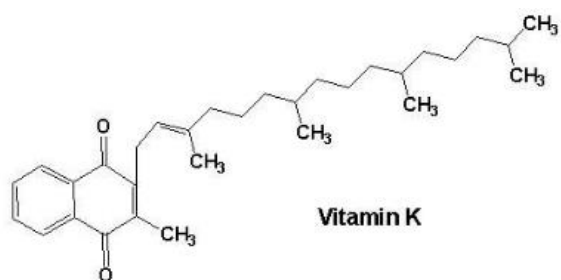


Figura 12: Vitamina K

Les vitamines que pertanyen al grup K són naftoquinones amb poliisoprenoides substituïts. La vitamina K es classifica en 3 tipus:

1. Vitamina K₁: Fil·loquinona
2. Vitamina K₂; Menaquinona
3. Vitamina K₃: Menadiona

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

3.4.3 Preparació de reactius i solucions

És molt important tindre en compte que les vitamines s'oxiden fàcilment davant de reactius que les puguin oxidar, com pot ser la solució d'hidròxid de potassi, o amb la temperatura. És per això que abans d'iniciar el procés de saponificació s'ha d'addicionar una barreja d'antioxidants.

Les vitamines liposolubles són especialment sensibles a l'exposició de la llum solar o de la llum blanca artificial, per aquest fet, sempre que es treballi amb aquesta mètica s'haurà d'utilitzar material opac o bé folrat de paper d'alumini. També s'ha de tindre en compte que si el laboratori té fluorescents blancs aquests hauran de romandre apagats fins al moment de la injecció de la mostra per evitar l'exposició. [6]

3.4.3.1 Preparació solució d'hidròxid de potassi (KOH) al 50%

Es pesen 10g d'hidròxid de potassi al granetari. Aquests 10g es dilueixen en 20 mL d'aigua destil·lada mesurats amb proveta en un vas de precipitats de vidre. Tindre en compte que és una reacció exotèrmica i que per tant s'escalfa.

3.4.4 Extracció de les vitamines

El procediment emprat per a realitzar l'extracció de les vitamines és el següent:

1. Pesen 10 g mostra i posar-ho en un matràs opac fons pla de 250 ml a la balança analítica
2. Addicionar 40 ml metanol, posar a reflux durant 40 min a 40°C agitar a 800-1000 rpm.
3. Després addicionar 2.5g BHT / àcid ascòrbic (antioxidant) i 10 ml KOH 50%. Comença la saponificació durant 40 min a 40°C i 200 rpm.
4. Quan acaba la saponificació addicionar 20,20 i 10 ml d'aigua (deixant 10 min de repòs entre cadascuna). Es deixa refredar a temperatura ambient i filtrar al buit. Es recull la part líquida i es posa en un embut de decantació.
5. Extracció líquid-líquid amb n-hexà 60 ml (3 vegades de 20 ml). Recollim la fase orgànica (la que queda a la part de a dalt). S'afegeix el MgSO₄ i després es filtra per finalment rotaevaporar-ho 40°C.
6. Es reconstrueix la mostra amb 10 ml acetonitril i posar al vial per fer l'anàlisi al HPLC.

3.4.5 Determinació cromatogràfica

Les condicions de l'anàlisi cromatogràfic són les següents:

- Fase mòbil: treball isocràtic 2:49:49 A:B:C en un anàlisi de 13 minuts.

Eluent A: Aigua/Acetonitril 95:5

Eluent B: Acetonitril

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

Eluent C: Metanol

- Volum d injecció: 20µl
- Detector: Espectrofotòmetre UV-Vis amb les longituds 325,265 i 277 nm
- Temperatura forn: 30°C
- Columna: C-18 5µm x 100 mm x 4.6 mm
- Temps de retenció: Els valors apareixen a la Taula 5

Taula 5: Temps de retenció de cada vitamina en el cromatograma

Compost	Temps retenció (min)
Vitamina A	2.405
Vitamina D ₂	5.717
Vitamina D ₃	6.260

A continuació en les Figures 13-15 hi ha els cromatogrames corresponents a les vitamines de les matèries primes. D'aquesta manera en els cromatogrames obtinguts en la matèria prima es va poder identificar el temps de retenció per a cada vitamina que es mostra a la Taula 5. En la matèria prima aportada pel client no hi ha vitamina.

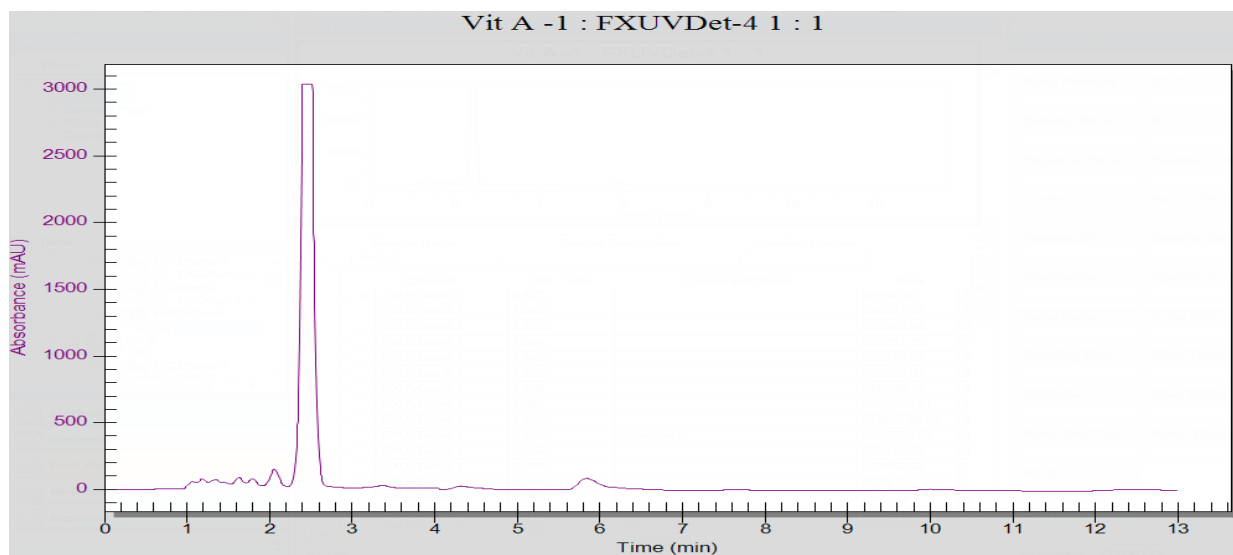


Figura 13: Representació de l'absorbència de la vitamina A en la matèria prima

A la Figura 13 tenim representat el cromatograma corresponent a la vitamina A. Es pot observar com apareix un pic alt i estret.

Desenvolupament de diferents metòdiques d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

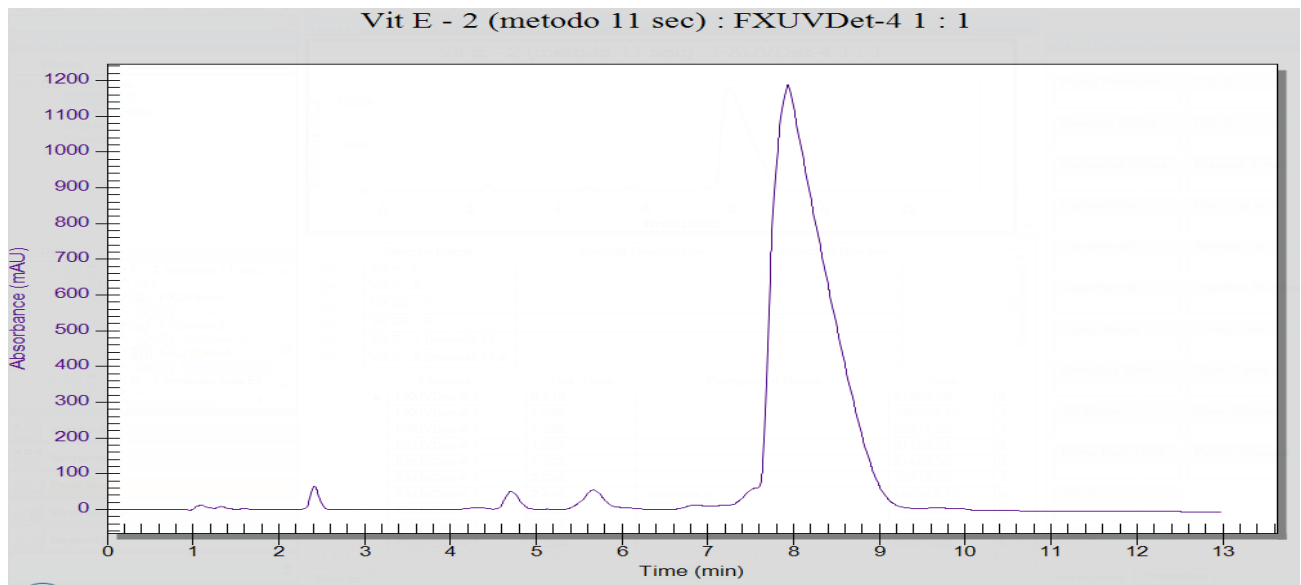


Figura 14: Representació de l'absorbància de la vitamina E en la matèria primera

En la Figura 14 es pot observar un pic alt i ample corresponent a la vitamina E.

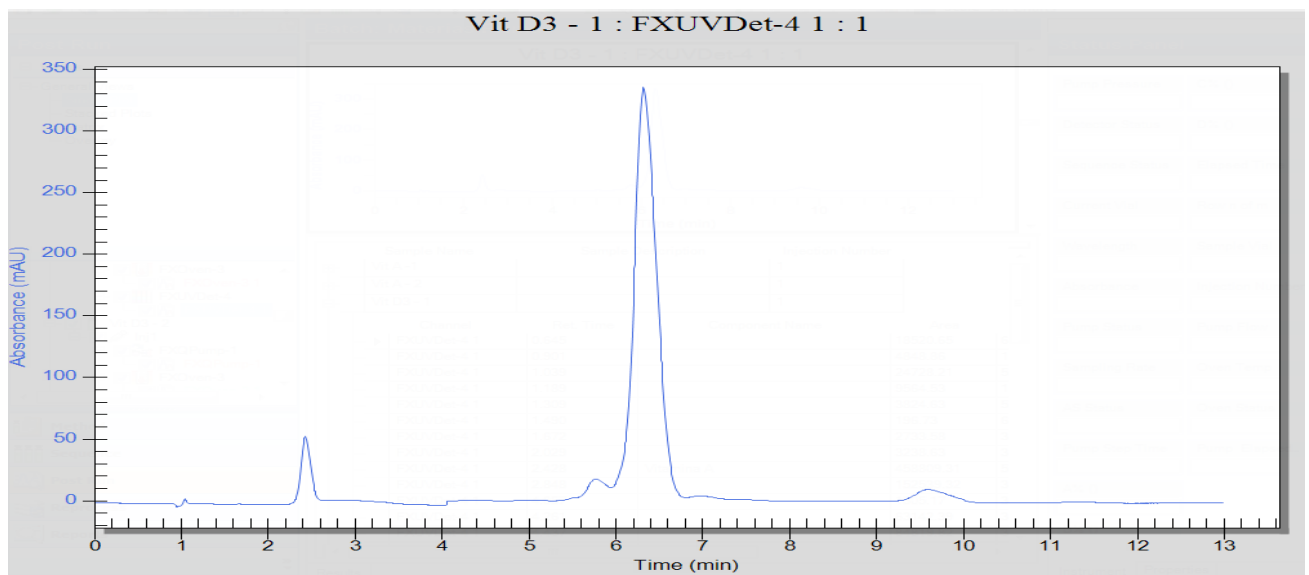


Figura 15: Representació de l'absorbància de la vitamina D en la matèria primera

A la Figura 15 hi ha la representació del cromatograma corresponent a la vitamina D. S'observa un pic alt i estret. És una mescla de la vitamina D₃ i D₂

3.4.5.1 Rectes de calibratge de cada vitamina

Les rectes de calibratge emprades en aquesta determinació ja es trobaven introduïdes en el mètode ja establert en l'equip. Es van obtenir a partir de patrons externs de cada vitamina.

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

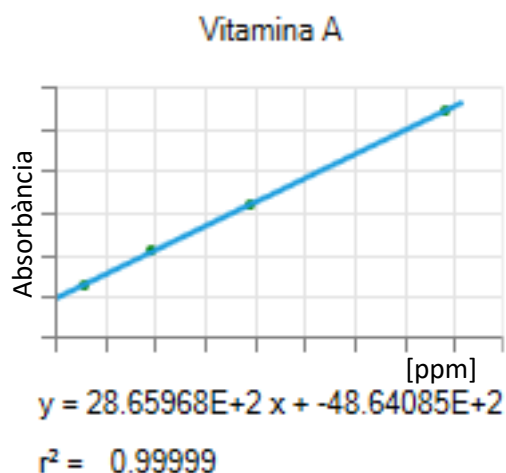


Figura 16: Representació de la recta per a la vitamina A

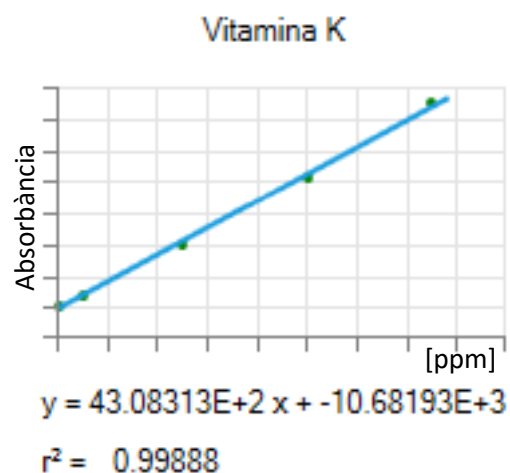


Figura 17: Representació de la recta de calibratge per a la vitamina K

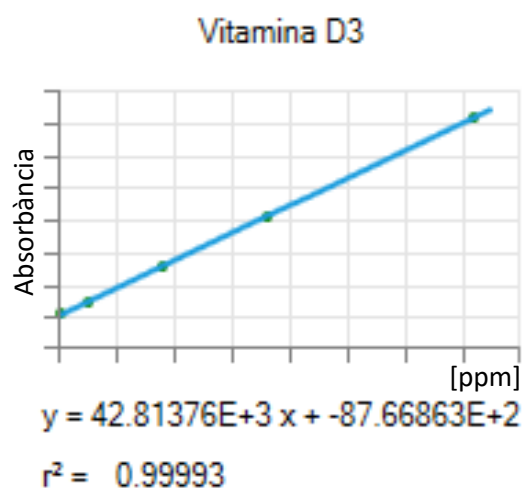


Figura 18: Representació de la recta calibratge per a la vitamina D3

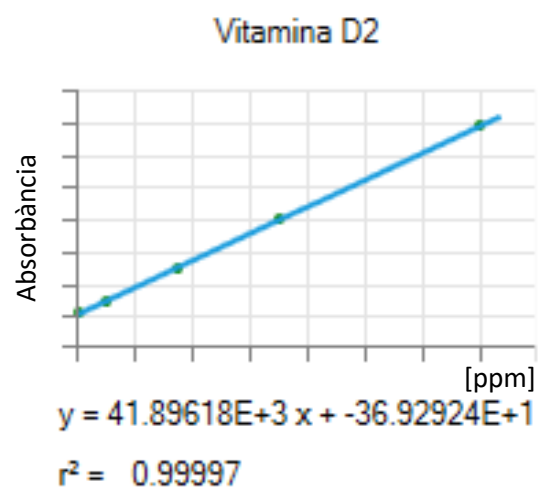


Figura 19: Representació de la recta de calibratge per a la vitamina D2

3.4.6 Resultats i discussió

Després de realitzar la determinació cromatogràfica per a les matèries primes i a partir de les rectes de calibratge per a cada vitamina i el seu temps de retenció, es va duu a terme la determinació de la concentració d'aquestes vitamines en mostres reals aportades per un client. Els resultats obtinguts van ser els següents:

Desenvolupament de diferents metòdiques d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

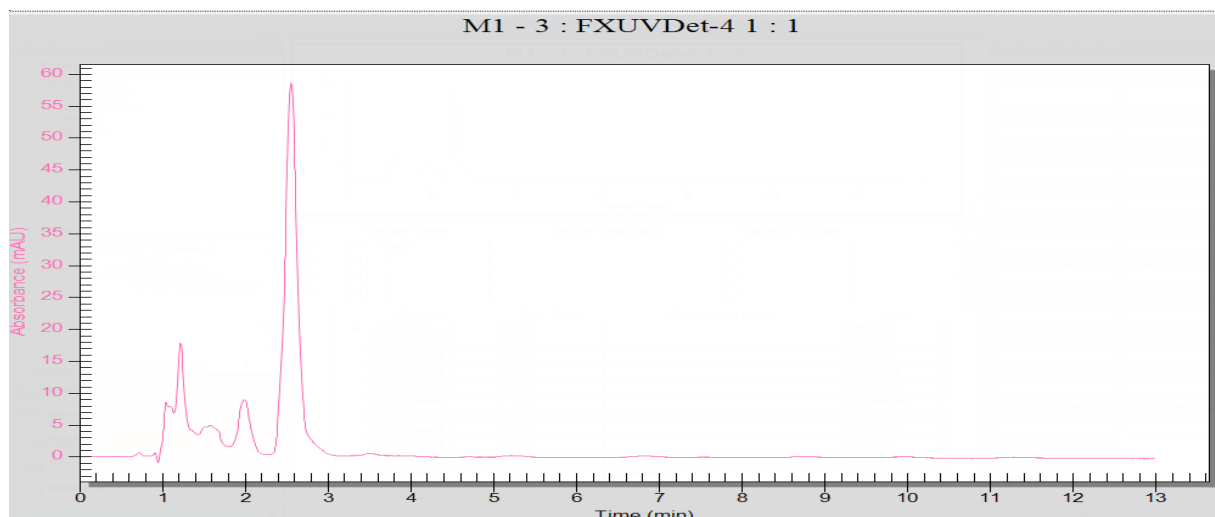


Figura 20: Representació de l'absorbència de la vitamina A en la mostra 2882

A la Figura 20 tenim representat el cromatograma corresponent a la mostra 2882. En aquest cromatograma obtenim un pic alt i estret corresponent a la vitamina A. En aquesta mostra no es va obtenir cap altre vitamina.

A partir del cromatograma podem realitzar els càlculs corresponents per tal de poder determinar la quantitat de vitamina que tenim en aquesta mostra. A la Taula 6 tenim els resultats obtinguts de cada vitamina a la mostra 2882.

Taula 6: Resultats obtinguts de la mostra real 2882

Paràmetres	Resultats	Mètode
Vitamina A (mg/kg)	39	HPLC-UV
Vitamina D ₃ (mg/kg)	<1	HPLC-UV
Vitamina E (mg/kg)	ND	HPLC-UV

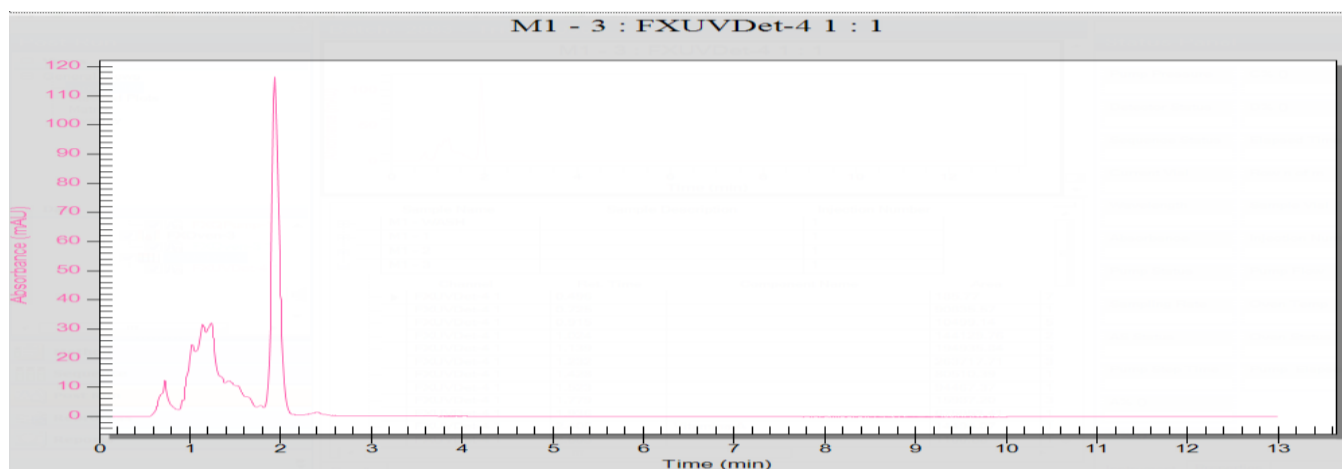


Figura 21: Representació de l'absorbència de la vitamina A en la mostra 2883

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

En la Figura 21 tenim el cromatograma de la mostra 2883, on s'observa un pic alt i estret corresponent a la vitamina A. En aquesta mostra tampoc va aparèixer la presència de cap vitamina.

A la Taula 7 tenim els resultats obtinguts de cada vitamina a la mostra 2883.

Taula 7: Resultats obtinguts de la mostra real 2883

Paràmetres	Resultats	Mètode
Vitamina A (mg/kg)	<1	HPLC-UV
Vitamina D ₃ (mg/kg)	<1	HPLC-UV
Vitamina E (mg/kg)	ND	HPLC-UV

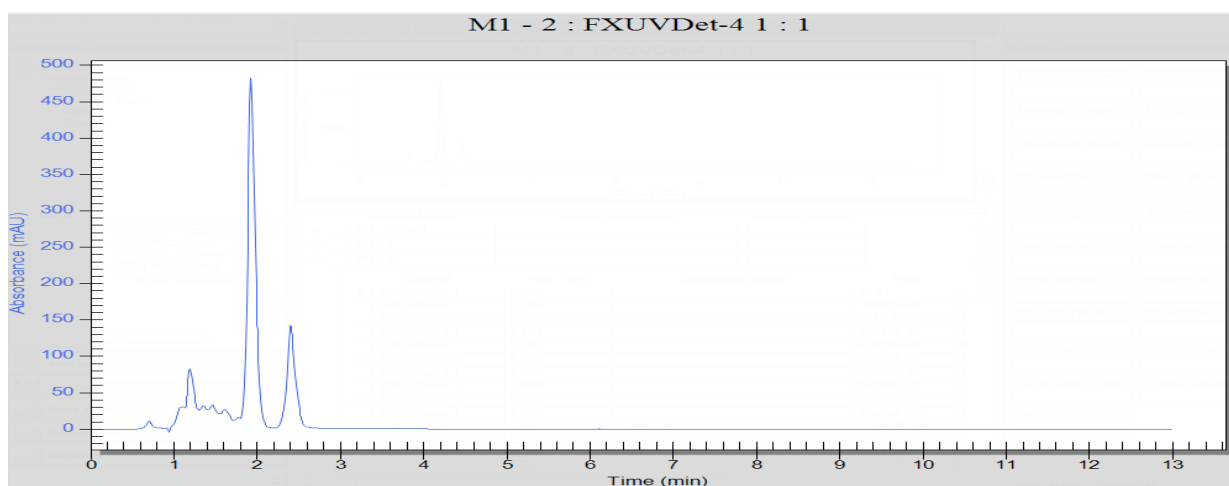


Figura 22: Representació de l'absorbància de la vitamina A en la mostra 2884

A la Figura 22 tenim representat el cromatograma corresponent a la mostra 2884. En aquest cromatograma obtenim un pic alt i estret corresponent a la vitamina A. No s'observa la presència de cap altre vitamina.

A partir del cromatograma podem realitzar els càlculs corresponents per tal de poder determinar la quantitat de vitamina que tenim en aquesta mostra. A la Taula 8 tenim els resultats obtinguts de cada vitamina a la mostra 2884.

Taula 8: Resultats obtinguts de la mostra real 2884

Paràmetres	Resultats	Mètode
Vitamina A (mg/kg)	68	HPLC-UV
Vitamina D ₃ (mg/kg)	<1	HPLC-UV
Vitamina E (mg/kg)	ND	HPLC-UV

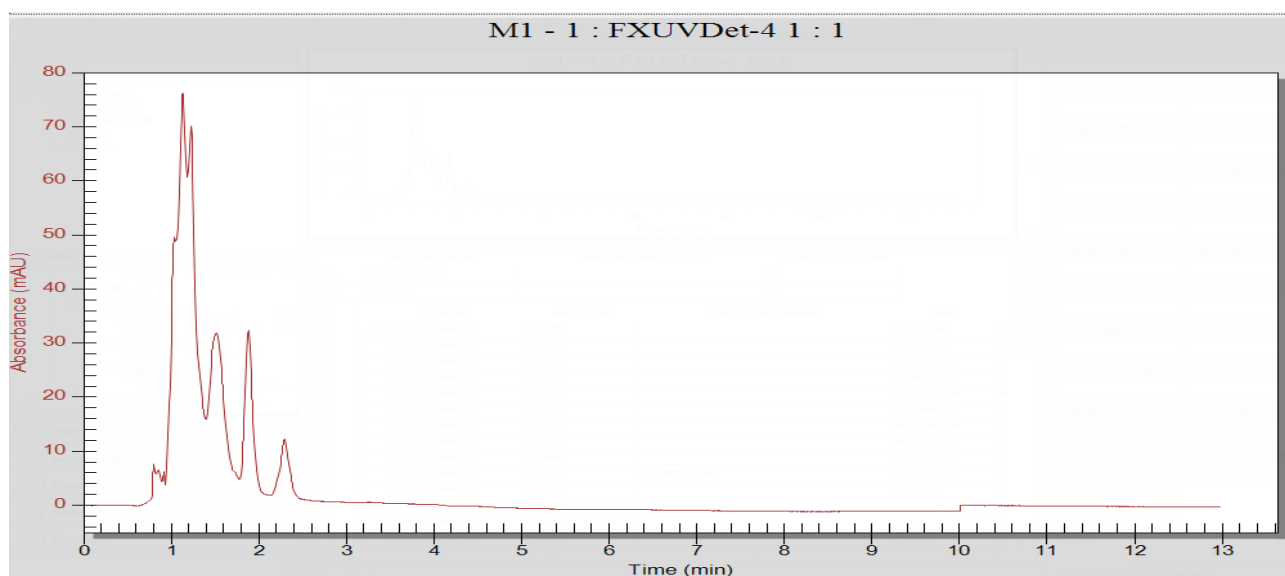


Figura 23: Representació de l'absorbància de la vitamina A en la mostra 2885

En la Figura 23 tenim el cromatograma de la mostra 2885, on s'observa un pic alt i estret corresponent a la vitamina A. En aquesta mostra tampoc va aparèixer la presència d'altres vitamines.

A la Taula 9 tenim els resultats obtinguts de cada vitamina a la mostra 2885.

Taula 9: Resultats obtinguts de la mostra real 2885

Paràmetres	Resultats	Mètode
Vitamina A (mg/kg)	8	HPLC-UV
Vitamina D ₃ (mg/kg)	<1	HPLC-UV
Vitamina E (mg/kg)	ND	HPLC-UV

3.4.7 Conclusions

Després de realitzar les corresponents determinacions de les 4 mostres reals de partida podem dir que aquestes mostres només presenten vitamina A a la seva composició. La vitamina D₃ apareix en una quantitat que podríem dir que és menyspreable. Tot i així, les mostres no presenten les quantitats indicades pel client de la vitamina A i D₃. La vitamina E no es troba present en cap de les mostres.

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

3.5 Determinació de vitamina D₃ en aliments

3.5.1 Objectiu:

Després de fer les determinacions de les vitamines anteriors, van arribar al laboratori mostres noves per analitzar i determinar el seu contingut en vitamina D₃. Per tal de revisar la mètode i donar millors resultats es realitza una optimització del mètode ja establert per a la determinació de vitamines.

A la Taula 10 tenim representades les mostres que s'han d'analitzar.

Taula 10: Mostres reals i la seva referència

Referència	Mostra
3731	Pastisset amb xocolata
3732	Magdalena clàssica
3733	Magdalena de xocolata
3734	Magdalena amb trossos de xocolata

La recta de calibratge i el temps de retenció és el mateix que en la determinació anterior. El procediment realitzat és la diferència entre aquesta determinació i l'anterior.

3.5.2 Preparació de reactius i solucions

La solució d'hidròxid de potassi al 50 % es prepara de la mateixa manera que en l'apartat anterior. [8]

3.5.2.1 Preparació solució d'hidròxid de potassi (KOH) saturada

Es pesen 50g d'hidròxid de potassi al granetari. Aquest 50g es dilueixen en 50 mL d'aigua destil·lada mesurats amb proveta en un vas de precipitats de vidre. Tindre en compte que és una reacció exotèrmica i que per tant s'escalfa.

3.5.2.2 Preparació del patró de 10 ppm de vitamina D₂

Es pesa a la balança analítica 1 mg de vitamina D₂, es dilueix en una mica d'acetonitril i la solució es fica a un matràs aforat opac de 100mL, s'enrasa el matràs amb acetonitril. En cas de que el matràs no sigui opac es folra de paper de plata. La solució és estable durant 6 mesos i s'ha de guardar a la nevera.

3.5.3 Optimització de l'extracció de la vitamina D₃ en aliments

En aquesta determinació es va realitzar una optimització en la etapa de l'extracció de les vitamines. Es va provar l'ús de diferents temperatures durant la reacció de saponificació en el reflux. També vaig realitzar l'extracció líquid-líquid amb diferents

Desenvolupament de diferents metodiques d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

volums d'hexà. Finalment, el procediment òptim per tal d'extreure la màxima quantitat de vitamina D₃ és el següent:

1. Pesar 10g mostra i posar-ho en un matràs fons pla de 250 ml a la balança analítica. Després es posa l'imant i 1000 µL de la solució patró de D₂ que actuarà com a patró intern.
2. Addicionar 1g àcid ascòrbic, 1g BHT, 40 ml metanol i 20 ml KOH 50%. També s'addiciona 1ml de patró intern de vitamina D₂. Posar-ho a reflux durant 30 min a 65°C agitar a 800-1000 rpm.
3. Després del reflux addicionar 50 ml d'aigua freda per tal de parar la reacció de saponificació, i deixar refredar fins a temperatura ambient.
4. Extracció líquid-líquid amb 100 ml de n-hexà. Agitar durant 35 minuts.
5. Addicionar 50 ml d'una solució saturada de KOH i agitar durant 10 minuts.
6. Deixar reposar la mostra fins que es separin les dues fases i recollir la fase orgànica (la que queda a la part de a dalt). Si s'observa emulsió s'afegeix 3 g de NaCl i es torna a agitar. Un cop es té la solució s'afegeix una espàtula d'àcid ascòrbic i BHT.
7. Rotaevaporar la solució obtinguda a 40°C per tal d'eliminar l'hexà present a la mostra.
8. Es reconstrueix la mostra amb 5 ml acetonitril, es filtra amb un filtre de nilò de 0.45 µm i es posa al vial per fer l'anàlisi al HPLC.

3.5.4 Determinació cromatogràfica

Les condicions de l'anàlisi cromatogràfic són les següents:

- Fase mòbil: treball isocràtic 2:49:49 A:B:C en un anàlisi de 13 minuts.
Eluent A: Aigua/Acetonitril 95:5
Eluent B: Acetonitril
Eluent C: Metanol
- Volum d'injecció: 20µl
- Detector: Espectrofotòmetre UV-Vis amb les longituds 325,265 i 277 nm
- Temperatura forn: 30°C
- Columna: C-18 5µm x 100 mm x 4.6 mm
- Temps de retenció:

Compost	Temps retenció (min)
Vitamina D ₂	5.717
Vitamina D ₃	6.260

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

3.5.5 Resultats i discussió

Amb les condicions cromatogràfiques indicades a l'apartat anterior es determina la quantitat de vitamina D₃ present a les quatre mostres aportades per un client. Els resultats obtinguts són els següents:

3731 : FXUVDet-4 1 : 1

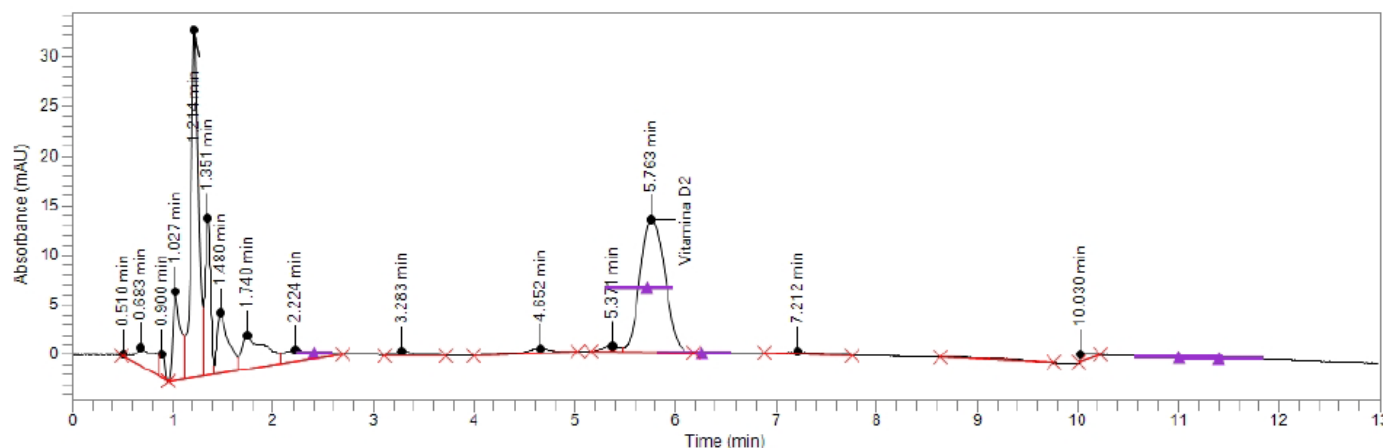


Figura 24: Representació de l'absorbància de la vitamina D₂ en la mostra 3731

A la Figura 24 tenim representat el cromatograma corresponent a la mostra 3731. S'observa com apareix un pic baix i ample corresponent a la vitamina D₂. No apareix en aquesta mostra la vitamina D₃. També apareix un pic petit corresponent a la vitamina A. No es van realitzar càlculs perquè no obtenim la vitamina esperada. A la Taula 11 tenim els resultats obtinguts.

Taula 11: Resultats obtinguts de la mostra real 3731

Pic	Temps de retenció (min)	Compost	Àrea	Alçada	Quantitat final (ppm)
1	0.510		257	128	
2	0.683		28.257	1.794	
3	0.900		9.117	2.437	
4	1.027		49.043	8.942	
5	1.214		176.075	34.872	
6	1.351		66.365	15.793	
7	1.480		49.325	6.106	
8	1.740		52.819	3.345	
9	2.405		25.063	1.205	
10	3.283		5.069	372	
11	4.652		10.511	480	
12	5.371		6.762	540	
13	5.763	Vit. D ₂	224.877	13.3713.3799	5.3763
14	7.212		4.750	184	
15	10.030		5.146	782	
Total			718.796		5.3763

Desenvolupament de diferents metòdiques d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

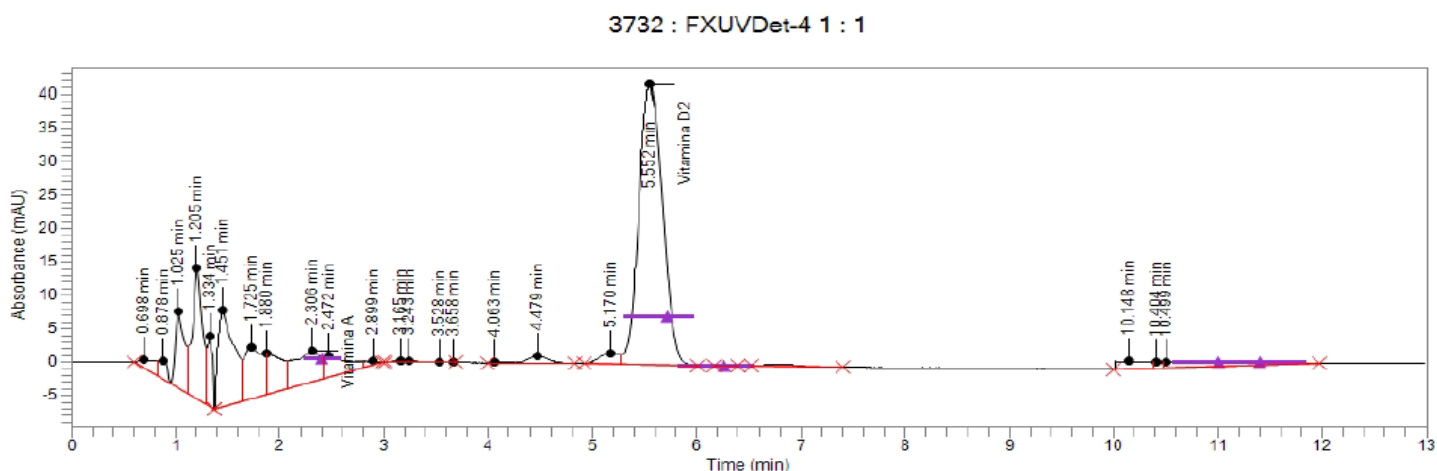


Figura 25: Representació de l'absorbència de la vitamina D₂ en la mostra 3732

En la Figura 25 es mostra el cromatograma de la mostra 3732. Apareix un pic alt i no molt ample corresponent a la vitamina D₂. No hi ha vitamina D₃. També apareix un pic petit corresponent a la vitamina A.

A la Taula 12 tenim els resultats obtinguts de cada vitamina.

Taula 12: Resultats obtinguts de la mostra real 3732

Pic	Temps de retenció (min)	Compost	Àrea	Alçada	Quantitat final (ppm)
1	0.698		16.804	1.251	
2	0.878		15.532	2.673	
3	1.025		68.423	11.495	
4	1.205		130.616	19.520	
5	1.334		37.295	10.496	
6	1.451		154.025	14.448	
7	1.725		95.014	7.741	
8	1.880		60.225	6.110	
9	2.306	Vit. A	85.300	4.613	31.4603
10	2.472		45.851	3.070	
11	2.899		5.332	483	
12	3.165		1.233	189	
13	3.658		22	46	
14	4.063		1.558	179	
15	4.479		13.867	1.023	
16	5.170		20.207	1.637	
17	5.552	Vit. D ₂	676.125	41.934	16.1469
18	6.269	Vit. D ₃	109	44	0.2073
19	10.148		23.936	1.143	
20	10.404		5.958	987	
21	10.499		42.363	938	
Total			1.508,147		47.8145

Desenvolupament de diferents metòdiques d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

3733 : FXUVDet-4 1 : 1

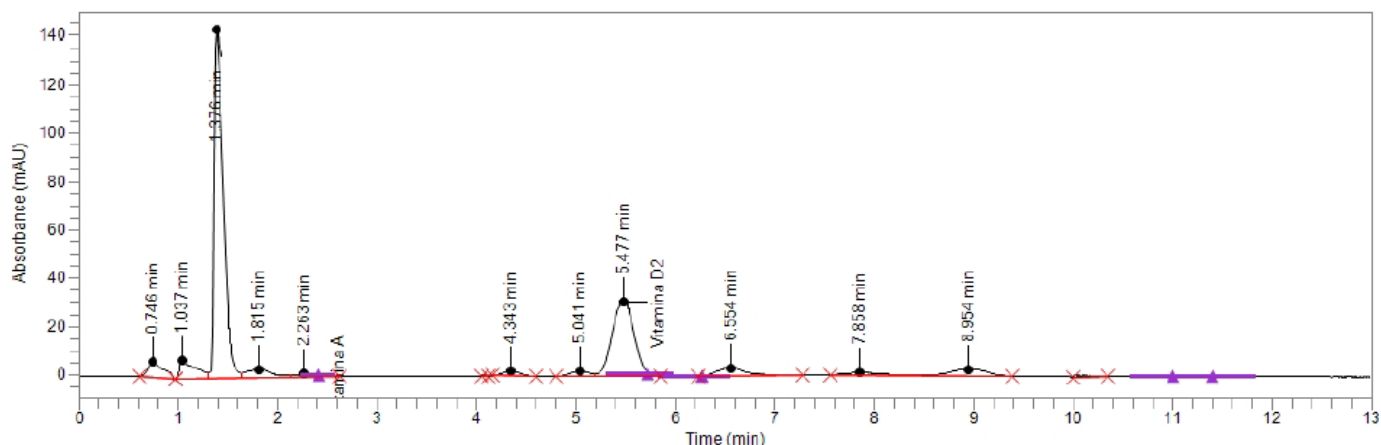


Figura 26: Representació de l'absorbència de la vitamina D₂ en la mostra 3733

A la Figura 26 hi ha el cromatograma de la mostra 3733, on podem observar com apareix un pic alt i no molt ample corresponent a la vitamina D₂. Tampoc apareix en aquesta mostra la vitamina D₃. També hi ha un pic petit corresponent a la vitamina A.

A la Taula 13 tenim els resultats obtinguts de cada vitamina.

Taula 13: Resultats obtinguts de la mostra real 3733

Pic	Temps de retenció (min)	Compost	Àrea	Alçada	Quantitat final (ppm)
1	0.746		67.203	6.505	
2	1.037		88.713	7.774	
3	1.376		936.779	144.046	
4	1.815		61.502	3.477	
5	2.263	Vit. A	15.728	973	7.1851
6	4.053		831	414	
7	4.343		24.523	2.086	
8	5.041		27.914	2.066	
9	5.477	Vit. D ₂	483.319	30.860	11.5449
10	6.554		65.40	3.124	
11	7.858		30.497	986	
12	8.954		69.409	2.741	
13	10.018		5.760	587	
Total			1.877,579		18.7300

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

3734 : FXUVDet-4 1 : 1

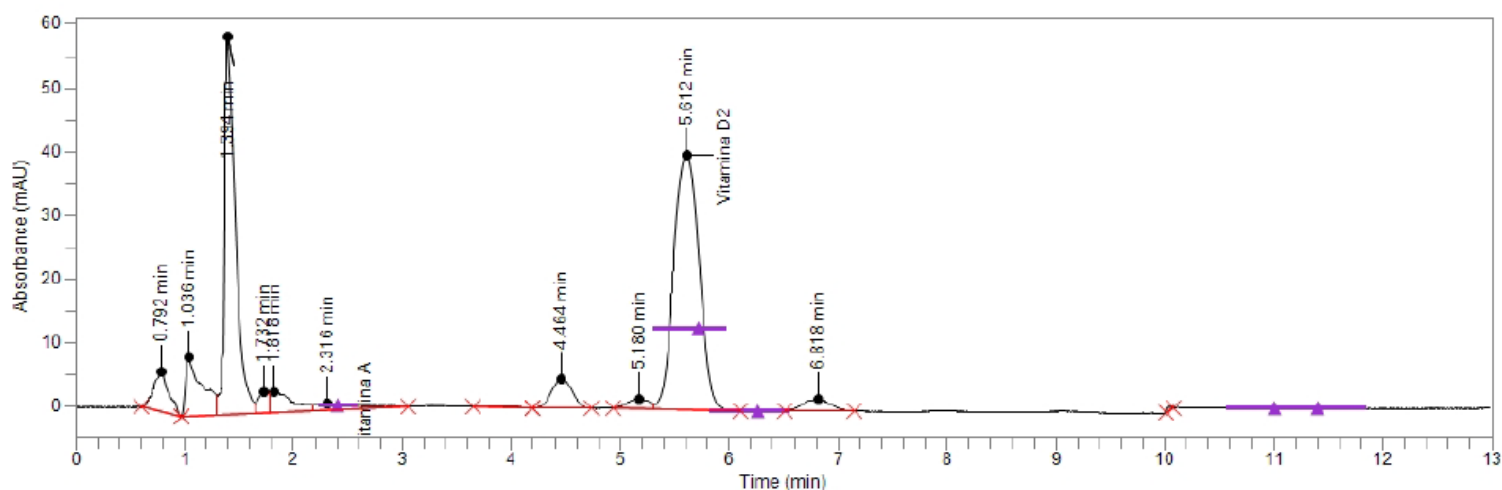


Figura 27: Representació de l'absorbància de la vitamina D₂ en la mostra 3734

A la Figura 27 es troba representat el cromatograma de la mostra 3734, on apareix un pic alt i no molt ample corresponent a la vitamina D₂. No hi ha vitamina D₃.

A la Taula 14 tenim els resultats obtinguts de cada vitamina.

Taula 14: Resultats obtinguts de la mostra real 3734

Pic	Temps de retenció (min)	Compost	Àrea	Alçada	Quantitat final (ppm)
1	0.792		61.695	6.395	
2	1.036		98.004	9.232	
3	1.394		428.529	59.472	
4	1.732		22.265	3.367	
5	1.818		45.552	3.146	
6	2.316	Vit. A	28.242	1.061	11.5515
7	3.863		1.424	79	
8	4.464		59.078	4.608	
9	5.180		20.393	1.517	
10	5.612	Vit.D ₂	648.530	40.173	15.4883
11	6.818		33.143	1.809	
12	10.023		1.719	680	
Total			1.448,573		27.0398

Per tal de poder quantificar la vitamina D₃ s'han de realitzar uns càlculs. Primer es calcularà el factor de resposta amb la concentració i l'àrea del pic del patró intern i l'àrea i els pics dels analits detectats. Cal indicar que sempre s'ha de revisar que el programa integri realment pics i no soroll:

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

$$RF = \frac{PA_a \times C_{is}}{PA_{is} \times C_a}$$

On RF és el factor resposta, PAa és l'àrea del pic de l'analit, Cis és la concentració del patró intern, PAis és el pic del patró intern i Ca és la concentració de l'analit.

Després es calcula la concentració en mg / kg

$$C = \frac{PA_a \times C_{is}}{PA_{is} \times RF_a} \times \frac{V}{W}$$

On C és la concentració final de l'analit en mg / kg, PAa és l'àrea del pic de l'analit, Cis és la concentració del patró intern, PAis és l'àrea del pic del patró intern, RFa és el factor resposta de l'analit, V és el volum de mostra diluït i W és el pes de la mostra en grams.

3.5.6 Conclusions

Després de realitzar l'anàlisi es pot confirmar que les mostres no contenen vitamina D₃ o que aquesta es troba en quantitats tan petites que no es pot analitzar amb el nostre equip i, per tant, és menyspreable la seva quantitat. Per tant, no hem de realitzar cap càlcul ja que no tenim presència de vitamina. El resultat final és inferior a < 1ppm.

3.6 Determinació d'hidroximetilfurfural (HMF) en mel.

3.6.1 Objectiu

L'objectiu d'aquesta determinació es determinar si en una mostra de mel aportada per un client extern presenta en la seva composició el compost HMF, per tal de determinar la qualitat de la mel.

3.6.2 L'hidroximetilfurfural en la mel

A la Figura 24 tenim representat l'hidroximetilfurfural més conegut com HMF. És un compost format per la degradació de productes amb sucre, en particular de la degradació de la fructosa. Presenta una estructura formada per un aldehid i un furà format durant la descomposició tèrmica dels glúcids[1].

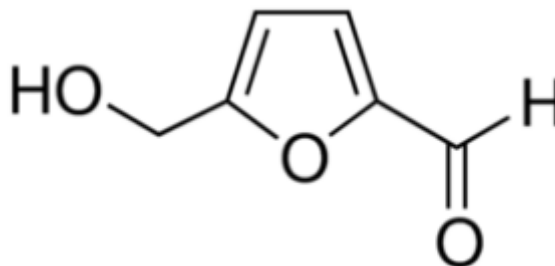


Figura 24: Compost HMF

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

Es troba identificat en una gran varietat d'aliments processats com la llet, els suc de fruita, mels i begudes alcohòliques... [2].

La seva aparició en mel està relacionada amb alteracions del color i el desenvolupament de sabors i olors estranys. Per aquest motiu la presència d'aquest aldehyd es considerat un dels paràmetres de qualitat a tindre en compte.

Aquest compost apareix de forma espontània i natural en la mel, com la representada en la Figura 25, degut a:

- pH àcid
- Aigua i composició rica en monosacàrids (fructosa i glucosa)
- Augmentant la seva concentració amb el temps



Figura 25:Mostra de mel

També hem de tenir en compte els factors que influeixen en la velocitat de formació del HMF. Entre aquests factors es troben:

- Augment de la temperatura (factor més influent) [4]
- Humitat
- Presència d'alguns minerals (K, Ca, Mg)
- Contingut d'aminoàcids (alanina, àcid aspàrtic...)

El contingut HMF en la mel és un indicatiu de les condicions en que la mel ha estat emmagatzemada, el tractament rebut i la edat que té.

Per aquest motiu, la legislació Europea utilitza aquest compost per controlar que el tractament de la mel ha estat l'adequat i que aquesta és fresca. El màxim contingut permès de HMF en la mel segons la normativa actual es de 40 mg de HMF/Kg de mel. Si trobem valors superiors ens indica que la mel es antiga i de baixa qualitat o que han estat sobreescalfades o adulterades [3]. A la Figura 26 es troba representat la reacció de degradació de la fructosa al compost d'hidroximetilfurfural.

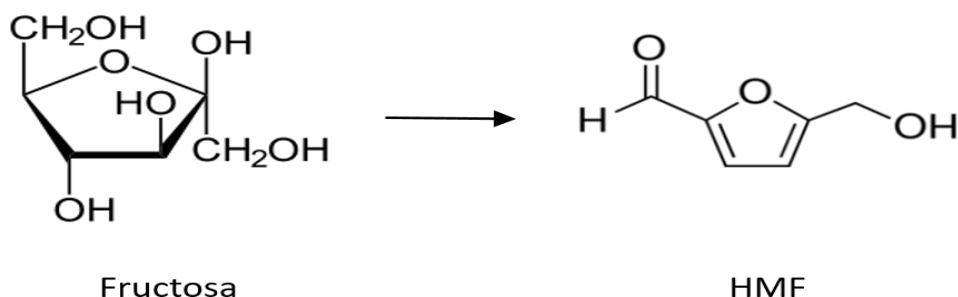


Figura 26: Representació reacció de la fructosa per donar el compost HMF

3.6.3 Preparació dels reactius i solucions

3.6.3.1 Preparació patró 1000 ppm HMF

Per preparar en un matràs de 5 ml un patró mare de 1000 ppm de HMF, es pesen en la balança analítica 0,0253 g de HMF i es dissolen en aigua ultrapura. S'acaba d'enrasar el matràs amb aigua ultrapura.

Aquesta solució s'utilitzarà per construir els patrons necessaris per realitzar la recta de calibratge.

$$25\text{ml} \times \frac{1000\text{ mg}}{1000\text{ ml}} \times \frac{100}{99} \times \frac{1\text{ g}}{1000\text{ mg}} = 0,0253\text{ g HMF}$$

3.6.3.2 Preparació dels patrons estàndard

A partir de la solució mare preparem patrons de 1,2,5,8 i 10 ppm en matrassos de 10 ml.

$$10\text{ ml} \times \frac{1\text{ mg}}{1000\text{ ml}} \times \frac{1000\text{ ml}}{1000\text{ mg}} = 0,10\text{ ml}$$

Els altres patrons es calculen amb la mateixa equació però canviant la concentració que tenim.

3.6.3.3 Preparació de la solució d'elució

Per preparar 100 ml de solució es fa una mescla de 10 ml d'acetonitril amb 90 ml d'aigua.

3.6.3.4 Preparació de la solució de la fase mòbil

Per preparar 1 L de solució es fa una mescla de 80 ml d'acetonitril amb 920 ml d'aigua (acetonitril/aigua 5:95)

3.6.4 Preparació de la mostra

- Es pesen 5g de mostra de mel en un tub Falcon de 50ml.
- Afegir 25 ml d' aigua ultrapura i 25 ml mostra.
- Agafar 1 ml d' alíquota i diluir-la en 9 ml d'aigua.
- Fer una extracció SPE

3.6.5 Extracció SPE

- A condicionar el cartutx amb 1 ml de metanol i 3 ml d'aigua ultrapura. (fent servir el buit durant tot el procés d'extracció)
- Fer passar 2 ml de mostra
- Eluir la mostra amb 4 ml de solució d'elució i traspasar a un vial per tal de realitzar la injecció a l'equip HPLC.

3.6.6 Determinació cromatogràfica

Les condicions de l'anàlisi cromatogràfic són les següents:

- Fase mòbil: treball isocràtic 100 % A en un anàlisi de 10 minuts.
Eluent A: Aigua/Acetonitril 95:5
- Volum d'injecció: 20µl
- Detector: Espectrofotòmetre UV-Vis amb les longituds 256 nm
- Temperatura forn: 30°C
- Columna: C-18 5µm x 100 mm x 4.6 mm

A la Figura 27 tenim representat el cromatograma corresponent a la identificació del compost d'hidroximetilfurfural. A partir d'aquest pic podem identificar el compost HMF quan tinguem una mostra real de mel. A la Taula 10 tenim els valors obtinguts en aquest cromatograma.

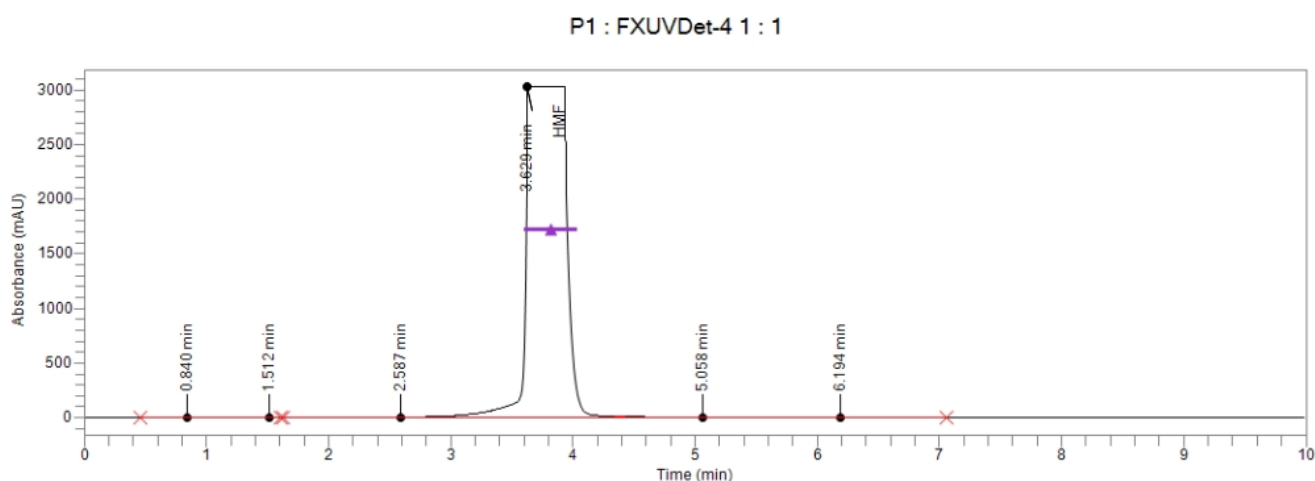


Figura 27 :Cromatograma identificació del compost HMF

Taula 10: Taula de valors obtinguts durant el cromatograma de la identificació del compost HMF

Pic	Temps retenció (min)	Nom component	Area	Alçada	Quantitat final (ppm)
1	0.840		104.400	3.871	
2	1.512		45.488	4.186	
3	2.587		205.011	8.061	
4	3.629	HMF	69.332,746	3.066,105	226.2601
5	5.058		368.532	7.684	
6	6.194		62.556	2.190	
Total			70.118,733		226.2601

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

En la Figura 28 tenim representada la recta de calibratge del compost HMF.

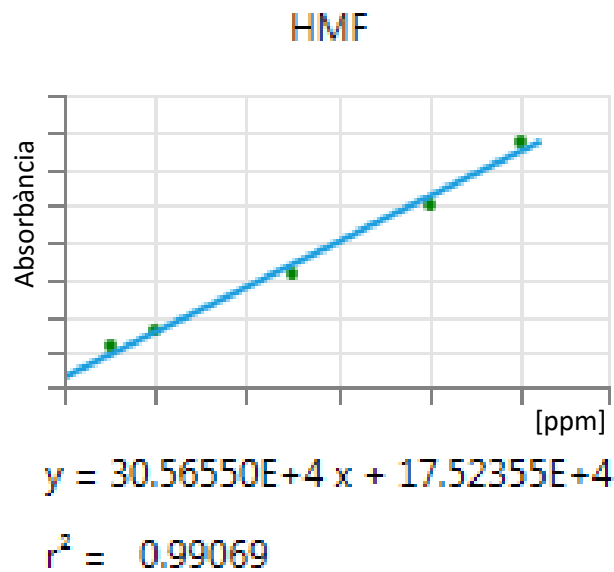


Figura 28: Recta de calibratge del compost HMF

3.6.7 Resultats i discussió

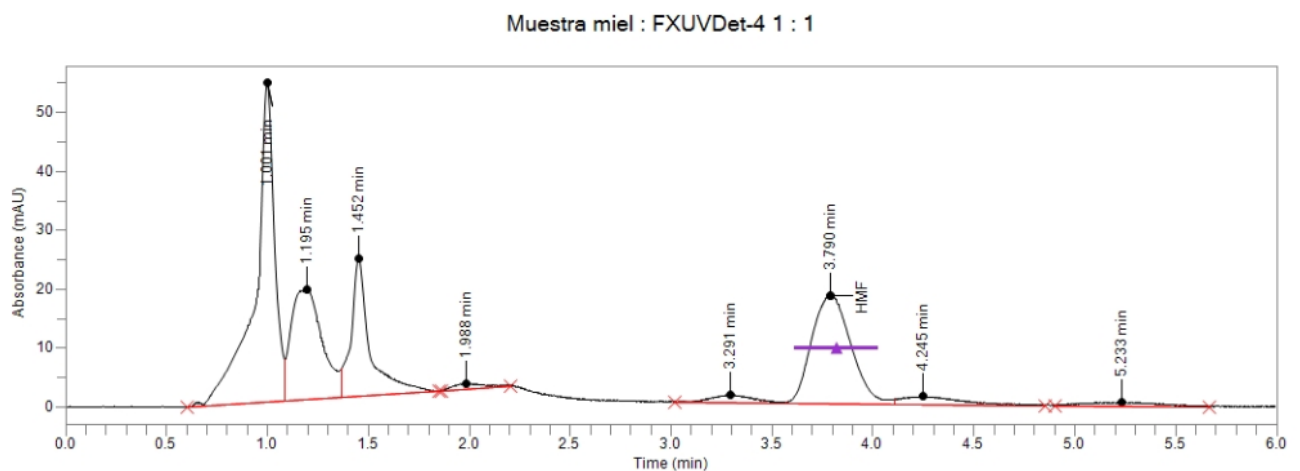


Figura 29: Cromatograma mostra de mel

A la Figura 29 tenim representat un cromatograma d'una mostra real de mel aportada per un client. Obtenim un pic baix i ample corresponent al compost HMF. A partir del cromatograma podem realitzar els càlculs corresponents per tal de poder determinar la quantitat de compost HMF que tenim en aquesta mostra.

A la Taula 11 aparèixen els valors obtinguts en aquest cromatograma.

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

Taula 11: Taula de valors obtinguts durant el cromatograma de la mostra de mel

Pic	Temps retenció (min)	Nom component	Area	Alçada	Quantitat final (ppm)
1	1.001		367.646	54.292	
2	1.195		202.072	18.774	
3	1.452		152.009	23.503	
4	1.988		10.187	963	
5	3.291		18.976	1.243	
6	3.790	HMF	249.110	18.345	0.2417
7	4.245		26.674	1.298	
8	5.233		16.004	607	
Total			1.042,676		0.2417

$$0,2417\text{ppm} \times \frac{4}{2} \times \frac{25}{1} = 12 \text{ ppm HMF}$$

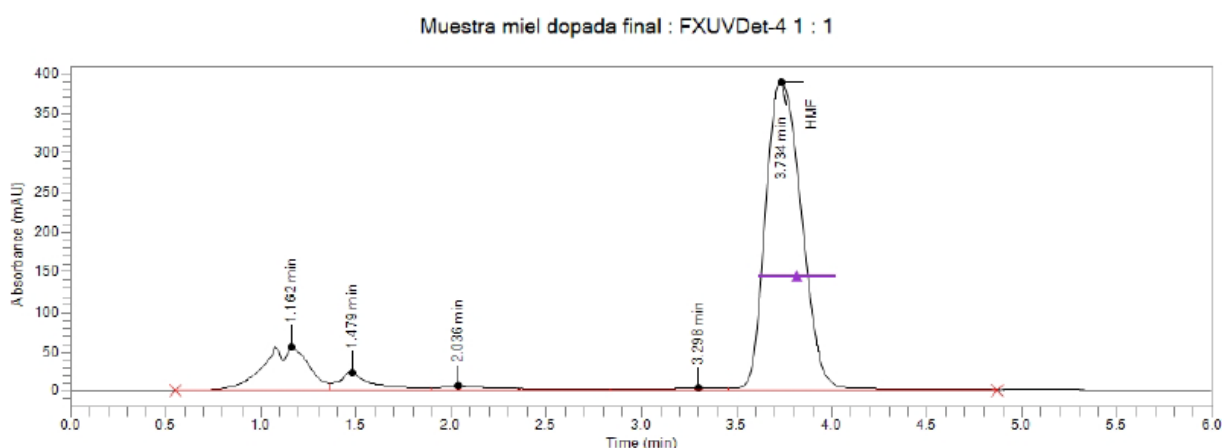


Figura 30: Cromatograma mostra de mel dopada amb 1000 ppm HMF

Taula 12: Taula de valors obtinguts durant el cromatograma de la mostra de mel dopada amb 1000 ppm HMF

Pic	Temps retenció (min)	Nom component	Area	Alçada	Quantitat final (ppm)
1	1.162		972.561	56.135	
2	1.479		295.708	23.877	
3	2.036		146.104	5.416	
4	3.298		69.024	2.924	
5	3.734	HMF	5185.615	389.523	16.3923
Total			6669.012		16.3923

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

A la Figura 30 tenim el cromatograma d'una mostra real de mel dopada amb 1000 ppm del compost d'hidroximetilfurfural. Obtenim un pic baix i ample corresponent al compost HMF .

Es realitzen els càlculs corresponents per tal de poder determinar la concentració d'aquest compost en la mostra. A la Taula 12 tenim el resultat obtingut d'aquest compost i amb aquest valor podem realitzar els càlculs.

$$16,39 \text{ ppm} \times \frac{4}{2} \times \frac{25}{1} = 819.61 \text{ HMF}$$

A partir d'aquests resultats podem calcular la recuperació d'aquest compost en la mostra de mel dopada amb 1000 ppm.

$$\frac{819.61 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} \times 100 = 82 \%$$

Com a resultat final obtenim una recuperació del 82%, la qual podríem dir que es tracta d'una recuperació bastant bona tenint en compte la matriu complexa en la que es troba el compost. El valor obtingut de concentració final en aquesta mostra ha estat:

$$12 \text{ ppm} \times \frac{81.9}{100} = 14,63 \text{ ppm HMF}$$

3.6.8 Conclusions

L'objectiu d'aquesta determinació era saber si teníem el compost hidroximetilfurfural (HMF) en la nostra mostra de mel. Finalment, he pogut determinar que en la mostra de mel sí que hi ha present aquest compost.

En la nostra mostra tenim 14 ppm del compost HMF. Per tant, aquest valor es troba dintre del rang permès en la legislació que és de 40 ppm, per aquest motiu podem afirmar que tenim una mel nova o mitjanament nova.

3.7 Determinació de lactosa en mostres reals

3.7.1 Objectiu

L'objectiu d'aquesta determinació és optimitzar un mètode ja establert de determinació de la lactosa en diferents mostres reals.

3.7.2 La lactosa

A la Figura 31 apareix representada una mostra de llet, la qual conté el compost de la lactosa. La lactosa és un tipus de carbohidrat classificat com un disacàrid perquè està format a partir de dos sucres simples. Està formada per una molècula de glucosa i una de galactosa.



Figura 31: Mostra de llet

Es troba present en totes les llets dels mamífers: ovella, vaca, cabra i humana. Es anomena el sucre de la llet. La lactosa conté l'enzim lactasa que s'encarrega de trencar la lactosa en els seus sucres principals.

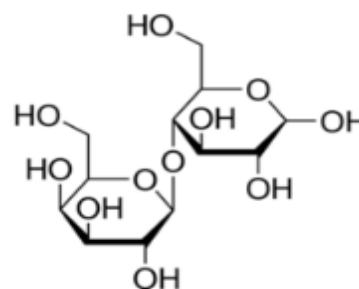


Figura 32: Estructura lactosa

A la Taula 13 tenim els valors límits en ppm els quals pertanyen a la recta de calibratge ja establerta en el mètode.

Taula 13: Taula valors dels límits en ppm que es poden mesurar de la lactosa

Compost	Límit inferior (ppm)	Límit superior (ppm)
Lactosa	0.5	50

3.7.3 Determinació de la lactosa

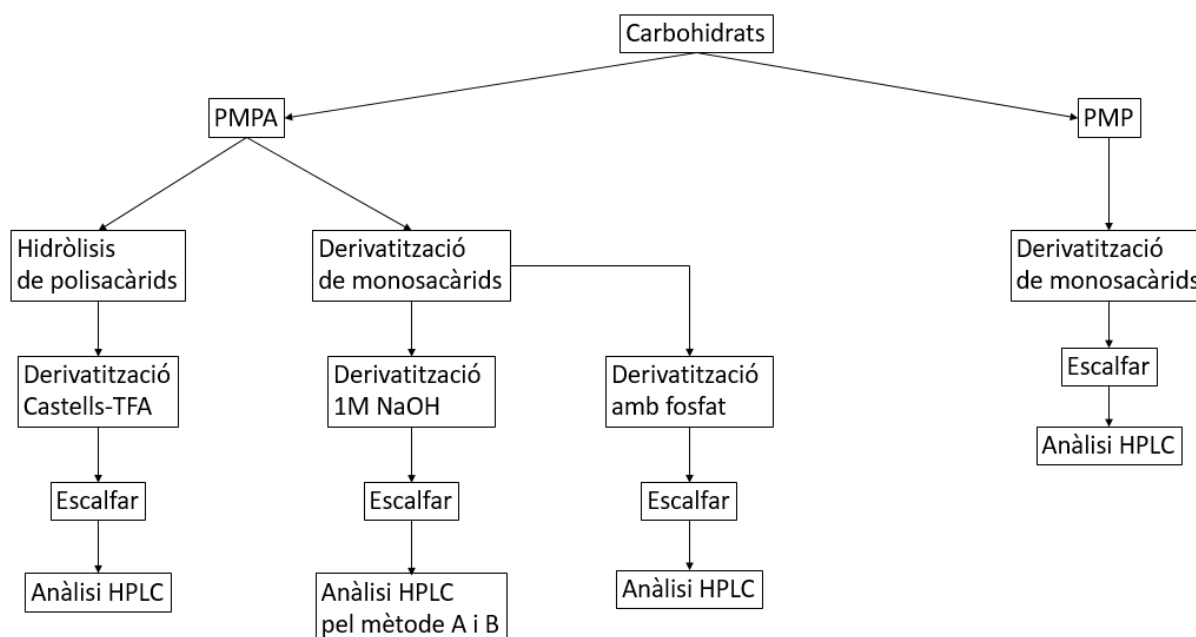


Figura 33: Esquema general de les diferents vies per a la determinació de la lactosa en una mostra real.

A la Figura 33 es mostra un esquema general on s'indica les dues possibles formes per a determinar la lactosa en una mostra. Hi han 2 reactius diferents per tal de realitzar aquesta determinació, tot i que el reactiu PMPA presenta 3 tipus de vies molt complexes i diferents entre si. Algunes presenten etapes molt semblants durant el procés però les condicions emprades no son les mateixes.

3.7.4 Preparació de reactius

3.7.4.1 Preparació solució NaOH 0,25 M

Per a preparar 25 ml de la solució es pesen en el granatari 0,25 g de NaOH que es dissolen en una solució Aigua/Metanol 50:50. Finalment, s'enrasa el matràs de 25 ml amb Aigua/Metanol 50:50.

$$25 \text{ ml} \times \frac{0,25 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0,25 \text{ g NaOH}$$

3.7.4.2 Preparació solució de PMP (3-metil-1-pentil-2-pirazolina-5-ona)

Per a preparar 10 ml de la solució es pesen a la balança analítica 0.2613 g de PMP i es dissolen amb la quantitat de NaOH 0,25 M necessària perquè el pH de la solució es mantingui entre 7.5 i 8.0. S'acaba d'enrasar fins a 10 ml amb una solució Aigua/Metanol 50:50.

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

$$10 \text{ ml} \times \frac{0,15 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{174,20 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{100}{99} = 0,2613 \text{ g PMP}$$

3.7.4.3 Preparació patró 1000 ppm lactosa

Per a preparar un patró mare de 1000 ppm de lactosa en un matràs de 10 ml, es pesen en la balança analítica 0,01 g de lactosa anhidra i es dissolen en aigua ultrapura. S'acaba d'enrasar el matràs amb aigua ultrapura. Aquesta solució s'utilitzarà per construir els patrons necessaris per realitzar la recta de calibratge.

$$10 \text{ ml} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0,01 \text{ g lactosa}$$

3.7.4.4 Preparació dels patrons estàndards

Per tal de realitzar la recta patró per poder quantificar la lactosa present a la mostra es preparen sis matrassos de 10 ml als quals s'afegeix una quantitat determinada del patró de 1000 ppm de lactosa, la qual ha estat prèviament derivatitzada, i s'enrasa amb aigua ultrapura.

La recta conté set punts: 0,5, 1, 10, 20, 30, 40 i 50 ppm de lactosa.

$$10 \text{ ml} \times \frac{0,5 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1000 \text{ mg}} = 0,05 \text{ ml patró 1000 ppm}$$

Els altres patrons es calculen amb la mateixa equació però canviant la concentració que tenim.

3.7.4.5 Preparació solució HCL 2N

$$100 \text{ ml} \times \frac{2 \text{ mols}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{36,5 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ ml}}{1,186 \text{ g}} \times \frac{100}{37} = 16,63 \text{ ml HCL 37\%}$$

3.7.5 Preparació de la mostra

En un tub Falcon s'introdueixen 25 ml de la mostra i 25 ml d'una solució aigua/acetoneitril 50:50. Es porta el tub al vòrtex durant 5 min i finalment s'introdueix a la centrífuga durant 5 min. (La mostra es guarda a la nevera mentre no s'utilitzi).

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

3.7.6 Reacció de derivatització de la lactosa

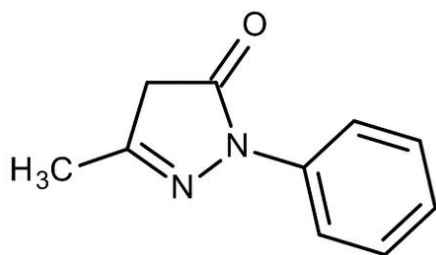


Figura 34: Compost PMP

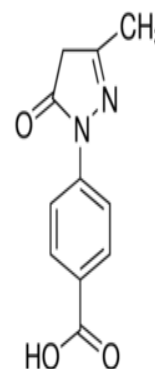


Figura 35: Compost PMPA

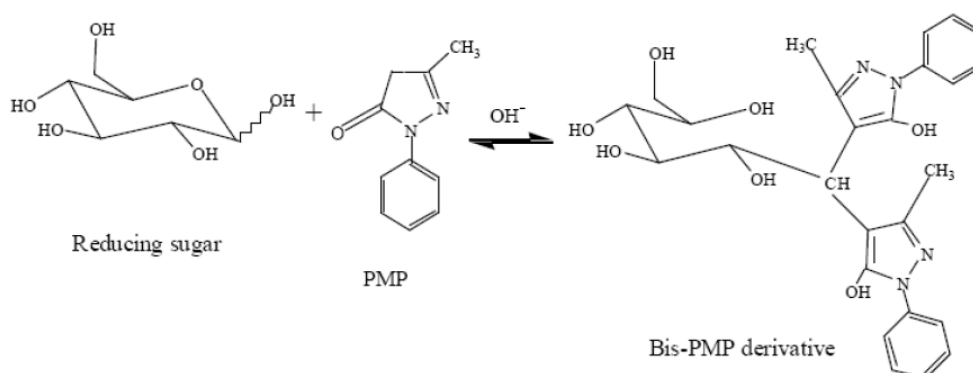


Figura 36: Representació general de la reacció de derivatització d'un carbohidrat amb el compost PMP. És anàloga amb el reactiu PMPA

En les figures 34-35 tenim representades les estructures dels compostos PMP i PMPA. A la Figura 36 tenim una representació general on tenim la reacció de derivatització de la lactosa amb PMP o PMPA. En tots dos casos el que fem es obtenir un compost molt més gran i per tant donarà més senyal d'absorbància UV durant l'anàlisi.

3.7.7 Mètodes de determinar la lactosa

- Mètode Castells- TFA amb PMP

3.7.7.1 Derivatització de la lactosa amb PMP

Primerament es prepara la solució de PMP a la qual s'afegeix 0.5 ml de la mostra. Aquesta solució, es posa a la placa calefactor a 70°C durant 1.5 hores. Es deixa refredar a temperatura ambient i s'afegeixen 1.5 ml d'àcid clorhídric 2M (s'observa un precipitat). Es porta la mostra a la centrífuga durant 5 minuts. Finalment, es filtra el sobrenedant amb un filtre de 0.22 µm i s'introdueixen en un vial que s'analitza amb l'equip HPLC-UV.

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

3.7.7.2 Determinació cromatogràfica

Les condicions de l'anàlisi cromatogràfic són les següents:

- Fase mòbil: treball isocràtic 10:90 en un anàlisi de 40 minuts.

Eluent A: Acetonitril

Eluent B: Metanol

- Volum d injecció: 10µl
- Detector: Espectrometria UV-Vis 256 nm
- Columna: C-18 5µm x 100 mm x 4.6 mm
- Temps de retenció:

Taula 14: Taula valors dels temps de retenció de la lactosa i del compost PMP

Compost	Temps retenció (min)
Lactosa	0.900
PMP	1.300

En la Taula 14 apareixen per a cada compost el temps de retenció en el que són retinguts a la columna i apareixen al cromatograma.

3.7.7.3 Resultats i discussió

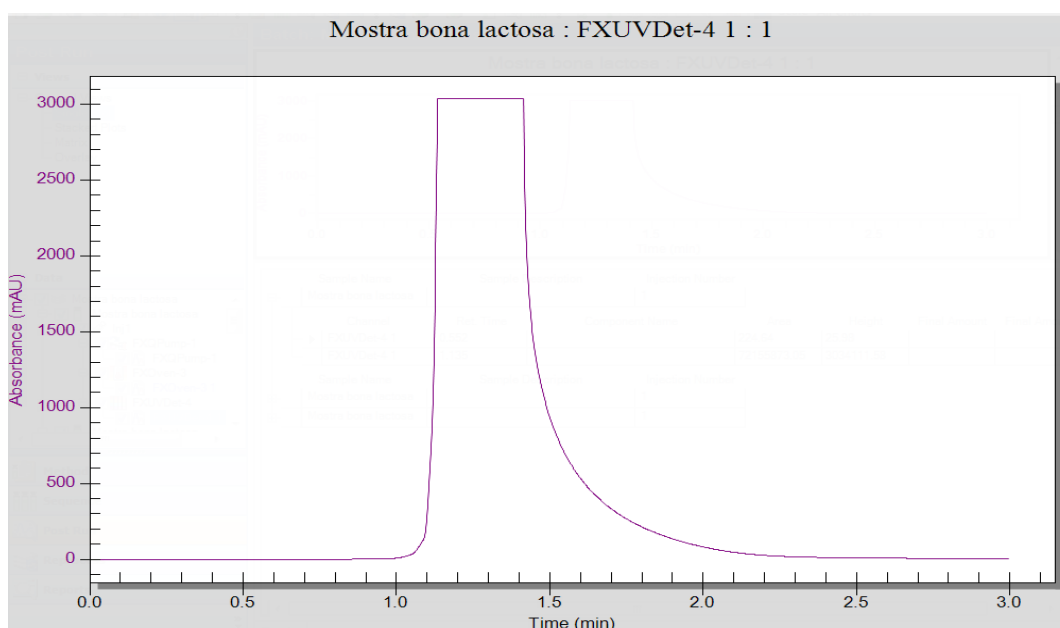


Figura 36: Cromatograma de la identificació del compost PMP

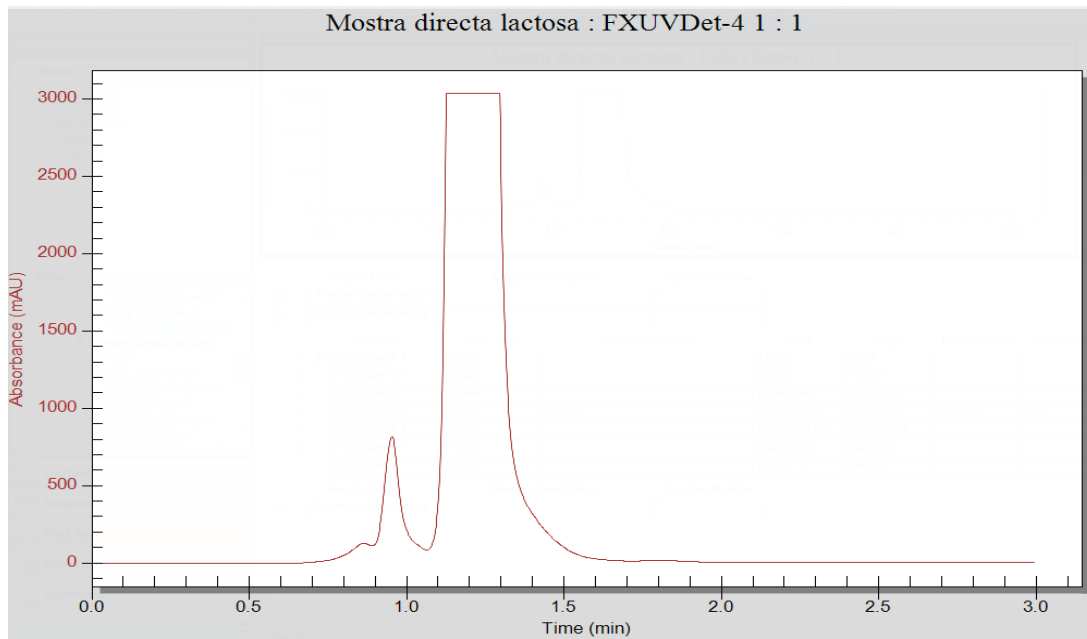


Figura 37: Cromatograma de la mostra real de lactosa juntament amb el PMP

En aquests cromatogrames de les Figures 36 i 37 tenim un pic alt i molt ample característic del compost PMP al primer cromatograma, i en el segon tenim aquest pic juntament amb un pic baix i estret corresponent a la lactosa en una mostra real.

3.7.7.4 Conclusions

Després de fer aquesta determinació obtenim un cromatograma on apareix el pic corresponent a la lactosa i un altre pic del PMP. Anteriorment amb aquest mètode s'obtenien uns bons resultats on el pic del PMP era alt i estret. En canvi, en el nostre cromatograma es un pic molt ample. Per tant, s'utilitzarà PMPA per tal de millorar la determinació de la lactosa en les mostres.

- **Mètode Castells- TFA amb PMPA**

3.7.7.5 Derivatització de la lactosa amb PMPA

Primerament es prepara la solució de PMPA a la qual s'afegeix 0.5 ml de la mostra. Aquesta solució, es posa a la placa calefactors a 70°C durant 1.5 hores. Es deixa refredar a temperatura ambient i s'afegeixen 1.5 ml d'àcid clorhídric 2M (s'observa un precipitat). Es porta la mostra a la centrífuga durant 5 minuts. Finalment, es filtra el sobrenedant amb un filtre de 0.22 µm i s'introdueixen en un vial que s'analitza amb l'equip HPLC-UV. [9]

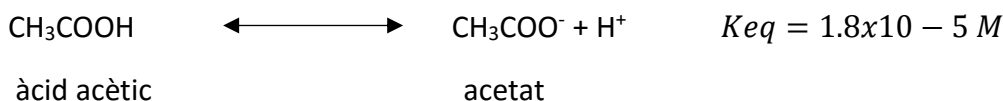
3.7.7.6 Determinació cromatogràfica

Les condicions de l'anàlisi mitjançant l' HPLC són les següents:

- Isocràtic
- Flux : 0.5 ml/min
- Volum injecció: 20 µl
- Temperatura columna: 30°C
- UV : $\lambda = 245$
- Temps anàlisi: 20 min
- Fases mòbils:
 - Fase A: Tampó de acetat d'amoni 0.1M
 - Fase B: Metanol/Acetonitril/Aigua (80:10:10)

(50:50 Fase A: Fase B)

La solució d'acetat d'amoni es tracta d'un tampó, i per preparar-ho s'ha de tenir en compte:



$$K_{eq} = \frac{[\text{H}^+][\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

$$[\text{H}^+] = K_{eq} \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

$$[\text{H}^+] = K_{eq} \frac{(0.1 \text{ M})}{(0.1 \text{ M})}$$

$$[\text{H}^+] = K_{eq}$$

$$[\text{H}^+] = 1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$\text{pH} = -\log 1.8 \times 10^{-5} = 4.74$$

3.7.7.7 Càlculs de les fases mòbils i els reactius

- **Fase mòbil A: Tampó d'acetat amoni 0.1M**
 - **Acetat de amoni 0.1M**

Per a preparar 200 ml de la solució es pesen a la balança analítica 1.573 g d'acetat d'amoni i es dissolen amb aigua ultrapura. S'acaba d'enrasar el matràs amb aigua ultrapura. Per a preparar el tampó de pH 4.74 es fa amb una solució d'àcid acètic.

Desenvolupament de diferents metodiques d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

$$200 \text{ ml} \times \frac{0.1 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{77.08 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{100}{98} = 1.573 \text{ g acetat amoni}$$

- **Àcid acètic**

Per a preparar 200 ml de la solució s'agafen 1.43 ml de la solució d'àcid acètic comercial al 80%, i es dissolen en aigua ultrapura. S'acaba d'enrasar el matràs amb aigua ultrapura.

$$200 \text{ ml} \times \frac{0.1 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{60.05 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ ml}}{1.05 \text{ g}} \times \frac{100 \text{ g}}{80 \text{ g}} = 1.43 \text{ ml àcid acètic}$$

Finalment, es mesclen les dues solucions per tal de tindre la solució tamponada d'acetat d'amoni 0.1M.

- **Fase mòbil B: Metanol/Acetonitril/Aigua (80:10:10)**

Per preparar 500 ml de la fase mòbil B es realitzen els següents càlculs:

$$500 \text{ ml} \times \frac{80 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 400 \text{ ml metanol}$$

$$500 \text{ ml} \times \frac{10 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 50 \text{ ml acetonitril}$$

$$500 \text{ ml} \times \frac{10 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 50 \text{ ml aigua}$$

- **Preparació de la solució PMPA 0.15 M**

Per a preparar 10 ml de la solució es pesen a la balança analítica 0.33 g del reactiu PMPA i es dissolen amb NaOH fins a pH 7.8-8.2. S'acaba d'enrasar el matràs amb aigua ultrapura.

$$10 \text{ ml} \times \frac{0.15 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{218.21 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{100 \text{ g}}{98 \text{ g}} = 0.33 \text{ g PMPA}$$

3.7.7.8 Resultats i discussió

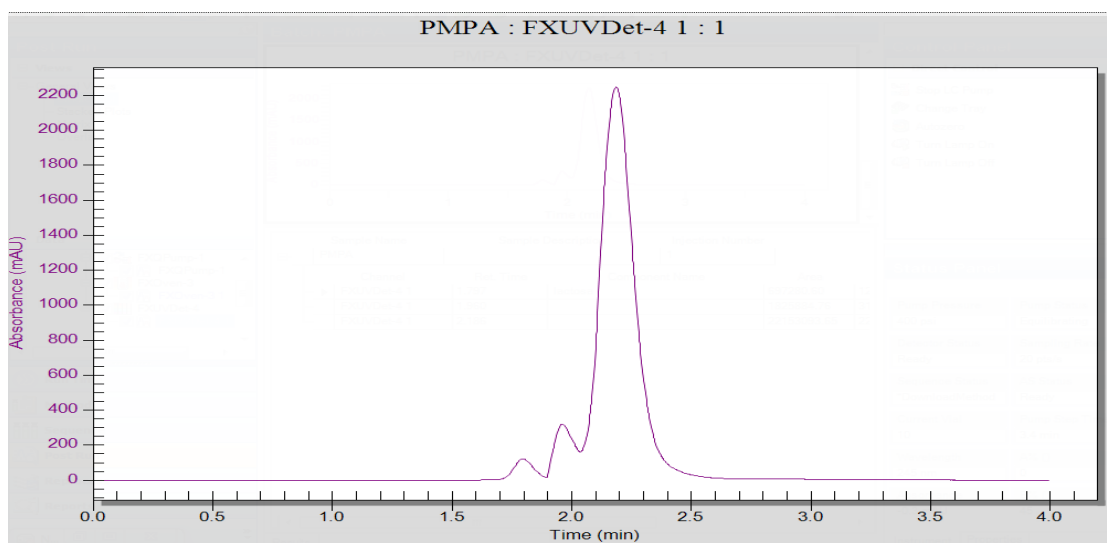


Figura 38: Cromatograma de la identificació del compost PMPA

En la Figura 38 tenim la representació d'un cromatograma on es troba representat el compost PMPA per tal de poder identificar-lo quan es realitzi l'anàlisi amb la mostra real. S'obté un pic alt i estret, això es degut a que el compost PMPA absorbeix en gran quantitat.

Després d'aquest cromatograma es realitza l'anàlisi dels patrons de lactosa amb 10,100 i 1000 ppm per tal d'identificar el pic corresponent a la lactosa, observant la variació en l'alçada dels pics per tal de assignar-lo.

En els següents cromatogrames de les Figures 39,40 i 41 tenim les representacions de les absorbàncies dels dos pics. El pic més alt i estret correspon tal i com hem determinat abans al compost PMPA. El pic petit que apareix als 2.3 minuts podria pertànyer al compost de la lactosa.

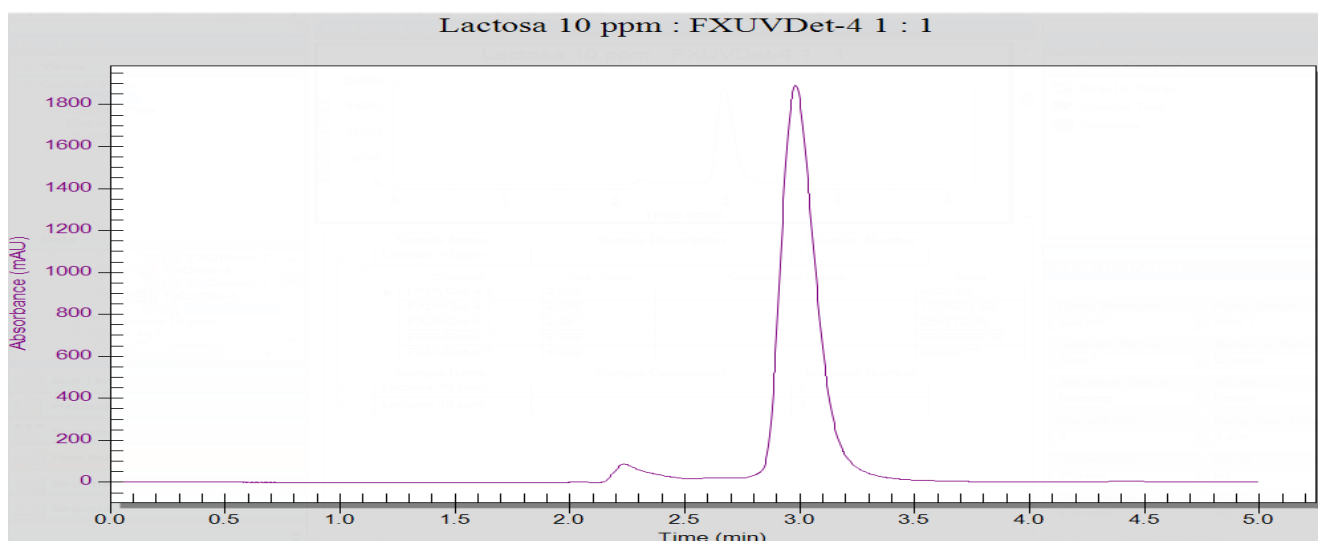


Figura 39: Cromatograma del patró de lactosa de 10 ppm derivatitzat amb el compost PMPA

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

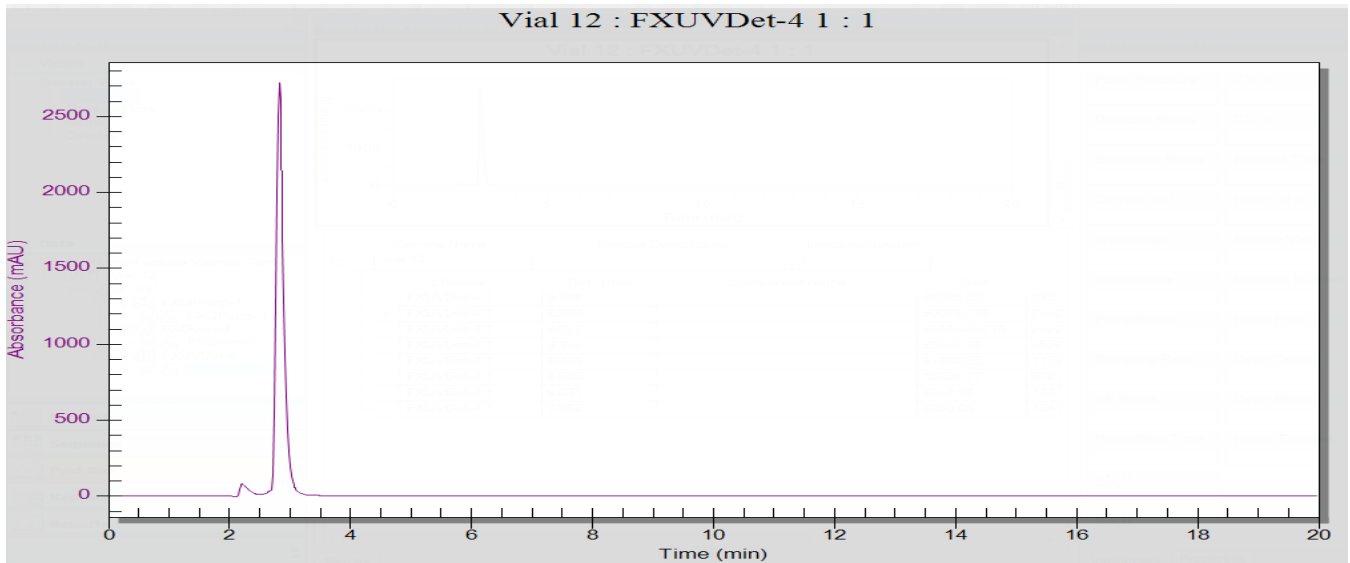


Figura 40: Cromatograma del patró de lactosa de 100 ppm derivatitzat amb el compost PMPA

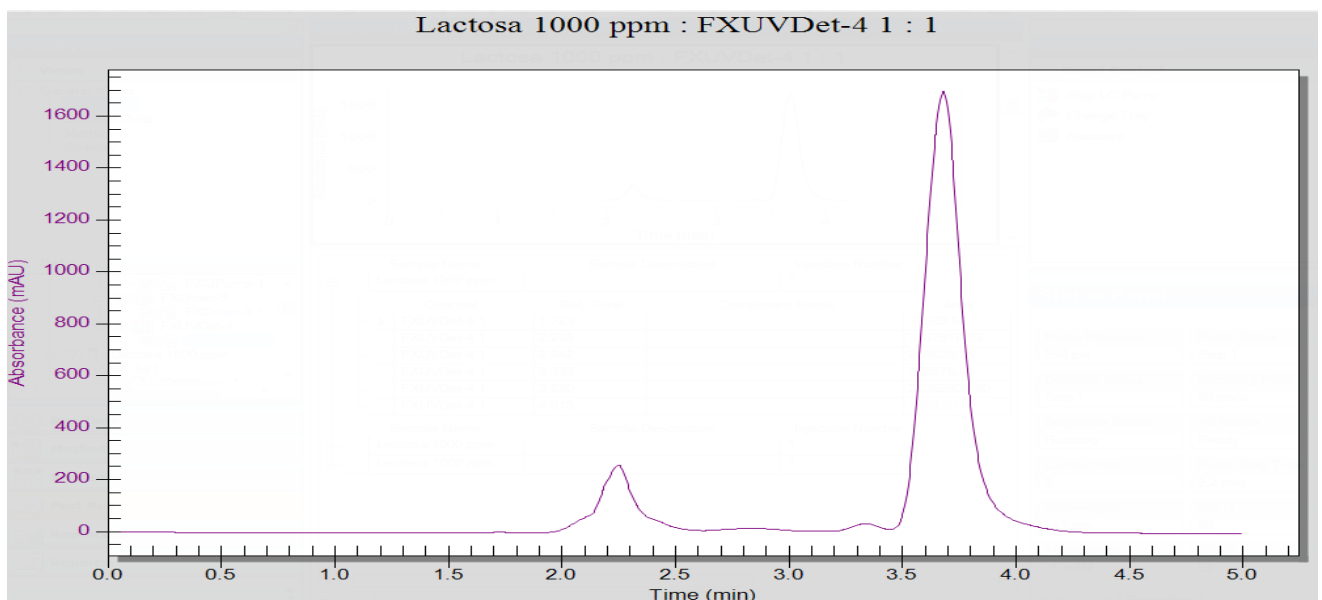


Figura 41: Cromatograma del patró de lactosa de 1000 ppm derivatitzat amb el compost PMPA

3.7.7.9 Conclusions

En el primer cromatograma ens apareix el pic de la lactosa petit i amb una mica de cua i un pic gran corresponent al PMPA. Amb els altres dos cromatogrames realitzo la comprovació de que el pic petit correspon a la lactosa. S'observa que aquest pic augmenta a mida que augmentem la concentració de patró de lactosa en l'anàlisi. Un cop identificat el pic de la lactosa es realitza la preparació dels patrons estàndards per tal de poder construir la recta de calibratge, i posteriorment realitzar l'anàlisi de les mostres reals. Aquestes etapes no s'han pogut realitzar per falta de temps.

4. Conclusions

As a final conclusion we can say that the main objective of this work has been fulfilled. The aim was to develop different analytical methods using the HPLC technique, analyzing the analytes indicated by the laboratory.

After performing the different determinations predicted by the laboratory of the HMF compound, and the presence of vitamins in real samples using different methods, reagents and techniques it can be said that the objective has been fulfilled for each determination.

The determination of lactose in actual samples could not be completed due to lack of time.

5. Bibliografia

1. Rada Mendoza M., Olano A, Villamiel M, 2002. **Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit based infant foods.** *Food Chem* 79: 513-516.
2. Bachmann S, Meier M, Kaenzig A. **5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Lebensmitteln.** *Lebensmittelchemie* 51(3): 49-50.
3. Subovsky M., Sosa López A., Rolla R., Castillo A., Aleman M., **Cambios en la formación del hidroximetilfurfural en mieles sometidas a calentamiento.** XXI Congreso Argentino. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste Corrientes, Argentina. *Tecnología Química*,(2000),7.
4. White. J.W. **Hidroximetilfurfural content of honey an indicator of its adulteration whit invert sugars.** *Bee World* 61(1):29-37.(1980).
5. <http://www.teknokroma.es/UserFiles/Filtracion/682.pdf>
6. Departament de biblioteques. Universidad Complutense de Madrid. [28 Novembre 2016]. Disponible en: <http://www.ucm.es/data/cont/docs/650-2013-12-02-gases%20l%C3%ADquidos.pdf>
7. FAO, Problemas en la cuantificación de vitaminas liposolubles en premezclas y alimentosteterminados.[7Desembre2016]. Disponible:<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S28.htm>
8. Stevens, J. Dowell, D. **Determination of Vitamins D₂ and D₃ in Infant Formula and Adult Nutritionals by Ultra-Pressure Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detection,** *Journal of AOAC International*. 3. Vol.95, 2012
9. C. B. Castells.C.B ; V. C. Arias. V.C. **Precolumn Derivatization of Reducing Carbohydrates with 4-(3-Methyl-5-oxo-2-pyrazolin- 1-yl) Benzoic Acid. Study of Reaction, High-Performance Liquid Chromatographic Separation and Quantitative Performance of Method.** División Química Analítica, Universidad Nacional de La Plata y CIDEPINT, Argentina. 2015

Desenvolupament de diferents metodiques d'anàlisi mitjançant la técnica HPLC

Autoavaluació assoliment competències Grau en Química

Nom: Raquel Córdoba Sánchez

Curs: 2016-2017

Competències Assoliment (Sí/No, comentaris)

B1	Sí. Jo crec que s'ha assolit aquesta competència ja que es practica de forma directa (assignatures) i indirecta al llarg de tot el grau.
B2	Sí. He aconseguit desenvolupar l'habilitat de detectar un problema i buscar una solució a aquest eficientment.
B3	Sí. Una visió crítica de tot el que ens rodeja és important per aconseguir millorar.
B4	Sí. En l'àmbit químic és molt important seguir un ordre i planificació per tal d'assolir els teus objectius amb el temps previst i, evitar o detectar errors més eficientment per poder-los solucionar amb rapidesa i eficàcia.
B5	Sí. Ha estat fàcil per a mi perquè estic acostumada a treballar en grup i amb persones desconegudes.
B6	Sí. Parlar en públic sempre havia estat molt complicat per a mi degut als nervis; però, gràcies al gran nombre d'exposicions i activitats de parla en públic de les assignatures del grau, he pogut desenvolupar molt aquesta habilitat i sóc capaç de parlar en públic.
B7	Sí. A part de ciutadania s'ha desenvolupat en altres assignatures com la d'anàlisi i control ambiental.
B8	Sí. S'ha cursat l'assignatura de 3rt d'enginyeria química

Desenvolupament de diferents metodiques d'anàlisi mitjançant la técnica HPLC

C1	Sí. Tinc certificat el 3r d'anglès de l'escola oficial d'idiomes.
C2	Sí. Bon maneig de els softwares editors de textos ja que a banda de ser ensenyats a la assignatura d'informàtica i documentació, s'han utilitzat durant tot el grau regularment.
C3	Sí. Saber gestionar la informació , seleccionar la informació rellevant i avaluar la fiabilitat de la font; és fonamental a l'hora de desenvolupar qualsevol projecte.
C4	Sí. Sóc nativa d'aquí, així que tinc un bon domini d'ambdues llengües oficials de la universitat.
C5	Sí. Un professional ha de ser conscient dels seus actes de forma que siguin ètics per la societat.
C6	Sí. He visitat la meva tutora amb regularitat al llarg del grau i s'ha fet un bon seguiment i desenvolupament del projecte acadèmic.

Autoavaluació general. Les competències transversals i nuclears es consideraran superades quan al final dels seus estudis els estudiants hagin assolit un 80 % de les competències B i C en nivell I, i un 50 % de les competències B i C en el seu nivell màxim.

Crec que s'han assolit correctament totes les competències transversals i nuclears del grau de Química.

Desenvolupament de diferents mètodes d'anàlisi mitjançant la tècnica HPLC

Competències transversals i nuclears del Grau en Química:

- B1 Aprendre a aprendre.
- B2 Resoldre problemes complexos de forma efectiva en el camp químic.
- B3 Aplicar el pensament crític, lògic i creatiu, demostrant capacitat d'innovació.
- B4 Treballar de forma autònoma amb responsabilitat i iniciativa.
- B5 Treballar en equip de forma cooperativa i responsabilitat compartida.
- B6 Comunicar informació, idees, problemes i solucions de manera clara i efectiva en públic o en àmbits tècnics concrets.
- B7 Tenir sensibilització en temes mediambientals.
- B8 Gestionar projectes tècnics o professionals complexos.
- C1 Dominar en un nivell intermedi una llengua estrangera, preferentment l'anglès.
- C2 Utilitzar de manera avançada les tecnologies de la informació i la comunicació.
- C3 Gestionar la informació i el coneixement.
- C4 Expressar-se correctament de manera oral i escrita en una de les dues llengües oficials de la URV.
- C5 Comprometre's amb l'ètica i la responsabilitat social com a ciutadà/ana i com a professional.
- C6 Definir i desenvolupar el projecte acadèmic i professional.