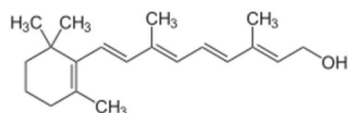
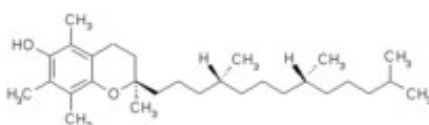


INTRODUCCIÓN

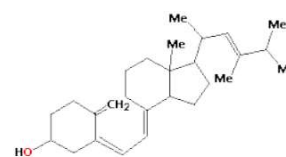
El estudio de vitaminas liposolubles (A, D₂, E y K) es de gran importancia tanto en Química Clínica como en Nutrición. Dichas vitaminas presentan una estructura química isoprenoide (Figura 1). Son sensibles a la luz, sufriendo procesos de isomerización u oxidación, y degradándose si se someten a altas temperaturas. Estas propiedades hacen que su determinación por Cromatografía de Capa Fina (TLC) y por Cromatografía de Gases (GC) esté limitada. Sin embargo, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) resulta adecuada ya que evita el contacto de los analitos con el aire y la luz, llevándose a cabo la determinación a temperatura ambiente.



Vitamina A



Vitamina E



Vitamina D₂

OBJETIVO

Familiarizar al alumno con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): manejo de instrumentación, control de las separaciones, identificación de picos. 2. Iniciar al alumno en la determinación cuantitativa: El objeto de esta práctica es realizar la determinación de vitaminas liposolubles, A (Retinol), D₂ (Ergocalciferol) y E (a-Tocoferol), en un preparado farmacéutico.

MATERIALES Y REACTIVOS

Reactivos

Patrones de vitaminas en metanol
Vitamina A 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Vitamina D₂ 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Vitamina E 9500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Metanol grado HPLC

Materiales

Matraces aforados de 10 mL
Pipetas de 5 mL

Condiciones instrumentales

Columna C18
Detector de absorbancia Longitud de onda 254 y 280 nm
Fase móvil 100 % Metanol
Elución Isocrática
Flujo 1,5 mL min⁻¹

PROCEDIMIENTO

Parte 1.- Preparación de patrones.

1. Para la determinación de tiempos de retención se preparan 10 mL en metanol de disoluciones individuales de vitamina A y vitamina D2 de las siguientes concentraciones:

Vitamina A 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Vitamina D2 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Nota: Será necesario calcular los volúmenes correspondientes de los patrones stock que llevados a 10 mL den la concentración requerida.

2. Para la curva de calibrado: Preparad 10 mL en metanol de mezclas de los tres patrones de las siguientes concentraciones:

	Concentraciones ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Vitamina A	75	150	225
Vitamina D2	50	100	150
Vitamina E	475	950	1425

Nota: Será necesario calcular los volúmenes correspondientes de los patrones stock que llevados a 10 mL den la concentración requerida.

Parte 2.- Identificación:

Inyección individual de 2 de los 3 patrones de vitaminas para determinar el tiempo de retención de cada compuesto en las condiciones cromatográficas utilizadas. El tiempo de retención del tercer compuesto se deducirá en las inyecciones de la mezcla de patrones.

Parte 3.-Medidas para la cuantificación (construcción de la curva de calibrado): Inyección por duplicado de tres niveles de concentración de una mezcla conteniendo las tres vitaminas. Se representará las áreas del pico cromatográfico con la correspondiente concentración para cada caso.

Parte 4.-Análisis de un preparado farmacéutico. Determinación cualitativa de las vitaminas consideradas en el extracto metanólico de una muestra real. Se inyectará por triplicado la muestra y se determinará la concentración de cada vitamina según la curva de calibrado

CÁLCULOS EXPERIMENTALES.

1. Realiza los cálculos necesarios para preparar las disoluciones de patrones y pásalos al informe. ¿Qué volumen de cada una de las vitaminas tienes que tomar de cada disolución concentrada para preparar cada uno de los niveles de calibrado?
2. Identifica cada una de las vitaminas mediante su tiempo de retención.
3. A partir del área de los picos cromatográficos de la mezcla de patrones establecer las rectas de calibrado correspondientes a cada patrón mediante análisis de regresión lineal (mínimos cuadrados). ¿Se ajustan los datos al modelo lineal?
4. A partir de las rectas de calibrado calcular la concentración de cada uno de los componentes del preparado farmacéutico.