



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SECCIÓN DE QUÍMICA ANALÍTICA



Determinación de parabenos en un enjuague bucal por electroforesis capilar, cuantificando con factor respuesta

Objetivo. Que el alumno sea capaz de realizar la interpretación de los resultados de una separación por electroforesis capilar para determinar la cantidad de uno o más analitos presentes en una muestra comercial, mediante la resolución paso a paso de un ejercicio empleando el método de factor respuesta.

Material de apoyo para las carreras de: Farmacia, Química Industrial, Química, Ingeniería Química, Bioquímica Diagnóstica, Química Farmacéutica Bióloga, para las asignaturas de Química Analítica en las que se revisan los temas de análisis instrumental, en particular métodos de separación y de cuantificación.

Elaborado por Alma Luisa Revilla Vázquez y Juan Manuel Paramo Jurado, en mayo del 2024, en el marco del proyecto PAPIME PE210824.

D. R. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Excepto donde se indique lo contrario esta obra está bajo una licencia Creative Commons Atribución No comercial, Noderivada, 4.0 Internacional (CC BY NC ND 4.0 INTERNACIONAL).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



ENTIDAD EDITORA. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Usted es libre de **compartir**, copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato.

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia.

Atribución: Usted debe dar crédito de manera adecuada y brindar un enlace a la licencia.

Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

No Comercial: Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales.

Sin Derivadas: Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

Forma sugerida de citar: Revilla, A. y Paramo, J. (2024). Determinación de parabenos en un enjuague bucal por electroforesis capilar cuantificando con factor respuesta. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

ELECTROFORESIS CAPILAR

El término electroforesis se utiliza para describir la migración de un compuesto cargado bajo la influencia de un campo eléctrico (fig. I). Cuando se utiliza un capilar usualmente de sílice fundida se denomina electroforesis capilar. La migración diferencial de los analitos dentro de zonas discretas se debe a las diferencias en las movilidades electroforéticas, vinculadas con la relación carga/masa y a la conformación espacial de los analitos en forma iónica, así como a la movilidad del flujo electro osmótico (FEO)¹.

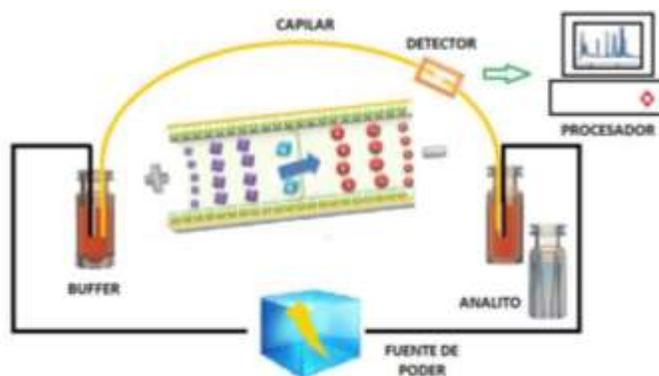


Fig I. Esquema de las partes de un equipo de electroforesis capilar¹

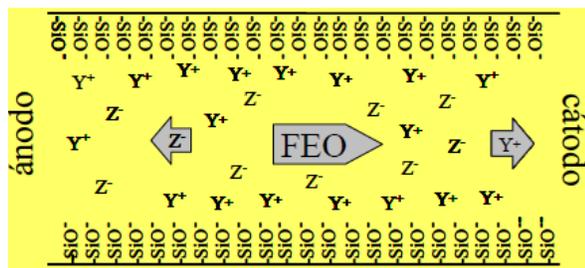


Fig. II Representación del flujo electroosmótico¹

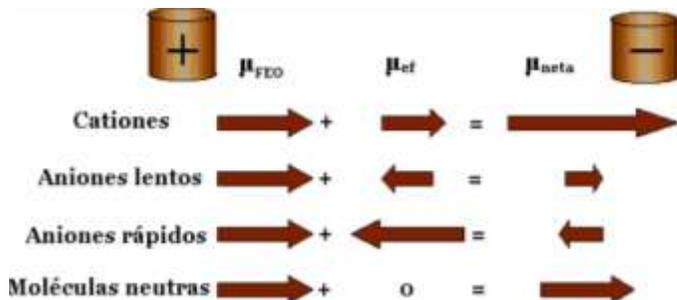


Fig. III Influencia del FEO en la movilidad de los iones¹

El flujo electroosmótico se genera cuando la superficie interna del capilar de sílice fundida esta cargada (debido a la deprotonación de los grupos silano) y se aplica un campo eléctrico, entonces los iones en solución se mueven hacia el electrodo de carga opuesta (fig. II). En general el FEO se mueve hacia el cátodo por la presencia de los iones H_3O^+ .

La movilidad del FEO impacta la movilidad de los iones presentes, haciendo posible que algunos aniones se muevan hacia el cátodo (fig. III), permitiendo separar y cuantificar en una sola corrida tanto cationes como aniones.

ESTÁNDAR INTERNO

En los métodos instrumentales donde se conoce que hay problemas de reproducibilidad por alguna situación, es mandatorio el empleo de un estándar interno. Para las técnicas de cromatografía de gases y electroforesis capilar, donde el volumen de muestra empleado es de un microlitro o menor, se tiene baja reproducibilidad en la inyección, por lo que el uso de un estándar interno es práctica común.

Un estándar interno (EI) es un compuesto de características químicas similares a los analitos a separar, que se debe adicionar por igual a la solución problema y sistemas patrón a una concentración conocida.

- Se agrega el estándar interno para corregir la pérdida de analito durante la preparación de la muestra o al momento de inyectarla, así como variaciones durante la separación entre una solución muestra y otra.
- Su adición no debe de causar ningún tipo de interferencia en el análisis, y debe de proporcionar una señal analítica similar al analito, pero distinguible del mismo.
- El estándar interno se añade a todas las muestras y estándares en cantidad conocida.

CURVA DE CALIBRACIÓN CON ESTÁNDAR INTERNO

La curva de calibración es el método de cuantificación más empleado, pero cuando se utiliza un estándar interno (EI), debe de hacerse un tratamiento particular de los datos que genera el equipo analítico. La ecuación para una curva de calibración es: **área/altura analito en función de su concentración**, pero ahora, debido a que en todos los sistemas se coloca una concentración conocida e igual de EI, se espera que la altura o área de dicho pico sea constante, sin embargo, dicha señal refleja la falta de reproducibilidad de la introducción del volumen tan pequeño de muestra. Por ello, se debe graficar:

$$\frac{\text{Área Analito}}{\text{Área EI}} = FR * \frac{[\text{Analito}]}{[\text{EI}]}$$

Donde la pendiente es igual a FR, que es el factor respuesta del analito en función del EI

Usualmente, en el eje X, no se grafica $[\text{Analito}]/[\text{EI}]$, porque este último término es constante en todos los sistemas, por lo que se puede trabajar graficando solamente en el eje X, la concentración del analito, $[\text{Analito}]$, como se indica en la figura IV.

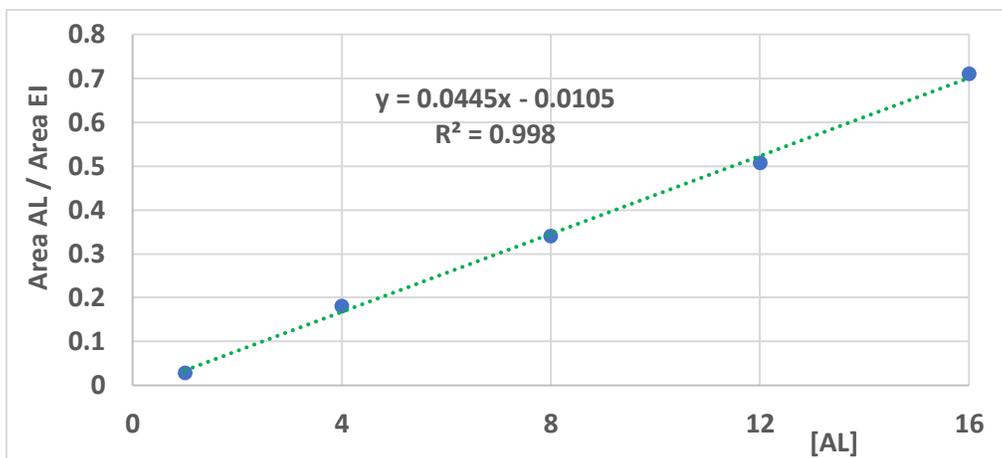


Fig IV. Representación de una curva de calibración cuando se emplean un estándar interno

FACTOR RESPUESTA

A fin de agilizar una determinación, es posible utilizar el método de Factor Respuesta, que tiene como principio trabajar en un intervalo de concentraciones donde la señal (área o altura) presenta una tendencia lineal* y luego se realiza la cuantificación de los analitos con solo 2 soluciones:

- 1) solución mezcla de estándares (analitos más estándar interno), todos de concentración conocida.
- 2) solución problema a la cual se adiciona estándar interno.

**El intervalo lineal se determina mediante la realización de una curva de calibración, una sola vez y todos los análisis en días posteriores se hacen por factor respuesta.*

Con los datos obtenidos para la solución 1, se calcula el **Factor Respuesta** de cada analito con relación al EI mediante la fórmula:

$$FR = \frac{\text{Área Analito}}{\text{Área EI}} * \frac{[EI]}{[\text{Analito}]}$$

En tanto con los datos de la solución 2, se calcula la **concentración desconocida del analito** en la solución problema, con la siguiente ecuación:

$$[\text{Analito}] = \frac{\text{Área Analito} * [EI]}{\text{Área EI} * FR}$$

Si se cuantifica más de 1 analito, el procedimiento se debe repetir para cada uno de los analitos a cuantificar, siempre y cuando se encuentren bien resueltos entre ellos.

En lugar de utilizar el área bajo la curva del pico, puede emplearse la altura del pico, sobre todo cuando el pico obtenido no es simétrico y presenta por ejemplo coleo, lo cual dificulta determinar dónde debe de terminar la integración del pico.

DETERMINACIÓN DE PARABENOS

Se analiza por electroforesis capilar el contenido de parabenos (metil y propil parabeno) en un enjuague bucal. Para ello se analiza una mezcla de estándares que contiene 10 ppm de cada parabeno: metilparabeno (MeP), propilparabeno (PrP) y como estándar interno etilparabeno (EtP). La solución mezcla se prepara tomando 1 mL a partir de disoluciones patrón de 100 ppm de cada parabeno y afora a 10 mL. La solución problema se prepara tomando **0.5 mL del enjuague bucal** que se coloca en un matraz de 25 mL, se adicionan 2 mL de EtP (100 ppm) y afora con agua.

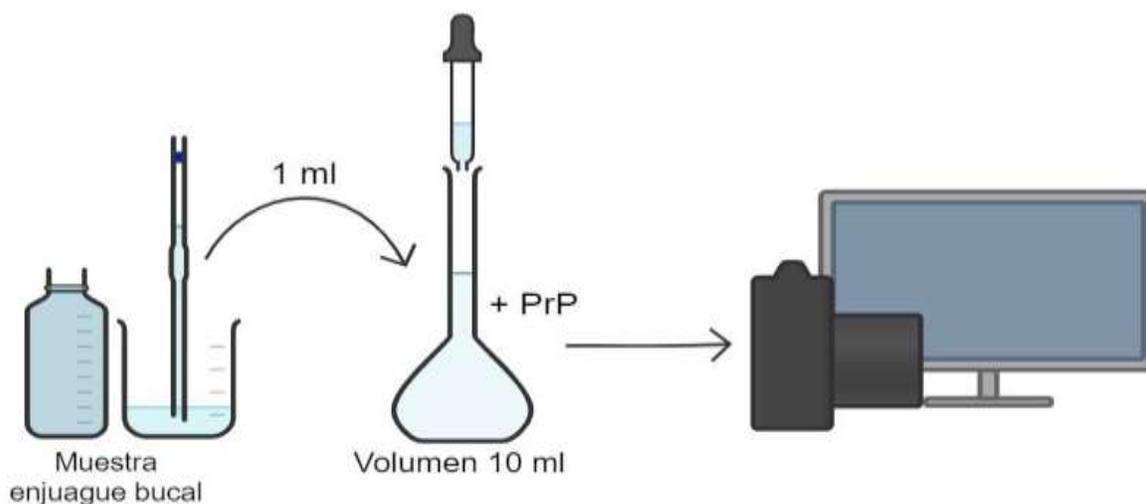


Figura 1. Esquema de la preparación de la solución problema

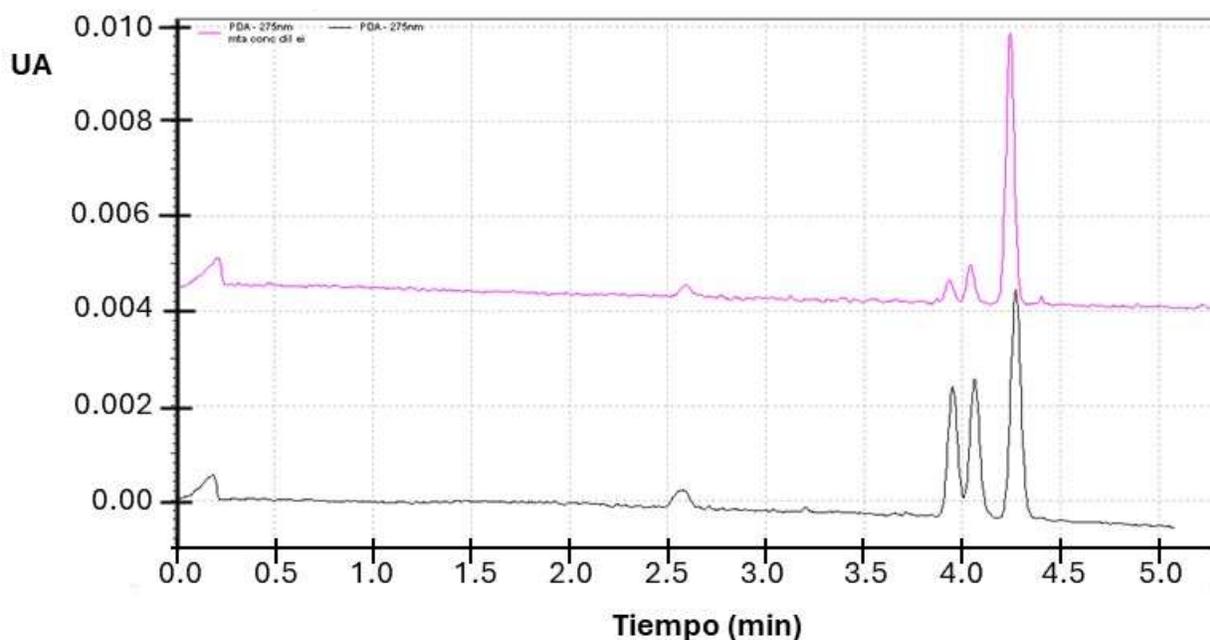


Figura 2. Electroferograma para la solución problema (rosa) y mezcla de estándares (negro). Capilar 50.4cm DI 75um. Búfer boratos 0.05M, pH 9.5, 25kV, @275nm. Inyección hidrodinámica: 0.5 psi por 5 s.

Tabla 1. Valores obtenidos para la mezcla de estándares.

| | Conc (ppm) | Tiempo migración | Altura de pico | Área de pico |
|----------------|------------|------------------|----------------|--------------|
| Metilparabeno | 10 | 4.271 min | 4821 | 17619 |
| Etilparabeno | 10 | 4.063 min | 2914 | 10428 |
| Propilparabeno | 10 | 3.950 min | 2723 | 9567 |

Tabla 2. Valores obtenidos para la solución problema

| | Conc (ppm) | Tiempo migración | Altura de pico | Área de pico |
|----------------|------------|------------------|----------------|--------------|
| Metilparabeno | ¿? | 4.221 min | 5716 | 27102 |
| Etilparabeno | 5 | 4.021 min | 789 | 2288 |
| Propilparabeno | ¿? | 3.913 min | 450 | 2047 |

RESOLUCIÓN DEL EJERCICIO

1. Calcule el valor de FR para MeP y PrP, empleando *altura de pico*

Para esto, se utilizan los valores de concentración y altura de pico obtenidos para la solución de la mezcla de estándares (Tabla 1) y la siguiente ecuación:

$$FR = \frac{\text{Altura Analito}}{\text{Altura EI}} * \frac{[EI]}{[Analito]}$$

Tabla 1. Valores obtenidos para la mezcla de estándares.

| | Conc (ppm) | Tiempo migración | Altura de pico | Área de pico |
|----------------|------------|------------------|----------------|--------------|
| Metilparabeno | 10 | 4.271 min | 4821 | 17619 |
| Etilparabeno | 10 | 4.063 min | 2914 | 10428 |
| Propilparabeno | 10 | 3.95 min | 2723 | 9567 |

FR MeP

$$FR = \frac{(\text{altura MeP}) * [EtP]}{(\text{altura EtP}) * [MeP]} = \frac{(4821 \text{ mm})(10 \text{ ppm})}{(2914 \text{ mm})(10 \text{ ppm})} = 1.654$$

FR PrP

$$FR = \frac{(\text{altura PrP}) * [EtP]}{(\text{altura EtP}) * [PrP]} = \frac{(2723 \text{ mm})(10 \text{ ppm})}{(2914 \text{ mm})(10 \text{ ppm})} = 0.934$$

2. Calcule la concentración de MeP y EtP en la solución problema

Para realizar estos cálculos, se emplean los datos obtenidos del análisis de la solución problema (Tabla 2) y la ecuación correspondiente.

$$[\text{Analito}] = \frac{\text{Altura Analito} * [\text{EI}]}{\text{Altura EI} * \text{FR}}$$

Tabla 2. Resultados obtenidos para la solución problema

| | Conc (ppm) | Tiempo migración | Área de pico | Altura de pico |
|----------------|------------|------------------|--------------|----------------|
| Metilparabeno | ¿? | 4.221 min | 17500 | 5716 |
| Etilparabeno | 8 | 4.021 min | 2288 | 789 |
| Propilparabeno | ¿? | 3.913 min | 1287 | 450 |

$$[\text{MeP}] = \frac{(\text{altura MeP}) * [\text{EtP std}]}{(\text{altura EtP}) * [\text{FR MeP}]} = \frac{(5716 \text{ mm})(8 \text{ ppm})}{(789 \text{ mm})(1.654)} = 35.04 \text{ ppm}$$

$$[\text{PrP}] = \frac{(\text{altura PrP}) * [\text{EtP std}]}{(\text{altura EtP}) * [\text{FR PrP}]} = \frac{(450 \text{ mm})(8 \text{ ppm})}{(789 \text{ mm})(0.934)} = 4.88 \text{ ppm}$$

3. Calcule la concentración de MeP y PrP (ppm) en el enjuague bucal

Siendo que la solución problema de enjuague se preparó tomando una alícuota de 1 mL y llevando a 10 mL de aforo con agua, se debe considerar dicha dilución. Por ello se multiplica por el volumen de aforo, entre el volumen de la alícuota empleada.

[MeP]

$$35.04 \text{ ppm} * \left(\frac{25 \text{ mL}}{0.5 \text{ mL}}\right) = 1752.0 \text{ ppm}$$

[PrP]

$$4.88 \text{ ppm} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}\right) = 48.8 \text{ ppm}$$

4. Calcular la concentración molar (mol/L) de MeP y PrP en el enjuague

Las concentraciones obtenidas de parabenos (problema 3) se encuentran en ppm ($\frac{mg}{L}$), para convertir la concentración ppm a molar ($\frac{mol}{L}$) se realiza el cálculo empleando la masa atómica de cada parabeno.

Masa atómica de MeP=152.15

Masa atómica de EtP= 180.2

[MeP] enjuague

$$\left(\frac{1752.0 \text{ mg MeP}}{1 \text{ L}}\right) \left(\frac{1 \text{ mmol MeP}}{152.15 \text{ mg MeP}}\right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}}\right) = 1.15 \times 10^{-2} \text{ M}$$

[PrP] enjuague

$$\left(\frac{48.8 \text{ mg EtP}}{1 \text{ L}}\right) \left(\frac{1 \text{ mmol MeP}}{180.2 \text{ mg EtP}}\right) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}}\right) = 2.7 \times 10^{-4} \text{ M}$$

5. Calcular el porcentaje (peso/volumen) de cada parabeno en el enjuague bucal (%p/v = g Parabeno/100 mL enjuague)

Para determinar el porcentaje peso/volumen se emplea la concentración ppm

Considerando la concentración ppm ($\frac{mg}{L}$)

[MeP] enjuague

$$\left(\frac{1752.0 \text{ mg}}{1 \text{ L}}\right) \left(\frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}}\right) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}}\right) * 100 = 0.175\% \text{ p/v}$$

[PrP] enjuague

$$\left(\frac{48.8 \text{ mg}}{1 \text{ L}}\right) \left(\frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}}\right) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}}\right) * 100 = 0.00488\% \text{ p/v}$$

6. Si la autoridad sanitaria permite no más de 0.8% de parabenos totales, indique si el enjuague bucal cumple lo estipulado en la normativa²

La NOM en cuestión establece que la cantidad de parabenos totales no puede ser superior a 0.8%. Por lo tanto, se acepta el límite para el enjuague bucal, dado que se tiene:

Parabenos totales= %p/v (MeP) + %p/v (EtP)

0.175% + 0.00488% = **0.179%** para el enjuague analizado

¡ RETO !

Si consideras que entendiste como se resuelve este tipo de ejercicios, ***realiza la determinación de parabenos empleando los datos de área de las tablas 1 y 2; compara los resultados.***

REFERENCIAS

- [1] Fundamentos de electroforesis capilar (2005). Miriam Aidé Castillo Rodríguez, Alma Luisa Revilla Vázquez, Raquel López Arellano, Patricia Rivera ISBN: 970-322350-8. UNAM FESC.
- [2] Secretaria de Gobernación. Diario Oficial. (s.f). ACUERDO por el que se determinan las sustancias prohibidas y restringidas en la elaboración de productos de perfumería y belleza. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5335505&fecha=11/03/2014#gsc.tab=0