














# MÉTODO DE ANÁLISIS DE ALCALOIDES TOTALES EN ALTRAMUZ

Extracción adaptada de Ganzera M. *et al.* J. Pharm. Biomed. 2010, 53:1231-35. Análisis volumétrico (titulación) basado en el método de Ruiz LP. *New Zealand J Agric Res.* 1977, 20:51-2.

## 1. Materiales y reactivos

- Vasos de precipitados 50 ml
- Agitador magnético
- Embudos y filtros de papel
- Balón de vidrio 250 o 500 ml fondo redondo
- Rotaevaporador
- pHmetro
- Bureta
- Matraz aforado 10, 100 y 250 ml
- Hidróxido de sodio (NaOH) 
- Ácido Clorhídrico (HCl)  
- Metanol (MeOH)   
- Sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Tetrabromo – fenoltaleinato de etilo (CAS 1176-74-5, Merck 86778)
- Etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)   
- Ácido toluen – 4 – sulfónico monohidrato  AS 6192-52-5, Merck 402885) 
- Diclorometano  

## 2. Protocolo

### NOTA IMPORTANTE: TRABAJAR SIEMPRE EN CAMPANA

#### 2.1 Preparación de solventes

- Solución de extracción HCl 0,5 N: añadir con cuidado 10,4 ml de ácido clorhídrico concentrado a 200 ml de agua destilada. Enrasar a un volumen de 250 ml. Puede calentarse.

Esta disolución también puede prepararse a partir de la disolución de HCl 4N que está disponible en el laboratorio. Para ello se toman

31,2 ml de esta disolución y se enrasa con agua destilada a un volumen de 250 ml.

- Solución indicadora Tetrabromo – fenolftaleinato de etilo 0,1% p/v en etanol. Pesar 10 mg de indicador (se guarda en nevera) y enrasar a 10 ml con etanol. Guardar en un recipiente ámbar en la nevera.
- Solución de valoración Ácido toluen – 4 – sulfónico 0.01 N en metanol. Pesar 194 mg de ácido y enrasar en 100 ml de metanol. Se puede guardar unas semanas en la nevera.
- NaOH 4 N: disolver con cuidado 16 g de NaOH en 80 ml de agua. Enrasar a 100 ml. Puede calentarse.
- Solución madre Lupinina 1000 mg/l: se disuelven 0,05 g de lupinina en 50 ml de metanol. Conservar a -20°C.

Nota: esta disolución patrón solo es necesaria cuando se quiere comprobar que el método funciona correctamente.

## 2.2 Extracción

- Se pesa 0,5 g de harina de altramuz en un tubo de TBARS y se añaden 16 ml de HCl 0,5 N. Se agita en vortex y se lleva al ultrasonidos durante 30 min.
- La muestra se enfría en un baño a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, el líquido se decanta a un tubo de centrifuga de plástico (de aproximadamente el mismo volumen que el tubo de TBARS). No pasa nada si se arrastra un poco de sólido.
- Se añaden 16 ml más de HCl 0,5 N al sólido, se vuelve a agitar en vortex y se sonica 30 min más.
- La muestra se enfría en un baño a temperatura ambiente. El líquido se decanta y se recoge sobre el obtenido anteriormente.
- Lavar el sólido con 2,5 ml de agua para asegurar que se arrastra todo el líquido y juntar con las fracciones de extracto. Si se arrastra un poco de sólido no importa.

- Se centrifuga el líquido a 7140xg (con el rotor de centrifuga nº 0850 se alcanzan 7100 RCF) durante 10 min. La solución puede tener un color rosado. Se recupera el sobrenadante y se recoge en un matraz Erlenmeyer con tapón de rosca (para separar se decanta el líquido, no pasa nada si queda un poco turbio o hay algo de sólido, ya que se filtra en el último paso). El pellet se descarta.
- Se ajusta el pH del líquido a 10 añadiendo NaOH 4 N gota a gota hasta que la solución pase de color amarillento a amarillo vivo. En ese punto la disolución tendrá pH=7 y habrá que añadir unas gotas más hasta que alcance pH=10. El valor del pH puede controlarse con papel indicador. La solución puede volverse un poco turbia.
- A continuación, se añaden 25 ml de diclorometano. Se tapa el matraz Erlenmeyer y se mezcla con cuidado para luego destapar y liberar la presión. Se repite este proceso dos veces más para asegurar una buena mezcla.
- Se traspasa esta mezcla a dos tubos de centrifuga de plástico<sup>1</sup> (ya que en uno solo no coge todo el volumen) y se centrifuga durante 15 min a 7140xg. Se obtiene una fase acuosa (superior, amarilla); una interfase sólida de color blanco y una fase orgánica (inferior, incolora). Se recupera la fase orgánica (inferior, incolora) con ayuda de una pipeta Pasteur y se deposita en un nuevo matraz Erlenmeyer de tapón roscado. Si se coge un poco de fase acuosa no pasa nada.

Nota: Es necesario el paso de centrifugación, ya que hay componentes de la muestra que actúan como emulsionante y las fases no se separan bien si no se centrifuga.

- La fase acuosa (superior, amarilla) se devuelve al primer matraz Erlenmeyer donde se añadió por primera vez el diclorometano para repetir la extracción, pero esta vez con 12,5 ml de diclorometano. Se mezcla bien y se destapa con cuidado para liberar la presión. Se vuelve a traspasar esta mezcla a dos tubos de centrifuga y se centrifuga durante 15 min a 7140xg.

---

<sup>1</sup> Estos tubos de centrifuga son de un tamaño aproximado al de los tubos de TBARS.

- Se recupera la fase orgánica (inferior, incolora) y se junta con la fase orgánica obtenida en la primera extracción.
- Se seca la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro (2 puntas de espátula). A continuación, se filtra y se recoge el extracto sobre un matraz redondo “con forma de corazón” de 100 ml.
- Se lava dos veces el sulfato de sodio con unos 2,5 ml de diclorometano para asegurar que se arrastra toda la muestra.
- El matraz redondo en el que se ha recogido el extracto se lleva a sequedad en el rotaevaporador. Una vez seco, se lavan las paredes del balón con unos 2,5 ml de diclorometano para arrastrar los alcaloides adheridos y concentrarlos en la parte inferior. Utilizar el vortex para lavar bien las paredes. Volver a llevar a sequedad en el rotaevaporador.
- Por último, añadir en el matraz redondo 1 ml de metanol para redissolver el extracto y lavar bien las paredes. Utilizar el vortex para ello.

### 2.3 Titulación

- Se añaden 3 gotas de solución indicadora en el extracto redissuelto en 1 ml de metanol. Se mezcla bien para intentar arrastrar toda la muestra de las paredes.
- Se añade solución de valoración gota a gota (bureta) hasta que el color de la muestra vira de azul a amarillo. Atención: si está verde no ha terminado de virar aún.
- Una vez ha virado, se tapa el balón y se agita, asegurando así que se arrastra toda la muestra que pueda quedar en las paredes; es probable que recupere el color azul.
- Se vuelve a añadir solución de valoración gota a gota hasta que el color de la muestra vira a amarillo, esperamos un minuto y si no vuelve a ponerse azul la titulación ha finalizado.
- El volumen de solución de valoración añadido es proporcional a la cantidad de alcaloide en la muestra, y puede ser utilizado para la cuantificación (1 equivalente de ácido = 1 eq. de alcaloide).

- Si se quiere comprobar que el método funciona correctamente, se toma 1 mL de solución patrón de Lupinina en una matraz redondo “con forma de corazón” y se valora de la misma forma que las muestras.

## 2.4 Cálculos

Se determina el porcentaje de alcaloides totales de la muestra en base a lupinina (PM = 169,26 g/mol) (Ecuación 1). La lupinina tiene un equivalente de base en su estructura para reaccionar con el ácido (Figura 1).

Ecuación 1. Cálculo del contenido de alcaloides totales (%).

$$X \text{ ml } p - \text{TsOH} \times \frac{0,01 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ mol lupinina}}{1 \text{ mol ácido}} \times \frac{169,26 \text{ g}}{1 \text{ mol lupinina}} \times \frac{1}{1 \text{ g muestra}} \times 100$$

$X \text{ ml } p - \text{TsOH}$  = volumen gastado en la valoración

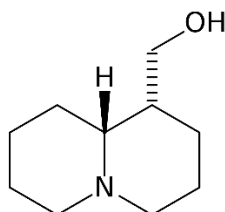


Figura 1. Estructura de la lupinina. El nitrógeno es el punto básico.