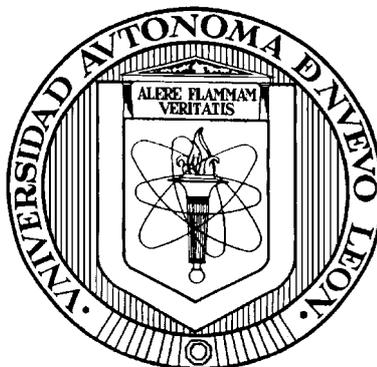


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA EN TORTILLAS
TOSTADAS DE MAÍZ**

Por

Q.F.B. GRACIELA GRANADOS GUZMAN

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación Terminal en Química
Biomédica**

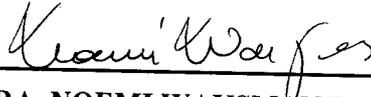
JULIO, 2008

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA EN TORTILLAS
TOSTADAS DE MAÍZ**

Aprobación de la Tesis:



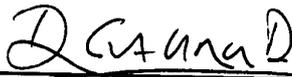
DRA. ROCÍO CASTRO RÍOS
Directora de tesis



DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
Co-Directora de Tesis



M.C. LIDIA RUNA NACCHA TORRES
Co-Directora de Tesis



DR. med. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA EN TORTILLAS
TOSTADAS DE MAÍZ**

Presentado por:

Q.F.B. Graciela Granados Guzmán

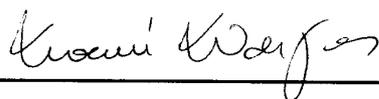
Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Rocío Castro Ríos y la co-dirección de la Dra. Noemí Waskman de Torres y la M.C. Lidia Runia Naccha Torres.

DIRECTORA

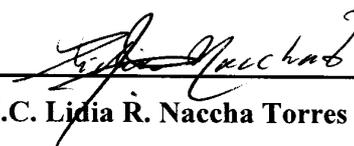


Dra. Rocío Castro Ríos

Co-DIRECTORAS



Dra. Noemí Waksman de Torres



M.C. Lidia R. Naccha Torres

INDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
	1.1 Características físicas y químicas de la acrilamida	1
	1.2 Fuentes de exposición	2
	1.3 Efectos sobre la salud	4
	1.4 Generación de acrilamida en alimentos	5
	1.5 Legislación	8
	1.6 Métodos para la determinación de acrilamida	9
2	JUSTIFICACION	14
3	OBJETIVO GENERAL	16
4	OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
5	MATERIAL Y METODOS	18
	5.1 Reactivos	18
	5.2 Material	20
	5.3 Características de la muestra	23
	5.4 Método Cromatográfico	24
	5.4.1 Cromatografía de fase inversa	24
	5.4.2 Cromatografía de par iónico	25
	5.4.3 Cromatografía de interacciones hidrofílicas	26
	5.4.4 Columnas acopladas	27
	5.4.5 Selección del modo cromatográfico	28
	5.5 Método de extracción y limpieza	31
	5.5.1 Volumen de ruptura	32
	5.5.2 Perfil de elución	33
	5.5.3 Optimización de la relación muestra-solvente	34
	5.5.4 Concentración de extractos	35
	5.5.5 Preconcentración en línea	36
	5.5.6 Recuperación	38

5.6	Cuantificación	39
5.6.1	Estandarización externa	39
5.6.2	Adición estándar	40
5.7	Validación	41
5.7.1	Linealidad	41
5.7.2	Exactitud y precisión	41
5.7.3	Límite de detección y límite de cuantificación	42
6	RESULTADOS	43
6.1	Desarrollo del método cromatográfico	43
6.1.1	Cromatografía de fase inversa	43
6.1.1.1	Columna Atlantis dC ₁₈	43
6.1.1.2	Columna Intersil Ph	47
6.1.1.3	Columna Discovery Cyano	49
6.1.1.4	Columna ISRP-GFFII	49
6.1.2	Cromatografía de par iónico	51
6.1.3	Cromatografía de interacciones hidrofílicas	54
6.1.4	Cromatografía con columnas acopladas	58
6.1.5	Selección del modo cromatográfico	59
6.2	Método de extracción y limpieza	60
6.2.1	Volumen de ruptura	60
6.2.2	Perfil de elución	61
6.2.3	Optimización de la relación muestra-solvente	64
6.2.4	Preconcentración en línea	67
6.2.5	Método final	69
6.2.6	Recuperación	71
6.3	Cuantificación	71
6.3.1	Estandarización externa	72
6.3.2	Adición estándar	72
6.4	Validación	72
7	DISCUSION DE RESULTADOS	73
7.1	Método cromatográfico	74
7.1.1	Cromatografía de fase inversa	74

	7.1.2 Cromatografía de par iónico	79
	7.1.3 Cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC)	83
	7.1.4 Columnas acopladas	85
	7.1.5 Resumen de los modos cromatográficos	87
	7.2 Método de extracción y limpieza	89
	7.2.1 Recuperación	93
	7.3 Cuantificación	94
	7.3.1 Estandarización externa	94
	7.3.2 Adición estándar	95
	7.4 Validación	95
	7.4.1 Linealidad	95
	7.4.2 Exactitud y precisión	96
	7.4.3 Límites de detección y cuantificación	97
8	CONCLUSIONES	98
9	PERSPECTIVAS	99
	BIBLIOGRAFIA	100

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Niveles de acrilamida reportados en algunos alimentos.	9
5.1	Soluciones utilizadas como fases móviles.	20
5.2	Columnas de fase inversa y condiciones evaluadas.	25
5.3	Fases móvil utilizadas para cromatografía de par iónico.	26
5.4	Fases móviles utilizadas para cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC).	27
5.5	Solventes de elución para los cartuchos de extracción en fase sólida en los que se estableció el perfil de elución.	34
5.6	Optimización de la relación muestra-solvente utilizando agua.	35
5.7	Optimización de la relación muestra-solvente utilizando metanol.	35
5.8	Estándares utilizados en la curva de calibración utilizada para la cuantificación por estandarización externa.	39
5.9	Niveles de concentración utilizados en la curva de calibración utilizada para la cuantificación por adición estándar.	40
6.1	Parámetros cromatográficos obtenidos en la columna Atlantis dC ₁₈ utilizando agua.	44
6.2	Parámetros cromatográficos obtenidos en la columna Atlantis dC ₁₈ utilizando ácido fórmico (HCOOH, 10 mM pH 3).	44
6.3	Parámetros cromatográficos obtenidos en la columna Atlantis dC ₁₈ utilizando ácido acético (CH ₃ COOH, 10 mM pH 5).	45
6.4	Parámetros cromatográficos obtenidos en la columna Atlantis dC ₁₈ utilizando hidroxilamina (NH ₂ OH, 10 mM pH 6.5).	45
6.5	Parámetros cromatográficos obtenidos en la columna Atlantis dC ₁₈ para el estudio del efecto del pH en la fase móvil.	46
6.6	Parámetros cromatográficos obtenidos para la columna Intersil Ph .	48

6.7	Parámetros cromatográficos obtenidos para la columna Discovery-Cyano.	49
6.8	Parámetros cromatográficos obtenidos para la columna Regis ISRP-GFFII.	50
6.9	Parámetros cromatográficos obtenidos en par iónico utilizando diferentes concentraciones de reactivo de par iónico (35°C).	51
6.10	Parámetros cromatográficos obtenidos en par iónico utilizando diferentes proporciones de ACN en la fase móvil.	52
6.11	Parámetros cromatográficos obtenidos en par iónico cuando se trabajó con distintas temperaturas de columna.	53
6.12	Parámetros cromatográficos obtenidos en HILIC cuando se utilizaron distintas proporciones de agua como solvente polar acuoso.	55
6.13	Parámetros cromatográficos para HILIC cuando se utilizó como solvente polar acuoso ácido fórmico (HCOOH, 10 mM, pH 3).	55
6.14	Parámetros cromatográficos para HILIC cuando se utilizó como solvente polar acuoso ácido acético (CH ₃ COOH, 10 mM, pH 5).	56
6.15	Parámetros cromatográficos para HILIC cuando se utilizó como solvente polar ácido trifluoroacético (TFA, 1%, pH 3).	56
6.16	Parámetros cromatográficos obtenidos HILIC cuando se utilizó como solvente polar MeOH.	56
6.17	Parámetros cromatográficos para HILIC cuando se utilizó como solvente polar isopropanol.	57
6.18	Análisis de resultados de los modos cromatográficos estudiados.	59
6.19	Volumen de muestra recuperado en la prueba de optimización de la relación muestra-solvente.	64
6.20	Programa de cambios de la válvula de desvío.	67
6.21	Resultados de validación.	72

LISTADO DE FIGURAS

Figura		Página
5.1	Válvula de desvío. A) Posición de carga B) Posición de Inyección.	29
5.2	Método de la FDA para la determinación y cuantificación de acrilamida en alimentos.	32
5.3	Procedimiento para establecer el volumen de ruptura.	33
5.4	Procedimiento para establecer el perfil de elución.	34
5.5	Esquema del sistema utilizado para la preconcentración en línea. A) Válvula de desvío en posición de carga B) Válvula de desvío en posición de inyección.	37
6.1	Variación del factor de retención (k) para la columna Atlantis dC ₁₈ en función del % de modificador orgánico en la fase móvil, con H ₂ O como solvente polar.	45
6.2	Variación del factor de retención (k) en función del pH para la columna Atlantis dC ₁₈ .	46
6.3	Cromatogramas para a) acrilamida b) metacrilamida con columna Atlantis dC ₁₈ , en las mejores condiciones de separación.	47
6.4	Cromatograma de un estándar de acrilamida obtenido con la columna Intersil Ph. Fase móvil: H ₂ O:ACN (98:2).	48
6.5	Cromatograma de un estándar de acrilamida obtenido con la columna Discovery-Cyano. Fase móvil: ACN 100%.	50
6.6	Cromatograma de un estándar de acrilamida obtenido con la columna ISRP-GFFII. Fase móvil: HCOONH ₄ (100mM, pH 5):ACN (99:1).	51
6.7	Variación de k en función de la concentración de reactivo de par iónico (35°C).	52
6.8	Variación de k en función del % ACN presente en la fase móvil.	52
6.9	Variación del factor de retención (k) en par iónico en función de la temperatura de la columna.	53

6.10	Cromatogramas para a) acrilamida b) metacrilamida con columna Kromasil C ₈ , en las mejores condiciones de separación.	54
6.11	Variación de k en HILIC en función del contenido de agua.	55
6.12	Cromatogramas a) acrilamida b) metacrilamida con columna Atlantis HILIC sílica. Fase móvil ACN:agua (95:1).	57
6.13	Cromatograma de un estándar de acrilamida (3.55 µg/mL) para las columnas Kromasil C ₈ -Atlantis dC ₁₈ acopladas. Fase móvil agua. T° ambiente.	58
6.14	Cromatograma de un estándar de acrilamida (3.55 µg/mL) obtenido con las columnas Regis ISRP-Intersil Ph acopladas. Fase móvil HCOONH ₄ (100mM, pH 5):ACN (99:1). T° 32° C.	59
6.15	Gráfico para volumen de ruptura. Cartuchos HLB y WCX.	61
6.16	Gráfico para volumen de ruptura. Cartuchos ENV+.	61
6.17	Perfiles de elución realizados con estándares de acrilamida (3 µg/mL). A) Cartucho HLB, solvente agua. B) Cartucho HLB, solvente H ₂ O:MeOH (80:20). C) Cartucho WCX, solvente agua. D) Cartucho WCX, solvente MeOH. Perfiles de elución realizados con estándares de metacrilamida (3 µg/mL). E) Cartucho HLB, solvente agua:MeOH (80:20). F) Cartucho WCX, solvente agua. G) Cartucho WCX, solvente MeOH.	63
6.18	Gráfico para perfil de elución. Cartuchos ENV+.	64
6.19	Cromatogramas obtenidos con diferente cantidad de muestra utilizando agua como solvente de extracción. A) 1 g de muestra B) 2 g de muestra C) 3 g. de muestra.	65
6.20	Cromatogramas con diferente cantidad de muestra utilizando MeOH como solvente de extracción. A) 1 g de muestra B) 2 g de muestra	66
6.21	Cromatogramas obtenidos para una prueba de extracción con 10 g de muestra. A) Muestra sin adicionar B) Muestra adicionada.	67
6.22	Cromatogramas para la optimización del volumen de inyección con un estándar de 2 µg/mL utilizando la preconcentración en línea. A) Volumen de inyección de 90 µL B) Volumen de inyección de 50 µL.	68
6.23	Cromatogramas para la optimización del volumen de inyección	69

con un extracto de una muestra de 10 g utilizando la preconcentración en línea. A) Volumen de inyección de 90 μL
B) Volumen de inyección de 50 μL .

- | | | |
|------|--|----|
| 6.24 | Procedimiento de extracción y limpieza. | 70 |
| 6.25 | Cromatograma para un extracto blanco utilizando el procedimiento de extracción y limpieza establecido. | 71 |

RESUMEN

Q.F.B. Graciela Granados Guzmán
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Julio 2008

**Título del estudio: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA EN
TORTILLAS TOSTADAS DE MAÍZ**

Número de páginas: 112

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias
con Orientación Terminal en Química Biomédica**

Área de estudio: Química Analítica.

Propósito y Método de Estudio:

La acrilamida es una molécula muy polar y altamente soluble en agua. Es un compuesto neurotóxico, genotóxico y carcinogénico, catalogado como probable carcinógeno para humanos por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer. En el 2002 se reportó la presencia de niveles muy altos de acrilamida en alimentos horneados, fritos o asados ricos en carbohidratos. Este hallazgo ha generado gran preocupación a nivel mundial por el riesgo que representa para la salud pública y ha llevado a organismos internacionales a incluir a la acrilamida como un tema prioritario en la seguridad alimentaria. En este trabajo se presenta el desarrollo y validación de un método de extracción y limpieza para la acrilamida en tortillas tostadas de maíz. En la primera etapa del trabajo, se optimizaron las condiciones de separación para acrilamida por HPLC y se seleccionó el método más adecuado. Las condiciones óptimas se establecieron utilizando dos columnas acopladas, Regis ISRP-GFFII e Intersil Ph, con una fase móvil de HCOONH_4 (100mM):ACN (99:1) y un flujo de 0.8 mL/min a 32°C. La segunda etapa consistió en implementar un método de extracción y limpieza. Se estableció que la extracción debía realizarse con metanol por agitación simple. La limpieza se llevó a cabo en cartuchos de extracción en fase sólida WCX y ENV+. La acrilamida se cuantificó por el método de adición estándar.

El método propuesto se validó evaluando la linealidad en un intervalo de concentraciones de 0.175 a 0.530 $\mu\text{g/g}$, con coeficientes de correlación mayores a 0.99. La exactitud expresada como porcentaje de error presentó valores de 2.4 %. La precisión expresada como % DER se calculó en 6.8 %. El límite de detección fue de 0.017 $\mu\text{g/g}$ y el límite de cuantificación de 0.058 $\mu\text{g/g}$.

Conclusiones:

Se desarrolló un método preciso y exacto capaz cuantificar acrilamida a niveles bajos en tortillas de maíz tostadas. Debido a que no fue posible utilizar a la metacrilamida como estándar surrogado, y a que el uso de la calibración externa dio un error muy grande, se realizó la cuantificación por el método de adición estándar. Si bien, el uso de la cromatografía de líquidos con columnas acopladas permitió la separación de la acrilamida de algunas de las interferencias de la matriz, fue indispensable incluir una etapa exhaustiva de tratamiento de la muestra.

FIRMA DEL DIRECTOR



Dra. Rocío Castro Ríos

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A _s	Factor de asimetría
CL	Cromatografía de líquidos
CG	Cromatografía de gases
g	Gramo
HFBA	Ácido heptafluorobutírico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
k	Factor de retención
kg	Kilogramo
L	Litro
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
rpm	Revoluciones por minuto
T°	Temperatura
t' _R	Tiempo de retención ajustado
TFA	Ácido trifluoroacético
UV-Vis	Ultravioleta visible
w	Ancho del pico
°C	Grados centígrados
λ	Longitud de onda
μg	Microgramo
μg/L	Microgramo por litro

$\mu\text{g}/\text{kg}$	Microgramo por kilogramo
$\mu\text{g}/\text{g}$	Microgramo por gramo
μL	Microlitro
%	Porcentaje

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Características físicas y químicas de la acrilamida

La acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$; 2-propenamida) es un compuesto sólido, blanco y cristalino que carece de aroma, su peso molecular es de 71.08 g/mol. Es una molécula muy polar y altamente soluble en agua (2155 g/L a 30°C), tiene baja solubilidad en alcoholes (1550 g/L en metanol y 860 g/L en etanol) y en otros solventes orgánicos polares (396 g/L en acetonitrilo, 126 g/L en acetato de etilo y 631 g/L en acetona). Es muy poco soluble en solventes orgánicos no polares como heptano o tetracloruro de carbono (<1 g/L). La acrilamida tiene una densidad de 1.27 g/mL (25°C), su punto de fusión es de 84.5°C y su punto de ebullición (a 25 mmHg) es de 125°C ^[1-3].

La acrilamida, comparada con otros compuestos vinílicos monoméricos, tiene buena estabilidad térmica y una larga vida de anaquel. En pruebas realizadas para evaluar la estabilidad no hubo evidencia de formación de polímeros luego de tres semanas de almacenamiento a 50°C, también se probó someter muestras puras durante 24 horas a temperaturas de 80°C, las cuales presentaron poca o ninguna polimerización^[1]. La estabilidad de la acrilamida a la luz fue evaluada por irradiación con lámparas y se presentó poca formación de polímeros^[1].

Su estructura química incluye una función polar amida que le proporciona una alta solubilidad en agua y una función vinílica que le permite ser polimerizada rápida y exotérmicamente^[4]. La acrilamida exhibe propiedades de ácido y base débil. El doble enlace de la acrilamida es susceptible a un amplio rango de reacciones químicas que incluyen adiciones nucleofílicas, de Diels-Alder, y reacciones de radicales^[1].

1.2 Fuentes de exposición

La acrilamida es el monómero a partir del cual es sintetizada la poliacrilamida. Este polímero de gran peso molecular puede ser modificado con el fin de desarrollar propiedades aniónicas o catiónicas para usos específicos. El principal uso de la poliacrilamida se da en el tratamiento del agua potable, para eliminar partículas sólidas y otras impurezas. Se emplea también para el tratamiento de aguas residuales de las industrias. La poliacrilamida empleada en el tratamiento de aguas no debe contener más

de un 0.05 % del monómero residual. El polímero se une con las partículas del agua y forma fuertes agregados que rápidamente se eliminan dejando una solución clara^[5].

El agua con más de 10 mg/L de poliacrilamida puede ser empleada para lavar o pelar frutas y vegetales, pero el monómero de acrilamida no debe exceder el 0.2 %^[5].

La poliacrilamida es ampliamente utilizada en geles cromatográficos y electroforéticos. También se emplea en la fabricación de pegamentos, papel, cosméticos, para aumentar la recuperación de aceite, como espesante y en agentes acondicionadores del suelo. La poliacrilamida se emplea además en la elaboración de tintes y en los lentes de contacto; se utiliza en jabones como espesante, en fijaciones dentales, en productos para el cabello y lociones para el afeitado. En la industria textil la poliacrilamida se utiliza para hacer las prendas más resistentes a las arrugas; en materiales de construcción y se incorpora en el cemento para ralentizar el proceso de deshidratación y así aumentar la fuerza estructural^[5]. La acrilamida y la poliacrilamida se emplean también para la producción de plásticos^[6].

La poliacrilamida se puede emplear en las cápsulas de gelatina si el monómero no está presente en una cantidad superior al 0.2 %. Los polímeros de acrilamida también pueden ser utilizados en los envoltorios o envases de los alimentos, en este caso la cantidad de monómero de acrilamida tampoco debe superar el 0.2 % del peso del papel^[5].

Antes de descubrirse la presencia de altos niveles de acrilamida en alimentos sometidos a altas temperaturas de cocción, se consideraba como principales fuentes de esta sustancia al agua potable y al humo de tabaco^[6].

1.3 Efectos sobre la salud

En estudios toxicológicos se encontró que la repetida administración de acrilamida a animales de experimentación produce daño al sistema nervioso periférico (neuropatía periférica), mientras que con dosis altas se presenta atrofia muscular y testicular, así como una disminución en los parámetros de eritrocitos. En dos estudios de administración crónica en que se administró acrilamida por medio de agua para beber a roedores, aumentó la incidencia en tumores de mama, útero, glándulas adrenales, tiroides y testicular. En humanos no ha sido confirmada la acción carcinogénica, pero no puede ser descartada. Debido a esto la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasificó en 1994 a la acrilamida en la categoría 2A, es decir como una sustancia “probable carcinógena para humanos”. En general, las organizaciones evaluadoras tienen la opinión de que la acrilamida es genotóxica y carcinogénica^[7-8] porque causa mutaciones genéticas y daño en el ADN en estudios in vivo e in vitro, además de mutación en células germinales^[9].

Los efectos tóxicos de la acrilamida se han observado después de exposición por vía dérmica y oral, lo cual indica que la absorción ocurre por estas dos rutas. En estudios realizados en ratas, conejos, perros y otros animales de experimentación administrando

acrilamida por vía intravenosa se encontró que este compuesto atraviesa la placenta con una distribución uniforme. Se sabe también que la principal ruta de metabolismo de la acrilamida es mediante su conjugación con glutatión para producir la N-acetil-S-(3-amino-3-oxipropil) cisteína. La conjugación es catalizada enzimática y no enzimáticamente en hígado, cerebro y piel. Cabe mencionar que la mayor parte de la acrilamida es excretada conjugada con glutatión en la orina, además en heces fecales y la bilis^[10]. La acrilamida se metaboliza también a glincinamida, un compuesto muy reactivo formado por la epoxidación del doble enlace. La exposición a sustancias muy reactivas y de vida media corta en el cuerpo puede demostrarse a través de sus productos de reacción estables (aductos) con biomacromoléculas. En el caso de la acrilamida, los niveles de exposición pueden estimarse por la cantidad de aductos de hemoglobina-acrilamida (Hb-AA) y de hemoglobina-glincinamida (Hb-G)^[2].

1.4 Generación de acrilamida en alimentos

Como ya se mencionó, hasta hace unos 10 años se pensaba que las principales fuentes de exposición a este tóxico eran la ocupacional, el hábito de fumar (que es una fuente bien conocida de acrilamida) y el agua potable. Sin embargo, en 1997 Bergmark y colaboradores^[11] encontraron altos niveles de acrilamida en sangre no solamente en trabajadores expuestos, sino también en los controles negativos de personas no fumadoras. A partir de este hecho se produjo un importante esfuerzo por encontrar la causa de los altos niveles de acrilamida. Resultados obtenidos por Tareke y colaboradores^[12-13], mostraron que la acrilamida se produce durante el tratamiento

térmico en varios tipos de alimentos crudos como las papas. En el 2002, la Autoridad Alimentaria Nacional Sueca publicó el primer reporte en el que se indicaba que la acrilamida se genera a concentraciones muy altas en alimentos comunes, ricos en almidón. Esto sucedía durante el proceso de preparación, debido a las altas temperaturas de cocción, como en el caso de la fritura, el horneado o el asado^[11-16]. En general, no se encuentra acrilamida en alimentos que no han sido sometidos a tratamientos térmicos o en aquellos que sólo han sido hervidos^[17].

Los mayores niveles encontrados hasta ahora (del orden de $\mu\text{g/g}$) están en alimentos amiláceos como la papa y los cereales. Investigaciones en curso tratan de explicar con mayor claridad por qué se forma la acrilamida y las condiciones que promueven o reducen su presencia en los alimentos. La situación se complica por el hecho de que la acrilamida es una sustancia que puede reaccionar y autodegradarse después de su formación^[17].

Recientemente, los investigadores han enfocado sus estudios a los posibles mecanismos de formación de acrilamida en los alimentos^[18]. Algunos grupos han confirmado que la vía más probable por la que se sintetiza es la reacción de Maillard entre aminoácidos y azúcares reductores, siendo la asparagina, principal aminoácido libre presente en papas y cereales, un participante crucial en la producción de acrilamida por esta vía^[19].

Stadler y colaboradores^[20] encontraron que el calentamiento de cantidades equimolares de asparagina y glucosa a 180°C por 30 minutos producen 368 μmol de acrilamida por mol de asparagina. La formación es dependiente de la temperatura hasta 170°C, iniciándose a temperaturas más elevadas un proceso de autodegradación aún poco explicado. Otros aminoácidos que producen bajas cantidades de acrilamida son alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, metionina, treonina y valina.

En los estudios realizados por Taeymans y colaboradores^[21] se describe la formación inicial de *N*-(D-glucos-1-il)-L asparagina, la cual está en equilibrio con la base de Schiff. Usualmente, cuando esta reacción se produce en medio acuoso, sigue la vía que termina en la 1-amino-1-deoxicetosa de asparagina, conocida como el compuesto de Amadori, el cual representa el primer intermediario estable generado en un sistema acuoso. La base de Schiff puede experimentar una ciclación intramolecular resultando el derivado de la oxazolidina-5-ona; si este último compuesto se decarboxila se obtiene el compuesto de Amadori decarboxilado, que puede sufrir una β -eliminación resultando finalmente una molécula de acrilamida y un amino azúcar.

Además Yasuhara y colaboradores^[22] han demostrado que cuando la asparagina reacciona con el glicerol, se forma acrilamida en un nivel de 4.42 $\mu\text{g/g}$ de asparagina, pero no sucede lo mismo cuando este aminoácido reacciona con etilenglicol. El resultado sugiere que la formación de acrilamida necesita de una molécula de tres carbonos, como el glicerol, para su formación.

1.5 Legislación

La Unión Europea ha legislado respecto del límite máximo de acrilamida permisible en alimentos como consecuencia de la migración de la misma a partir de materiales plásticos como los envases, en este caso la acrilamida no debe ser encontrada en los alimentos en concentraciones mayores a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de alimento^[23]. Por otra parte, como ya se ha mencionado, la poliacrilamida también se emplea en la depuración de aguas debido a que se une a partículas sólidas haciendo más fácil que se retengan en el filtrado y puedan ser eliminadas. El riesgo de exposición en este caso puede provenir de las mínimas cantidades de la forma sin polimerizar que puedan estar presentes. El límite máximo de acrilamida en aguas de bebida establecido por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[24].

De acuerdo a diversos análisis realizados por grupos de estudio de Noruega, Suecia, Suiza, Reino Unido y Estados Unidos los niveles de acrilamida en diferentes alimentos oscilan entre 3500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ encontrados en papas fritas y concentraciones menores a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ encontrados en cerveza^[25]. En la Tabla 1.1 se presentan las concentraciones de acrilamida encontradas en una gran variedad de productos. Como puede observarse los niveles de acrilamida encontrados en algunos alimentos como los cereales, el pan suave y el café presentan concentraciones cien veces mayores a las permitidas en agua. A pesar de ello, aún no existe normativa^[26]. Lo más próximo a una legislación al respecto, es la propuesta 65 del estado de California en Estados Unidos, la cual derivó en una ley instaurada en 1986, cuyo nombre es *Safe Drinking Water and Toxic Enforcement Act*. Esta ley establece que los ciudadanos de California deben ser

informados, de forma pública y comprensible, sobre las sustancias de las que el Estado sepa que provocan cáncer, problemas fetales u otros daños reproductivos. Las sustancias que comprende esta legislación se encuentran enumeradas en un listado que se revisa anualmente, y en el cual la Acrilamida aparece desde 1990 como cancerígeno^[27].

Tabla 1.1 Niveles de acrilamida reportados en algunos alimentos^[26].

Alimentos	Concentración de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)			
	Media	Mediana	Mínimo-Máximo	Número de Muestras
Papas a la francesa/papas dulces	1312	1243	170-2287	38
Papas fritas	537	330	<50-3500	39
Productos empanizados	36	36	<30-42	2
Productos de repostería	112	<50	<50-450	19
Bisquetes, galletas estilo cracker, tostadas, pan frito	423	142	<30-3200	58
Cereales para el desayuno	298	150	<30-1346	29
Fritura de maíz	218	167	34- 416	7
Pan suave	50	30	<30-162	41
Pescado y productos del mar, fritos y empanizados	35	35	30-39	4
Pollo o piel de pollo frita o empanizada	52	52	39-64	2
Bebidas de malta instantáneas	50	50	<50-70	3
Polvo de chocolate	75	75	<50-100	2
Polvo de café	200	200	170-230	3
Cerveza	<30	<30	<30	1

1.6 Métodos para la determinación de acrilamida

Debido a la alta solubilidad en agua de la acrilamida, en la mayoría de los métodos analíticos reportados, la extracción se lleva a cabo utilizando agua a

temperatura ambiente^[6,9,12,14,28-36]. La muestra tiene que estar finamente dividida para asegurar una buena eficiencia de la extracción. Son necesarios sólo unos pocos minutos de agitación para dispersar la muestra en agua fría por lo tanto es una extracción relativamente rápida. Se han utilizado también como solventes de extracción agua a temperaturas de 65°C^[18,37] y 80°C^[38], metanol^[39-40], acetona^[41], acetonitrilo^[42], propanol^[43] y diclorometano^[44]. Durante el proceso de extracción no se recomienda el calentamiento o la ultrasonicación para evitar la formación de partículas pequeñas que causen problemas en las etapas posteriores de tratamiento^[41].

Los extractos obtenidos son generalmente sometidos a una etapa de limpieza por extracción en fase sólida (SPE) utilizando combinaciones de cartuchos de fase inversa (C₁₈, poliméricas)^[30-31,33-35,45], de intercambio iónico^[28-29,31,33,37,45] o fases mixtas^[6,14,29,31,35,38-39]; o bien se lleva a cabo una desproteización química utilizando la solución Carrez I (hexacianoferrato (II) de potasio) y Carrez II (sulfato de zinc)^[37,46].

La determinación de acrilamida se realiza por cromatografía líquida o por cromatografía de gases, siendo la espectrometría de masas el sistema de detección más empleado^[6,9,12,14,18,28-31,33-38,40,42-49].

El análisis por cromatografía de gases se lleva a cabo luego de una etapa previa de derivatización, por brominación^[12,40,46], en el cual se produce un compuesto mucho más volátil, de fácil identificación, por la relación isotópica característica del bromo (⁷⁹Br/⁸¹Br). Con la etapa de derivatización se logra una mejor selectividad, pero es un método tedioso que requiere largo tiempo, por lo que muchos investigadores prefieren

realizar el análisis directo. Sin embargo, la acrilamida no es un candidato natural para esto, pues los solventes polares que son requeridos para llevar a cabo una buena extracción no se adaptan correctamente a la inyección en una columna capilar. Además, como se trata de una molécula pequeña cuyo peso molecular es de 71 Da, no muestra un espectro de masas único o convincente^[41].

Sin embargo, un grupo de laboratorios ha persistido en la tarea de desarrollar un método directo para acrilamida por CG^[50]. La preparación de la muestra es rápida comparada con el método que incluye la derivatización de acrilamida, y evita el manejo de sustancias peligrosas y corrosivas. En este método la extracción del analito se lleva a cabo empleando solventes orgánicos como alcoholes o cetonas seguido de la limpieza de la muestra utilizando una extracción líquido/líquido. Sin embargo, hay que poner especial atención en la extracción del analito, volviéndose este paso más demandante que el proceso de brominación. Se requieren cuidados extra porque pueden extraerse precursores, que conducen a la formación de un artefacto durante el análisis por CG en el puerto de inyección^[51-53].

Debido a que la acrilamida es un compuesto muy polar y de baja volatilidad, el análisis se desarrolla en columnas capilares con fases de mediana a alta polaridad (por ejemplo 5%-fenil-polidimetilsiloxano, carbowax, polietilenglicol). El método de detección más utilizado es la espectrometría de masas^[34,42-43,54], y como estándar interno se han utilizado la acrilamida isotópicamente marcada^[42] y la metacrilamida^[34,44].

Durante los pasados 30 años la cromatografía líquida ha sido utilizada para determinar acrilamida en poliacrilamida, en suelos y en otras muestras ambientales. Actualmente, para el análisis de acrilamida en alimentos la cromatografía líquida ha cobrado gran importancia gracias a su alta sensibilidad y a que no es necesaria una derivatización previa. Diferentes fases estacionarias han sido utilizadas para la separación de acrilamida en cromatografía líquida, siendo las más ampliamente utilizadas en los trabajos publicados las de fase inversa (C₁₈, fenil-hexil)^[4,9,18,28,36,39,41,55]. Sin embargo por la alta polaridad de este analito es difícil obtener una buena retención y en muchos casos se observa coelución de componentes de la matriz que interfieren en la determinación y que hacen necesario implementar etapas exhaustivas de limpieza. Además en general, los métodos por fase inversa emplean esencialmente fases móviles acuosas, lo que es una desventaja en los acoplamientos con espectrometría de masas. Para la detección se reporta el uso de espectrometría de masas simple y en tándem con fuentes de electrospray. Se ha empleado también la detección ultravioleta, aunque es un sistema que tiene una menor sensibilidad y selectividad^[41].

Algunos grupos de investigación han trabajado en la obtención de anticuerpos para acrilamida con el objetivo de desarrollar un método de inmunoensayo (ELISA), teniendo como dificultades la reactividad de la acrilamida aunado al pequeño tamaño de la molécula^[41]. Sin embargo, recientemente Preston y colaboradores^[56], produjeron un anticuerpo policlonal capaz de unirse a acrilamida por la síntesis de un inmunógeno constituido de acrilamida derivatizada con ácido 3-mercaptopbenzoico, y su conjugación con la proteína acarreadora bovina tiroglobulina. Se produjo, así mismo, antisuero que mostró una gran afinidad por el inmunógeno desarrollado, y éste fue utilizado para

desarrollar la técnica de ELISA para detectar acrilamida. Este método mostró tener una alta especificidad por la acrilamida, con un límite de detección en muestras de agua de 65.7 µg/kg, límite que se considera bajo.

En los últimos años se han publicado artículos en los que se determinan niveles de acrilamida en diversos alimentos, principalmente papas ^[25,26,28-35,41], cereales ^[30-32,34-38], chocolate ^[28,39] y café ^[28,39,40]. La mayor parte de los alimentos estudiados son típicos de las dietas europeas, estadounidense y japonesa, más no de la dieta mexicana, cuya base es el maíz.

El maíz es un producto de muy alto consumo a nivel nacional, un cereal rico en carbohidratos, y que se prepara a altas temperaturas, características que lo hacen un candidato ideal para generar acrilamida.

Algunos grupos de investigación extranjeros han reportado la presencia de acrilamida en totopos, sin embargo los métodos utilizados han sido desarrollados para otro tipo de muestras y no son eficientes para la extracción de este compuesto en productos de maíz^[57-58]. Teniendo esto en consideración, planteamos la necesidad de desarrollar un método analítico confiable para la determinación de este compuesto en alimentos elaborados a base de maíz como lo son las tortillas tostadas.

CAPITULO 2

JUSTIFICACION

La acrilamida es un compuesto neurotóxico, genotóxico y carcinógeno.

En el 2002 se reportó por primera vez el hallazgo de niveles muy altos de acrilamida en alimentos horneados, fritos o asados ricos en carbohidratos, lo que llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a considerar a la acrilamida como un tema prioritario de seguridad alimentaria.

En México, el maíz es un alimento básico en la dieta y sus derivados reúnen las características para producir acrilamida; aunque hasta ahora la información al respecto es insuficiente.

Para establecer los niveles de este tóxico es necesario contar con un método analítico confiable, desarrollado específicamente para alimentos elaborados a base de maíz.

CAPITULO 3

OBJETIVO GENERAL

Establecer un método analítico para la determinación de los niveles de acrilamida en tortillas tostadas de maíz.

CAPITULO 4

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar las condiciones de separación para el análisis de acrilamida por HPLC.
2. Seleccionar el método más adecuado.
3. Implementar un procedimiento de extracción y limpieza para acrilamida en tortillas tostadas de maíz.
4. Validar el método desarrollado.

CAPITULO 5

MATERIAL Y METODOS

5.1 Reactivos

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes reactivos:

- Acetonitrilo, *Fischer Scientific*, Grado HPLC.
- Acido acético glacial, *Baker Analyzed*, 99.7 %.
- Acido fórmico, *Merck*, 98-100 %.
- Acido heptafluorobutírico (HFBA), *Aldrich*, 99 %.
- Acido trifluoroacético (TFA), *Sigma Aldrich*, ≥ 98 %.
- Agua, Laboratorios Monterrey, bidestilada plus.
- Agua desionizada, Pure Lab UHQII, Elga, Francia.
- Clorhidrato de hidroxilamina, *Baker Analyzed*, 100 %.
- Formato de amonio, *Riedel-de Haën*, 98 %.

- Hidróxido de sodio, *Fluka*, ≥ 98 %.
- Isopropanol, *Fermont*, Grado HPLC.
- Metanol, *Fermont*, Grado HPLC.
- Solución de hidróxido de amonio, *Fluka*, 98 %.

Los estándares utilizados fueron:

- Acrilamida, *Fluka*, ≥ 99.8 %.
- Metacrilamida, *Fluka*, ≥ 98 %.

Soluciones estándar de acrilamida y metacrilamida

Para el desarrollo de este estudio se utilizó una solución concentrada de acrilamida (2 mg/mL) disuelta en agua bidestilada plus; las soluciones de trabajo empleadas (50, 40, 12, 8, 5, 4, 3.55, 2.4, 0.8 y 0.48 $\mu\text{g/mL}$) se prepararon por medio de diluciones.

Los estándares de metacrilamida se prepararon también a partir de una solución concentrada (2 mg/mL) y los estándares de trabajo se prepararon por medio de diluciones.

Preparación de fases móviles

Todas las fases móviles que se utilizaron fueron filtradas con membranas de nylon de 47 mm, 0.45 μm de poro (Pall Corporation, USA) y sonicadas por 15 minutos para su desgasificación.

Las fases móviles acuosas fueron preparadas con agua desionizada obtenida con un equipo Pure Lab UHQII, Elga, Francia. En la tabla 5.1 se presentan las soluciones utilizadas.

Tabla 5.1. Soluciones utilizadas como fases móviles.

Soluciones	Concentración	pH	
Acido acético glacial (CH_3COOH)	10 mM	5	pH ajustado con hidróxido de amonio
Acido fórmico (HCOOH)	10 mM	3	pH ajustado con formiato de amonio
Acido fórmico (HCOOH)	0.1%		
Acido heptafluorobutírico (HFBA)	40, 100 y 200 mM	3	pH ajustado con hidróxido de amonio
Acido trifluoroacético (TFA)	40, 30 y 200 mM	3	pH ajustado con hidróxido de amonio
Formiato de Amonio (HCOONH_4)	100 mM		
Hidroxilamina (NH_2OH)	10 mM	6.5	pH ajustado con hidróxido de amonio

5.2 Material

Para la etapa de desarrollo del método cromatográfico, se utilizaron las siguientes columnas:

- Atlantis dC₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.3 μm ; Waters Corporation, USA).

- Atlantis dC₁₈ (150 x 2.1 mm, 1,3 µm; Waters Corporation, USA).
- Atlantis HILIC sílica (100 x 2.1 mm, 3µm; Waters Corporation, Milford MA, USA).
- Kromasil C₈ (150 x 2 mm, 3.5µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA).
- Kromasil C₁₈ (150 x 4.6 mm, 3 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA).
- Intersil Ph (260 x 4.6 mm, 6µm; GL Sciences Inc., Torrance, CA, USA).
- Discovery Cyano (150 x 4.6 mm, 5µm; Supelco, Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA).
- ISRP-GFFII (150 x 4.6 mm, 5µm; Regis Technologies Inc., Morton Grove, IL, USA).

En la fase de implementación del procedimiento de extracción y limpieza de la muestra se utilizaron los siguientes cartuchos de SPE:

- Fase inversa Oasis HLB 200 mg, 6 mL (Waters Corporation, Milford MA, USA).
- Fase mixta Oasis WCX 30 mg, 1 mL (Waters Corporation, Milford MA, USA).
- Copolímero de poliestireno-divinilbenceno hidroxilado Isolute ENV+ 500 mg, 3 mL (Biotage, Charlottesville, Virginia, USA).

Además durante el procedimiento de extracción se utilizaron filtros para centrífuga Ultrafree-CL de tamaño de poro 0.45 µm, con membrana Durapore PVDF, con capacidad de 2 mL (Millipore, Bedford, MA, USA).

Todos los extractos se filtraron antes de la inyección en HPLC con filtros de jeringa Acrodisc, con membrana de nylon de un diámetro de 13 mm y poro de 0.45 μm (Pall Corporation, East Hills, NY, USA).

En el desarrollo del presente trabajo, se utilizaron los siguientes equipos:

- Agitador rotatorio Unimax 1010, Heidolph Instruments, (Kelheim, Alemania).
- Balanza analítica GR-120, AND, (Tokio, Japón).
- Balanza semianalítica GX-200, AND, (Tokio, Japón).
- Baño de ultrasonido, Bransonic 3510, Branson, (Danbury, CT, USA).
- Bomba de vacío, Modelo SA55NXGTE-4870, Emerson, (St. Louis, M.O., USA).
- Centrífuga IEC Centra CL3, Thermo Scientific, (Waltham, MA, USA).
- Cromatógrafo de líquidos Alliance 2690, Waters (Milford MA, USA) equipado con un sistema de bombeo cuaternario, inyector automático y un detector UV-Vis de arreglo de diodos Waters 996.
- Cromatógrafo de líquidos Chance Analítico, Knauer (Berlín, Alemania), con bomba de doble pistón K-120, válvula de inyección manual A-1357 y detector UV de longitud de onda fija K-2001.
- Bomba de doble pistón K-120, Knauer (Berlín, Alemania).
- Válvula de desvío A-1357, Knauer (Berlín, Alemania).

- Cromatógrafo de líquidos HP 1100 (Hewlett Packard, Santa Clara CA, USA). Equipado con desgasificador, sistema de bombeo cuaternario, inyector automático, detector de UV variable.
- Estación de vacío para SPE con 12 posiciones, Phenomenex (Torrance, California, USA).
- Potenciómetro pH 209, Hanna Instruments (Woonsocket, RI, USA).
- Plancha de calentamiento CIMAREC, Barnstead Internacional, (Dubuque, Iowa, USA).
- Rotavapor Büchi RE 121, equipado con baño de agua Büchi 461, (Flawil, Suiza).
- Vórtex Thermolyne Tipo 37600, Barnstead Internacional, (Dubuque, Iowa, USA).

5.3 Características de la muestra

Se utilizaron como matriz modelo tortillas de maíz tostadas marca Milpa Real, elaboradas por Bimbo, S.A. de C.V. En el desarrollo de la validación se utilizó como matriz modelo tostadas de maíz horneadas marca Sanissimo, S.A. de C.V. Todas las tostadas fueron trituradas y homogenizadas con ayuda de un mortero de porcelana.

5.4 Método cromatográfico

Se establecieron las condiciones óptimas de separación en tres diferentes modos cromatográficos, utilizando a la metacrilamida como estándar surrogado.

La optimización se realizó con inyecciones de 20 μL de una mezcla de estándares de acrilamida y metacrilamida (5 $\mu\text{g/mL}$) a una λ de lectura de 210 nm. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y en todos los casos se analizaron blancos de solvente.

5.4.1 Cromatografía de fase inversa

Se utilizaron 4 diferentes columnas en las que se optimizaron las condiciones de separación, una columna C_{18} , una fase inversa-fenil, una fase inversa-ciano y una fase inversa-exclusión molecular.

Con la columna Atlantis dC_{18} , las pruebas se realizaron utilizando un flujo de fase móvil de 0.3 mL/min, el equipo Alliance 2690 y metacrilamida como estándar surrogado. Con las columnas ISPR-GFFII, Intersil Ph y Discovery-Cyano, se utilizó un flujo de 1 mL/min y los análisis se hicieron en el equipo HP 1100. Para estas columnas no se evaluó la metacrilamida como estándar surrogado. En la tabla 5.2 se presentan las

columnas, fases móviles y proporciones que se estudiaron para establecer las condiciones óptimas de trabajo.

Tabla 5.2. Columnas de fase inversa y condiciones evaluadas.

Columna	Fase móvil		Proporción					Flujo (mL/min)	
Atlantis dC ₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.3 μm)	H ₂ O	ACN	100:0	99:1		95:5	90:10	0.3	
		MeOH							
	Buffer HCOOH (10 mM, pH 3)	ACN	100:0	99:1		95:5	90:10	0.3	
		MeOH							
	Buffer CH ₃ COOH (10 mM, pH3)	ACN	100:0	99:1		95:5	90:10	0.3	
		MeOH							
	Buffer NH ₂ OH (10 mM pH 6.5)	ACN	100:0	99:1		95:5	90:10	0.3	
		MeOH							
	Intersil Ph (260 x 4.6 mm, 6 μm)	H ₂ O	ACN			98:2	95:5		1.0
			MeOH						
		Isopropanol	100:0						1.0
	Discovery Cyano (150 x 4.6 mm, 5 μm)	H ₂ O	ACN				5:95	10:90	1.0
MeOH									
ACN		100						1.0	
	Isopropanol	100						1.0	
ISRP GFFII (150 x 4.6 mm, 5 μm)	H ₂ O	ACN			98:2			1.0	
		MeOH							
	HCOOH (100 mM)	ACN			98:2			1.0	
		MeOH							
	HCOOH (100 mM)	ACN		99:1	98:2			1.0	
		MeOH							

5.4.2 Cromatografía de par iónico

Se utilizó una columna Kromasil C₈, el flujo de la fase móvil fue de 0.2 mL/min y todos los experimentos se realizaron en el equipo Alliance 2690. Como fase móvil se

probaron dos reactivos formadores de pares iónicos: el ácido heptafluorobutírico (HFBA) y el ácido trifluoroacético (TFA), a diferentes concentraciones y a pH 3. Se utilizó ACN en todos los casos. Se evaluó la temperatura de la columna en un intervalo de 30 a 40°C. En la Tabla 5.3 se presentan las condiciones utilizadas.

Tabla 5.3. Fases móvil utilizadas para cromatografía de par iónico.

Fase móvil	Proporción		Temperatura (°C)	Flujo (mL/min)
HFBA (40 mM):ACN	99:1		35	0.3
HFBA (100 mM):ACN	99:1		35	0.3
TFA (40 mM):ACN	99:1		40	0.3
TFA (40 mM):ACN	99:1		37.5	0.3
TFA (40 mM):ACN	99:1		35	0.3
TFA (130 mM):ACN	99:1	95:5	35	0.3
TFA (200 mM):ACN	99:1		35	0.3
TFA (200 mM):ACN	99:1		30	0.3

5.4.3 Cromatografía de interacciones hidrofílicas

Se utilizó una columna Atlantis HILIC sílica, todos los experimentos se realizaron utilizando un flujo de fase móvil de 0.3 mL/min, el equipo Alliance 2690 y la columna a temperatura ambiente. Como fase móvil se utilizaron distintas proporciones de ACN y solvente polar a distinto pH. En la tabla 5.4 se muestran las condiciones que se utilizaron.

Como solventes polares se probaron: H₂O, buffer de ácido fórmico (HCOOH: 10mM, pH 3), buffer de ácido acético (CH₃COOH: 10mM, pH 5), buffer de hidroxilamina (NH₂OH: 10mM pH 6.5), MeOH, isopropanol y TFA al 1%.

Tabla 5.4. Fases móviles utilizadas para cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC).

Fase móvil	Proporciones				
	99:1	95:5	90:10	60:40	40:60
H ₂ O:ACN	99:1	95:5	90:10	60:40	40:60
Buffer HCOOH (10 mM, pH 3):ACN	99:1	95:5	90:10	60:40	40:60
Buffer CH ₃ COOH (10 mM, pH 5):ACN	99:1	95:5	90:10	60:40	40:60
MeOH:ACN	99:1	95:5			
Isopropanol:ACN	99:1	95:5	90:10		
TFA (1%, pH 3):ACN		95:5	90:10		

5.4.4 Columnas acopladas

Se acoplaron dos columnas cromatográficas por medio de tubería de PEEK[®] y se evaluaron los resultados con las fases móviles que tuvieron mejores resultados en las columnas individualmente. Se inyectaron estándares de acrilamida al máximo flujo que permitió el acoplamiento.

Se acoplaron las columnas Kromasil C₈ y Atlantis dC₁₈ y se utilizó en todas las pruebas como fase móvil agua, un flujo de 0.1 mL/min, la columna a temperatura ambiente y el equipo Chance Analítico Knauer.

También se acoplaron las columnas de fase inversa ISRP-GFFII e Intersil Ph. El análisis se llevó a cabo en el equipo HP 1100 y se utilizó como fase móvil HCOONH₄:ACN (99:1) con un flujo de 0.8 mL/min a 32°C para controlar la presión. Este acoplamiento se realizó directamente con un tubo de PEEK[®] y utilizando una válvula de desvío. En la figura 5.1 se presenta un esquema del montaje utilizado con la válvula de desvío. Cuando la válvula se encuentra en la posición de carga, el analito que ha sido inyectado por la bomba HP pasa por la columna ISRP-GFFII y se dirige al desecho, mientras que la fase móvil proveniente de la bomba Knauer se dirige a la columna Intersil y después al detector, tal y como se observa en la figura 5.1 (A). En el momento del cambio de válvula a la posición de inyección, el solvente proveniente de la bomba Knauer se dirige a la columna ISRP-GFFII, después hacia la columna Intersil Ph y posteriormente al detector, mientras que la fase móvil de la bomba HP va al desecho. Esto se ilustra en la figura 5.1 (B).

5.4.5 Selección del modo cromatográfico

Los criterios utilizados para elegir el mejor sistema cromatográfico fueron:

a) Tiempo de retención ajustado (t'_R)^[59], que se calculó con la siguiente fórmula:

$$t'_R = t_R - t_M$$

donde:

t_R = Tiempo de retención

t_M = Tiempo muerto

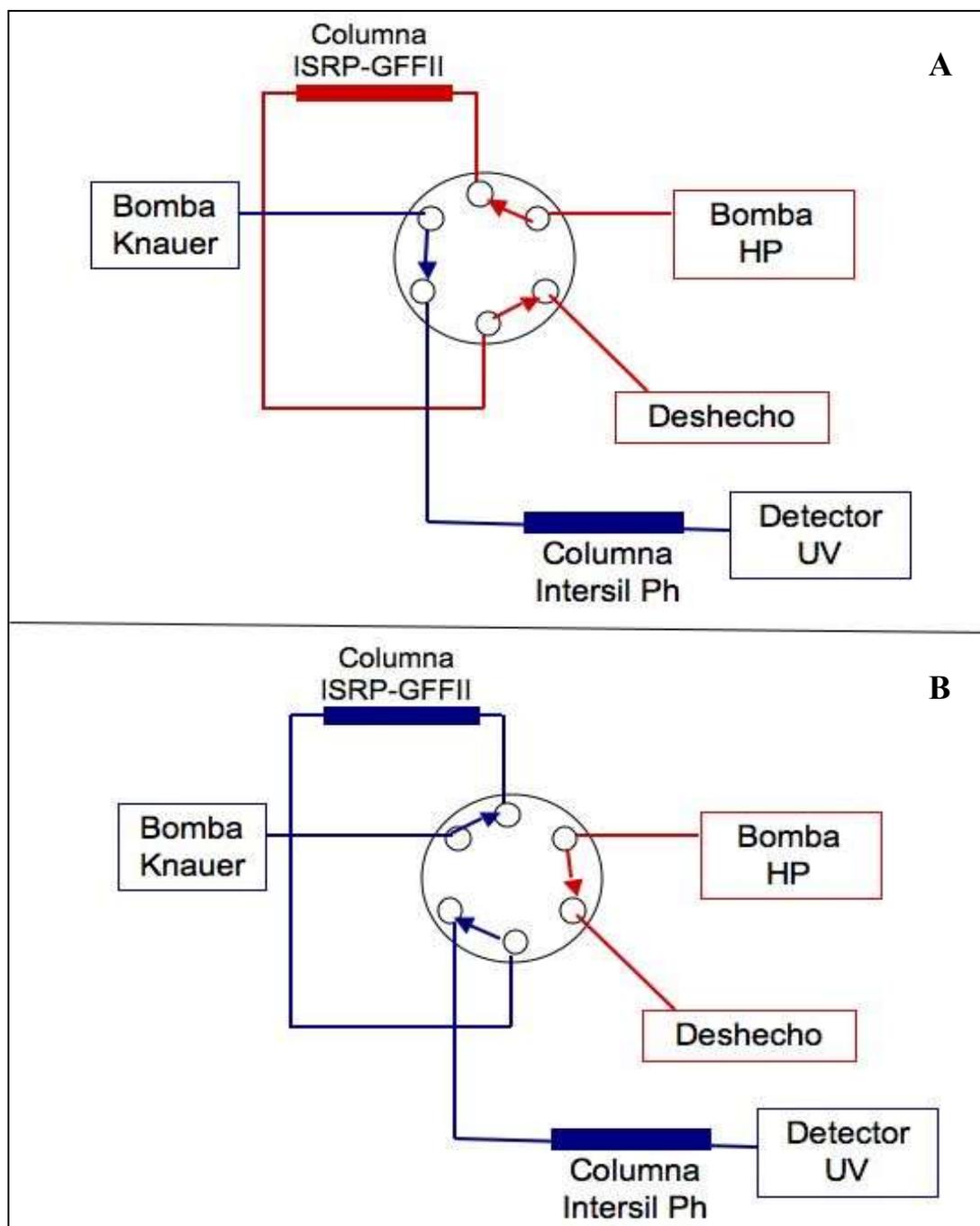


Figura 5.1. Válvula de desvío. A) Posición de carga B) Posición de inyección

b) Factor de retención (k)^[59], que se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$k = \frac{t'_R}{t_M}$$

donde:

t'_R = Tiempo de retención ajustado

t_M = Tiempo muerto

En cuanto a este parámetro el valor óptimo debe estar entre 1 y 5^[59].

c) Factor de asimetría (A_s)^[60], calculado con la siguiente fórmula:

$$A_s = \frac{(t_f - t'_R)}{(t'_R - t_i)}$$

donde:

t'_R = Tiempo de retención ajustado

t_i = Tiempo inicial del pico

t_f = Tiempo final del pico

Se considera que cuando el factor de asimetría es igual a 1, el pico es simétrico^[60].

d) Resolución entre acrilamida y metacrilamida (R_s)^[59], que se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

donde:

t_{R2} = Tiempo de retención del pico 2

t_{R1} = Tiempo de retención del primer pico

W_1 = Ancho del pico 1

W_2 = Ancho del pico 2

Se considera que un pico está completamente separado del siguiente cuando el valor de la resolución es mayor a 1.5^[59].

5.5 Método de extracción y limpieza

Para conseguir una buena eficiencia en la extracción y poder así alcanzar la sensibilidad requerida para la detección de acrilamida en la matriz de estudio, se realizaron modificaciones al método propuesto por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para la determinación y cuantificación de acrilamida en alimentos^[61], del cual se muestra un esquema en la figura 5.2.

Este procedimiento se divide en dos etapas: la parte de extracción y la parte de limpieza de la muestra, y en ambas se realizaron ajustes para lograr la optimización.

En todos los casos la extracción se llevó a cabo adicionando el solvente de extracción a la muestra previamente triturada y homogenizada con ayuda de un mortero de porcelana. La extracción se realizó por agitación simple utilizando primero un vórtex por 2 minutos y posteriormente un agitador rotatorio a una velocidad de 182 rpm durante veinte minutos. La mezcla se centrifugó a 4600 rpm por 15 minutos y la porción acuosa resultante se filtró con filtros para centrífuga Ultrafree CL con un tamaño de poro de 0.45 μm a 4600 rpm por 5 minutos. La limpieza de las muestras se llevó a cabo utilizando cartuchos de extracción en fase sólida, en los que se estableció el volumen de ruptura y el perfil de elución.

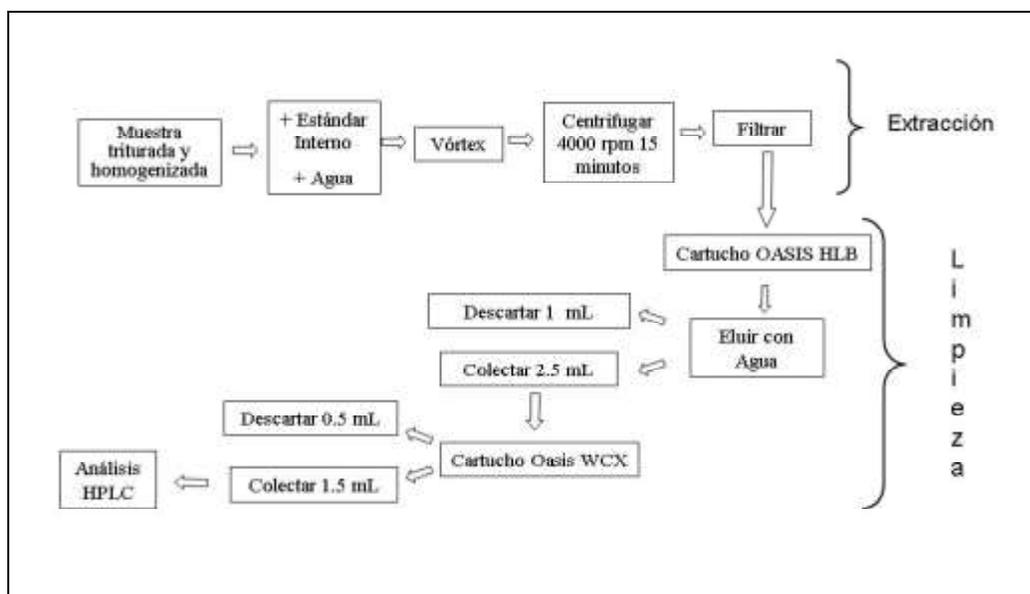


Figura 5.2. Método de la FDA para la determinación y cuantificación de acrilamida en alimentos^[61].

5.5.1 Volumen de ruptura

El volumen de ruptura se realizó para todos los cartuchos de extracción en fase sólida. Se acondicionaron los cartuchos con 3.5 mL de MeOH y 3.5 mL de agua, posteriormente se pasaron 15 mL de estándar de acrilamida ($3 \mu\text{g/mL}$) y se colectaron fracciones de 1.5 mL que fueron analizadas por HPLC. En la Figura 5.3 se muestra el procedimiento general.

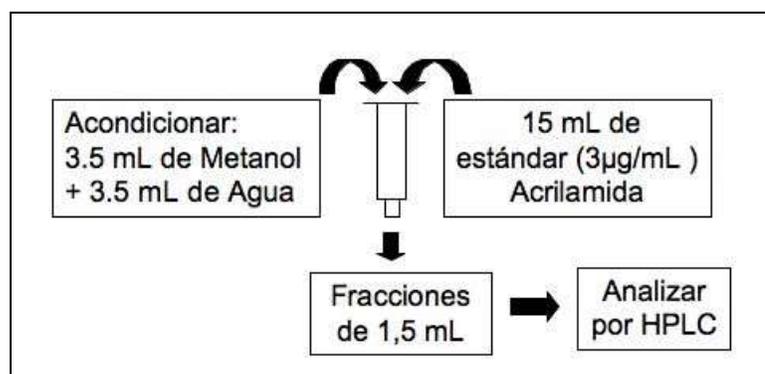


Figura 5.3. Procedimiento para establecer el volumen de ruptura.

5.5.2 Perfil de elución

El perfil de elución se realizó en todos los cartuchos de extracción en fase sólida. Se acondicionaron los cartuchos con 3.5 mL de MeOH y 3.5 mL de agua, posteriormente se pasaron 1.5 mL de estándar de acrilamida ($3 \mu\text{g/mL}$) y se realizó la elución con 8.5 mL del solvente correspondiente. En la Figura 5.4 se presenta un diagrama con el procedimiento general. En los cartuchos HLB y WCX, se llevo a cabo este procedimiento también con metacrilamida. En la tabla 5.5 se presentan los solventes de elución que se utilizaron en cada cartucho.

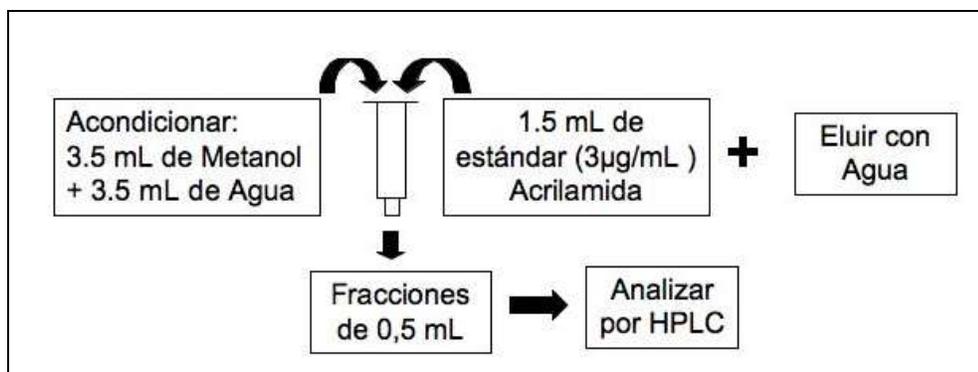


Figura 5.4. Procedimiento para establecer el perfil de elución.

Tabla 5.5. Solventes de elución para los cartuchos de extracción en fase sólida en los que se estableció el perfil de elución.

Cartucho	Solvente de elución
Oasis HLB	H ₂ O
	H ₂ O:MeOH (80:20)
Oasis WCX	H ₂ O
ENV +	H ₂ O
	MeOH

5.5.3 Optimización de la relación muestra-solvente

Para establecer la relación óptima muestra-solvente, se pesó una cantidad determinada de muestra y se agregaron 10 mL de solvente, se mezcló en vórtex por 2 minutos y posteriormente en un agitador rotatorio por 20 min. Finalmente se centrifugó a 4600 rpm por 20 minutos. El volumen de porción acuosa resultante, se midió en una probeta de 10 mL. En la tabla 5.6 se muestran las pruebas realizadas. Cabe mencionar que en los experimentos en los que se utilizaron 1, 2 y 3 g, las muestras fueron

adicionadas con acrilamida a un nivel de 3 $\mu\text{g/g}$ y sometidas al procedimiento de limpieza.

Tabla 5.6. Optimización de la relación muestra-solvente utilizando agua.

Cantidad de Muestra (g)	Volumen de agua (mL)	Extracciones
1	10	1
2	10	1
2.5	10	1
3	10	1
3.5	10	1
4	10	1

En las pruebas en las que el metanol se utilizó como solvente de extracción, el extracto final se evaporó y se reconstituyó con 1.5 mL de agua, posteriormente se realizó el procedimiento de extracción y limpieza. La tabla 5.7 muestra las pruebas realizadas.

Tabla 5.7. Optimización de la relación muestra-solvente utilizando metanol.

Cantidad de Muestra (g)	Volumen de metanol (mL)	Adición de Estándar de acrilamida	Extracciones
1	10	3 $\mu\text{g/g}$	3
2	10	3 $\mu\text{g/g}$	3
10	100	0.355 $\mu\text{g/g}$	3

5.5.4 Concentración de extractos

Cuando se extrajo con metanol, para conseguir una mejor señal de la acrilamida, se decidió incluir dos etapas de concentración de los extractos por evaporación a presión

reducida, utilizando un rotavapor con una temperatura de 37°C y una velocidad de 120 rpm.

La primera etapa se llevó a cabo después de la extracción por agitación simple, donde se reconstituyó con agua. La segunda etapa se realizó después de la limpieza en los cartuchos de extracción en fase sólida.

5.5.5 Preconcentración en línea

Se utilizó el cromatógrafo de líquidos Knauer, modelo Chance Analítico, con una bomba K-120 y una válvula de desvío adicionales. Para la preconcentración se utilizó una columna Atlantis dC₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.3 µm) y para el análisis las columnas Atlantis dC₁₈ (150 x 2.1 mm, 1.3 µm) y Kromasil C₈ (150 x 2 mm, 3.5 µm) acopladas. Se utilizaron estándares de acrilamida y metacrilamida de 3 µg/ml. El esquema del montaje utilizado se muestra en la figura 5.5. En la figura 5.5(A) la válvula de desvío se encuentra en la posición de carga, la bomba de preconcentración envía la muestra inyectada a la columna de preconcentración donde es retenida, y el solvente se dirige al desecho. Mientras que el solvente proveniente de la bomba de separación pasa por las columnas de separación y al detector UV. Cuando la válvula de desvío se encuentra en la posición de inyección (figura 5.6 B), la fase móvil de la bomba de separación pasa a través de la columna de preconcentración, pero en sentido contrario, arrastrando así los analitos hacia las columnas de separación y hacia el detector UV. El contenido de la bomba de preconcentración se dirige al desecho.

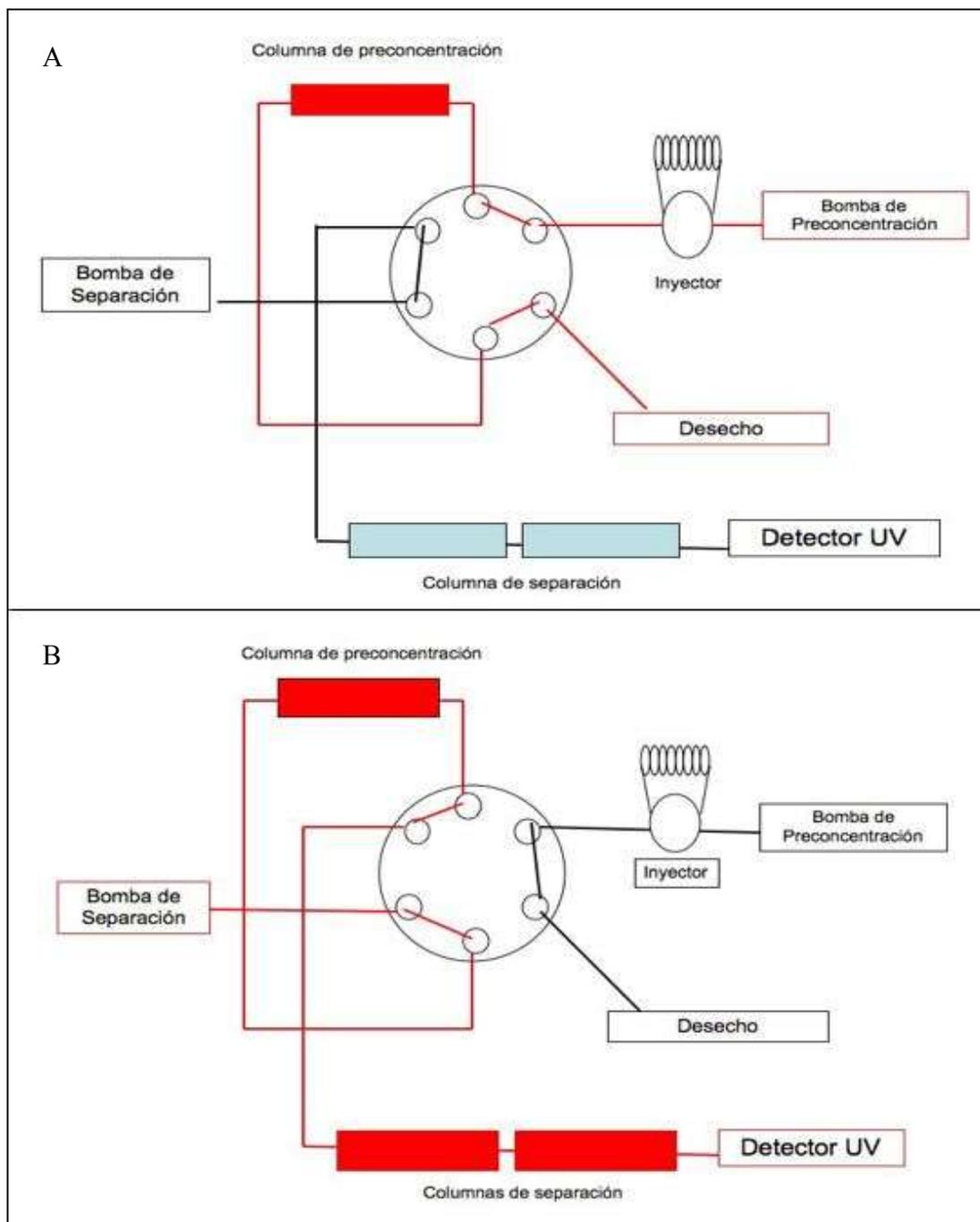


Figura 5.5. Esquema del sistema utilizado para la preconcentración en línea.
A) Válvula de desvío en posición de carga B) Válvula de desvío en posición de inyección.

Para determinar el tiempo de cambio de posición de la válvula de desvío se realizaron pruebas con estándares de acrilamida y metacrilamida, utilizando sólo la columna de preconcentración (Atlantis dC₁₈, 100 x 2.1 mm, 1.3 µm).

Para determinar el volumen máximo de inyección, se realizaron pruebas inyectando 50 µL y 90 µL de un estándar de 2 µg/mL de acrilamida, así como de extractos adicionados con 0.355 µg/g de acrilamida.

5.5.6. Recuperación

La recuperación se calculó utilizando muestras blanco y muestras adicionadas a un nivel de 0.175 µg/g. Para la cuantificación se utilizó una curva de calibración con estándares de acrilamida preparados en agua en un rango de concentración de 0.48 a 8 µg/mL. La recuperación se calculó con la siguiente fórmula^[63]:

$$\%R = \frac{C_1 - C_2}{C_{añadida}} \times 100$$

donde:

% R= Porcentaje de recuperación

C₁= Concentración calculada para la muestra adicionada

C₂= Concentración calculada para la muestra sin adicionar

C_{añadida}= Concentración añadida

5.6 Cuantificación

Debido a que no se utilizó la metacrilamida como estándar surrogado, se evaluaron como métodos de cuantificación la estandarización externa y la adición estándar.

5.6.1 Estandarización externa

En la estandarización externa se analizaron muestras blanco y muestras adicionadas con 0.175 $\mu\text{g/g}$ de acrilamida utilizando una solución estándar, que se sometieron al método de extracción y limpieza establecidos y se analizaron por HPLC.

Para la cuantificación se utilizaron estándares preparados en agua a 5 niveles de concentración, con los que se construyó la curva de calibración, se realizó la regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la recta, con esta ecuación se calculó la concentración de acrilamida. Las concentraciones de los estándares utilizados se presentan en la tabla 5.8.

Tabla 5.8. Estándares utilizados en la curva de calibración utilizada para la cuantificación por estandarización externa.

Es lar	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
1	0.48
2	0.8
3	2.4
4	4.0
5	8.0

Se calculó el porcentaje de error relativo, utilizando la siguiente fórmula^[59]:

$$\% \text{ Error Relativo} = \frac{\text{Concentración obtenida} - \text{Concentración esperada}}{\text{Concentración esperada}} \times 100$$

5.6.2 Adición estándar

Para la cuantificación por adición estándar, se adicionó la muestra a 3 niveles de concentración, que se muestran en la tabla 5.9. A todas las muestras se les sometió al proceso de extracción y limpieza establecido y se analizaron por HPLC.

Tabla 5.9. Niveles de concentración utilizados en la curva de calibración utilizada para la cuantificación por adición estándar.

Es lar	Concentración (µg/g)
1	Muestra + 0.175
2	Muestra + 0.355
3	Muestra + 0.530

Con los resultados que se obtuvieron para las muestras adicionadas, se construyó la curva de calibración, se realizó una regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la recta, con esta ecuación se calculó la concentración de acrilamida. Se calculó el porcentaje de error relativo, utilizando la siguiente fórmula^[59].

$$\% \text{ Error Relativo} = \frac{\text{Concentración obtenida} - \text{Concentración esperada}}{\text{Concentración esperada}} \times 100$$

5.7 Validación

De acuerdo a las recomendaciones de la US-FDA^[61] para evaluar el método propuesto se determinaron la linealidad, la exactitud, la precisión, el límite de detección y el límite de cuantificación. Se utilizó el método de adición estándar para realizar la cuantificación.

5.7.1 Linealidad

Se construyó una curva de calibración adicionando la muestra con estándar de acrilamida a 3 niveles de concentración (tabla 5.9) por cuadruplicado, estas muestras fueron sometidas al procedimiento de extracción y limpieza. Se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y se confirmó la relación lineal con los coeficientes de correlación y determinación.

5.7.2 Exactitud y precisión

Se prepararon muestras blanco y muestras adicionadas a 3 niveles de concentración, que se analizaron por cuadruplicado. Las muestras se prepararon pesando 4 g de muestra, a las muestras adicionadas se les añadió 0.175, 0.355 y 0.530 $\mu\text{g/g}$ de estándar de acrilamida. Todas las muestras se sometieron al procedimiento de extracción y limpieza establecido.

Para evaluar la exactitud se calculó el porcentaje de error relativo, con la fórmula^[59]:

$$\% \text{ Error Relativo} = \frac{\text{Concentración obtenida} - \text{Concentración esperada}}{\text{Concentración esperada}} \times 100$$

Para evaluar la precisión se calculó la desviación estándar relativa, con la fórmula^[64]:

$$\%DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

donde:

% DER = Desviación estándar relativa

s = Desviación estándar

\bar{x} = Media

5.7.3 Límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección se determinó considerando una relación Señal/Ruido de 3^[64].

El límite de cuantificación se determinó considerando una relación Señal/Ruido de 10^[64].

CAPITULO 6

RESULTADOS

6.1 Desarrollo del método cromatográfico

Los resultados de la optimización de las condiciones de trabajo para los diferentes modos cromatográficos estudiados se presentan a continuación.

6.1.1 Cromatografía de fase inversa

6.1.1.1 Columna Atlantis dC₁₈

En las tablas 6.1, 6.2, 6.3 y 6.4 se presentan los resultados obtenidos utilizando como modificadores orgánicos ACN y MeOH a distintas proporciones. En la Figura 6.1

se presenta una gráfica que muestra el comportamiento del factor de retención (k) cuando se utilizaron diferentes proporciones de modificador orgánico y agua.

Tabla 6.1. Parámetros cromatográficos obtenidos en la columna Atlantis dC₁₈ utilizando agua.

Fase móvil	t'_R	k	A_S	R_S
H ₂ O	0.93	0.79	1.38	6.03
H ₂ O:ACN (99:1)	0.69	0.58	1.88	5.43
H ₂ O:ACN (95:5)	0.32	0.25	1.19	3.48
H ₂ O:ACN (90:10)	0.17	0.14	1.13	1.87
H ₂ O:MeOH (99:1)	0.82	0.69	1.49	0.00
H ₂ O:MeOH (95:5)	0.54	0.46	2.07	4.41
H ₂ O:MeOH (90:10)	0.36	0.31	1.75	3.43

Tabla 6.2. Parámetros cromatográficos obtenidos en la columna Atlantis dC₁₈ utilizando ácido fórmico (HCOOH, 10 mM, pH 3).

Fase móvil	t'_R	k	A_S	R_S
Buffer HCOOH (10 mM, pH 3)	1.01	0.86	1.94	6.36
Buffer HCOOH (10 mM, pH 3):ACN (99:1)	0.33	0.22	1.23	6.40
Buffer HCOOH (10 mM, pH 3):ACN (95:5)	0.17	0.13	0.65	3.30
Buffer HCOOH (10 mM, pH 3):ACN (90:10)	0.13	0.10	0.88	1.89
Buffer HCOOH (10 mM, pH 3):MeOH (99:1)	0.78	0.66	1.92	5.89
Buffer HCOOH (10 mM, pH 3):MeOH (95:5)	0.47	0.40	1.70	5.00
Buffer HCOOH (10 mM, pH 3):MeOH (90:10)	0.21	0.17	1.92	3.43

Tabla 6.3. Parámetros cromatográficos obtenidos en la columna Atlantis dC₁₈ utilizando ácido acético (CH₃COOH, 10 mM, pH 5).

Fase móvil	t' _R	k	A _S	R _S
Buffer CH ₃ COOH (10 mM pH 5)	1.06	0.91	2.80	6.67
Buffer CH ₃ COOH (10 mM pH 5):ACN (99:1)	0.70	0.61	1.85	5.91
Buffer CH ₃ COOH (10 mM pH 5):ACN (95:5)	0.41	0.37	2.13	3.52
Buffer CH ₃ COOH (10 mM pH 5):ACN (90:10)	0.35	0.32	1.88	1.72
Buffer CH ₃ COOH (10 mM pH 5):MeOH (99:1)	0.79	0.68	1.34	5.46
Buffer CH ₃ COOH (10 mM pH 5):MeOH (95:5)	0.51	0.44	1.17	5.14

Tabla 6.4. Parámetros cromatográficos obtenidos en la columna Atlantis dC₁₈ utilizando hidroxilamina (NH₂OH, 10 mM, pH 6.5).

Fase móvil	t' _R	k	A _S	R _S
Buffer NH ₂ OH (10 mM pH 6.5)	0.92	0.78	1.89	6.29
Buffer NH ₂ OH (10 mM pH 6.5):ACN (99:1)	0.72	0.62	1.93	5.16
Buffer NH ₂ OH (10 mM pH 6.5):ACN (95:5)	0.48	0.46	1.20	3.59
Buffer NH ₂ OH (10 mM pH 6.5):ACN (90:10)	0.40	0.39	0.63	1.33

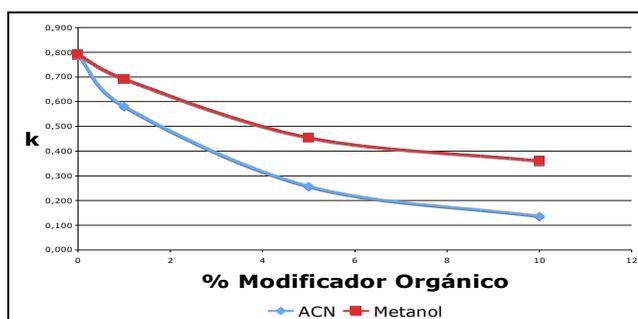


Figura 6.1. Variación del factor de retención (k) para la columna Atlantis dC₁₈ en función del % de modificador orgánico en la fase móvil, con H₂O como solvente polar.

En la tabla 6.5 se presentan los resultados de la evaluación del efecto que tuvo el pH de la fase móvil en la separación. El estudio se realizó con buffers a 3 diferentes valores de pH. La figura 6.2 muestra la influencia que tiene el pH sobre el factor de retención (k).

Tabla 6.5. Parámetros cromatográficos obtenidos en la columna Atlantis dC₁₈ para el estudio del efecto del pH en la fase móvil.

Fase móvil	t'_R	k	A_S	R_S
Buffer HCOOH (10 mM, pH 3)	1.01	0.86	1.94	6.36
Buffer CH ₃ COOH (10 mM pH 5)	1.06	0.91	2.80	6.67
Buffer NH ₂ OH (10 mM pH 6.5)	0.92	0.78	1.89	6.29

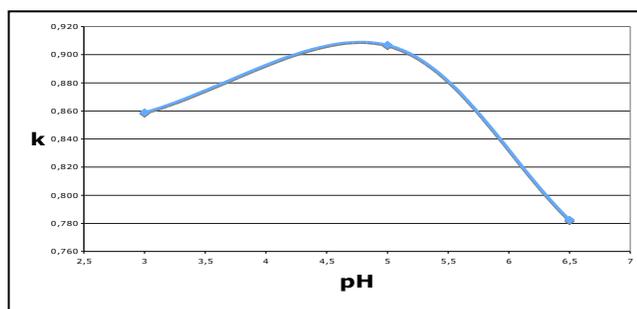


Figura 6.2. Variación del factor de retención (k) en función del pH para la columna Atlantis dC₁₈.

Para la columna Atlantis dC₁₈, se obtuvo la mejor separación utilizando como fase móvil agua a temperatura ambiente, con un flujo de 0.3 mL/min. En la figura 6.3 se muestran los cromatogramas que se obtuvieron para estas condiciones.

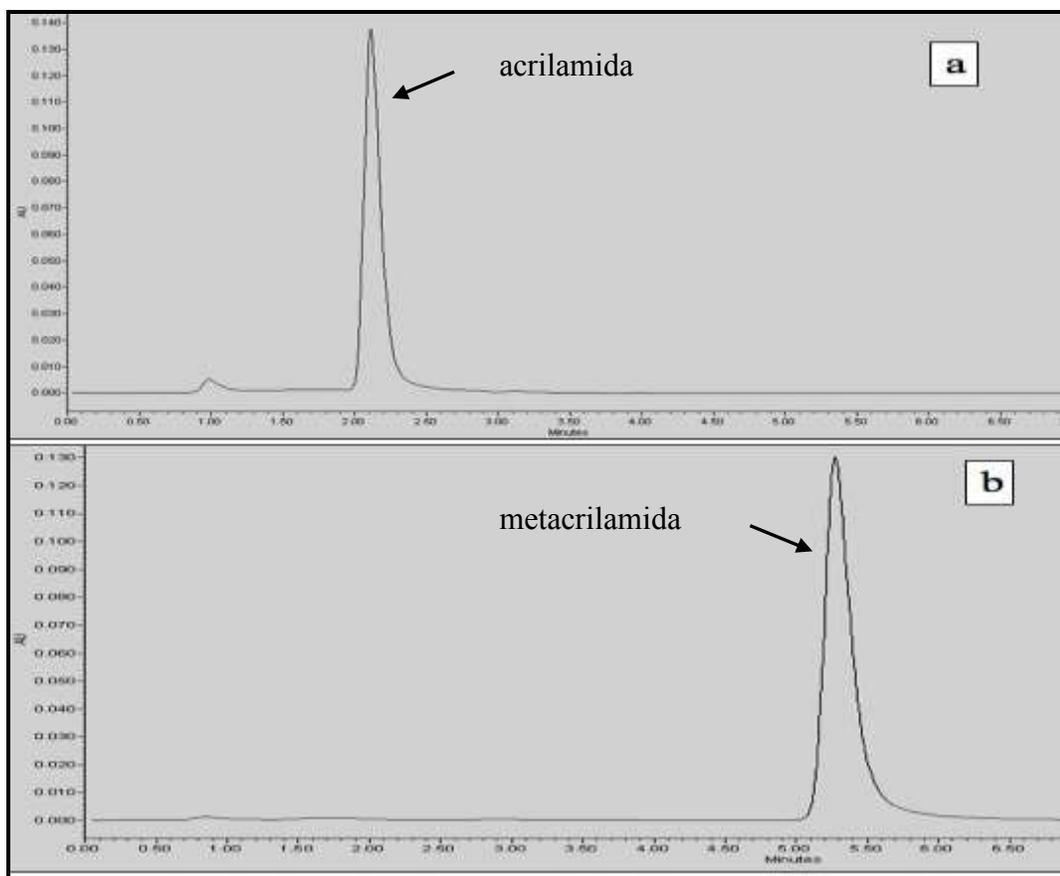


Figura 6.3. Cromatogramas para a) acrilamida b) metacrilamida con columna Atlantis dC₁₈, en las mejores condiciones de separación.

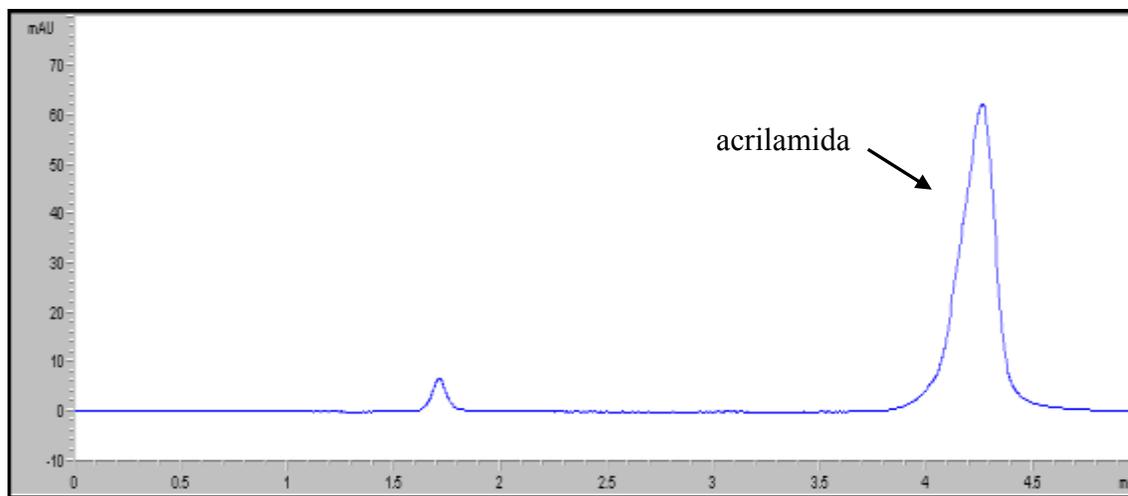
6.1.1.2 Columna Intersil Ph

En el caso de la columna de fase inversa-fenil Intersil Ph, se estudiaron diferentes tipo de modificador orgánico (ACN, MeOH, isopropanol) y su proporción. Como solvente polar se utilizó agua. Los resultados se presentan en la tabla 6.6.

Tabla 6.6. Parámetros cromatográficos obtenidos para la columna Intersil Ph .

Fase móvil	t'_R	k	A_S
H ₂ O:ACN (95:5)	2.30	1.38	0.77
H ₂ O:ACN (98:2)	2.30	1.49	0.85
H ₂ O:MeOH (95:5)	1.72	0.64	1.16
H ₂ O:MeOH (98:2)	2.40	0.82	1.46
isopropanol (100)	N/D	N/D	N/D

Los mejores resultados para la columna Intersil Ph, se consiguieron al utilizar H₂O:ACN (98:2) con un flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente. Uno de los cromatogramas obtenidos, se presenta en la figura 6.4.

**Figura 6.4.** Cromatograma de un estándar de acrilamida obtenido con la columna Intersil Ph. Fase móvil: H₂O:ACN (98:2)

6.1.1.3 Columna Discovery Cyano

En la columna de fase inversa-ciano Discovery, se estudiaron diferentes tipos de modificador orgánico (ACN, MeOH, isopropanol) y su proporción. Como solvente polar se utilizó agua. Los resultados se presentan en la tabla 6.7.

Tabla 6.7. Parámetros cromatográficos obtenidos para la columna Discovery-Cyano.

Fase móvil	t'_R	k	A_S
H ₂ O:ACN (5:95)	1.21	1.08	4.99
H ₂ O:ACN (2:98)	1.20	1.07	4.73
ACN (100)	1.15	1.03	4.70
H ₂ O:MeOH (5:95)	N/D	N/D	N/D
H ₂ O:MeOH (2:98)	N/D	N/D	N/D
isopropanol (100)	0.97	0.71	1.57

Los mejores resultados se consiguieron utilizando como fase móvil ACN al 100 %, con un flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente. En la figura 6.5 se presenta uno de los cromatogramas que se obtuvo con estas condiciones para la columna Discovery-Cyano.

6.1.1.4 Columna ISRP-GFFII

Para la columna de fase inversa-exclusión molecular Regis ISRP-GFFII, se estudió el tipo y proporción de solvente orgánico, así como el pH de la fase móvil. Los resultados se presentan en la tabla 6.8.

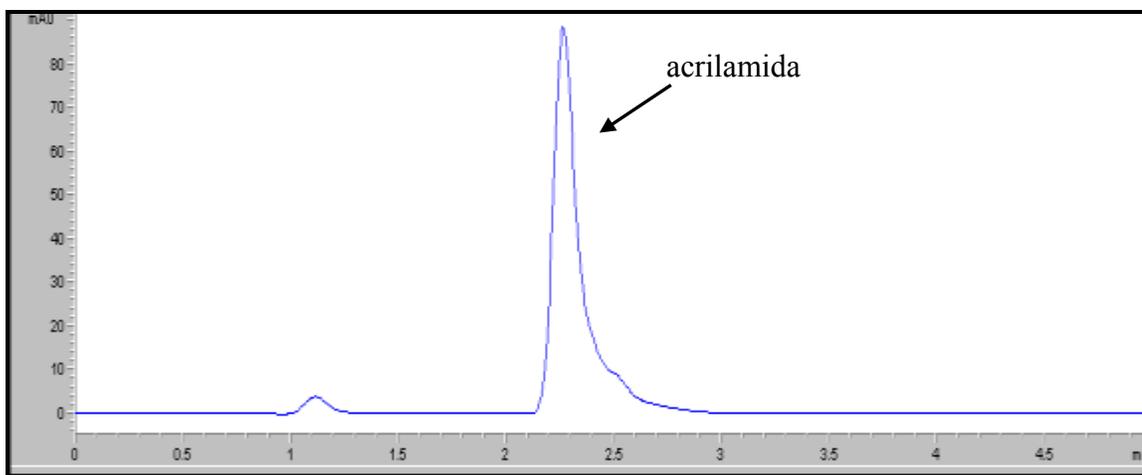


Figura 6.5. Cromatograma de un estándar de acrilamida obtenido con la columna Discovery-Cyano. Fase móvil: ACN 100%

Tabla 6.8. Parámetros cromatográficos obtenidos para la columna ISRP-GFFII.

Fase móvil	t'_R	k	A_S
H ₂ O:ACN (98:2)	1.06	0.95	1.81
H ₂ O:MeOH (98:2)	1.08	0.93	1.87
HCOOH(0.1%):ACN (98:2)	1.12	1.01	3.59
HCOOH(0.1%):MeOH (98:2)	1.09	0.97	4.09
HCOONH ₄ (100 mM):ACN (99:1)	1.18	1.03	1.25
HCOONH ₄ (100 mM):ACN (98:2)	1.16	0.97	1.52
HCOONH ₄ (100 mM):MeOH (98:2)	1.08	0.93	1.87

Los mejores resultados para la columnas ISRP-GFFII, se obtuvieron con HCOONH₄ (100mM):ACN (99:1) como fase móvil, con un flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente. En la figura 6.6 se presenta uno de los cromatogramas que se obtuvo utilizando estas condiciones.

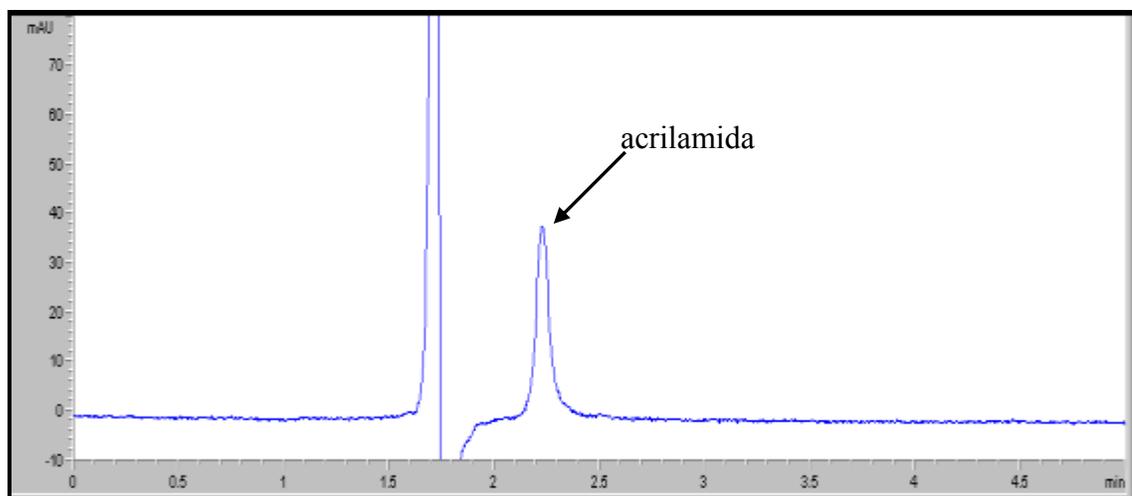


Figura 6.6. Cromatograma de un estándar de acrilamida obtenido con la columna ISRP-GFFII. Fase móvil: HCOONH₄ (100 mM, pH 5):ACN (99:1).

6.1.2 Cromatografía de par iónico

En la tabla 6.9, se muestran los resultados que se obtuvieron al utilizar como reactivo de par iónico ácido heptafluorobutírico (HFBA) y ácido trifluoroacético (TFA) a distintas concentraciones. En la figura 6.7, se presenta la variación del factor de retención (k) en función de la concentración de HFBA y TFA.

Tabla 6.9. Parámetros cromatográficos obtenidos en par iónico utilizando diferentes concentraciones de reactivo de par iónico (35°C).

Fase móvil	t'_R	k	A_s	R_s
HFBA (40 mM):ACN (99:1)	1.56	0.80	2.16	10.47
HFBA (100 mM):ACN (99:1)	0.13	0.04	2.34	8.65
TFA (40 mM):ACN (99:1)	1.11	0.57	2.16	5.89
TFA (130 mM):ACN (99:1)	1.20	0.56	1.52	10.75
TFA (200 mM):ACN (99:1)	0.35	0.22	1.59	2.26

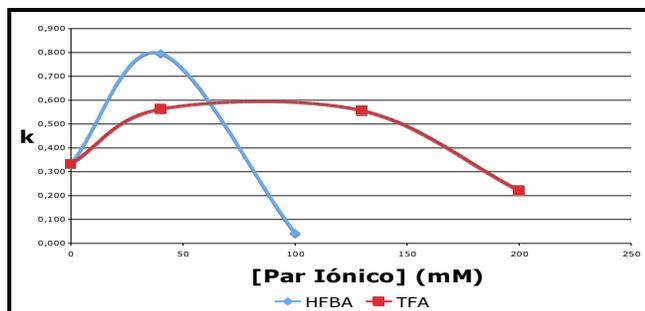


Figura 6.7. Variación de k en función de la concentración de reactivo de par iónico (35°C).

En la tabla 6.10 se presentan los resultados que se obtuvieron al utilizar ACN en distintas proporciones (35°C). En la figura 6.8, se muestra el comportamiento del factor de retención (k), al variar la proporción de acetonitrilo en la fase móvil.

Tabla 6.10. Parámetros cromatográficos obtenidos en par iónico utilizando diferentes proporciones de ACN en la fase móvil.

Fase móvil	t'_R	k	A_S	R_S
TFA (130 mM):ACN (99:1)	1.20	0.56	1.52	10.75
TFA (130 mM):ACN (95:5)	0.91	0.47	1.29	5.50

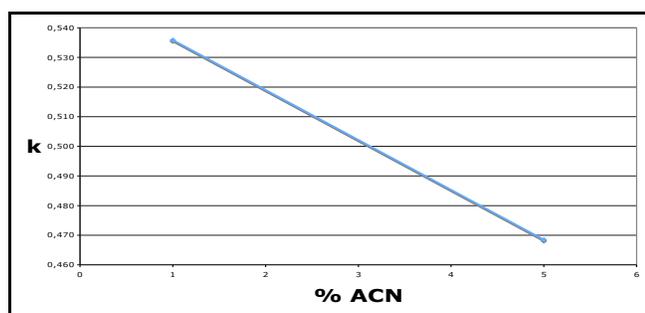


Figura 6.8. Variación de k en función del % ACN presente en la fase móvil.

Se realizaron pruebas a distinta temperatura de columna. Los resultados se presentan en la tabla 6.11. En la Figura 6.9 se muestra el efecto que tuvo la temperatura sobre el factor de retención (k).

Tabla 6.11. Parámetros cromatográficos obtenidos en par iónico cuando se trabajó con distintas temperaturas de columna.

Fase móvil	t'_R	k	A_S	R_S
TFA 40 mM:ACN (99:1) a 35°C	1.11	0.57	1.59	5.89
TFA 40 mM:ACN (99:1) a 37.5°C	0.91	0.47	2.16	5.53
TFA 40 mM:ACN (99:1) a 40°C	0.23	0.09	2.13	5.48

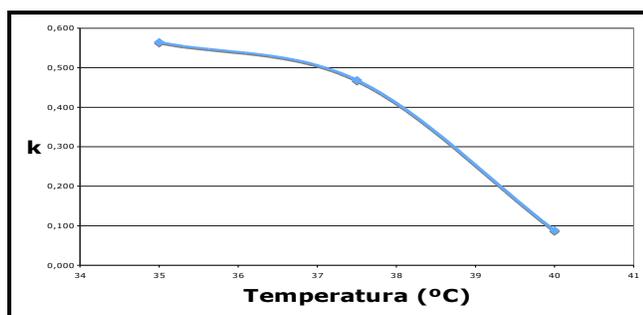


Figura 6.9. Variación del factor de retención (k) en par iónico en función de la temperatura de la columna.

La mejor separación en la cromatografía de par iónico se obtuvo cuando se utilizó como fase móvil HFBA 40 mM:ACN en proporción 99:1 a 35°C, con un flujo de 0.2 mL/min. En la figura 6.10 se muestran dos de los cromatogramas obtenidos bajo estas condiciones con la columna Kromasil C₈.

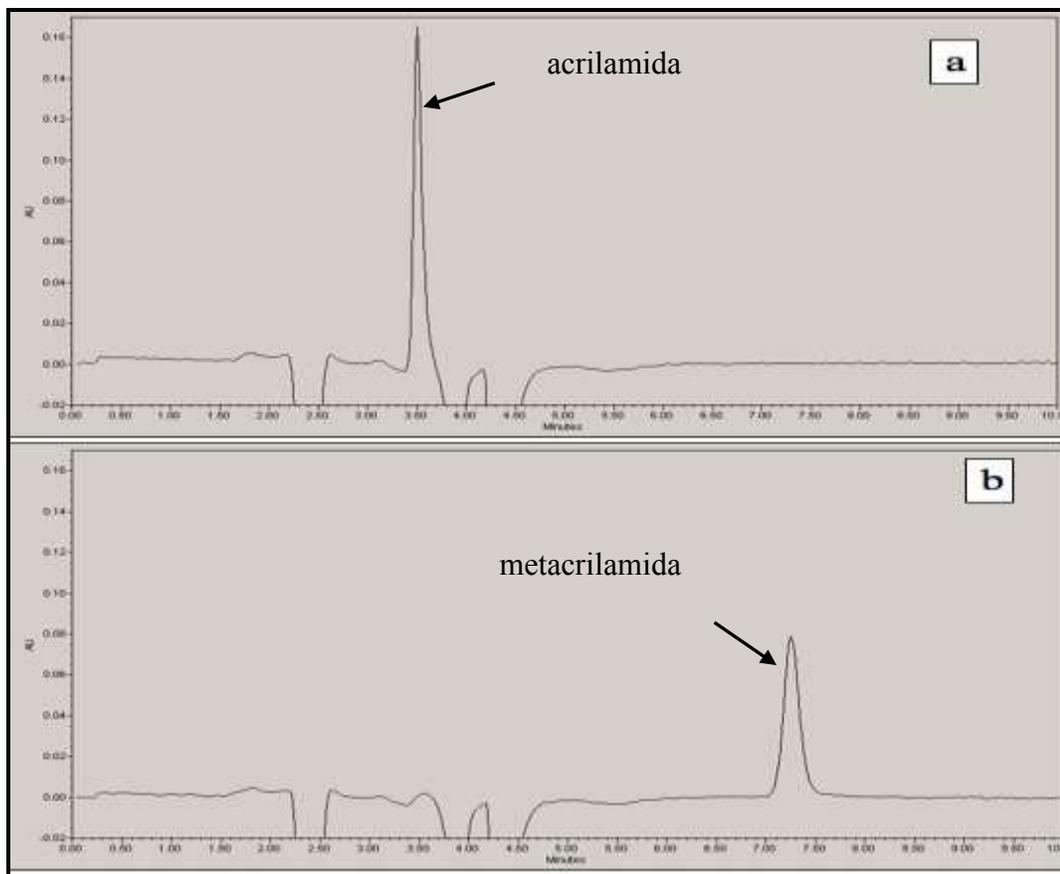


Figura 6.10. Cromatogramas para a) acrilamida b) metacrilamida con columna Kromasil C₈, en las mejores condiciones de separación.

6.1.3 Cromatografía de interacciones hidrofílicas

Los resultados de este estudio se presentan en las tablas 6.12, 6.13, 6.14, 6.15, 6.16 y 6.17. La figura 6.11 muestra el efecto que tuvo la proporción de agua en la fase móvil sobre el factor de retención (k).

Tabla 6.12. Parámetros cromatográficos obtenidos en HILIC cuando se utilizaron distintas proporciones de agua como solvente polar acuoso.

Fase móvil	t'_R	k	A_S	R_S
ACN:H ₂ O (95:5)	0.60	0.86	2.00	0.00
ACN: H ₂ O (90:10)	0.50	0.64	2.26	0.00
ACN: H ₂ O (60:40)	0.56	0.78	1.02	0.00
ACN: H ₂ O (40:60)	0.52	0.68	1.03	0.40

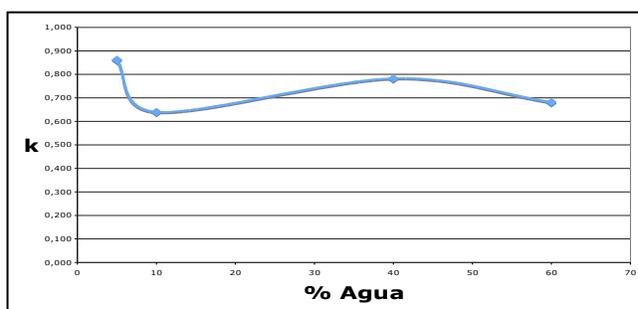


Figura 6.11. Variación de k en HILIC en función del contenido de agua.

Tabla 6.13. Parámetros cromatográficos para HILIC cuando se utilizó como solvente polar acuoso ácido fórmico (HCOOH, 10 mM, pH 3).

Fase móvil	t'_R	k	A_S	R_S
ACN:Buffer HCOOH (10 mM, pH 3) (99:1)	0.09	0.07	1.60	0.04
ACN:Buffer HCOOH (10 mM, pH 3) (95:5)	0.00	0.00	2.59	0.06
ACN:Buffer HCOOH (10 mM, pH 3) (90:10)	0.32	0.21	1.96	0.02
ACN:Buffer HCOOH (10 mM, pH 3) (60:40)	0.07	0.06	2.63	0.03

Tabla 6.14. Parámetros cromatográficos para HILIC cuando se utilizó como solvente polar acuoso ácido acético (CH₃COOH, 10 mM, pH 5).

Fase móvil	t _R	k	A _S	R _S
ACN:Buffer CH ₃ COOH (10 mM, pH 5) (99:1)	0.00	0.00	4.00	0.02
ACN:Buffer CH ₃ COOH (10 mM, pH 5) (95:5)	0.03	0.02	5.30	0.03
ACN:Buffer CH ₃ COOH (10 mM, pH 5) (90:10)	0.02	0.01	3.19	0.00
ACN:Buffer CH ₃ COOH (10 mM, pH 5) (60:40)	0.00	0.00	0.58	0.01
ACN:Buffer CH ₃ COOH (10 mM, pH 5) (40:60)	0.11	0.88	0.88	0.10

Tabla 6.15. Parámetros cromatográficos para HILIC cuando se utilizó como solvente polar ácido trifluoracético (TFA, 1%, pH 3).

Fase móvil	t _R	k	A _S	R _S
ACN:TFA (1%) (95:5)	0.08	0.06	3.78	0.10
ACN:TFA (1%) (90:10)	0.09	0.07	4.73	0.03

Tabla 6.16. Parámetros cromatográficos obtenidos en HILIC cuando se utilizó como solvente polar metanol.

Fase móvil	t _R	k	A _S	R _S
ACN:MeOH (99:1)	0.07	0.06	5.20	0.01
ACN:MeOH (95:5)	0.16	0.13	0.64	0.15

Se realizaron pruebas utilizando buffers de ácido fórmico a pH 3 y de ácido acético a pH 5. Los resultados de estas pruebas se muestran en las tablas 6.13 y 6.14.

Tabla 6.17. Parámetros cromatográficos para HILIC cuando se utilizó como solvente polar isopropanol.

Fase móvil	t'_R	k	A_S	R_S
ACN:isopropanol (99:1)	0.11	0.09	2.54	0.01
ACN:isopropanol (95:5)	0.10	0.08	1.89	0.07
ACN:isopropanol (90:10)	0.06	0.05	3.21	0.00

En la cromatografía de interacciones hidrofílicas, no se tuvieron buenos resultados, la figura 6.12 representa dos de los cromatogramas obtenidos cuando se utilizó como fase móvil ACN:H₂O, en proporción 95:5 a temperatura ambiente, con un flujo de 0.3 mL/min.

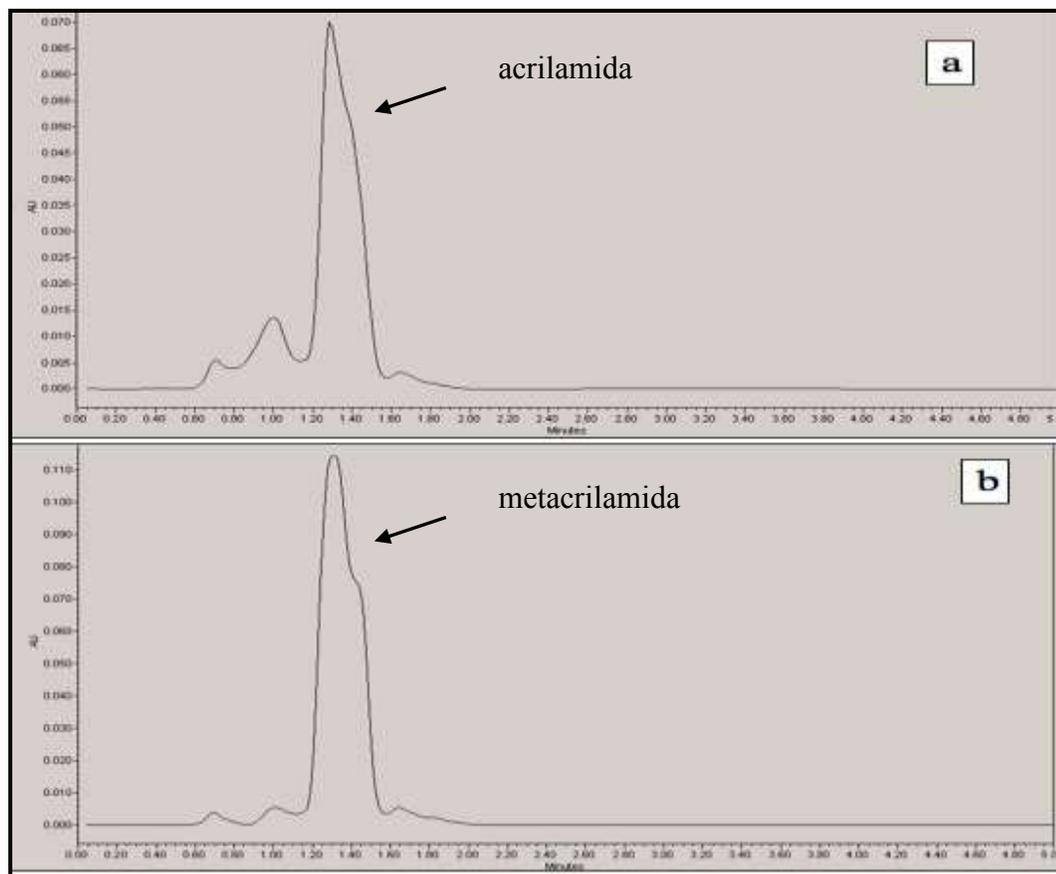


Figura 6.12. Cromatogramas a) acrilamida b) metacrilamida con columna Atlantis HILIC sílica. Fase móvil ACN:agua (95:1).

6.1.4 Cromatografía con columnas acopladas

Se acoplaron las columnas Kromasil C₈ y Atlantis dC₁₈, a un flujo de 0.9 mL/min. En la figura 6.13 se presenta uno de los cromatogramas obtenidos bajo estas condiciones.

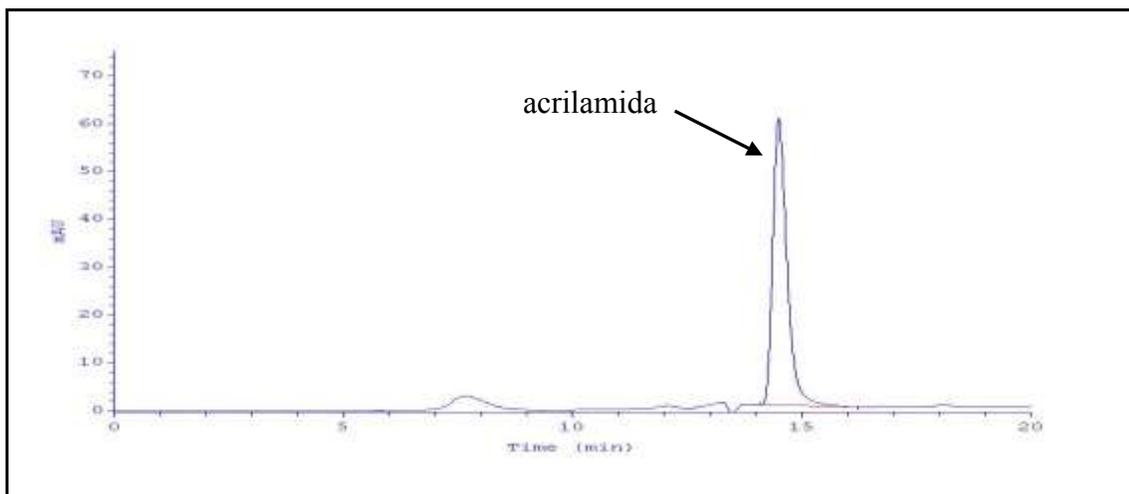


Figura 6.13. Cromatograma de un estándar de acrilamida (3.55 $\mu\text{g/mL}$) para las columnas Kromasil C₈-Atlantis dC₁₈ acopladas. Fase móvil agua. T° ambiente.

Se acoplaron también las columnas de fase inversa Regis ISRP-GFFII e Intersil Ph. Se utilizó como fase móvil HCOONH₄ (100 mM):ACN (99:1), con un flujo de 0.8 mL/min con 32°C. En la figura 6.14 se presenta uno de los cromatogramas que se obtuvo para un estándar de acrilamida bajo estas condiciones.

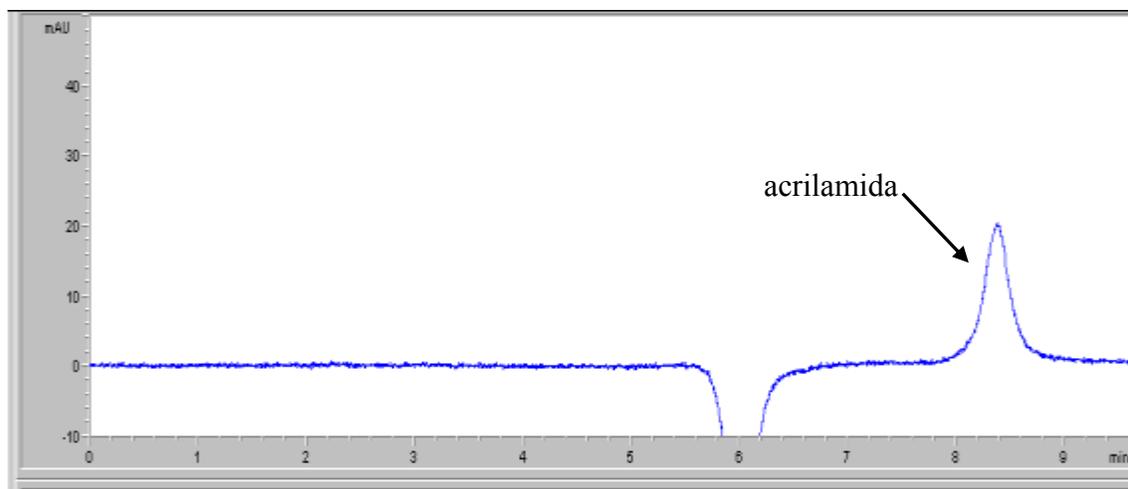


Figura 6.14. Cromatograma de un estándar de acrilamida ($3.55 \mu\text{g/mL}$) obtenido con las columnas Regis ISRP-Intersil Ph acopladas. Fase móvil HCOONH_4 (100 mM, pH 5):ACN (99:1). $T^\circ 32^\circ\text{C}$.

6.1.5 Selección del modo cromatográfico

En la tabla 6.18 se presenta una comparación de los diferentes modos cromatográficos, tomando en cuenta los mejores resultados para cada uno.

Tabla 6.18. Análisis de resultados de los modos cromatográficos estudiados.

	Fase inversa (Atlantis dC ₁₈)	Par iónico	Interacciones hidrofílicas (HILIC)
Retención (<i>k</i> : 1-5)	Regular (0.79)	Regular (0.80)	Regular (0.86)
Resolución (<i>R_S</i> >1.5)	Total (6.03)	Total (10.47)	Nula (0.01)
Forma del pico (<i>A_S</i> =1)	Buena (1.55)	Regular (1.59)	Mala (2.00)
Ventajas/ Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ FM sólo agua ✓ Temperatura ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> 7 FM requiere reactivos costosos 7 Requiere control de temperatura 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ FM simple ✓ Temperatura ambiente

De acuerdo a estos criterios, se eligió continuar trabajando con la columna Atlantis dC₁₈, sin embargo, al analizarse extractos de las muestras no se consiguió separar a la acrilamida de las interferencias, por lo que fue necesario evaluar otras columnas de fase inversa. Debido a que no se consiguió la separación con ninguna de las columnas, se optó por utilizar la técnica de columnas acopladas, que se describió en la sección 5.4.4.

6.2 Método de extracción y limpieza

6.2.1 Volumen de ruptura

El volumen de ruptura se estableció en 3 diferentes cartuchos:

- Fase inversa HLB
- Fase mixta WCX
- Copolímero de poliestireno-divinilbenceno hidroxilado ENV+

Este estudio nos indicó que tanto en los cartuchos HLB como en los WCX, sólo es posible pasar 1.5 mL de muestra sin que haya pérdida del analito. La figura 6.15 muestra los resultados de esta prueba.

En los cartuchos ENV+ cuando la muestra está disuelta en metanol, es posible pasar 1.5 mL. Cuando la muestra está disuelta en agua es posible pasar hasta 12 mL. La figura 6.16 muestra estos resultados.

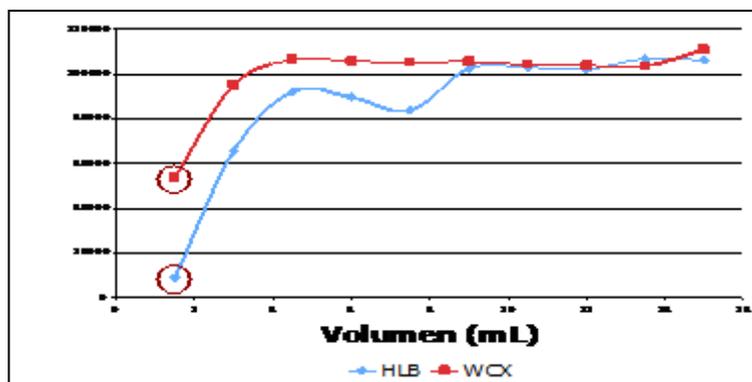


Figura 6.15. Gráfico para volumen de ruptura. Cartuchos HLB y WCX.

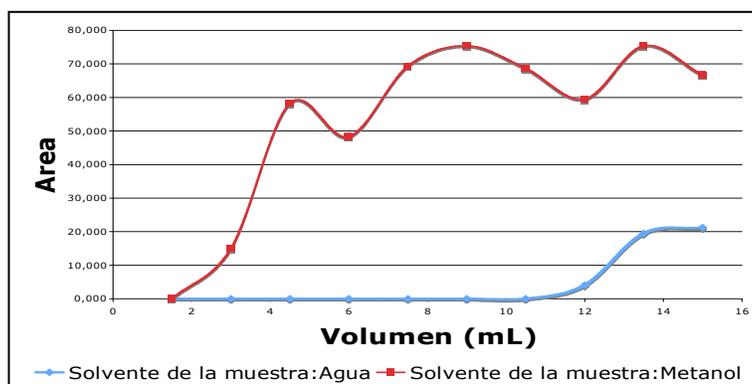


Figura 6.16. Gráfico para volumen de ruptura. Cartuchos ENV+.

6.2.2 Perfil de elución

La prueba se realizó utilizando como solventes de elución agua y metanol. La figura 6.17 (A) muestra los resultados para el cartucho Oasis HLB cuando se realizó la elución de acrilamida sólo con agua, la figura 6.17 (B) cuando se eluyó con H₂O:MeOH (80:20). En cuanto al cartucho Oasis WCX, la figura 6.17 (C) muestra los resultados cuando la elución de acrilamida se realizó con agua y la figura 6.17 (D) cuando se utilizó MeOH. La figura 6.17 (E) presenta los resultados para el cartucho Oasis HLB cuando se eluyó la metacrilamida con agua:MeOH (80:20). En el cartucho Oasis WCX se realizó la elución de metacrilamida con agua como lo muestra la figura 6.17 (F) y con MeOH en la figura 6.17 (G).

Se decidió eluir las muestras con H₂O:MeOH (80:20) en los cartuchos HLB (figuras 6.17 B y E), determinándose que fue necesario descartar los primeros 1.5 mL y coleccionar los siguientes 2 mL.

Cuando los cartuchos WCX se eluyeron con agua fue necesario coleccionar desde el principio hasta 2 mL, mientras que cuando se eluyó con MeOH también hubo que coleccionar desde el principio hasta 3 mL. Se eligió eluir con MeOH (figuras 6.17 D y G).

En el caso de los cartuchos ENV+, se pasaron 1.5 mL de estándar de acrilamida y se eluyó con MeOH. La figura 6.18 muestra un gráfico de los resultados. Se determinó que es necesario descartar los primeros 3 mL y coleccionar los siguientes 2 mL.

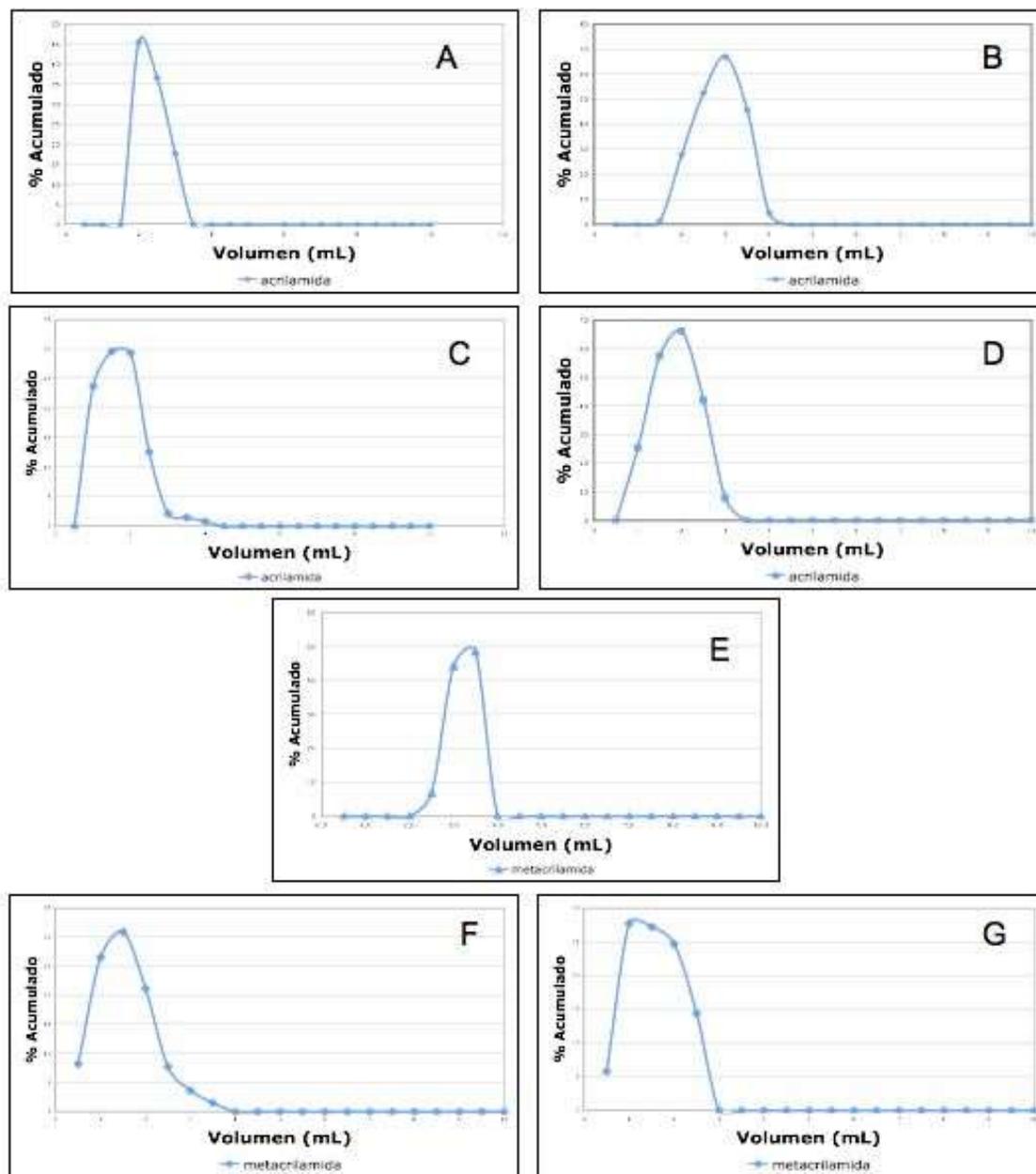


Figura 6.17. Perfiles de elución realizados con estándares de acrilamida ($3 \mu\text{g/mL}$). A) Cartucho HLB, solvente agua. B) Cartucho HLB, solvente H₂O:MeOH (80:20). C) Cartucho WCX, solvente agua. D) Cartucho WCX, solvente MeOH. Perfiles de elución realizados con estándares de metacrilamida ($3 \mu\text{g/mL}$). E) Cartucho HLB, solvente agua:MeOH (80:20). F) Cartucho WCX, solvente agua. G) Cartucho WCX, solvente MeOH.

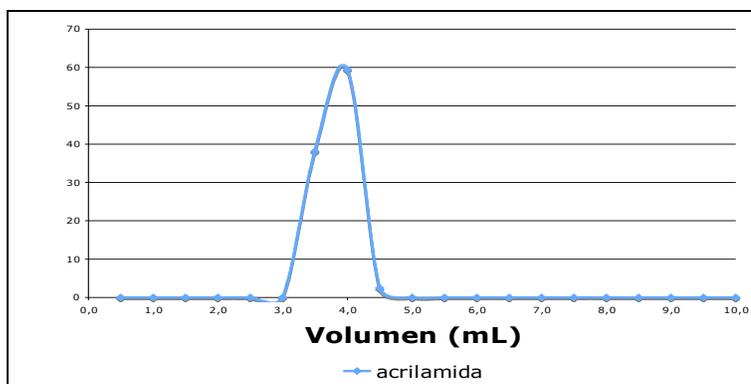


Figura 6.18. Gráfico para perfil de elución. Cartuchos ENV+.

6.2.3 Optimización de la relación muestra solvente.

Se realizó el procedimiento de extracción y limpieza para 1, 2 y 3 gramos de muestra utilizando agua como solvente de extracción. En la figura 6.19 se presentan los cromatogramas obtenidos para cada caso. El volumen de porción acuosa resultante para las diferentes cantidades de muestra se presenta en la tabla 6.19.

Tabla 6.19. Volumen de muestra recuperado en la prueba de optimización de la relación muestra-solvente.

Cantidad de Muestra (g)	Volumen de agua (mL)	Volumen recuperado (mL)
1	10	7.8
2	10	5.5
2.5	10	3.3
3	10	3
3.5	10	2.5
4	10	0

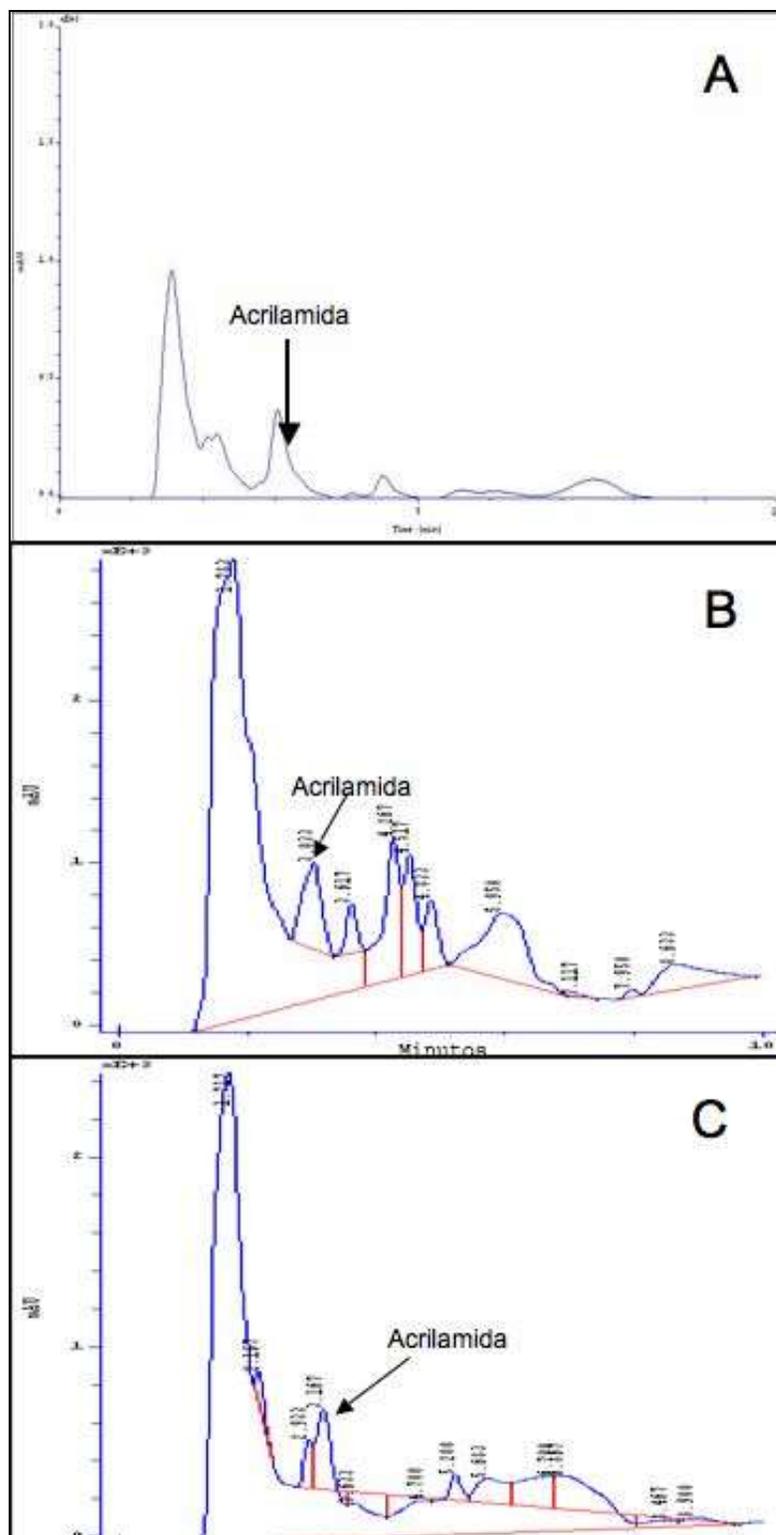


Figura 6.19. Cromatogramas obtenidos con diferente cantidad de muestra utilizando agua como solvente de extracción. A) 1 g de muestra B) 2 g de muestra C) 3 g de muestra.

Se utilizaron 1 y 2 g de muestra adicionada con 3 $\mu\text{g/g}$, utilizando MeOH como solvente de extracción. En la figura 6.20 se muestran los cromatogramas que se obtuvieron para los extractos correspondientes.

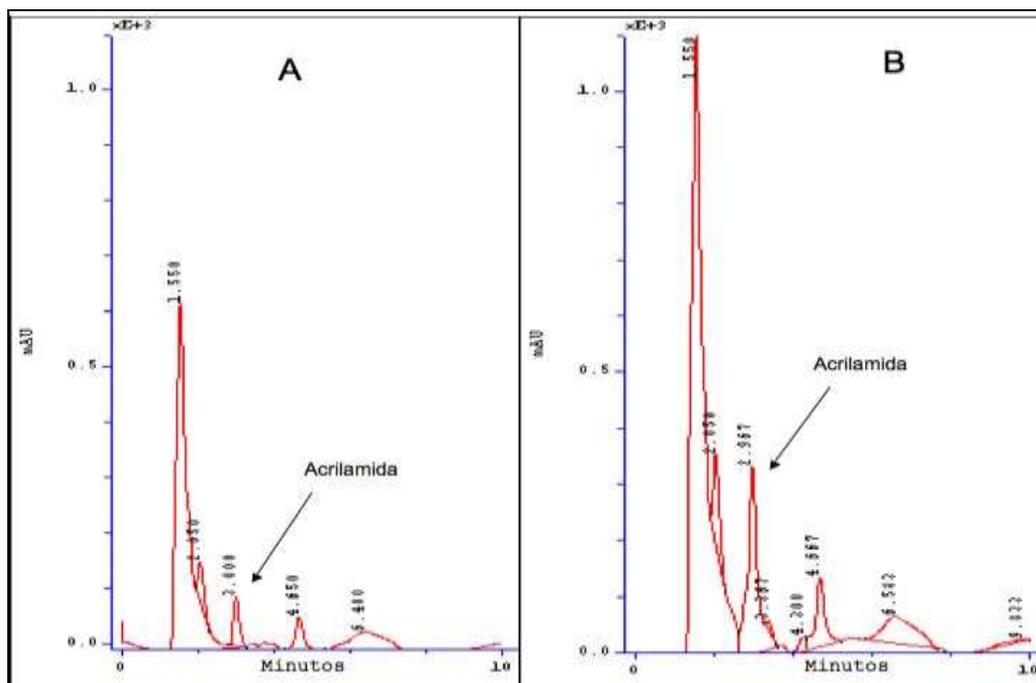


Figura 6.20. Cromatogramas con diferente cantidad de muestra utilizando MeOH como solvente de extracción. A) 1 g de muestra B) 2 g de muestra.

En la figura 6.21(A) se presenta el cromatograma obtenido para el extracto de una muestra de 10 g extraída con 300 mL de MeOH sin adicionar; y en la figura 6.21(B) aparece un cromatograma para el extracto de una muestra de 10 g adicionada con 0.355 $\mu\text{g/g}$ de estándar de acrilamida.

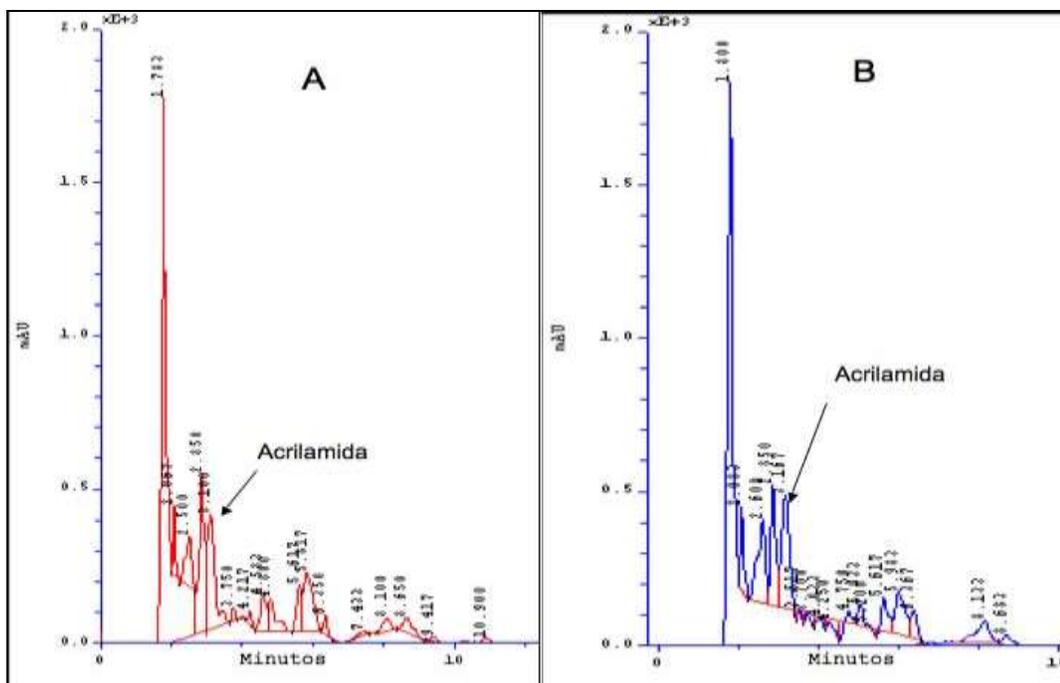


Figura 6.21. Cromatogramas obtenidos para una prueba de extracción con 10 g de muestra. A) Muestra sin adicionar B) Muestra adicionada.

6.2.4 Preconcentración en línea

Para la preconcentración en línea, fue necesario establecer un programa de cambios de la válvula de desvío. Se utilizaron estándares de acrilamida y metacrilamida con la columna de preconcentración. Los resultados se muestran en la tabla 6.20.

Tabla 6.20. Programa de cambios de la válvula de desvío.

	t'_R	$t_{inicial}$	t_{final}	Programa
acrilamida	4.12	3.70	4.97	$(t_i - 1 \text{ min})$ 2.7
metacrilamida	9.25	8.75	9.97	$(t_f + 1 \text{ min})$ 10.97

Los resultados de las pruebas para encontrar el volumen óptimo de inyección de muestra se presenta en la figura 6.22 (A y B) las cuales son cromatogramas de pruebas con estándares, mientras que la figura 6.23 (A y B) presenta los cromatogramas de la inyección de un extracto de 10 g de muestra adicionado con 0.355 $\mu\text{g/g}$ de estándar de acrilamida.

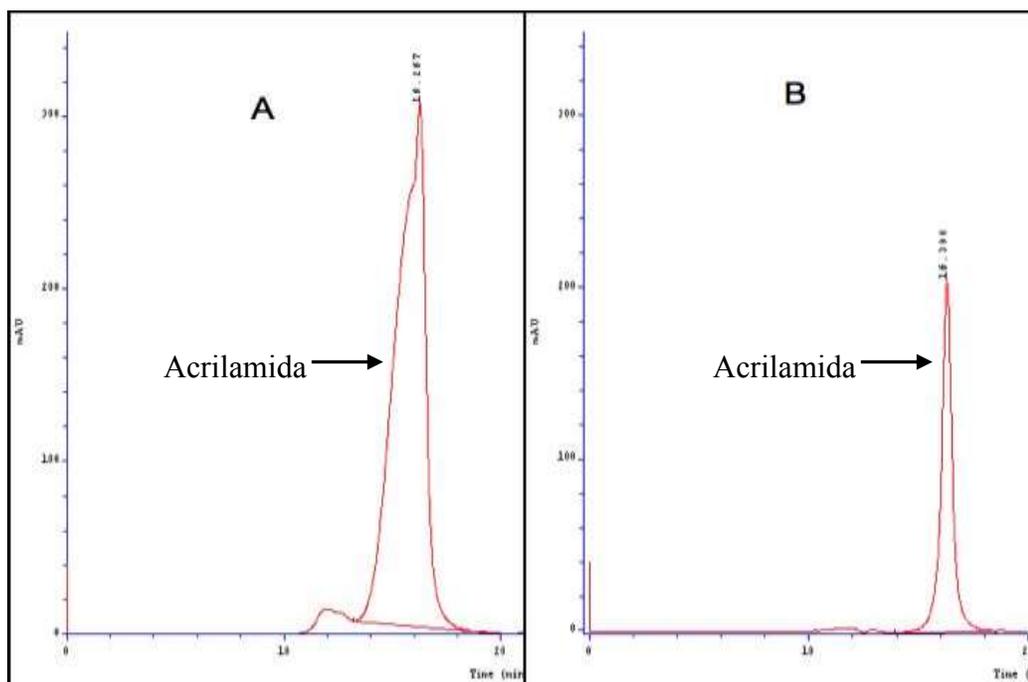


Figura 6.22. Cromatogramas para la optimización del volumen de inyección con un estándar de 2 $\mu\text{g/mL}$ utilizando la preconcentración en línea. A) Volumen de inyección de 90 μL B) Volumen de inyección de 50 μL .

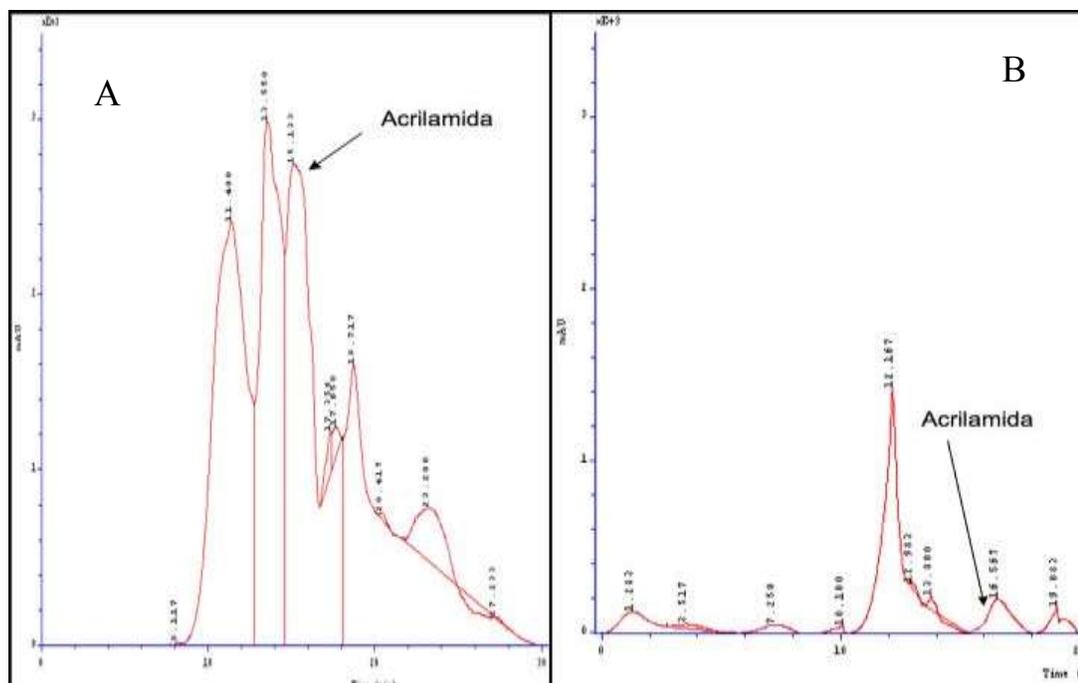


Figura 6.23. Cromatogramas para la optimización del volumen de inyección con un extracto de una muestra de 10 g utilizando la preconcentración en línea. A) Volumen de inyección de 90 μ L B) Volumen de inyección de 50 μ L.

6.2.5 Método final

El procedimiento de extracción y limpieza que se estableció finalmente, en base a los resultados, fue el siguiente: se pesaron 4 g de muestra previamente triturada y homogenizada en un mortero de porcelana. A la muestra se le agregaron 40 mL de MeOH, esta mezcla se agitó por 2 minutos en el vórtex y 20 min en un agitador rotatorio a 182 rpm, después se centrifugó a 4600 rpm por quince minutos. Se tomó la porción de metanol y se filtró en un filtro para centrífuga con un poro de 0.45 μ m a 4600 rpm por 5 minutos. Esta porción clarificada se rotaevaporó a 37°C con una velocidad de 120 rpm. Posteriormente, la muestra se reconstituyó en 8 mL de agua, que se pasaron a través de

un cartucho WCX previamente acondicionado, colectándose todo el volumen. El total del eluato se pasó por los cartuchos ENV+ previamente acondicionados, se eluyó con 4 mL de metanol, se descartaron los primeros 9.5 mL (8mL del eluato + 1.5 mL de MeOH) y se colectaron los siguientes 2 mL. Este volumen se evaporó nuevamente a presión reducida y se reconstituyó en 0.1 mL de agua. El extracto final se filtró con acrodiscos de 13 mm con tamaño de poro de 0.45 μm y se inyectaron 20 μL en el equipo HP 1100, utilizando las columnas acopladas ISRP-GFFII e Intersil Ph y como fase móvil HCOONH_4 (100 mM):ACN (99:1) con un flujo de 0.8 mL/min a una temperatura de 32°C. Este procedimiento se esquematiza en la figura 6.24.

En la figura 6.25 se presenta el cromatograma obtenido para una muestra de tortilla tostada sometida al procedimiento propuesto.

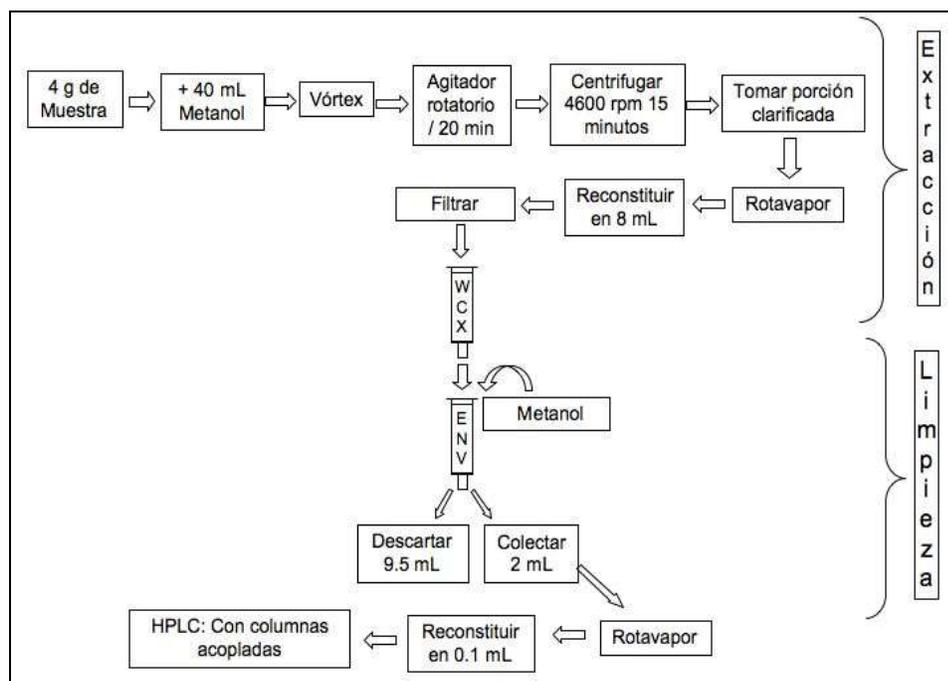


Figura 6.24. Procedimiento de extracción y limpieza.

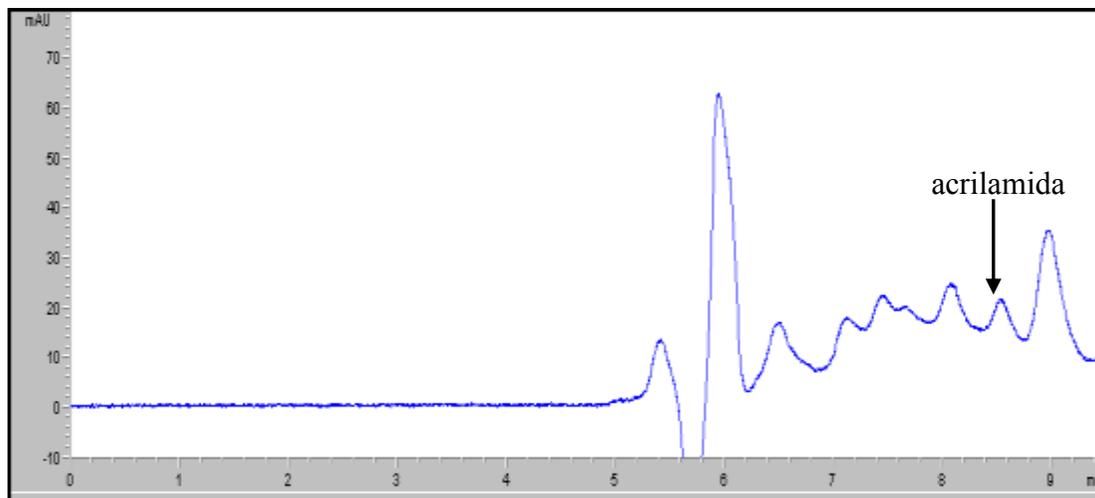


Figura 6.25. Cromatograma para un extracto de tortilla tostada sin adicionar utilizando el procedimiento de extracción y limpieza establecido.

6.2.6 Recuperación

Se encontró que del total del analito se extrajo el 27 %.

6.3 Cuantificación

Debido a que no fue posible utilizar a la metacrilamida como estándar surrogado, se evaluaron dos métodos de cuantificación.

6.3.1 Estandarización externa

Utilizando el método de estandarización externa, se calculó un error relativo de 71.4 %. La concentración añadida en este caso fue de 0.175 $\mu\text{g/g}$, y la concentración calculada fue de 0.05 $\mu\text{g/g}$.

6.3.2 Adición estándar

Con el método de adición estándar, se calculó un error relativo de 2.4%. En este caso, se añadió una concentración de 0.175 $\mu\text{g/g}$ y la concentración calculada fue de 0.171 $\mu\text{g/g}$.

6.4 Validación

Los resultados de la validación del método propuesto se presentan en la tabla 6.21.

Tabla 6.21. Resultados de validación.

Linealidad Intervalo($\mu\text{g/g}$) r r^2 Ecuación	0.175-0.530 > 0.99 > 0.99 $y = 252.77x + 45.53$
Exactitud (% Error relativo, $n = 4$)	2.4
Precisión (% DER, $n = 4$)	6.8
LOD ($\mu\text{g/g}$, S/N = 3)	0.017
LOQ ($\mu\text{g/g}$, S/N = 10)	0.058

CAPITULO 7

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo de este trabajo, fue determinar los niveles de acrilamida en tortillas de maíz, que han sido sometidas a un proceso de cocción a temperaturas mayores a 120°C. Como se mencionó en la introducción, los estudios donde se detectaron acrilamida en totopos, fueron desarrollados para otro tipo de alimentos, por lo que no hay un método específico para los productos de maíz que se consumen en el país.

En éste trabajo se optimizaron las condiciones de separación en los modos cromatográficos estudiados, así como las etapas de extracción y limpieza de la muestra, para lograr la mejor eficiencia posible y detectar la acrilamida en la matriz de estudio.

7.1 Método cromatográfico

7.1.1 Cromatografía de fase inversa

La cromatografía de fase inversa es la más popular de las cromatografías de líquidos, en base a su excepcional rango de aplicaciones, versatilidad y simplicidad de operación^[65]. Se clasifica como una cromatografía de reparto, en la que se tiene una fase móvil polar y una fase estacionaria no polar. En este caso el mecanismo de separación se basa en la partición de los analitos entre las cadenas no polares de la fase estacionaria y la fase móvil polar^[59].

La variable que tiene mayor efecto en la cromatografía de fase inversa, es precisamente la polaridad del solvente utilizado como fase móvil, debido a que en este modo cromatográfico los componentes más polares se eluyen primero, porque son los más solubles en la fase móvil y un aumento de la polaridad produce un aumento en el tiempo de elución^[59].

Teniendo en cuenta esto, se estudió el efecto del contenido y tipo de modificador orgánico en la fase móvil con respecto a la retención de acrilamida. Como puede observarse en la figura 6.1, en la columna Atlantis dC₁₈, como era de esperarse para un sistema de fase inversa, el factor de retención es bajo. Un aumento en la proporción de solvente orgánico en la fase móvil resultó en la disminución del factor de retención (k).

En el caso de las columnas Intersil Ph, ISRP-GFFII y Discovery-Cyano es importante destacar que se consiguió buena retención (k : 1-5) cuando se utilizó ACN, como puede verse en las tablas 6.6, 6.7 y 6.8. En la columna Intersil-Ph, cuando se utilizó isopropanol no fue posible observar la acrilamida y cuando se utilizó MeOH se obtuvo una retención baja. En la columna Discovery-Cyano cuando se utilizó isopropanol se obtuvo una retención baja, mientras que cuando se utilizó MeOH en la fase móvil, no fue posible observar la acrilamida.

Otros parámetros que se tomaron en cuenta al evaluar los resultados fueron el factor de asimetría y la resolución. Como se mencionó en la Introducción, un pico se considera totalmente simétrico cuando se obtiene un valor de 1 para el factor de asimetría, mientras que 2 picos se consideran totalmente resueltos, cuando se presenta un valor de resolución mayor a 1.5^[59]. En la columna Atlantis dC₁₈ una mayor proporción de ACN produjo una ligera mejoría en la forma de los picos pues se tuvieron valores más cercanos a uno, como puede verse en las tablas 6.1, 6.2 y 6.4. Estos resultados se contrapusieron a los obtenidos para el parámetro de factor de retención, pues como ya se mencionó, al aumentar la proporción de solvente orgánico, ocurrió una disminución en la retención. Cuando se utilizó MeOH como solvente orgánico, no se presentó un patrón definido para el factor de asimetría. En lo que respecta a la resolución, en todos los casos se logró una separación total de los picos pues se obtuvieron valores mayores a 1.5.

En la columna Intersil Ph, la menor proporción de ACN mejoró la simetría de los picos porque se obtuvieron valores más cercanos a la unidad, mientras que cuando se

trabajó con MeOH, el factor de asimetría empeoró al disminuir la proporción de este solvente. Con la columna Discovery-Cyano se presentó una mala simetría de los picos con ACN como solvente orgánico ($A_S \gg 1$), condición que mejoró cuando se utilizó isopropanol. En la columna ISRP-GFFII el uso de MeOH en la fase móvil dió como resultado picos con mayor asimetría. En ninguna de estas columnas se utilizó metacrilamida como estándar surrogado, porque en los extractos que se obtuvieron siguiendo el procedimiento de extracción y limpieza establecido no logró recuperarse, por lo que no se calculó el parámetro de resolución.

En general, las amidas son un grupo funcional que se suele considerar como neutro. Por un lado, la presencia del grupo carbonilo tiene el efecto de retirar electrones, favoreciendo el desplazamiento del equilibrio a la forma desprotonada. Por otro lado, la estructura de las amidas se estabiliza por resonancia mediante la participación del par de electrones no enlazantes del átomo de nitrógeno. Si el nitrógeno está protonado, dicha estabilización no puede producirse^[66-67]. Sin embargo, en las enamidas la presencia del enlace vinílico permite la protonación en presencia de ácido de Brønsted, formando cationes de N-acilimino^[68-69]. Aunque no se han reportado valores de pKa o pKb para la acrilamida, en la literatura existen numerosas referencias a las propiedades ácido-base de este compuesto y de hecho numerosos procedimientos analíticos aprovechan estas propiedades^[41, 32, 68-69].

En relación a la influencia del pH, en la columna Atlantis dC₁₈, la máxima retención se observó a un valor de 5, la disminución o incremento de este valor, produjo una disminución en la retención, como puede verse en la figura 6.2. Aunque, como ya se

mencionó, el mecanismo primario de separación en la cromatografía de fase inversa es la partición, la influencia del pH pudo deberse a interacciones secundarias con los grupos silanol libres que se encuentran presentes en la fase estacionaria. Cuando la fase móvil tiene un pH de 3, algunos grupos silanol están desprotonados, lo que permite la interacción con la acrilamida. A medida que el pH aumenta, la proporción de grupos silanol desprotonados aumenta, por que se observa una interacción máxima con la acrilamida a un pH de 5. El incremento de este valor no produce cambios en la ionización de los grupos silanol, pero se sabe que la acrilamida se encuentra en su forma neutra a valores de pH cercanos a 7^[70], lo que reduciría la interacción y por lo tanto el valor del factor de retención sería menor.

En lo referente al factor de asimetría, como se presenta en la tabla 6.5, la forma del pico empeoró de manera importante con un pH de 5, lo que volvió esta condición inelejible para continuar trabajando. A valores de pH de 3 y 6.5, también se observaron picos asimétricos. En cuanto a la resolución, cabe mencionar que en todos los casos se logró una separación total de los picos.

En la columna Regis ISRP-GFFII también se estudió la influencia del pH en la fase móvil (tabla 6.8). Con ácido fórmico 0.1 % (pH alrededor de 2), fue posible retener a la acrilamida cuando se usó ACN, sin embargo la simetría del pico fue mala ($A_S \gg 1$). Con MeOH los resultados fueron similares, el factor de retención fue cercano a la unidad y la simetría, fue mala. Por último, con formiato de amonio 100 mM se evaluó un pH mayor (alrededor de 5). Cuando se utilizó como fase móvil $\text{HCOONH}_4:\text{ACN}$ (98:2) se tuvieron valores para el factor de retención cercanos a la unidad, y un pico con simetría

regular. El factor de retención mejoró al disminuirse la proporción de ACN, y de esta manera se consiguió una k de 1.03, es decir, dentro del rango considerado como óptimo; para este caso el factor de asimetría presentó valores aceptables. Se evaluó también MeOH como modificador orgánico y se obtuvieron valores de factor de retención similares, sin embargo la forma del pico empeoró comparada con la que se obtuvo con el ACN.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos para la columna de fase inversa Atlantis dC₁₈ y aunque no se obtuvieron valores óptimos para el factor de retención, se estableció que los mejores resultados se produjeron cuando se utilizó como fase móvil agua a temperatura ambiente, con un flujo de 0.2 mL/min. Dos de los cromatogramas obtenidos para acrilamida y metacrilamida con estas condiciones se presentan en la figura 6.3. Como puede verse, los picos que se obtuvieron tienen buena forma y el cromatograma no presenta picos negativos que dificulten la cuantificación.

Para la columna Intersil Ph, los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó como fase móvil H₂O:ACN (98:2) con un flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente. Aquí es importante mencionar, que con esta columna se obtuvo la mayor retención. Uno de los cromatogramas que se obtuvo se presenta en la figura 6.4. Como puede observarse, se obtuvo un pico de buena forma y un cromatograma sin picos negativos.

La columna Discovery-Cyano dió los mejores resultados cuando se utilizó como fase móvil ACN 100 % con un flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente. Si bien en

este caso aunque no hubo mucha diferencia en los valores de k y A_S que se obtuvieron utilizando menores proporciones de ACN, cabe mencionar que la forma del pico en el cromatograma fue mejor cuando se trabajó con las condiciones elegidas. El cromatograma se presenta en la figura 6.5.

Teniendo en cuenta los resultados para la columna ISRP-GFFII, se consideró que las mejores condiciones de trabajo se tuvieron al utilizar HCOONH_4 (100 mM):ACN (99:1) con un flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente. Uno de los cromatogramas que se obtuvo bajo estas condiciones se presenta en la figura 6.6. Como puede verse en este caso el cromatograma presenta picos negativos, sin embargo esta columna utilizando las condiciones elegidas, fue de las que mostró mejores resultados cuando se utilizaron muestras reales.

7.1.2 Cromatografía de par iónico

La cromatografía de pares iónicos es un tipo de cromatografía de reparto en fase inversa que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas y compuestos ionizables, así como para mezclas de compuestos neutros y iónicos^[59,65]. En la cromatografía de pares iónicos la fase móvil está constituida por un solvente orgánico como MeOH o ACN, y un compuesto iónico que aporta un contraión de carga opuesta a la del analito^[59], que es el responsable de regular la retención de los compuestos iónicos y que también tiene un ligero efecto en la retención de compuestos neutros^[65].

Existen distintas variables que afectan la retención y selectividad en la cromatografía de par iónico. Las más importantes son el reactivo de par iónico (tipo y concentración), el pH, la fuerza iónica, la composición del buffer, el solvente orgánico (tipo y concentración), las propiedades de sorción de la fase estacionaria y la temperatura. La influencia de estas variables, sin embargo, no sigue un comportamiento lineal e interdependiente, por lo que no es posible formular reglas simples^[65].

Aunque se han propuesto diferentes modelos para explicar la retención en la cromatografía de pares iónicos, hasta ahora no hay una posición unánime al respecto. Se han propuesto tres modelos fundamentales. El primero postula que la molécula del soluto forma un par iónico con el contraión en la fase móvil y que posteriormente, éste par iónico sin carga interacciona con la fase estacionaria lipofílica. El segundo modelo propone que el contraión se adsorbe en la superficie no polar de la fase estacionaria con su grupo iónico orientado hacia la superficie formando así un intercambiador iónico que retendrá al analito. El tercer modelo propone que el reactivo formador de pares iónicos se distribuye sobre la superficie de la fase estacionaria formando una doble capa eléctrica. La retención de los analitos se produce por atracciones electrostáticas con el reactivo formador de par iónico de la superficie y por adsorción en la porción lipofílica del analito sobre la fase estacionaria^[71].

En cuanto a los resultados obtenidos en el presente trabajo para la cromatografía de par iónico, la figura 6.7 muestra la variación del factor de retención (k) con HFBA y TFA a distintas concentraciones y a una misma temperatura. En éste gráfico es posible observar que la adición de par iónico resultó en un aumento importante de la retención.

Así mismo es posible apreciar que, contrariamente a lo esperado, un aumento en la concentración del reactivo formador de pares iónicos produjo una disminución importante de la retención al utilizarse HFBA. Cuando se trabajó con TFA, la retención se mantuvo a concentraciones de 50 y 130 mM, mientras que a concentraciones de 200 mM es posible observar una disminución considerable. Ya que los resultados mostraron que un aumento en la concentración de pares iónicos disminuye la retención, se realizó una prueba sin utilizar reactivos de par iónico, lo cual demostró que si estos no son incluidos, la retención es nula. Cabe mencionar que aún a concentraciones bajas no se logró retener la acrilamida.

La forma de los picos se evaluó con ayuda del factor de asimetría (tabla 6.9). En las pruebas con TFA y HFBA podemos observar que el aumento de la concentración de HFBA en la fase móvil resultó en picos asimétricos, mientras que con el TFA en la fase móvil no se observó un comportamiento definido. En la tabla 6.9, también se pueden observar los valores para la resolución, los cuales nos indican que en todas las pruebas se logró una separación total de los picos, pues se obtuvieron valores superiores a 1.5.

Se realizaron pruebas para mostrar la influencia que tiene la proporción de solvente orgánico (ACN) en la fase móvil, los resultados se presentan gráficamente en la figura 6.8. Se observó que un aumento en la proporción de solvente orgánico, resultó en una menor retención de acrilamida. De igual manera puede advertirse que aún a la menor concentración de ACN, no se logró retener la acrilamida.

La tabla 6.10 muestra los valores para el factor de asimetría, y para la resolución obtenidos cuando se varió la proporción de solvente orgánico. En esta tabla podemos ver que aunque la variación numéricamente no fue muy grande, un aumento en la proporción de solvente orgánico mejoró la simetría de los picos, presentándose así un efecto contrario a lo que ocurrió con la retención. En lo referente a la resolución, es posible decir que en ambas condiciones de estudio se obtuvo una separación total de los picos, pues se consiguieron valores mayores a 1.5.

El efecto que tiene la temperatura de la columna sobre la retención se muestra en la figura 6.9. El estudio se realizó variando la temperatura entre 35 y 40°C. En la figura 6.9 es posible observar que un aumento de temperatura, disminuye la retención de la acrilamida. Como se mencionó anteriormente, la temperatura es uno de los factores que más afectan la retención en este modo cromatográfico, por lo que fue necesario controlarla para mantener la reproducibilidad de los tiempos de retención. En la tabla 6.11 de la sección de resultados, se presentan los valores para factor de asimetría y resolución cuando se varió la temperatura de la columna. Los valores que presenta el factor de asimetría no fueron muy diferentes entre sí, y no siguieron un comportamiento definido, aunque si es posible observar que a temperaturas de 37.5 y 40°C los picos fueron muy asimétricos, pues los valores son mayores a 1 ($A_S \gg 1$). En lo concerniente a la resolución, se aprecia que en todos los casos se produjo una separación total de los picos, ($R_S > 1.5$).

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando como fase móvil HFBA 40 mM:ACN (99:1), a una temperatura de 35°C. La figura 6.10 corresponde a los

cromatogramas obtenidos bajo estas condiciones para acrilamida y metacrilamida, como puede observarse, en este cromatograma se presentan picos negativos que dificultan la cuantificación.

7.1.3 Cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC)

La cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC) es una variante de la cromatografía de fase normal y constituye una alternativa para la separación de compuestos polares. La fase estacionaria es un material polar que puede ser sílice pura o modificada con grupos –ciano, -amino- o –diol, mientras que la fase móvil es altamente orgánica con una pequeña cantidad de solvente polar acuoso. En este tipo de cromatografía las partículas polares de la columna son cubiertas por una delgada capa de agua de la fase móvil. La separación se produce por la partición del analito entre la capa polar acuosa y la capa orgánica menos polar, por lo que el carácter hidrofílico de los analitos, aumenta la retención^[72-75].

De acuerdo al mecanismo de separación para este modo cromatográfico, la condición a tomar en cuenta, es la proporción de solvente orgánico en la fase móvil. En el presente trabajo se evaluó el efecto del contenido de la fase móvil y en la tabla 6.12 se presentan los resultados utilizando diferentes proporciones de agua en la fase móvil. En este caso se logró retener la acrilamida. Así mismo, es posible observar que la forma del pico es sumamente asimétrica ($A_S \gg 1$), y no fue posible conseguir una buena resolución pues los valores para este parámetro fueron menores a 1.5. En la figura 6.11

se pueden apreciar gráficamente los resultados para el factor de retención, donde no se observó un comportamiento definido.

En la tabla 6.13 se muestran los resultados utilizando como solvente polar acuoso ácido fórmico. En este caso podemos observar que la retención fue nula. Se obtuvieron picos asimétricos ($A_S \gg 1$) y no resueltos ($R_S \ll 1.5$).

En la tabla 6.14 se presentan los resultados obtenidos cuando se trabajó con ácido acético como solvente polar acuoso. Se observó que la retención fue prácticamente nula. Los resultados para el factor de simetría mostraron picos asimétricos cuando el contenido de ácido fórmico fue menor. Tampoco se consiguió la resolución de los picos, pues los valores están muy por debajo de 1.5.

En la tabla 6.15 se presentan los resultados obtenidos con TFA (200 mM, pH 3). Al igual que para las condiciones anteriores, los valores del factor de retención mostraron que la retención fue nula. Además el factor de asimetría indicó que los picos que se produjeron fueron asimétricos, pues los valores sobrepasan de manera importante la unidad. No se logró resolución de los picos.

Ya que con solventes polares acuosos se obtuvieron malos resultados, se probó utilizar como solventes polares MeOH e isopropanol. En la tabla 6.16 se presentan los resultados para la prueba con MeOH. No se logró retener la acrilamida como lo muestra el factor de retención y se produjeron picos asimétricos ($A_S \gg 1$). En la tabla 6.17 se presentan los resultados para la prueba con isopropanol. No se logró retener la

acrilamida. Los resultados del factor de asimetría (A_S) indican que los picos fueron asimétricos. No fue posible lograr que los picos de acrilamida y metacrilamida se separarán ($R_S \ll 1.5$).

Con los resultados que se presentan en las tablas 6.13, 6.14 y 6.15, se observó que a ningún valor de pH se logró retener la acrilamida.

Teniendo en cuenta los datos anteriores, es posible decir que con la cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC) no se obtuvieron buenos resultados, pues no fue posible tener condiciones óptimas de retención, los picos fueron asimétricos y esta condición no mejoró pese a todas las pruebas realizadas, además la resolución en todos los casos fue nula. En la figura 6.12 se presenta un ejemplo de los cromatogramas que se obtuvieron.

7.1.4 Columnas acopladas

La aplicación de columnas acopladas a la cromatografía de líquidos, ha sido utilizada desde 1973, y se ha desarrollado desde entonces, siendo su mayor ventaja, utilizar dos columnas cromatográficas para aumentar la capacidad de separación y/o limpieza, que se obtendría con una sola columna^[75]. En este trabajo se utilizó la forma homomodal, la cual consiste en utilizar 2 columnas de selectividad análoga^[75-76].

La primera prueba se realizó utilizando la columna Kromasil C₈ y la columna Atlantis dC₁₈, con las cuales fue posible mejorar la selectividad del análisis. Sin embargo debido a que se presentaron problemas al momento de utilizar muestras, se probó acoplar otras columnas de fase inversa, teniendo en cuenta que este fue el modo cromatográfico en el que se presentaron mejores resultados.

Se decidió acoplar las columnas ISRP-GFFII e Intersil Ph, que requieren fases móviles compatibles. Con estas columnas individualmente no fue posible separar la acrilamida de las interferencias de la matriz, mientras que cuando fueron acopladas, la selectividad aumentó y se consiguió la separación. En la figura 6.14 se muestra el cromatograma de un estándar de acrilamida que se obtuvo con este acoplamiento. En la figura 6.25 se muestra un cromatograma de un extracto blanco, en el cual fue posible identificar la acrilamida.

Con el fin de desechar la mayor cantidad de interferencia posible y obtener un cromatograma más limpio, se evaluó la posibilidad de utilizar una válvula de desvío, sin embargo, en los cromatogramas obtenidos, el pico correspondiente a acrilamida presentaba un “hombro” debido al movimiento de la válvula, por lo que finalmente no se utilizó.

7.1.5 Resumen de los modos cromatográficos

Para cumplir con el objetivo 2, fue necesario evaluar los resultados de las condiciones óptimas logradas para cada modo cromatográfico. En la tabla 6.18 se presenta un análisis de estos resultados.

Si bien con las columnas Atlantis dC₁₈, Kromasil C₈ y HILIC, no fue posible conseguir las condiciones óptimas para el factor de retención ($k':1-5$), la cromatografía de fase inversa muestra ventajas sobre los otros dos modos evaluados. En lo referente al factor de asimetría (A_S) la cromatografía de fase inversa y la cromatografía de par iónico presentaron valores similares, sin embargo, es posible notar en el cromatograma de par iónico (figura 6.10) picos negativos que dificultan la cuantificación de acrilamida, por lo tanto, se consideró que la simetría es mejor para fase inversa. En cuanto a la cromatografía de interacciones hidrofílicas, no hay punto de discusión, pues en todos los casos el pico fue amorfo.

Respecto a la resolución, tanto para fase inversa como para par iónico se presentó una separación total de los picos, lo cual no fue posible conseguir en la cromatografía de interacciones hidrofílicas.

De acuerdo a la experiencia que se obtuvo con este trabajo es posible mencionar que otro punto a favor de la cromatografía de fase inversa es que si bien el costo de la columna es mayor que para par iónico esto se compensa pues, en fase inversa se utilizó como fase móvil agua, mientras que en par iónico se utilizaron reactivos como HFBA y

TFA que son costosos. Otra desventaja de la cromatografía de par iónico fue la necesidad de contar con un control de temperatura, mientras que la cromatografía de fase inversa se desarrolló a temperatura ambiente.

Teniendo todo esto en consideración es que se eligió continuar trabajando con la cromatografía de fase inversa. Sin embargo, como se indicó con anterioridad, no fue posible la separación de la acrilamida con las columnas de forma individual, por lo que se probó acoplar las columnas para mejorar la selectividad. El primer acoplamiento se llevó a cabo utilizando las columnas Kromasil C₈ y Atlantis dC₁₈, a pesar de que se consiguió la separación, cuando se utilizó la columna Atlantis dC₁₈ con extractos reales se observó un aumento importante de presión de la columna, que hizo necesarios lavados exhaustivos de la misma, que no lograron solucionar el problema.

Por lo que se optó probar el acoplamiento con las columnas ISRP-GFFII y la Intersil Ph, con las cuales se consiguió la separación.

Teniendo todo esto en consideración, se eligió como sistema cromatográfico las columnas acopladas de fase inversa ISRP-GFFII e Intersil Ph, con un flujo de 0.8 mL/min a 32°C.

7.2 Método de extracción y limpieza

En la figura 5.2 se muestra el esquema general propuesto por la FDA para la determinación y cuantificación de acrilamida en alimentos^[61], el cual fue modificado para mejorar la eficiencia en la extracción de acrilamida en tortillas de maíz. El método se divide en una fase de extracción y en una fase de limpieza y fue necesario realizar la optimización de ambas etapas.

La primera prueba se llevó a cabo utilizando el método de la FDA, sin ninguna modificación, utilizando a la metacrilamida como estándar surrogado. El método indica que la limpieza de los extractos debe realizarse con cartuchos de extracción en fase sólida (HLB y WCX). Las condiciones de trabajo de los cartuchos se optimizaron con el volumen de ruptura y el perfil de elución. El volumen de ruptura se estableció con el objetivo de determinar el máximo volumen de muestra que es posible pasar a través de un cartucho sin que se produzcan pérdidas importantes del analito, mientras que el perfil de elución se estableció con el fin de determinar las fracciones de eluato que deben colectarse en cada cartucho para recuperar la máxima cantidad de analito con la menor dilución posible.

El método de la FDA marca que la elución de los extractos debe llevarse a cabo con agua, sin embargo en el perfil de elución, no fue posible recuperar a la metacrilamida utilizando solamente agua. Se eluyó con agua y metanol en una proporción 80:20 y así fue posible extraer ambos compuestos como se observa en las

figuras 6.17 (B y E). Una vez establecidos estos parámetros se procedió a analizar muestras.

La extracción se llevó a cabo respetando las proporciones de muestra-solvente y los tiempos de agitación marcados por la FDA. La limpieza de los extractos se efectuó utilizando los cartuchos de extracción en fase sólida HLB y WCX, con las condiciones que se establecieron. El análisis cromatográfico se realizó en el HPLC Alliance 2690, con la columna de fase inversa Atlantis dC₁₈, que había sido seleccionada como la que había proporcionado mejores resultados. El cromatograma resultante de esta prueba se presenta en la figura 6.19 (A), y como puede observarse no se consiguió ver la señal de la acrilamida.

Teniendo esto en cuenta, las siguientes modificaciones al método, estuvieron encaminadas a concentrar la acrilamida. Se optó por incluir una etapa de evaporación a presión reducida de la porción acuosa resultante de la extracción por agitación simple y otra etapa de evaporación para el extracto final, reconstituyéndolos en agua a un volumen menor. Se evaluó también, utilizar una mayor cantidad de muestra en el mismo volumen de extracción para aumentar la señal producida por la acrilamida; sin embargo, al mezclar la muestra triturada con agua se formó una masa altamente higroscópica, que no dejaba suficiente líquido para continuar con el procedimiento.

Se realizaron pruebas con agua, utilizando 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 gramos, el volumen recuperado en cada caso se presenta en la tabla 6.19. La máxima cantidad de muestra que pudo utilizarse fueron 3 gramos. Como puede observarse en los cromatogramas de

las figuras 6.19 (B) y 6.19 (C), se presentó interferencia de la matriz, por lo que se procedió a realizar pruebas con MeOH como solvente de extracción, con extracciones sucesivas. En las figuras 6.20 (A) y 6.20 (B) se muestran los cromatogramas obtenidos utilizando 1 y 2 gramos de muestra y como puede apreciarse con estas condiciones se obtuvieron cromatogramas más limpios, lo que volvió más sencilla la cuantificación. Sin embargo, la señal que se obtuvo continuaba siendo baja para las concentraciones esperadas.

Buscando concentrar la acrilamida para observar una mejor señal, se procedió a escalar la muestra, respetando la proporción muestra:solvente (1 g : 30 mL), pero utilizando 10 g de muestra y realizando 3 extracciones con 100 mL de MeOH cada una. Se hicieron pruebas utilizando muestras adicionadas y sin adicionar, los resultados se muestran en las figuras 6.21 (A) y 6.21 (B). Aunque se extrae una mayor cantidad de muestra, también se extrae una mayor cantidad de las interferencias.

Para la siguiente prueba, se adicionó una etapa de preconcentración en línea a los ajustes mencionados anteriormente. El objetivo era inyectar una mayor cantidad de muestra, sin que se ensancharan los picos. Para esto fue necesario utilizar un equipo HPLC modificado; el esquema de la figura 5.5 muestra las dos distintas posiciones del inyector y se explica su funcionamiento en el apartado 5.5.5 de Metodología. Para establecer el volumen de inyección se hicieron pruebas inyectando 90 y 50 μL de estándares y de muestras. Los resultados se presentan en las figuras 6.22 (A y B) para los estándares y en las figuras 6.23 (A y B) para muestras adicionadas con 0.355 $\mu\text{g/g}$ de acrilamida. Como puede observarse en los cromatogramas correspondientes a los

estándares, se obtuvo una buena señal cuando se inyectó un volumen de 90 μL , pero el pico fue ancho y asimétrico, mientras que al inyectar 50 μL se obtuvo un pico delgado y con buena forma. Cabe mencionar que si bien la señal no es tan intensa como con 90 μL , la respuesta no disminuye en proporción al volumen inyectado, esto se explica porque el alto volumen de inyección produce un ensanchamiento de banda extracolumnar. En cuanto a las muestras adicionadas con un volumen de inyección de 90 μL (figuras 6.23 A y B) hubo gran interferencia de la matriz que no permitió la cuantificación de acrilamida, mientras que con un volumen de inyección de 50 μL fue posible obtener un pico resuelto. Pese a los buenos resultados que se obtuvieron con esta prueba, no se realizó la validación, pues el método no fue reproducible. Además presentaba otras desventajas, como ser un método muy largo que consumía mucho solvente y generaba por tanto una gran cantidad de residuos.

A continuación, se realizaron nuevamente modificaciones al método de la FDA, procurando superar las desventajas de las pruebas anteriores. Se decidió cambiar los cartuchos de extracción en fase sólida, que presentaban baja retención para acrilamida. Se decidió mantener los cartuchos WCX para eliminar interferencias de los extractos y probar los cartuchos ENV+, por lo que fue necesario optimizar las condiciones de trabajo de estos cartuchos con el volumen de ruptura y el perfil de elución. Con los resultados de estas pruebas, fue posible determinar que los cartuchos ENV+ presentaban una mayor retención y era posible pasar a través de ellos hasta 12 mL de muestra, que posteriormente fue eluída con MeOH, esto fue importante para concentrar la acrilamida. Con base en esto, pudo disminuirse la cantidad de muestra, y el número de extracciones realizadas.

Se utilizaron entonces 4 g de muestra que fueron extraídos con 40 mL de MeOH por agitación simple, respetando las proporciones de muestra-solvente establecidas. Se optó por extraer nuevamente con MeOH, debido que los extractos que se tuvieron fueron más limpios que con agua. La extracción en fase sólida se llevó a cabo pasando el extracto primero por los cartuchos WCX y posteriormente por los cartuchos ENV+. El análisis cromatográfico se llevó a cabo con las columnas acopladas ISRP-GFFII e Intersil Ph. El esquema del procedimiento establecido se presenta en la figura 6.24. Otro punto importante a destacar en este método, es que no se continuó utilizando a la metacrilamida como estándar surrogado, pues en las pruebas realizadas con extractos de la muestra, no se consiguió recuperarla. Finalmente se obtuvieron cromatogramas que nos permitieron observar la señal de la acrilamida y cuantificarla, como se muestra en la figura 6.25.

7.2.1 Recuperación

Se calculó la recuperación de acrilamida para evaluar la eficiencia del método de extracción. Se encontró que del total del analito, se extrajo sólo el 27 %. Si bien el valor de recuperación es bajo, es importante destacar que fue posible obtener una buena señal cromatográfica. Además, es importante mencionar que en general, los métodos de análisis de acrilamida, presentan valores de recuperación bajos (5 – 40.1 %), por lo que los valores calculados en este trabajo son similares a los reportado en la bibliografía^[36,55].

7.3 Cuantificación

Debido a que no fue posible continuar utilizando a la metacrilamida como estándar surrogado, se evaluaron dos métodos de cuantificación.

7.3.1 Estandarización externa.

El método de cuantificación más utilizado es el de estandarización externa, el cual utiliza uno o varios estándares externos que contienen concentraciones conocidas de analitos que se preparan separadamente de las muestras que contienen analito. La estandarización se logra construyendo una curva de calibración, y cuando la relación es lineal, puede obtenerse la ecuación de la recta y con ella calcular la concentración del analito. Sin embargo, la estandarización externa, tiene una grave limitación, pues cuando dos matrices son diferentes, se introduce un error sistemático proporcional que no es posible ignorar. Cuando se previenen problemas relacionados con la matriz, se debe demostrar que el efecto de la matriz es despreciable o bien, utilizarse otro método de cuantificación^[62].

En la estandarización externa, el error obtenido (71.4 %) fue muy grande, lo cual nos indica, que existe interferencia de la matriz y debe considerarse otro método de estandarización.

7.3.2 Adición estándar

En el método de adición estándar se añaden a la muestra alícuotas de una solución estándar^[62]. Utilizando las muestras adicionadas, se construye una curva de calibración, con la cual se realiza la cuantificación, pero en este caso, se eliminan los efectos de matriz, porque la curva se construye en la muestra^[62].

El error relativo obtenido fue de 2.4 %, por lo que se decidió realizar las cuantificaciones de acrilamida utilizando el método de adición estándar.

7.4 Validación

La validación puede definirse como el acto de demostrar y documentar que un procedimiento opera eficientemente. El proceso de validación significa asegurar y proporcionar evidencia de que un proceso (dentro de parámetros específicos) es capaz de producir resultados consistentemente^[77]. Para lograr éste objetivo se determinaron la linealidad, la exactitud, la precisión y los límites de detección y cuantificación.

7.4.1 Linealidad

La linealidad en un procedimiento analítico es la habilidad (dentro de un rango dado) de obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra^[78].

El método fue lineal en un rango de 0.175 a 0.530 $\mu\text{g/g}$. Se obtuvieron coeficientes de correlación y determinación mayores a 0.99. Estos resultados son similares a los obtenidos en trabajos previos de detección de acrilamida por HPLC con detector UV-Vis^[32-39].

7.4.2 Exactitud y precisión.

La Exactitud de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia que hay entre un valor que es aceptado como verdadero o bien aceptado como referencia y el encontrado^[78]. La exactitud se expresó como error relativo, y en este trabajo se obtuvo un valor de 2.4 %, calculado por el método de adición estándar, para eliminar el efecto de la matriz. Este resultado coincide con los reportados en la bibliografía (0.7-6.3 %)^[32].

La precisión de un procedimiento analítico expresa la cercanía (grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas de múltiples muestras de la misma muestra homogénea bajo condiciones prescritas^[78]. La precisión se expresó como desviación estándar relativa, y se calculó un valor de 6.8 %, el cual es menor al señalado por la AOAC en función de la concentración del analito (15 %)^[79] y también está dentro de los valores citados en la bibliografía (3-21 %)^[31,39,41].

7.4.3 Límites de detección y cuantificación

El límite de detección para un procedimiento analítico es la menor cantidad de analito en una muestra que es posible detectar pero no necesariamente cuantificable como un valor exacto^[78]. El límite de cuantificación para un procedimiento analíticos es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinado con apropiada precisión y exactitud. El límite de cuantificación es un parámetro para pruebas cuantitativas con bajos niveles de componentes en las matrices de muestra^[78].

El límite de detección para este trabajo fue de 0.017 $\mu\text{g/g}$ y el límite de cuantificación de 0.058 $\mu\text{g/g}$, valores que son similares a los límites encontrados en las referencias para trabajos realizados utilizando HPLC con detector de UV-Vis (LOD: 0.015 $\mu\text{g/g}$, LOQ: 0.045 $\mu\text{g/g}$)^[32,39]. Además, es importante mencionar que con los límites de detección y cuantificación que se obtuvieron en este trabajo, es posible determinar los niveles de acrilamida presentes en los alimentos mencionados en la Tabla 1.1.

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método preciso y exacto capaz de cuantificar acrilamida en tortillas tostadas de maíz.

Debido a que no fue posible utilizar a la metacrilamida como estándar surrogado, y que el uso de la calibración externa da un error muy grande, fue necesario realizar la cuantificación por el método de adición estándar.

Si bien el uso de la cromatografía de líquidos con columnas acopladas permitió la separación de la acrilamida de algunas de las interferencias de la matriz, fue indispensable incluir una etapa exhaustiva de tratamiento de la muestra.

CAPITULO 9

PERSPECTIVAS

- Buscar alternativas del método de extracción y limpieza para mejorar la recuperación.
- Aplicar el método establecido para determinar acrilamida en muestras comerciales.

BIBLIOGRAFIA

1. Berihie Girma Kibatu. Dissertation: coordination chemistry of acrylamide an N-pyrazolypropanamide: syntheses and structures. Universitat Magdeburg, Alemania, 1-22, 2006.
2. Swedish Scientific Expert Committee: Grivas Spiros, Jägestad Margaetha, Lingnert Hans, Skog Kerstin, Törnqvist Margaerta y Aman Per. Report: acrylamide in food – Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. Suecia, 1-22, 2002.
3. Rothweiler B., Kuhn E. y Prest H. GC-MS approaches to the analysis of acrylamide in foods. Am. Lab., 35-38, 2004.
4. Govaert Y., Ariseto A., Van Loco J., Scheers E., Fraselle S., Weverbergh E., Degrootd J. M. y Goeyens L. Optimisation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of acrylamide in foods. Anal. Chim. Acta., 556, 275-280, 2006.
5. Jiménez S., Morales Navas F. J., Arribas-Lorenzo G. y Martí López E. Transcripción de conferencia: formación de acrilamida durante el procesado y cocinado de alimentos. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España, 2007.
6. Svensson K., Abramsson L., Becker W., Glynn A., Hellenas K. E., Lind Y., Rosen J. Dietary intake of acrylamide in Sweden. Food and Chemical Toxicology, 41, 1581-1586, 2003.
7. Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition (JIFSAN) Acrylamide in food workshop: Scientific issues, uncertainties, and research strategies. www.jifsan.umd.edu/acrylamide2002.htm, octubre 2006.
8. FAO/WHO. Health implications of acrylamide in food. Suiza, 2002. www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/acrylamide_full.pdf, octubre 2006.
9. Konings E. J. M., Baars A. J., van Klaveren J. D., Spanjer M. C., Rensen P. M., Hiemstra M., van Kooij J. A. y Peters P. W. J. Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. Food and Chemical Toxicology, 41, 1569-1579, 2003.
10. U.S. EPA, Office of Pollution Prevention and Toxins. Chemical summary for acrylamide. Estados Unidos, 1994, EPA-749-F-94-005a.

- 11 Bergmark E. Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. Chem. Res. Toxicol., 10, 1, 78-84, 1997.
- 12 Tareke E., Landin H. H., Rydberg P., Olsson U., Tornqvist M. Heating of food and haemoglobin adducts from carcinogens: possible precursor role of glycidol. Food and Chemical Toxicology, 38, 11, 963-969, 2000.
- 13 Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Ehrenberg L., Tornqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. J. Agric. Food Chem., 50, 17, 4998-5006, 2002.
- 14 Fohgelberg P., Rosen J., Hellenas K. E. y Abramsson-Zetterberg L. The acrylamide intake via some common baby food for children in Sweden during their first year of life - an improved method for analysis of acrylamide. Food and Chemical Toxicology, 43, 951-959, 2005.
- 15 Landin H. H., Tareke E., Rydberg P., Olsson, U. y Tornqvist, M. Heating of food and haemoglobin adducts from carcinogens: possible precursor role of glycidol. Food and Chemical Toxicology, 38, 963-969, 2000.
- 16 Zhang Y., Zhang G. Y. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods - Review and recent developments. J. Chromatogr. A, 1075, 1- 21, 2005.
- 17 Masson Lilia, Muñoz J. R., Romero N., Camilo C., Encina C., Hernández L, Castro J. y Robert P. Acilamida en patatas fritas: revisión actualizada. Grasas y Aceites, 58, 2, 185-193, 2007.
- 18 Zyzak D. V., Sanders R. A., Stojanovic M., Tallmadge D. H., Eberhart B. L., Ewald D. K., Gruber D. C., Morsch T. R., Strothers M. A., Rizzi G. P. y Villagran M. D. Acrylamide formation mechanism in heated foods. J. Agric. Food Chem., 51, 4782- 4787, 2003.
- 19 Mottram D. S., Wedzicha B. L. y Dodson A.T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. Nature, 2002, 419, 448- 449.
- 20 Stadler R. H., Blank I., Varga N., Robert F., Hau J., Guy P. A., Robert M. C., Riediker S. Acrylamide from Maillard reaction products. Nature, 419, 449-450, 2002.
- 21 Taeymans D., Wood J., Ashby P., Blank I., Studer A., Stadler R., Gondé P., Van Eijck P., Lalljie S., Lingnert H., Lindblom M., Matissek R., Müller D., Tallmadge D., O'brien J., Thompson S., Silvani D., Whitmore T. A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44, 323- 347, 2004.

- 22 Yasuhara A., Tanaka Y., Hengel M., Shibamoto T. Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. J. Agric. Food Chem., 51, 3999- 4003, 2003.
- 23 Diario Oficial de la Unión Europea. Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. L 39/2, 2003.
- 24 World Health Organization. Acrylamide in drinking water, WHO guidelines for drinking water quality. WHO/SDE/WSH/03.04/71, 1-7, 2003.
- 25 CFSAN/Office of Plant & Dairy Foods. Survey data on acrylamide in food: total diet study results. www.cfsan.fda.gov/~dms/acrydat2.html, septiembre 2006.
- 26 FAO/WHO. Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA), Roma, QD 305.A7, 1-35, 2002.
- 27 OEHHA. Proposition 65: Safe drinking water and toxic enforcement act of 1986. <http://www.oehha.org/prop65/law/P65law72003.html>, junio 2008.
- 28 Roach J. A. G., Andrzejewski D., Gay M. L., Nortrup D., Musser S. M. Rugged LC-MS/MS survey analysis for acrylamide in foods. J. Agric. Food Chem., 51, 7547-7554, 2003.
- 29 Riediker S., Stadler R. H., Analysis of acrylamide in food by isotope-dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A., 1020, 121-130, 2003.
- 30 Becalski A., Lau B. P. Y., Lewis D., Seaman S. W., Hayward S., Sahagian M., Ramesh M., Leclerc Y. Acrylamide in french fries: Influence of free amino acids and sugars, J. Agric. Food Chem., 52, 12, 3801-3806, 2004.
- 31 Andrzejewski D., Roach J. A. G., Gay M. L., Musser S. M. Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS. J. Agric. Food Chem., 52, 1996-2002, 2004.
- 32 Paleologos E. K., Kontominas M. G. Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection. J. Chromatogr. A., 1077, 128-135, 2005.
- 33 Matthys C., Bilau M., Govaer Y., Moons E., De Henauw S., Willems J. L. Risk assessment of dietary acrylamide intake in Flemish adolescents. Food and Chemical Toxicology, 43, 271-278, 2005.

- 34 Claeys W. L., De Vleeschouwer K., Hendrickx M. E., Effect of amino acids on acrylamide formation and elimination kinetics. *Biotechnol. Prog.*, 21, 1525-1530, 2005.
- 35 Young M. S., Jenkins K. M., Mallet, C. R. Solid-phase extraction and cleanup procedures for determination of acrylamide in fried potato products by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, 87, 961-964, 2004.
- 36 Marín J. M., Pozo O. J., Sancho J. V., Pitarch E., López F. J. y Hernández F. Study of different atmospheric-pressure interfaces for LC-MS/MS determination of acrylamide in water at sub-ppb levels. *J. Mass Spectrom.*, 41, 1041-1048, 2006.
- 37 Delatour T., Perisset A., Goldmann T., Riediker S., Stadler R. H. Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4625-4631, 2004.
- 38 Becalski A., Lau B. P.Y., Lewis D. y Suaman S. W. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 802-808, 2003.
- 39 Gökmen V., Senyuva H. Z., Acar J., Sarioglu K. Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1088, 193-199, 2005.
- 40 Elmore J. S., Koutsidis, G., Dodson A. T., Mottram D. S., Wedzicha B. L. Measurement of acrylamide and its precursors in potato, wheat, and rye model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1286-1293, 2005.
- 41 Castle L., Eriksson S. Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods. *J. AOAC Int.*, 88, 274-284, 2005.
- 42 Mastovska K., Lehotay S., Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7001-7008, 2006.
- 43 Amrein T. M., Bachmann S., Noti A., Biedermann M., Barbosa M. F., Biedermann-Brem S., Grob K., Keiser A., Realini P., Escher F., Amado R. Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: A comparison of cultivars and farming systems. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5556-5560, 2003.
- 44 Granvogl M., Jezussek M., Kofhler P. y Scheberle P. Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes – A minor but potent precursor in acrylamide formation. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4751-4757, 2004.

- 45 Mestdagh F., De Meulenaer B., Poucke C. V., Detavernier C., Cromphout C. y Peteghem C. V. Influence of oil type on the amounts of acrylamide generated in a model system and in french fries. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6170-6174, 2005.
- 46 Pittet A., Perisset A., Oberson J. M. Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1035, 123-130, 2004.
- 47 Calbiani F., Careri M., Elviri L., Mangia A. y Zangnoni I. Development and single-laboratory validation of a reversed-phase liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for identification and determination of acrylamide in foods. *J. AOAC*, 87, 1, 107-115, 2004.
- 48 Cavalli S., Polesello S., Saccani G. Determination of acrylamide in drinking water by large-volume direct injection and ion-exclusion chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1039, 155-159, 2004.
- 49 Jesussek M., Schieberle P. A new LC/MS-method for the quantitation of acrylamide based on a stable isotope dilution Assay and derivatization with 2-mercaptobenzoic acid. Comparison with two GC/MS methods. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7866-7871, 2003.
- 50 Biedermann M., Biedermann-Brem S., Noti A., Grob K., Egli P., Mandli, H., Two GC-MS methods for the analysis of acrylamide in foods. *Mitt Lebensm Hyg*, 93, 638-652, 2002.
- 51 Grob K, Biedermann M., Hoenicke K. y Gatermann R. Comment on “Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips” by J. R. Pedersen and J. O. O lsson, *Analyst*, 2003, 128, 332. *Analyst*, 129, 92, 2004.
- 52 DeVries J. X., y Post B. E. Comment on “Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips” by J. R. Pedersen and J. O. O lsson, *Analyst*, 2003, 128, 332. *Analyst*, 129, 93-95, 2004.
- 53 Tanaka M., Yoneda Y., Terada Y., Endo E. y Yamada T. Comment on “Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips” by J. R. Pedersen and J. O. O lsson, *Analyst*, 2003, 128, 332. *Analyst*, 129, 96-98, 2004.
- 54 Wenzl T, Lachenmeier D. W., Gökmen V. Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 119-137, 2007.
- 55 Zhang Y., Ren Y., Zaho H., Zhang Y. Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using gas chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, 584, 322-332, 2007.

- 56 Preston A., Fodey T., Elliott C. Development of a high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay for the routine detection of the carcinogen acrylamide in food, via rapid derivatisation pre-analysis. Anal. Chim. Acta, 608, 2, 178-185, 2008.
- 57 FDA. CFSAN/Office of Plant & Dairy Foods. Survey data on acrylamide in food: total diet study results. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrydat2.html>, octubre 2006.
- 58 FAO. El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y Nutrición Humana, <http://www.fao.org/docrep/To395S/T0395S00.htm>, noviembre 2006.
- 59 Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. Principios de análisis instrumental. Ed. McGraw-Hill, España, 2001.
- 60 Rubinson K. A., Rubinson J. F. Análisis instrumental. Ed. Pearson Prentice Hall, España, 2001.
- 61 Musser S. Detection and quantitation of acrylamide in foods. www.cfsan.fda.gov/~dms/acrylami.html, septiembre 2006.
- 62 Harvey D. Química analítica moderna. Ed. McGraw Hill, España, 2002.
- 63 Koscielniak P. On analytical usefulness of recovery method. Analytical Letters, 2004, Vol. 37, 12, 2625-2640.
- 64 Miller J. N., Miller J. C. Estadística y quimiometría para química analítica. Ed. Pearson Prentice Hall, España, 2002.
- 65 Poole C. F. The essence of chromatography. Elsevier, E.U.A., 2003.
- 66 Solomons G. T. W. Química orgánica. Ed. Limusa Wiley, México, 2002.
- 67 Wade L. G. Jr. Química orgánica. Ed. Prentice Hall, España, 2004.
- 68 Wang X., Porco J. A. J. Modification of C-terminal peptides to form peptide enamides: Synthesis of chondriamides A and C. J. Org. Chem., 66, 24, 8215-8221, 2001.
- 69 Friedman M. J. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. J. Agric. Food Chem., 51, 4504-4526, 2003.
- 70 Lee M. R., Chang L. Y., Dou J. P. Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-positive chemical ionization tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta., 582, 19-23, 2007.
- 71 Basova E. M., Bolshova T. A., Ivanov V. M. Models and regularities of retention in ion-pair chromatography. J. Anal. Chem., 51, 638, 1996.

- 72 Grumbach E. S., Wagrowski-Diehl D. M., Mazzeo J. R., Alden B., Iraneta P. C. Hydrophilic interaction chromatography using silica columns for the retention of polar analytes and enhanced ESI-MS sensitivity. LCGC, 22, 10, 2004.
- 73 Schlichtherle-Cerny H., Affolter M., Cerny C. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry of small polar compounds in food analysis. J. Anal. Chem., 75, 10, 2349-2354, 2003.
- 74 Mingliang Y., Hanfa Z., Liang K., Zhengdeng L., Renan W., Jiany Ni Hydrophilic interactions capillary electrochromatography for the separation of polar compounds. LCGC, 19, 10, 2001.
- 75 Hogendoorn E., Zoonen P.V. y Hernández F. The versatility of coupled-column LC. LCGC Europa, 16, 12, 2-10, 2003.
- 76 Wong V., Shalliker R. A. Isolation of the active constituents in natural materials by “heart-cutting” isocratic reversed-phase two-dimensional liquid chromatography. J. Chromatogr. A., 1036, 15-24, 2004.
- 77 The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Note for guidance on process validation. Londres, 2001.
- 78 ICH Steering Committee. Text on validation of analytical procedures Q2A. 1994.
- 79 AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures. <http://www.aoac.org/vmeth/PVM.pdf>, febrero 2007.