



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Estudio para la determinación de asparagina en alimentos

Autora: Henar González Díez

Tutores: Dr. Luis Mariano Debán Miguel y Dra. María Isabel Campos Labadie

(Departamento de Química Analítica)

AGRADECIMIENTOS

El siguiente trabajo ha sido realizado por la alumna del Grado en Química de la Universidad de Valladolid HENAR GONZÁLEZ DIEZ, en el departamento de Química Analítica, bajo la dirección del Dr. LUIS MARIANO DEBÁN MIGUEL y la Dra. MARÍA ISABEL CAMPOS LABADIE.

La realización de este trabajo ha supuesto para mí un periodo de aprendizaje intenso tanto en el campo científico como a nivel personal. Por lo tanto, me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han acompañado en este camino.

Agradecer a mis tutores el haberme facilitado la realización de este estudio y el haberme permitido tomar iniciativa en todo momento.

Del mismo modo, agradecer a los profesionales FRANCISCO DE LA ROSA y ROSARIO GÓMEZ los cuales me han brindado su ayuda y el material de laboratorio necesario.

INDICE

1.	ACRÓNIMOS	4
2.	RESUMEN/ABSTRACT	5
3.	INTRODUCCIÓN	6
3.1.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	8
4.	OBJETIVOS	13
5.	TÉCNICAS Y MATERIALES UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN	14
5.1.	TÉCNICAS DE SEPARACIÓN	14
5.2.	DETECCIÓN	14
6.	RESULTADOS EXPERIMENTALES	15
6.1.	REACTIVOS Y EQUIPOS EMPLEADOS	15
6.1.1.	REACTIVOS	15
6.1.2.	EQUIPOS	15
6.2.	ANÁLISIS DE ASPARAGINA	16
6.2.1.	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN	16
6.2.2.	ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS	16
6.2.3.	ESPECTROSCOPIA RAMAN	22
6.2.4.	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECTOR DE ULTRAVIOLETA	24
6.2.5.	CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA	29
6.3.	REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN CON ORTO-FALDEHIDO (OPA) Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS	30
6.3.1.	PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DEL AGENTE DERIVATIZANTE	32
6.3.2.	ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA	32
6.3.3.	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA	36
6.4.	EXTRACCIONES DE LAS MUESTRAS Y MEDIDAS	42
6.4.1.	EXTRACCIONES	42
6.4.2.	MEDIDAS	43
6.4.3.	MEDIDAS CON ADICIONES PATRÓN	53
7.	CONCLUSIONES	55
8.	BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS	56
9.	ANEXOS	60
9.1.	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECTOR DE ULTRAVIOLETA	60
9.2.	CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA	62
9.3.	MEDIDAS	64

1. ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Asn: Asparagina.

CDs: *Carbon dots*. Nanopartículas de carbono.

CE: Electroforesis capilar.

CG-MS: Cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas.

CL-MS: Cromatografía de líquidos con detector de espectrometría de masas.

ELSD: *Evaporative Light Scattering*, detector evaporativo de dispersión de luz.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FDL: Fluorescencia.

FID: Detector de ionización de llama.

HPLC: *High performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alta eficacia.

M.A.P.: Métodos de adiciones patrón.

NBD-Cl: 4-cloro-7-nitrobenxofurazan.

NIR: *Near-infrared spectroscopy*. Espectroscopía de infrarrojo cercano.

OPA: Orto-ftalaldehido.

OPT: OPA+ etanol+ 2-mercaptoetanol + tampón borato.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

SPE: Extracción en fase sólida.

TFIR: *Fourier-transform infrared spectroscopy*, espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier.

UV: Ultravioleta.

UV-Vis: ultravioleta-visible.

2. RESUMEN/ABSTRACT

La asparagina (Asn) es un aminoácido que puede encontrarse en múltiples alimentos. En la actualidad, está tomando mucha importancia su estudio puesto que es uno de los principales componentes en la reacción de Maillard que puede derivar en la producción de acrilamida, compuesto cancerígeno.

En el siguiente trabajo se ha realizado un estudio para la determinación de asparagina mediante cromatografía de líquidos (HPLC) con detector ultravioleta/visible (UV-Vis) y con detector de fluorescencia (FLD); realizando en el último caso una derivatización previa con orto-ftaldehído (OPA). Además, también se procedió a realizar un breve estudio por cromatografía de gases (CG) con detector de ionización de llama (FID).

A lo largo del trabajo se plantean los inconvenientes y las ventajas que presentan cada una de las técnicas de análisis utilizadas, así como el interés de llevar a cabo su determinación mediante un proceso de derivatización.

Asparagine (Asn) is an amino acid that can be found in a lot of foods. Currently, its research is becoming very important because asparagine is one of the main components of the Maillard reaction that can lead to the production of acrylamide, a carcinogenic compound.

In the following work, a study has been carried out for the determination of asparagine by liquid chromatography (HPLC) with a ultraviolet / visible detector (UV-Vis) and with a fluorescence detector (FLD); in the last one it is necessary a derivatization with o-Phthalaldehyde (OPA). In addition, a brief study was also carried out by gas chromatography (GC) with flame ionization detector (FID).

Throughout the work, we raise the disadvantages and advantages presented by each of the analysis techniques used, as well as the interest of carrying out its determination with a derivatización process.

3. INTRODUCCIÓN

La asparagina (Asn) se obtuvo por primera vez mediante extracción del jugo del espárrago en 1806 por el químico francés **Pierre Robiquet [1]**. Es un aminoácido no esencial, es decir, el organismo es capaz de sintetizarlo partiendo de otros compuestos (ácido aspártico y amonio) en el hígado. Las características de la asparagina se indican a continuación:

- Fórmula molecular: $C_4H_8N_2O_3$.
- Peso molecular: 132.12 g/mol.
- Punto de fusión: 235 °C.
- Densidad: 1g/cm³.
- $pK_1=2.14$ y $pK_2=8.72$.
- Posee en su estructura cadenas laterales capaces de formar enlaces de hidrógeno. El grupo amina actúa como donador de hidrógenos, mientras que el grupo carboxilo es receptor de hidrógenos (Fig.1).

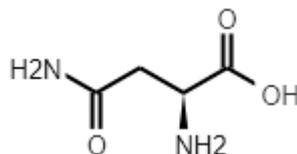


Figura 1: Estructura química de la asparagina

Este aminoácido puede encontrarse en diferentes alimentos como: harinas, huevos, frutos secos, carne de aves, marisco, etc [2].

En la actualidad ha tomado importancia el estudio de la asparagina en alimentos por ser un componente básico para la formación de acrilamida a partir de la reacción de **Maillard [3]**. Esta reacción consiste en hacer reaccionar el grupo amino de un aminoácido, la asparagina, y un grupo carbonilo de un azúcar reductor como la glucosa, fructosa, maltosa o lactosa. Para poder llevar a cabo la reacción se necesita: temperaturas generalmente superiores a 120 °C (la temperatura ideal oscila entre los 150°C y 250 °C), humedad y pH alcalino (el valor óptimo es pH 10). Dependiendo de las

condiciones de trabajo se forman diferentes compuestos intermedios, dando lugar a los productos finales, entre ellos la acrilamida (Fig. 2) [4,5].

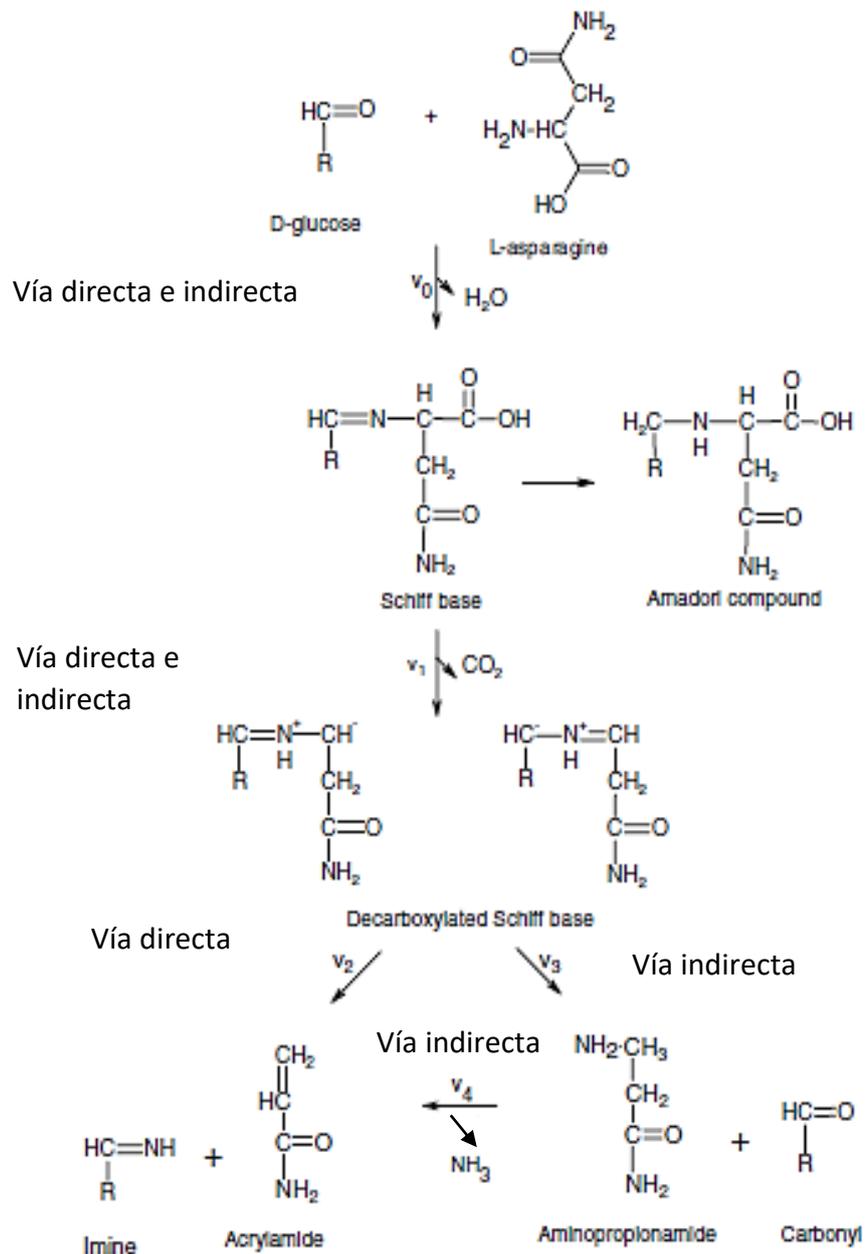


Figura 2: Reacción directa e indirecta de Maillard

La acrilamida, como hemos comentado, es uno de los compuestos resultantes de la reacción de Maillard, se transforma en el cuerpo humano en un compuesto químico conocido como glicidamida, (Fig.3), la cual es la causante de mutaciones y daños en el ADN [6-8]. Como subproductos de esta reacción cuando se lleva a cabo tanto por vía

directa como indirecta son los mismos: se obtiene agua, dióxido de carbono y una imina. [9].

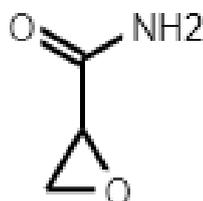


Figura 3: Estructura de la glicidamida

La formación de la acrilamida dependerá de los niveles de asparagina y azúcares reductores presentes en el alimento, por eso son necesarias técnicas sensibles, precisas y selectivas que sean capaces de determinar la cantidad de asparagina en las muestras.

El Reglamento (UE) 2017/2158 de la Comisión, de 20 de noviembre de 2017, establece los niveles de acrilamida de referencia para reducir su presencia en los alimentos [10]. En la actualidad la herramienta más eficaz para el control del contenido de acrilamida es el empleo de la enzima asparaginasa. Esta enzima es capaz de hidrolizar la asparagina obteniendo como producto final el ácido aspártico y amoníaco, (Fig. 4). Sin embargo, su elevado coste (100 U/mg son 171 €) limita su aplicación a gran escala [11].

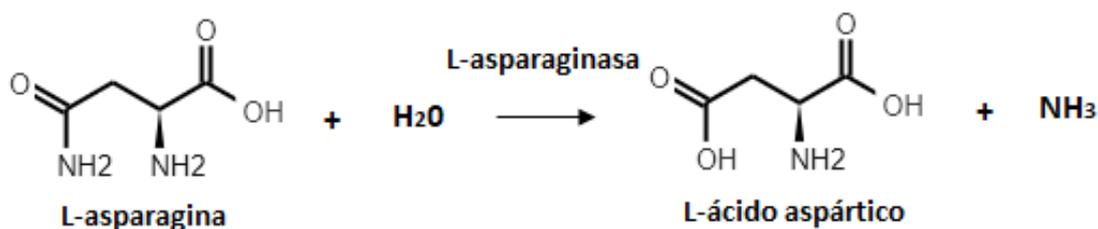


Figura 4: Reacción de hidrólisis catalizada por la L-asparaginasa.

3.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En la revisión bibliográfica realizada se encuentran diversos métodos analíticos para el análisis cualitativo y cuantitativo de la asparagina. Uno de los más utilizados es la **cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia**, debido

a su alta sensibilidad del orden de nanogramos. A las muestras, diferentes tipos de alimentos y bebidas, se les realiza un tratamiento previo, el cual consiste en una extracción con tiodiglicol acidificado con HCl, precipitación de las proteínas con ácido 5-sulfosalicílico, adición de NaOH (1 M) hasta que el pH se ajusta a 2.2 y finalmente enrase con un tampón de citrato de pH 2.2. Posteriormente se lleva a cabo una derivatización pre-columna utilizando fenilisotiocianato (Fig.5). En la separación cromatográfica se trabaja en gradiente para facilitar la separación de los diferentes aminoácidos [12-15].

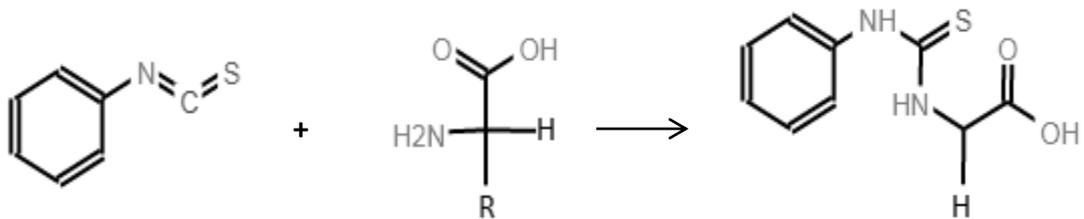


Figura 5: Reacción de fenilisotiocianato con un aminoácido

También mediante HPLC con detector fluorimétrico, en otras investigaciones se analizó la asparagina pero llevando a cabo una derivatización post-columna con ninhidrina (Fig.6) [12,14-16].

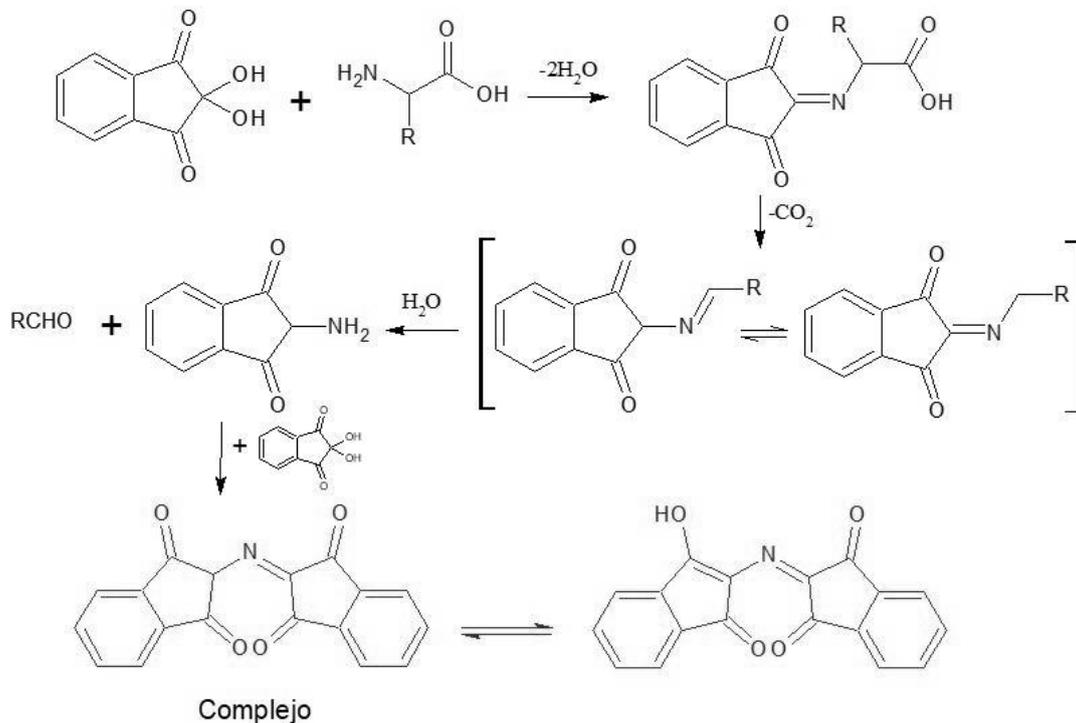


Figura 6: Reacción de ninhidrina con un aminoácido

En algunos estudios, la derivatización de la asparagina se realiza con o-ftaldialdehído, esta derivatización pre-columna resulta más fácil de llevar a cabo que los casos anteriores y presenta mejores resultados (Fig.7) [12, 15, 17-28].

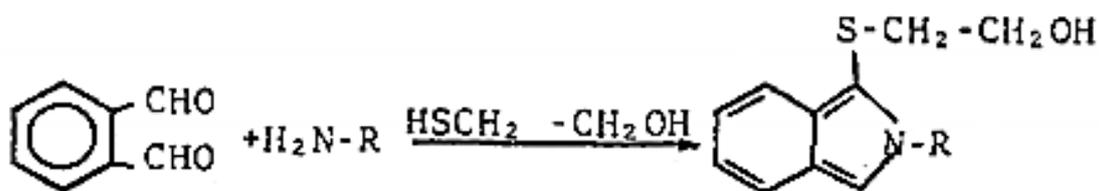


Figura 7: Reacción OPA, aminoácido y 2-mercaptoetanol. Como subproducto se obtiene agua y un protón.

Por **cromatografía de intercambio iónico [19]** y una previa derivatización con ninhidrina se ha cuantificado la asparagina que contienen algunos cereales, como el trigo y el centeno.

Otros autores estudiaron los niveles de asparagina presentes en muestras de alimentos como: patatas, berenjena, garbanzos, harina de trigo, etc..., mediante **electroforesis capilar con detección UV-Visible [20 y 21]**, realizando una derivatización previa con 4-cloro-7-nitrobenzofurazan o 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (Fig. 8).

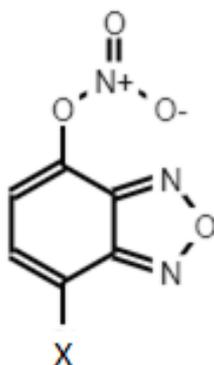


Figura 8: Estructura del agente derivatizante NBD-Cl y NBD-F dependiendo si X se sustituye por un cloro o por un flúor.

Las nanopartículas de carbono CDs “Carbon dots”, sintetizadas por pirólisis teniendo como precursor L-asparagina, presentan **luminiscencia** con un máximo de emisión a 441 nm cuando se excita a 348 nm. Esto permite la determinación de asparagina mediante técnicas luminiscentes [22 y 23].

En otros estudios se describe el análisis de diferentes aminoácidos, entre los que se encuentra la asparagina, en ingredientes utilizados en la alimentación animal. Para ello, se utiliza una **cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta**. Se realiza previamente una extracción de las proteínas con agua desionizada y se hidrolizan; para posteriormente llevar a cabo una derivatización pre-columna utilizando el reactivo isotiocianato de fenilo. En cuanto a las condiciones cromatográficas; trabajar en gradiente facilita la separación de los distintos aminoácidos [12, 24 y 25].

Knol, Linssen y van Boekel propusieron un modelo cinético para la formación de acrilamida a partir de fructosa y asparagina. En una de las etapas que llevaron a cabo analizaron la asparagina con **cromatografía de alta resolución y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD)** [26]. El detector ELSD es un detector de masas, compuesto por un aerosol adecuado para la detección de componentes de muestras no volátiles en un eluyente volátil. Registra en continuo la luz dispersada por las partículas sólidas residuales después de la evaporación de la fase móvil. Su respuesta es proporcional a la masa del analito y no está limitado por las características espectrales de los compuestos.

Otros métodos realizan la determinación de asparagina por **cromatografía líquida de alta resolución con detector de espectrometría de masas** de electrospray (ESI) [27-28]. Se toma la muestra (pan), se homogenizan, se trata con agua desionizada, se centrifuga y el líquido sobrenadante se hace pasar por un cartucho C₁₈ para aislar la asparagina.

Varios autores realizan la determinación de asparagina por **espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier**, previa separación mediante **cromatografía líquida de alta resolución**. Esta técnica permite separar la asparagina de forma selectiva, se recoge la fracción de líquido en la que se encuentra el aminoácido de interés y se deja secar sobre una superficie para que forme una película. Esta película una vez seca se analiza con el espectrofotómetro el cual registra los espectros en el intervalo de 1800 cm⁻¹ -800 cm⁻¹ [29 y 30].

Guorong y col. [31] realizan estudios mediante **espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)** para la determinación de asparagina en plantas solanáceas.

Mediante **espectroscopía Raman** se han realizado estudios con láser de Nd: YAG con el fin de obtener el espectro vibracional de la L-asparagina y proceder a su determinación [32-33].

De todos los trabajos consultados, se concluye que las metodologías más utilizadas para el estudio de la L-asparagina en harinas son: cromatografía de líquidos de alta resolución con detectores UV-Visible y fluorescente.

4. OBJETIVOS

Proponer un método sencillo, aplicable al análisis de asparagina en muestras de productos alimenticios.

Inicialmente, se planteó realizar un estudio previo de este compuesto por técnicas de absorción y emisión molecular y Raman, a efectos de su caracterización y posterior determinación por cromatografía de líquidos de alta resolución, en los dos primeros casos.

A continuación, se procedería a estudiar las condiciones óptimas de medida por HPLC con detector de UV-Visible, y fluorimétrico. Por último, se trataría de llevar a cabo un breve estudio para su posible determinación por CG con detector de FID.

5. TÉCNICAS Y MATERIALES UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN

5.1. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

- 1) **Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**: Es una técnica de separación por elución en el que la fase móvil es un líquido. La muestra se inyecta y pasa a la columna, donde los analitos se separan dependiendo de su afinidad por la fase móvil y la fase estacionaria.
- 2) **Cromatografía de gases (CG)**: Es una técnica de separación por elución en el que la fase móvil es un gas. La muestra es inyectada y volatilizada en el portal de inyección y en la columna se produce la separación de los distintos analitos en función de su interacción con la fase estacionaria.

5.2. DETECCIÓN

- 1) **Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis**: Se basa en la medición de la absorción de radiación ultravioleta y visible por parte de los analitos. Esta técnica de detección puede ir también acoplada a una técnica de separación.
- 2) **Espectrometría de fluorescencia**: La fluorescencia es un proceso de emisión. Consiste en la emisión por relajación de las moléculas que previamente han sido excitadas por una radiación electromagnética. Este método de detección se puede utilizar en consonancia con una técnica de separación.
- 3) **Detector de ionización de llama (FID)**: Está formado por un quemador (hidrogeno/oxígeno) al cual llega el gas portador con el analito procedente de la columna cromatográfica y un electrodo colector situado encima de la llama. A las temperaturas de trabajo, la mayoría de los compuestos orgánicos se ionizan y generan una diferencia de potencial entre el quemador y el electrodo. Esta diferencia de potencial es amplificada y registrada permitiendo la detección de los compuestos.
- 4) **Espectroscopía Raman**: Es una técnica de detección capaz de proporcionar en poco tiempo gran información química y estructural. Se basa en el estudio de luz dispersada por un compuesto al incidir sobre él un haz de luz altamente monocromático (procedente de un láser). No es preciso tratamiento previo y presenta como ventaja que es una técnica no destructiva.

6. RESULTADOS EXPERIMENTALES

6.1. REACTIVOS Y EQUIPOS EMPLEADOS

6.1.1. REACTIVOS

- L-asparagina, Sigma Aldrich, ≥ 98 % pureza.
- Orto-ftaldehído, Sigma Aldrich, en polvo, ≥ 97 % pureza.
- 2-mercaptoetanol, Sigma Aldrich, ≥ 99 % pureza.
- Acrilamida, Sigma Aldrich, ≥ 99 % pureza HPLC, en polvo.
- Metanol, Sigma Aldrich, $\geq 99,9$ % pureza HPLC.
- Etanol, Sigma Aldrich, $\geq 99,8$ % pureza HPLC.
- Acetonitrilo, Sigma Aldrich, $\geq 99,9$ % pureza HPLC.
- Agua desionizada.
- Ácido ortofosfórico, PanReac AppliChem, 85% pureza.
- Di-hidrógeno fosfato de potasio, PanReac AppliChem, 99.5 % pureza.
- Ácido bórico, Sigma Aldrich, $\geq 99,5$ % pureza.
- Hidróxido sódico, Sigma Aldrich, grado ACS, ≥ 97 % pureza.
- Bombonas de gases de H₂, N₂ y aire sintético Alphagaz™, Air Liquid.

6.1.2. EQUIPOS

- Balanza Precisa 40SM-20A (± 0.00001 g)
- Espectrofotometría UV-Vis

Equipo	HEWLETT PACKARD AGILENT 8453
Cubeta	Cuarzo
Lámpara	Deuterio y wolframio

- Cromatografía HPLC-UV/Vis

Equipo	AGILENT 1200
Columna	Col Kromaphase, C ₁₈ , 5.0 μ m, 150 mm x 4.6 mm

- Cromatografía de gases-FID

Equipo	AGILENT TECHNOLOGIES 6890N
Columna	Polietilenglicol 30 m x 0.25 mm diámetro interno x 0.25 µm de espesor

- Espectrometría de fluorescencia

Equipo	Hitachi F-3000
Cubeta	Cuarzo
Lámpara	Xenón

- Cromatografía HPLC-FLD

Equipo	AGILENT 1100
Columna	Col Kromaphase 100, C ₁₈ , 5.0, 150 mm x 4.6 mm

- Espectrometría Raman

Equipo	i-Raman
Láser	Láser de Diodos ($\lambda=785$ nm)

6.2. ANÁLISIS DE ASPARAGINA

6.2.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN

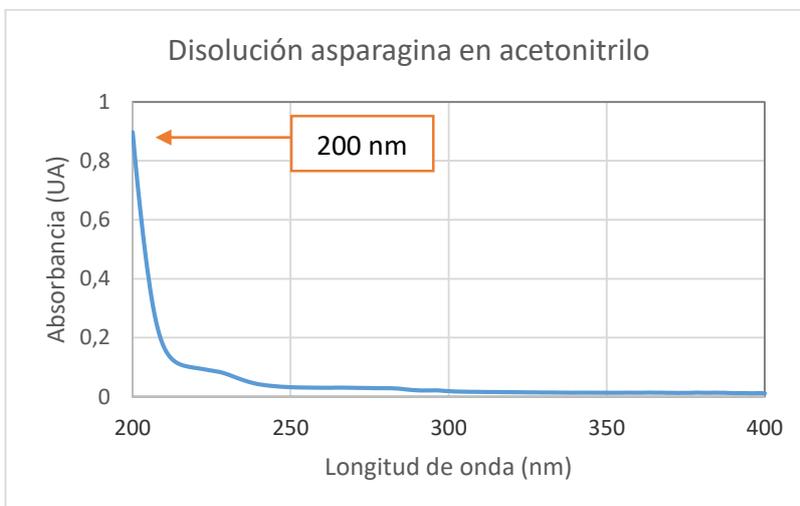
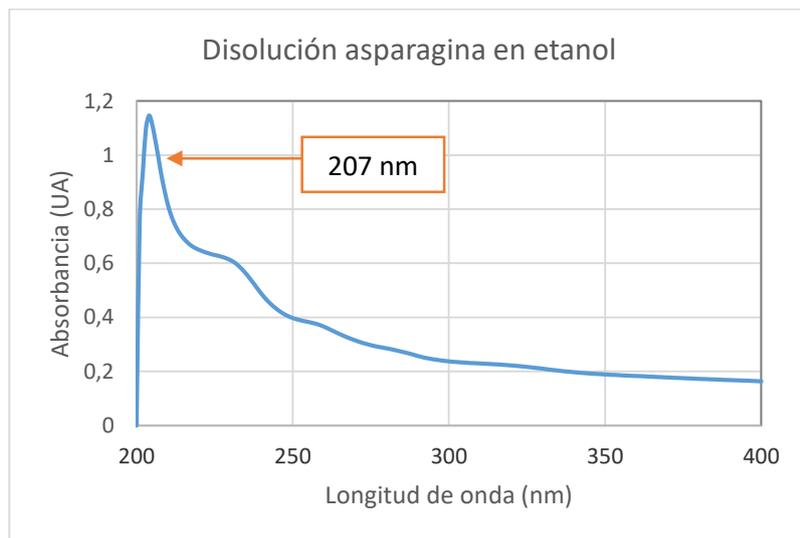
La muestra patrón original de L- asparagina, es un sólido blanco. A partir del mismo, se prepararon diferentes disoluciones, utilizando agua, metanol, acetonitrilo, hexano y etanol como disolvente. Se estudió en esa gran variedad de disolventes para evaluar el comportamiento y estabilidad del analito en los distintos medios.

Se toman alrededor 0.025 g, se disuelven en el medio correspondiente y se enrasan a 50 ml para preparar, en cada caso, las disoluciones patrón de máxima concentración; a partir de estas se prepararon otras de menor concentración tomando diferentes alícuotas y enrasando al volumen adecuado.

6.2.2. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

Se realiza un estudio para determinar la longitud de onda óptima de absorción de la asparagina en los distintos disolventes, con el fin de fijar las condiciones de

medida para llevar a cabo su determinación por HPLC-UV/Vis. En todos los espectros se observó un máximo de absorción entre 200 y 210 nm. Se muestran los espectros correspondientes a la disolución de asparagina en los distintos disolventes en la Fig.9.



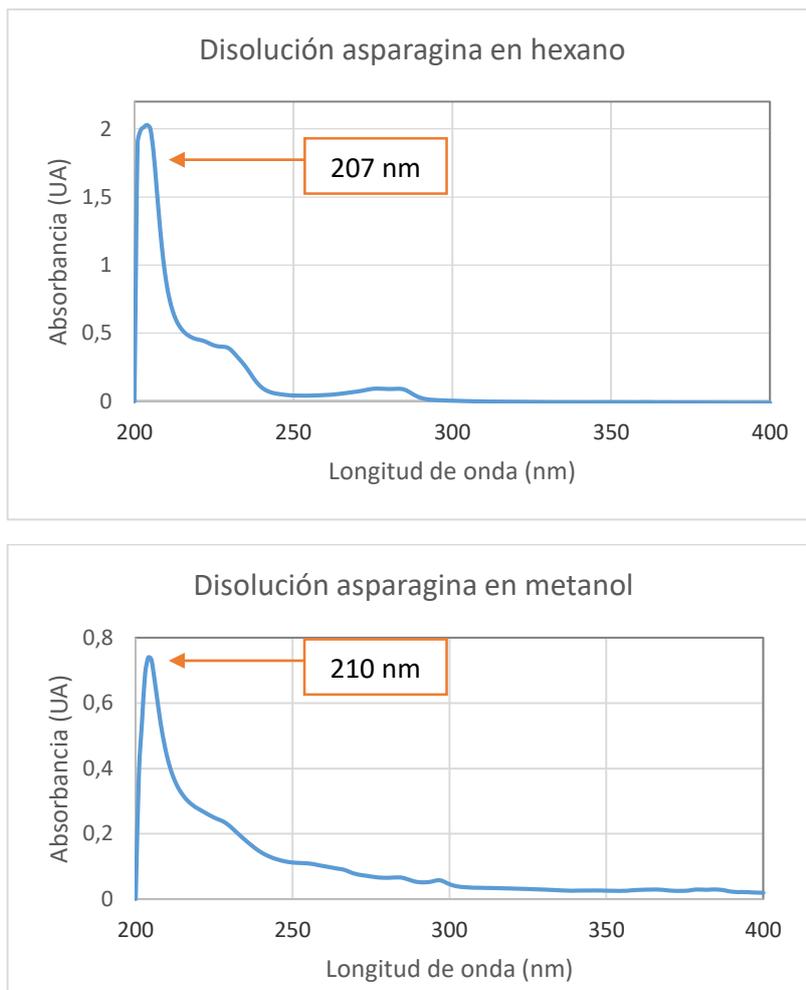


Figura 9: Espectro UV-Vis de la disolución de asparagina en los distintos disolventes

INFLUENCIA DEL TIEMPO

Se mantuvieron las muestras en recipientes de plástico cerrados y en ausencia de luz durante un periodo de tiempo de hasta dos meses, procediéndose a medir la absorbancia de las disoluciones anteriormente citadas con el fin de observar su estabilidad. Se comprobó que en metanol y etanol el espectro variaba, posiblemente por la reacción del alcohol con la asparagina obteniéndose el correspondiente éster (Fig.10). Cuando el disolvente utilizado era el hexano también se observaban modificaciones en su espectro; debido a la posible epimerización de la asparagina. En agua y acetonitrilo los espectros de absorción sufrieron ligeras modificaciones.

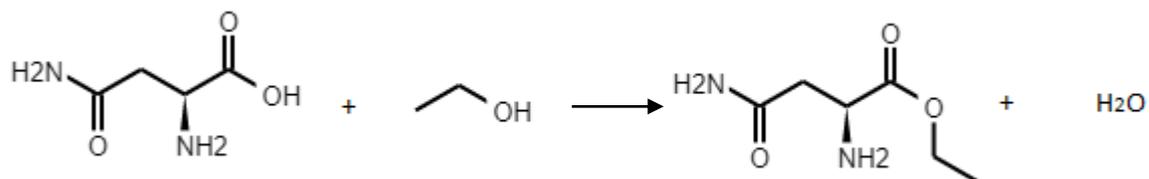


Figura 10: Esterificación asparagina al reaccionar con etanol. Es similar con metanol.

A continuación, se muestran los espectros correspondientes a la disolución de asparagina en los distintos disolventes al cabo de dos meses. (Fig.11).



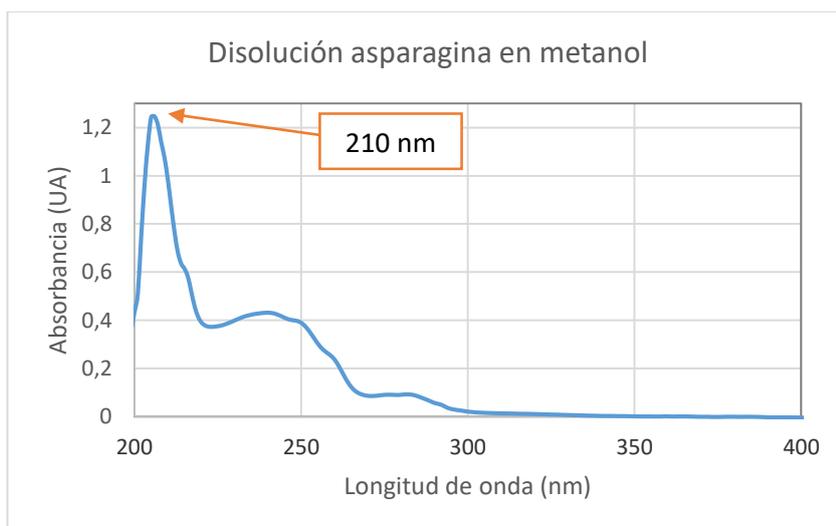
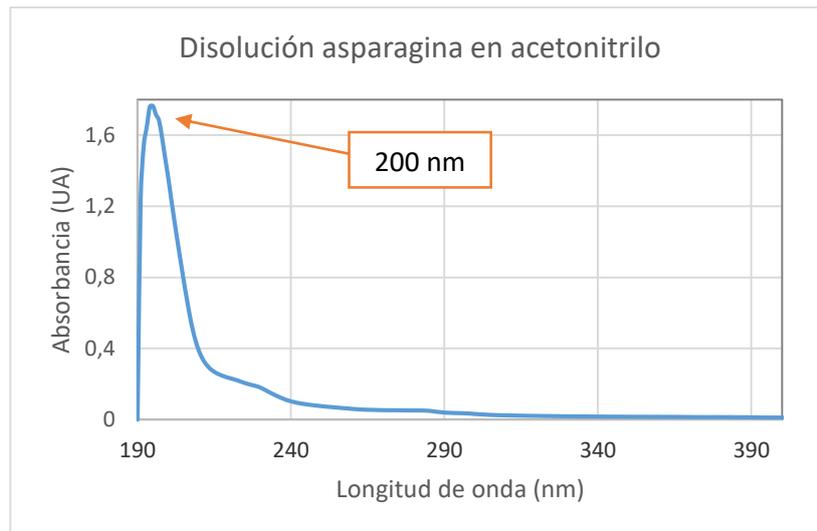


Figura 11: Espectro UV-Vis de la disolución de asparagina en los distintos disolventes al cabo de dos semanas de su preparación.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN

Se realizó una línea de calibrado de diferentes patrones de asparagina en **agua**; en la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para un intervalo de entre 1 y 52 ppm, cuando se representan, Fig. 12, la buena linealidad se observa entre 1 y 20 ppm. No se tiene en cuenta el valor de 52 ppm en la representación dado que el resultado nos indica una saturación en la medida, con un elevado error. El valor de la absorptividad molar es $4.24 \cdot 10^4$ L/mol · cm.

Tabla 1: Línea de calibrado UV-Vis, patrones de asparagina en agua.

Concentración (ppm)	Absorbancia (UA)
1.04	0.239
2.09	0.280
4.18	0.268
10.50	0.441
20.88	0.880
52.20	1.614

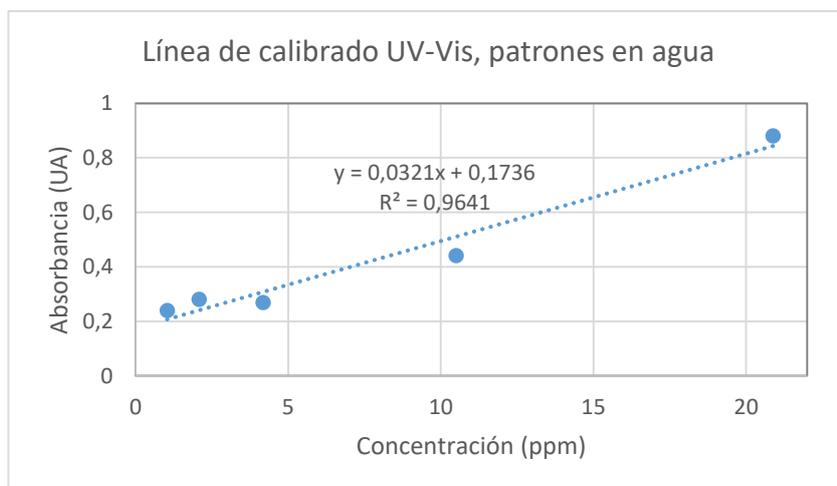


Figura 12: Línea de calibrado UV-Vis. Asparagina disuelta en agua.

En el caso de las disoluciones patrón en **metanol**, su línea de calibrado no presenta una buena linealidad, debido a la reacción secundaria de formación de esteres metílicos anteriormente citada.

En medio **acetónitrilo** se realizó también una línea de calibrado con diferentes patrones. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para el intervalo de entre 0.08 y 8,08 ppm. La mejor linealidad se observa aproximadamente en dicho intervalo

como se puede comprobar en la Fig. 13. El valor de la absorptividad molar es $4.88 \cdot 10^3$ L/mol · cm.

Tabla 2: Línea de calibrado UV-Vis, patrones de asparagina en acetonitrilo.

Concentración (ppm)	Absorbancia (UA)
0.08	0.095
0.32	0.197
0.81	0.211
1.62	0.213
4.04	0.221
8.08	0.238

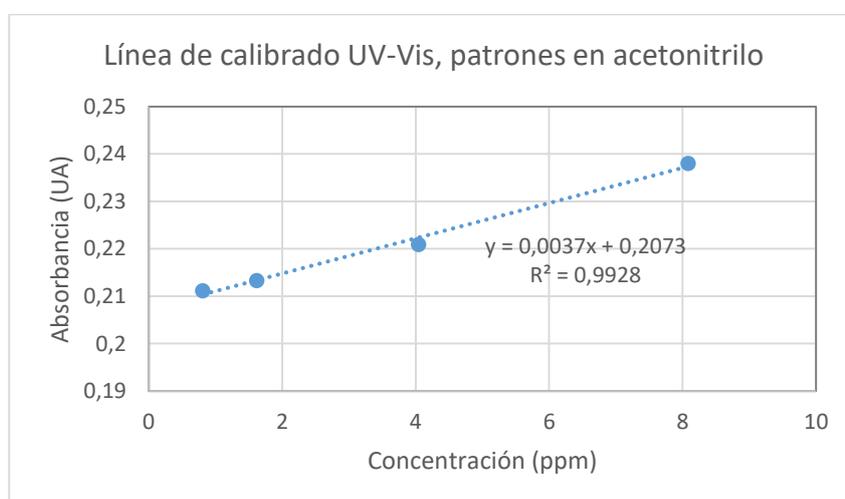


Figura 13: Línea de calibrado UV-Vis. Asparagina disuelta en acetonitrilo.

6.2.3. ESPECTROSCOPÍA RAMAN

Se realizan diferentes medidas por esta técnica para caracterizar la muestra sólida correspondiente al patrón de asparagina (Fig. 14). Los desplazamientos e intensidades relativas de las bandas podrían permitir identificar el compuesto en dicho tipo de muestras. La asparagina está compuesta por 17 átomos, por lo que posee 45 modos normales de vibración; además como no existen elementos de simetría en una molécula aislada todos los modos normales son activos en Raman. Los desplazamientos más característicos que se pueden apreciar en el espectro Raman de la asparagina se reflejan en la tabla 3.

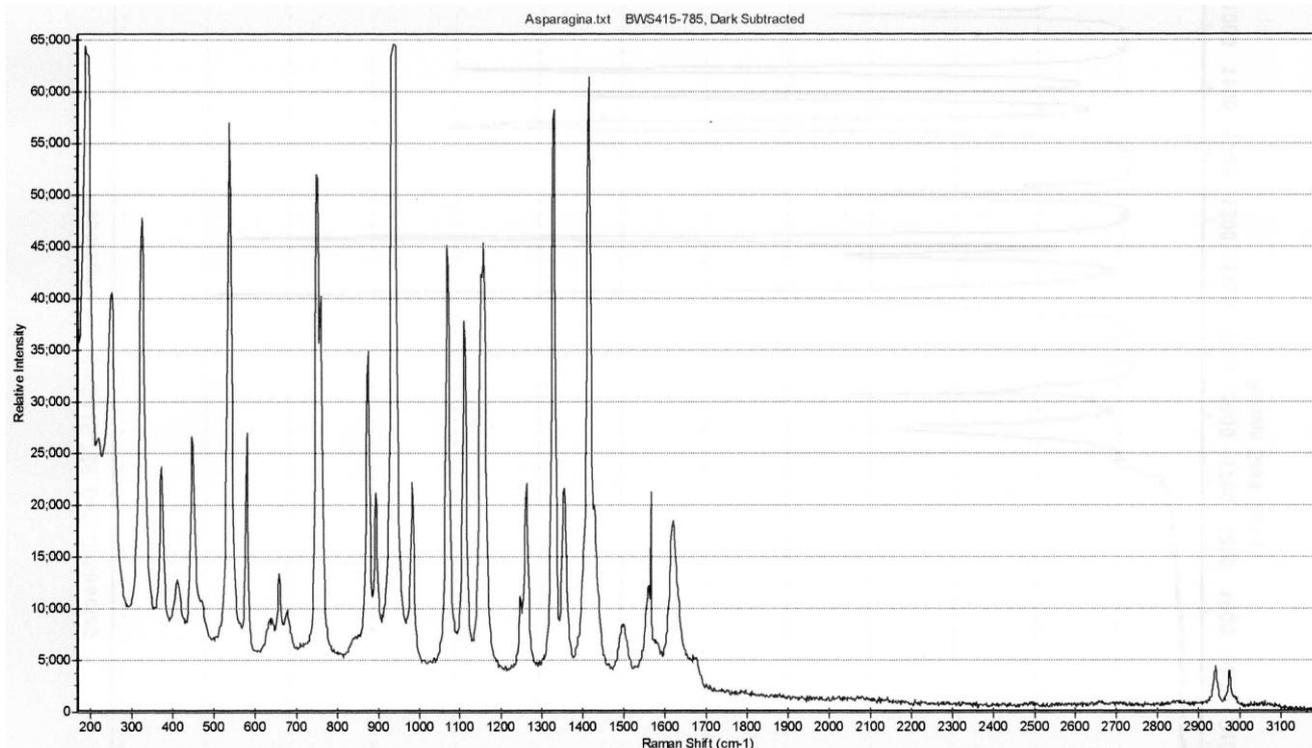


Figura 14: Espectro Raman de la asparagina.

Tabla 3: Desplazamientos del espectro Raman de la asparagina

Desplazamiento (cm ⁻¹)	Descripción
247	Torsión C-C
323	Flexión C-C-C
537	Torsión NH ₂
750	Aleteo NCO
874	Balanceo CH ₂
937	Extensión C-C
1070	Extensión C-N
1110	Balanceo NH ₃ ⁺
1150	Aleteo NH ₂
1328	Flexión C-H
1410	Extensión C-N (amida primaria)
1500	Flexión NH ₃ ⁺
2950	Extensión CH ₂
2980	Extensión CH

En el intervalo entre 2900 y 3000 cm⁻¹ aparece también la molécula de agua.

6.2.4. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECTOR DE ULTRAVIOLETA

Se estudiaron las disoluciones patrón de acetonitrilo, agua y metanol a distintas concentraciones, se fijó la longitud de onda a 200 nm, 204 nm y 210 nm respectivamente; y se trabajó con diferentes fases móviles. Dadas las características del compuesto y de la columna utilizada, se procedió en primer lugar a su estudio con una fase constituida únicamente con acetonitrilo para posteriormente modificar los porcentajes de este; con el fin de encontrar las condiciones más óptimas de medida. (Tabla 4)

Tabla 4: Fases móviles

Fase móvil	% Acetonitrilo	% Agua	% Metanol	% Tampón fosfato pH=2.8
1	100	0	0	0
2	80	10	10	0
3	20	70	10	0
4	40	40	20	0
5	5	85	0	10

Todas las disoluciones patrón fueron medidas al menos por triplicado para comprobar la reproducibilidad de los resultados. En patrones en acetonitrilo los mejores resultados se obtienen con *fase móvil 1*; en medio acuoso con *fase móvil 3*; y las disoluciones patrón en metanol las condiciones idóneas de trabajo son las correspondientes a *fase móvil 5*.

En la tabla 5 se recogen los tiempos de retención de la asparagina en los distintos medios y condiciones que ha sido medida, los cuales pueden verse reflejados en las Figuras 15, 16 y 17 que corresponden a los diferentes cromatogramas.

Tabla 5: Tiempos de retención de la asparagina

Disolvente	Fase móvil	Tiempo de retención de la L-asparagina(min)
Acetonitrilo	1	3.63
Agua	3	1.31
Metanol	5	1.40

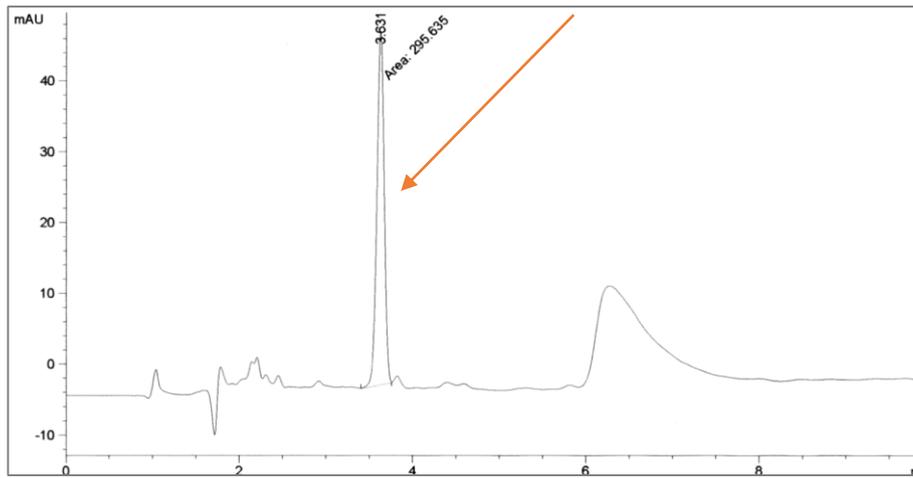


Figura 15: Disolución asparagina en acetonitrilo. Fase móvil 1.

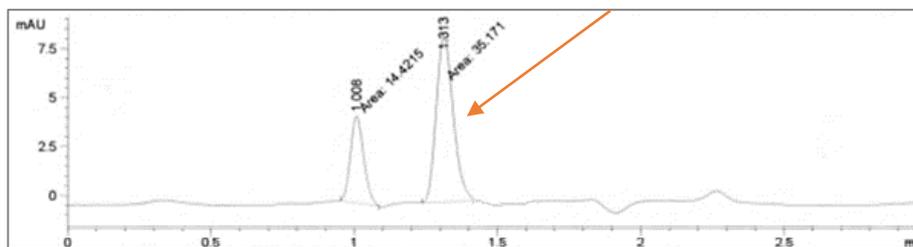


Figura 16: Disolución asparagina en agua. Fase móvil 3.

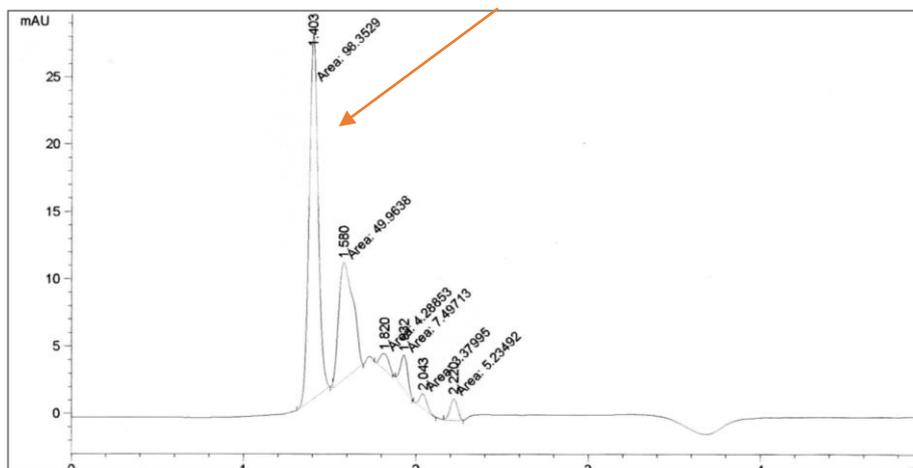


Figura 17: Disolución de asparagina en metanol. Fase móvil 5.

A continuación y en las condiciones óptimas de medida, se procedió a realizar las correspondientes líneas de calibrado en acetonitrilo, agua y metanol. Los resultados se reflejan en las Tablas 6, 7, 8 y Figuras 18, 19 y 20.

LÍNEA DE CALIBRADO DE ASPARAGINA EN ACETONITRILLO, FASE MÓVIL 1.

Tabla 6: Resultados de asparagina en acetonitrilo. Fase móvil 1.

Concentración (ppm)	Área pico (mAU · s)
0.32	804.69
0.81	806.077
1.62	819.297
4.04	968.205
8.08	1157.7

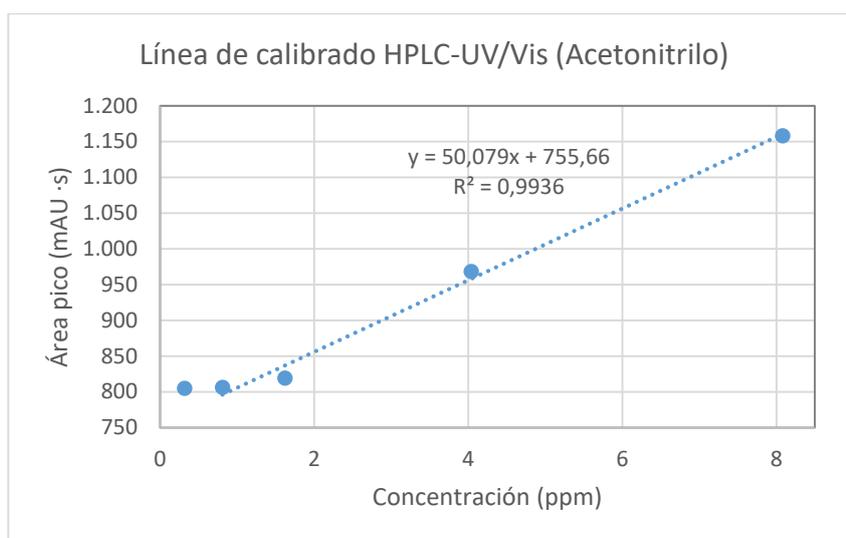


Figura 18: Línea de calibrado HPLC-UV/Vis, fase móvil 1, asparagina en acetonitrilo.

LÍNEA DE CALIBRADO DE ASPARAGINA EN AGUA, FASE MÓVIL 3.

Tabla 7: Resultados de asparagina en agua. Fase móvil 3.

Concentración (ppm)	Área pico (mAU · s)
0.10	----
0.21	1.001
0.42	3.949
1.04	6.900
4.18	35.171
10.50	69.115
20.88	122.426

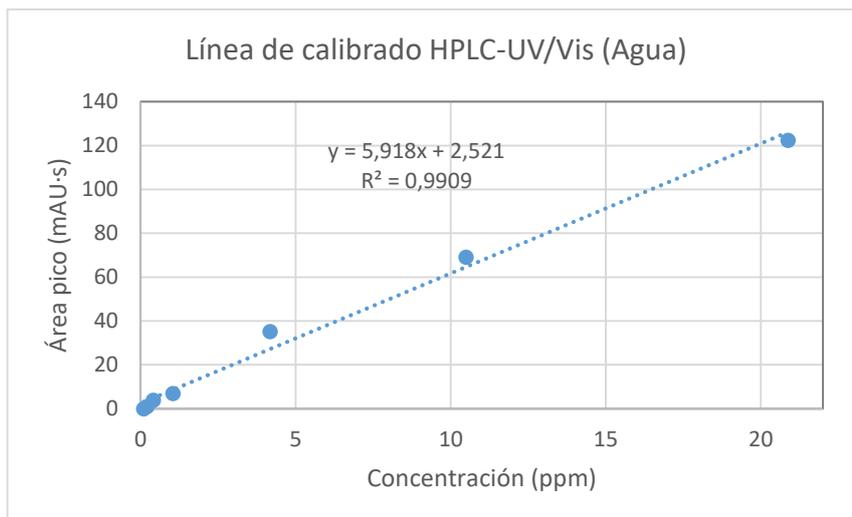


Figura 19: Línea de calibrado HPLC-UV/Vis, fase móvil 3, asparagina en agua.

LÍNEA DE CALIBRADO DE ASPARAGINA EN METANOL, FASE MÓVIL 5.

Tabla 8: Resultados de asparagina en metanol. Fase móvil 5.

Concentración (ppm)	Área pico (mAU · s)
1.02	48.241
5.08	114.813
10.16	98.353
20.32	102.151
50.80	174.904

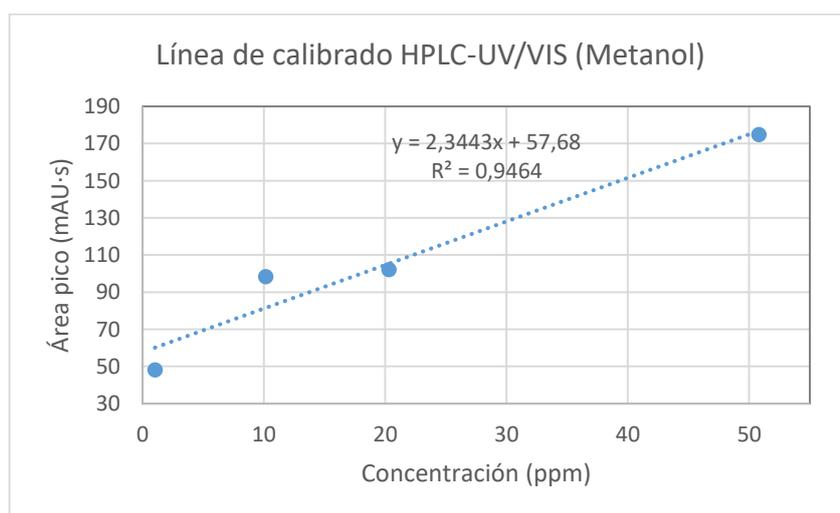


Figura 20: Línea de calibrado HPLC-UV/Vis, fase móvil 5, asparagina en metanol.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el procedimiento más adecuado sería el correspondiente a disoluciones en medio acuoso o en acetonitrilo, el medio

metanol no es recomendable por la inestabilidad del compuesto en el mismo. Se puede llegar a la conclusión de que con este tipo de columna los tiempos de retención son muy cortos; lo cual podría representar un problema en el análisis de muestras más complejas, por la presencia de otros aminoácidos, sin embargo, en nuestro caso los resultados de los estudios previos a la muestra han sido bastante satisfactorios.

Los límites de detección (LoD) obtenidos para los patrones en agua es de 0.11 ppm y en metanol es de 0.26 ppm; mientras que los límites de cuantificación (LoQ) son 0.36 ppm y 0.87 ppm respectivamente.

Se realizó además un breve estudio de patrones de **acrilamida** en agua y metanol. Se pretende comprobar si en el proceso de extracción de las muestras por Soxhlet se genera, debido a las temperaturas que alcanza el vidrio, algo de acrilamida ya que se apreciaba un ligero depósito marrón en los bordes del matraz y olor a horneado. A continuación, se muestran los correspondientes cromatogramas (Fig. 21 y 22) en medio acuoso y metanol, en ellos se observa que el tiempo de retención de la acrilamida es de 1.62 minutos y 1.58 minutos respectivamente.

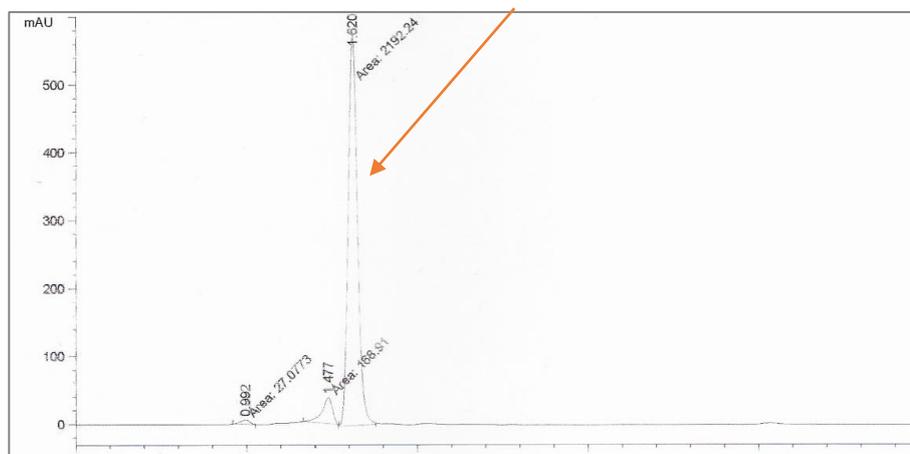


Figura 21: Disolución de acrilamida en agua. Fase móvil 3.

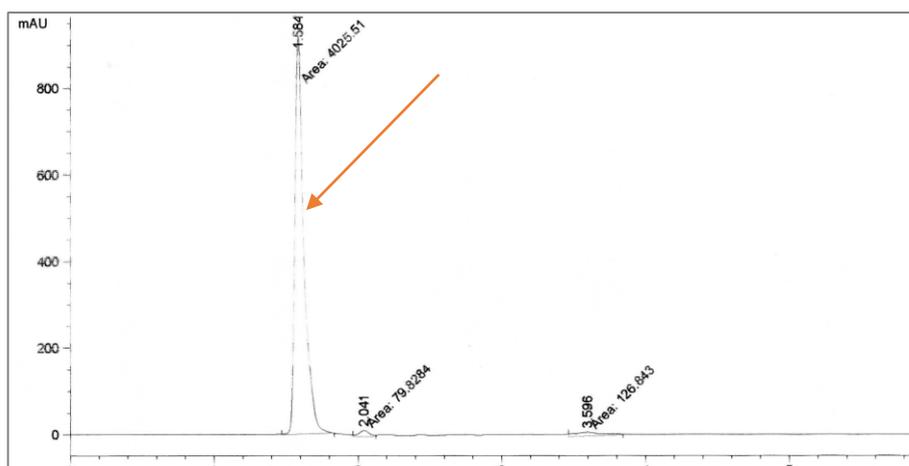


Figura 22: Disolución de acrilamida en metanol. Fase móvil 5.

El resto de los cromatogramas se muestran en anexos (**Cromatografía de líquidos con detector de ultravioleta**).

6.2.5. CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA

Se estudiaron las disoluciones patrón en metanol de distintas concentraciones (entre 158.96 ppm y 1.57 ppm) en varias condiciones de trabajo (rampas de temperatura), las cuales tienen en común las temperaturas del portal de inyección (265°C) y detector (305°C) así como el volumen de muestra inyectada (0.2 µl). Las medidas se realizaron en gradiente según lo reflejado en la Tabla 9:

Tabla 9: Rampas de temperatura.

El tiempo entre paréntesis indica los minutos que se mantiene la temperatura inicial del horno o la temperatura final de la rampa.

Condiciones	T ^a inicial (horno)	1 ^o Rampa	2 ^o Rampa
1	150 °C (1 min)	30 °C /min hasta 240 °C (10 min)	
2	80 °C (2 min)	20 °C /min hasta 250 °C (10 min)	
3	150 °C (1 min)	20 °C /min hasta 200 °C (2 min)	20 °C /min hasta 240 °C (8 min)
4	100 °C (1 min)	10 °C /min hasta 200 °C (1 min)	20 °C /min hasta 240 °C (1 min)
5	180 °C (2 min)	10 °C /min hasta 250 °C (1 min)	10 °C /min hasta 270 °C (2 min)

En la Figura 23 se recoge el cromatograma correspondiente a una disolución de 158.96 ppm de asparagina en metanol, en las condiciones 2.

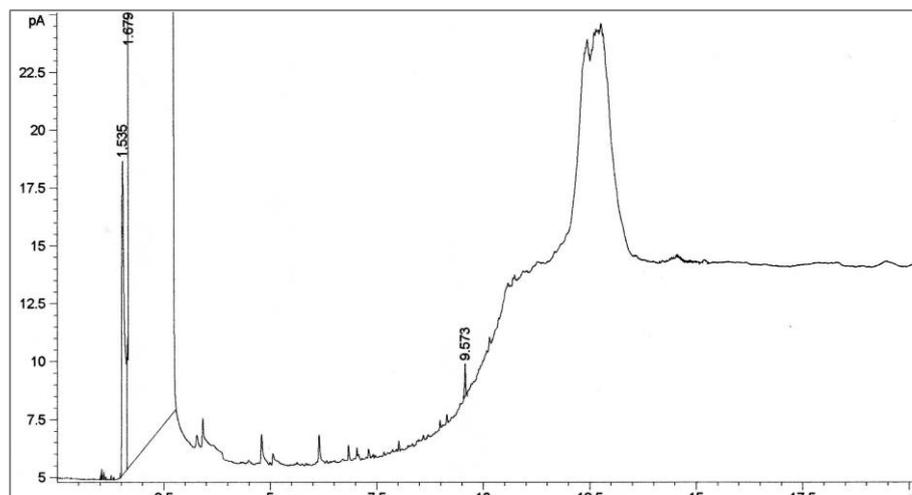


Figura 23: Disolución de asparagina en metanol. Condiciones 2.

Los resultados de ninguna de las condiciones estudiadas fueron satisfactorios. El resto de los cromatogramas se encuentran recogidos en el apartado de anexos **(Cromatografía de gases con detector de ionización de llama)**.

Podríamos concluir que la cromatografía de gases con detector FID se ve condicionada por el pequeño número de átomos que posee la asparagina así como por el medio utilizado. El metanol favorece la formación de los correspondientes esteres metílicos, tres, lo cual podría ser la causa de la anchura del pico obtenido, provocado por posibles solapamientos.

6.3. REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN CON ORTO-FTALDEHIDO (OPA) Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS

De acuerdo con lo reflejado en el apartado de antecedentes bibliográficos, con el fin de mejorar los resultados anteriores, se ha procedido a la derivatización de la asparagina para su posterior detección.

La asparagina de forma natural no presenta fluorescencia por lo que es necesaria una derivatización para posteriormente ser medida directamente por espectrometría de fluorescencia y por cromatografía de líquidos HPLC con detector de fluorescencia.

El orto-ftaldehído (OPA) es el agente de derivatización más comúnmente usado para la determinación de aminoácidos primarios, principalmente porque ofrece una buena sensibilidad.

El OPA desarrolla la fluorescencia al reaccionar con funciones amino primarias. Dicha reacción tiene lugar en medio acuoso a pH alcalino en presencia de un agente reductor fuerte como el 2-mercapto-etanol, 3-mercapto-1-propanol o etanotiol [34], este último no se suele utilizar porque a pesar de que la estabilidad del derivado fluorescente aumenta, los picos observados en el cromatograma son anchos y asimétricos [14]. El compuesto resultante de la reacción entre el OPA y el 2-mercaptoetanol es el (1Z, 6Z)- 3, 4- dihidrobenzo [1,4] oxatiocina (OPT), este compuesto es estable durante una semana si se almacena a -20°C y en oscuridad, realizando cada 3-4 días adiciones de unos 20 µl de 2-mercaptoetanol para favorecer su estabilidad.

El derivado isoindólico formado mediante reacción del OPT y la asparagina, es fluorescente con un máximo de excitación a 340 nm y una región de emisión entre 400-500 nm. Este compuesto es inestable [34]. Dicha inestabilidad es debida a un reordenamiento intermolecular espontáneo y lento entre el azufre y el oxígeno, dando lugar a un compuesto no fluorescente (II) (Fig. 24) [14].

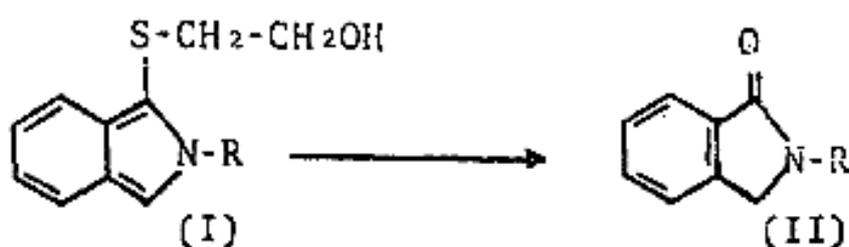


Figura 24: Reacción espontánea.

Esta reacción depende del radical R, que se corresponde con parte de la estructura del aminoácido. Todos los aminoácidos menos la glicina y la histidina producen isoindoles de cierta estabilidad. En cualquier caso, los tiempos entre la formación del compuesto (I) y su detección tienen que ser lo suficientemente cortos (en torno a 4 minutos) para que la variación en la fluorescencia sea despreciable [34].

Según lo descrito en la bibliografía [14], no es necesario eliminar el exceso de OPA antes de medir la muestra ya que el reactivo por sí mismo no interfiere en la separación o detección. Sin embargo, como los derivados OPA-aminoácidos son inestables, para conseguir unos resultados reproducibles es esencial controlar de manera muy precisa el tiempo de reacción. La reacción se completa totalmente en un minuto a temperatura ambiente. Como se carece de una pre-columna, se realiza esta etapa en un tubo de ensayo.

6.3.1. PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DEL AGENTE DERIVATIZANTE

El OPT se obtiene disolviendo una cantidad aproximada de 270 mg de OPA en 5 ml de etanol, a dicha disolución se añaden 200 µl de 2-mercaptoetanol y seguidamente se enrasa a 50 ml con una disolución tampón borato/ ácido bórico pH de 9,5. Es conveniente dejar envejecer el OPT durante 24 horas antes de llevar a cabo la reacción de derivatización. La disolución derivatizante deja de ser útil cuando la disolución incolora cambia a amarillo.

6.3.2. ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA

Una vez hecha la derivatización en las diferentes disoluciones patrón de asparagina en **agua**, con el espectrofluorímetro se realiza el espectro de emisión y excitación para fijar las condiciones óptimas en cada uno de los casos. En primer lugar, se fija la longitud de onda de absorción (excitación) a fin de obtener la correspondiente de emisión. A continuación para concretar de forma más precisa la longitud de onda de excitación, se fija la de emisión y se hace el barrido correspondiente para encontrar la idónea en excitación, el espectro (Fig. 25) se recogió manteniendo constante la longitud de onda de emisión a 430 nm, obteniéndose como longitud de onda de excitación 339 nm.

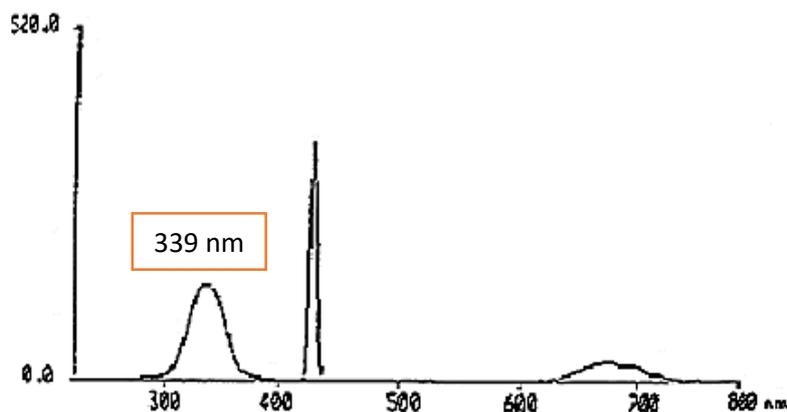


Figura 25: Espectro de excitación del ácido 4-amino -2-(1-((2-hidroxiethyl) tio)-2H-isoindol-2-il)-4-oxobutanoico (derivado isoindólico).

Posteriormente con la longitud de onda de absorción de 339 nm se realiza el correspondiente barrido en emisión, obteniéndose dos bandas, la más intensa a 430 nm y otra de mucha menor intensidad a una longitud de onda aproximadamente igual a 680 nm. (Fig. 26)

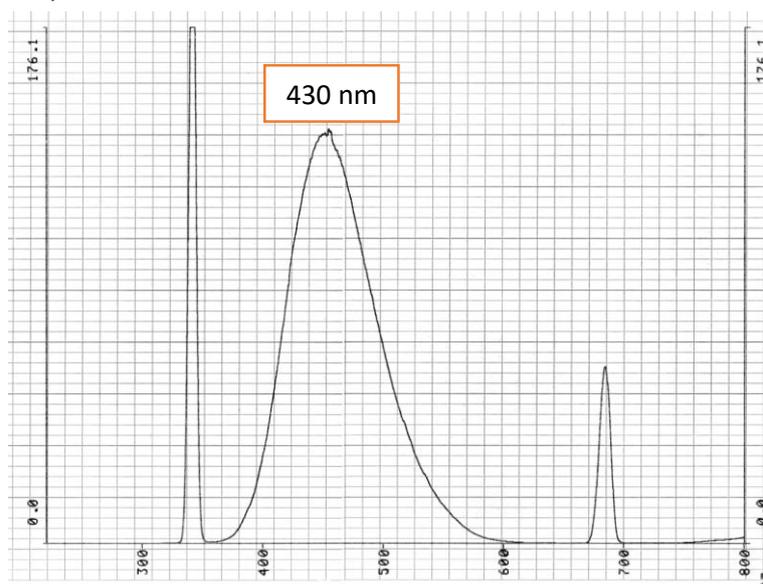


Figura 26: Espectro de emisión del derivado isoindólico

INFLUENCIA DEL TIEMPO

Se estudia la estabilidad del derivado isoindólico fluorescente resultante de la derivatización; para ello se mide su fluorescencia dejando pasar intervalos de tiempo diferentes. De ese modo se comprueba que los mejores resultados se obtienen en los dos primeros minutos después de la derivatización. A fin de comprobar la conveniencia

de dejar envejecer el reactivo derivatizante durante 24 horas antes de su utilización; se procedió a medir la intensidad de emisión de los patrones en función del tiempo de preparación del OPT, a los 15 minutos de ser preparada y a las 24 horas, los resultados se recogen en las tablas 10, 11, 12, 13 y figuras 27 y 28.

- Medidas de la intensidad después de la derivatización y sin dejar envejecer el OPT.

Tabla 10: Resultados de la espectrometría de fluorescencia. Disoluciones de asparagina en agua derivatizadas in-situ. Sin dejar envejecer el OPT.

Concentración Asn (ppm)	Intensidad
0.397	57.18
0.978	108.50
1.936	346.30
3.872	423.10
5.808	963.10
9.680	1404.00
15.488	2041.00
19.360	2224.00

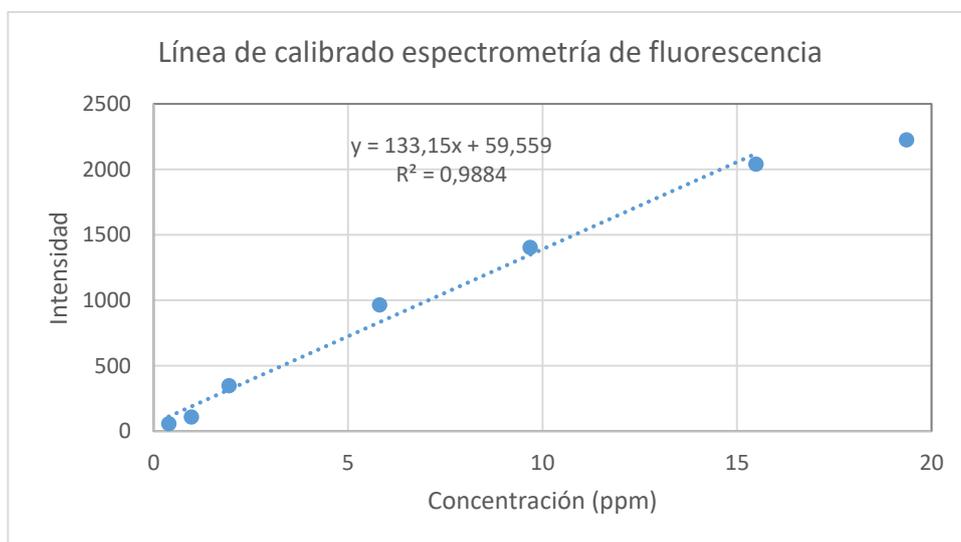


Figura 27: Línea de calibrado espectrometría de fluorescencia. Disoluciones de asparagina en agua derivatizadas in-situ. Sin dejar envejecer el OPT.

- Medidas de la intensidad después de la derivatización y con disolución OPT envejecida 24 horas.

Tabla 11: Resultados de la espectrometría de fluorescencia. Disoluciones de asparagina en agua derivatizadas in-situ. Disolución OPT envejecida 24 horas.

Concentración Asn (ppm)	Intensidad
0.194	18.66
0.397	46.74
0.978	95.47
1.936	253.90
3.872	409.60
5.808	719.50
9.680	1150.00
15.488	1389.00
19.360	1787.00

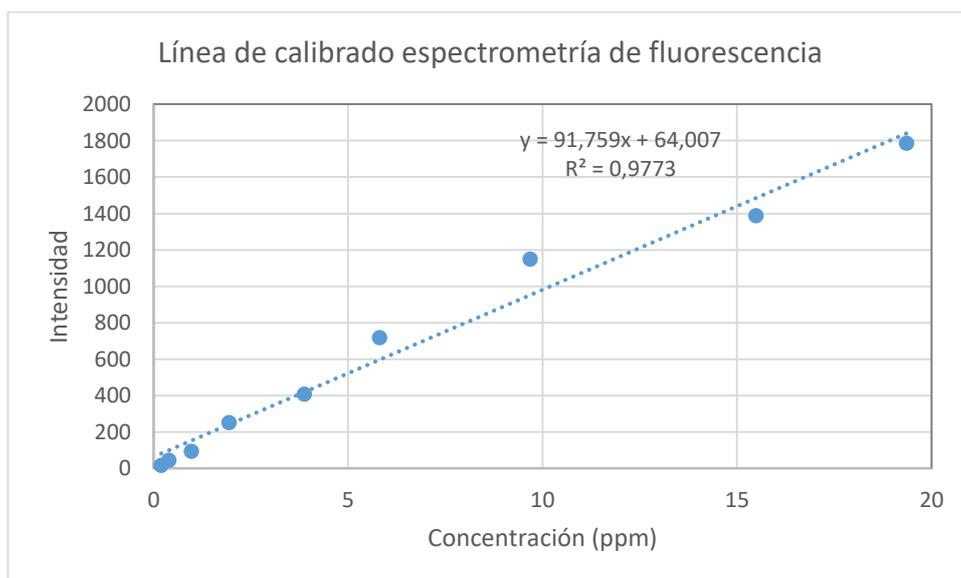


Figura 28: Línea de calibrado espectrometría de fluorescencia después de derivatización. Disoluciones de asparagina en agua. Disolución OPT envejecida 24 horas.

- Medidas de la intensidad después de 2 horas y media de la derivatización y con disolución OPT envejecida 24 horas.

Tabla 12: Resultados de la espectrometría de fluorescencia. Disoluciones de asparagina en agua medidas tras dos horas y media de la derivatización. Disolución OPT envejecida 24 horas

Concentración Asn (ppm)	Intensidad
0.003	36.72
0.006	17.99
0.012	18.01
0.024	66.23
0.048	24.53
0.097	45.04
0.194	45.27
0.387	75.85

- Medidas de la intensidad después de 24 horas de la derivatización y con disolución OPT envejecida 24 horas.

Tabla 13: Resultados de la espectrometría de fluorescencia. Disoluciones de asparagina en agua medidas tras 24 horas de la derivatización. Disolución OPT envejecida 24 horas.

Concentración Asn (ppm)	Intensidad
0.387	17.03
0.968	14.15
1.936	14.36
3.872	20.26
5.808	56.59
9.680	59.37
15.488	56.71

Con estos ensayos se puede comprobar que las medidas de intensidad realizadas con el derivado isoindólico al cabo del tiempo recomendado no presenta una relación lineal con la concentración; además de que el hecho de dejar envejecer la disolución derivatizante para mejorar los resultados no supone un progreso apreciable.

6.3.3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA

Se estudiaron las disoluciones derivatizadas de los patrones en agua y metanol, se fijó la longitud de onda de excitación a 339 nm y la de emisión a 460 nm. Dadas las características del compuesto, y de los estudios anteriormente realizados con

disoluciones patrón de asparagina en agua y metanol (apartado 6.2.4.) se procedió a realizar las medidas de los derivados isoindólicos en las mismas fases que las reflejadas en dicho apartado, *fase móvil 3* en agua y *fase móvil 5* en metanol.

Fase móvil	% Acetonitrilo	% Agua	% Metanol	% Tampón fosfato pH=2.8
3	20	70	10	0
5	5	85	0	10

La derivatización se lleva a cabo dos minutos antes de la inyección en el cromatógrafo, para que el compuesto presente su máxima fluorescencia.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN

Se procede al estudio de disoluciones patrón en **agua** de diferentes concentraciones entre 3 ppb y 4 ppm. En la figura 29 se muestra el resultado obtenido para una concentración de asparagina de 0.2 ppm, donde el pico del derivado de la asparagina es el correspondiente a 1.962 minutos, se observa otro pico a 1.316 minutos, posiblemente debido a impurezas en el patrón o los reactivos.

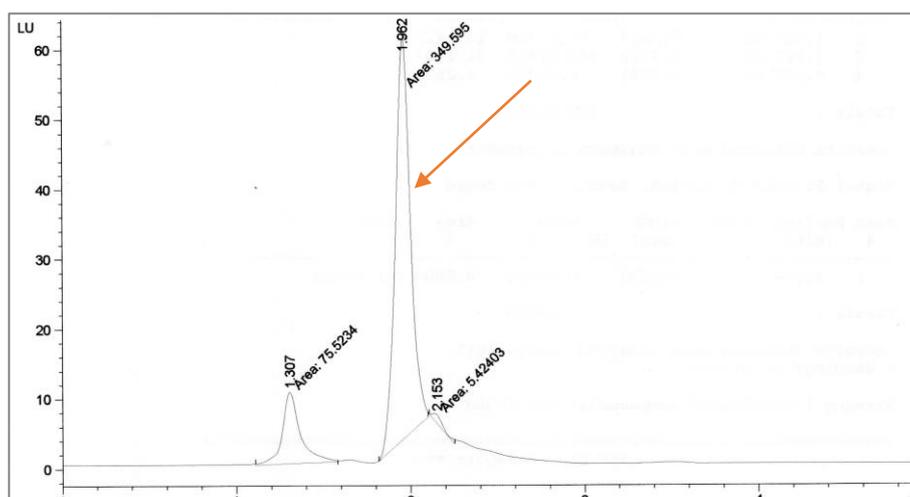


Figura 29: Disolución de asparagina derivatizada en agua de concentración 0.2 ppm. Condiciones 3.

Cuando la concentración de la asparagina era igual o superior a 2 ppm se aprecia una amplia banda que posiblemente incluye varios picos en el cromatograma a un tiempo de retención de 1.598 minutos (Fig. 30) que dificulta la medida del derivado isoindólico, quizás por reacciones secundarias no controladas. En consecuencia a partir

de dicha concentración, la relación lineal entre la intensidad y la concentración del derivado isoindólico deja de existir.

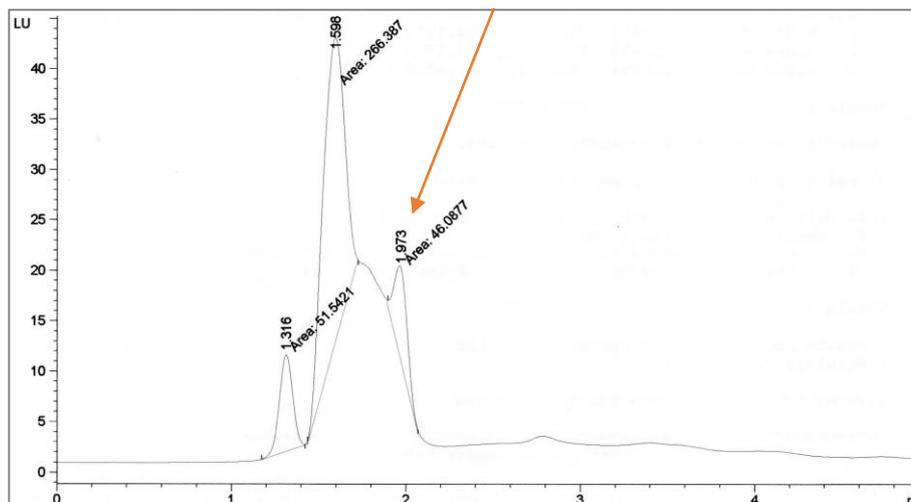


Figura 30: Disolución de asparagina derivatizada en agua. Condiciones 3.

Al medir las disoluciones patrón en **metanol** se observan dos picos, uno correspondiente al derivado a 1.640 minutos de retención y otro posiblemente de impurezas a 1.358 minutos. Cabe destacar que la intensidad de fluorescencia en este medio es mucho menor debido a la reacción de esterificación de la asparagina ya explicada en apartados anteriores (5.2.2).

En la Figura 31 se muestran los picos obtenidos para 50 ppb.

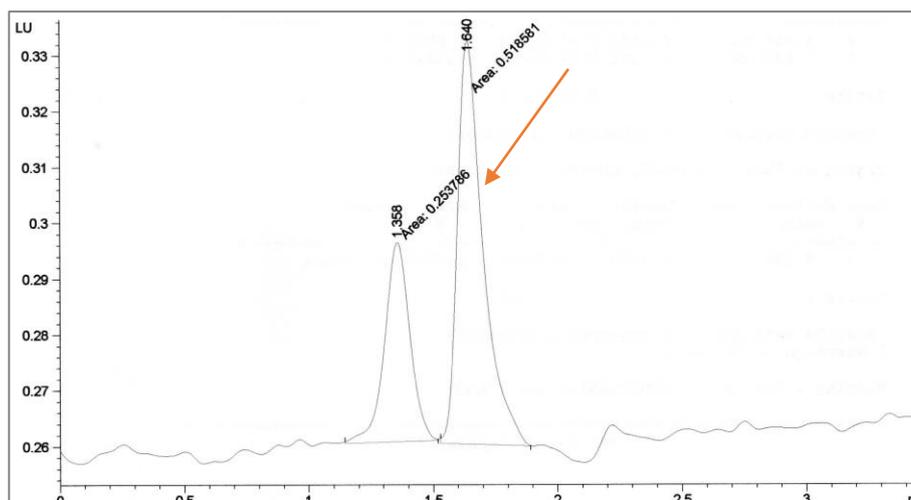


Figura 31: Disolución de asparagina derivatizada en metanol. Condiciones 5.

Como en el caso anterior (disolución de asparagina en agua), al aumentar la concentración de asparagina en metanol por encima de 1 ppm, se aprecia un nuevo

pico en el cromatograma con un tiempo de retención de 2.054 minutos (Fig.32) e igual que anteriormente la relación lineal entre la concentración y la intensidad deja de ajustarse a una recta.

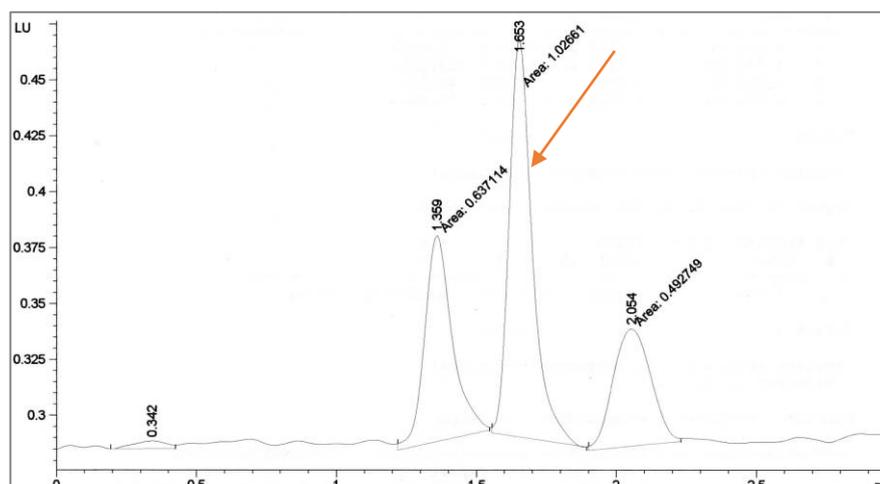


Figura 32: Disolución de asparagina derivatizada en metanol. Condiciones 5.

INFLUENCIA DEL TIEMPO

Se analizaron después de la derivatización las disoluciones de asparagina en **agua** (*fase móvil 3*) y en **metanol** (*fase móvil 5*). Dichas disoluciones se midieron, unas al momento de ser preparadas y otras a las dos semanas de su preparación con el fin de comprobar si se producía alguna modificación en la señal.

En los cromatogramas de las disoluciones en **agua** recién preparadas aparecen los dos picos correspondientes a tiempo de retención en torno a 1.3 y 1.9 minutos, mientras que en los cromatogramas de disoluciones de asparagina preparadas al cabo de dos semanas se observan una amplia aparición de picos incluyendo los anteriores pero de área menor, lo que induce a concluir que con el transcurso del tiempo se produce una modificación del compuesto originando otros derivados. Los resultados se observan en la Figura 33. Por consiguiente se procederá a realizar las medidas inmediatamente después al proceso de preparación de la disolución y derivatización de la misma.

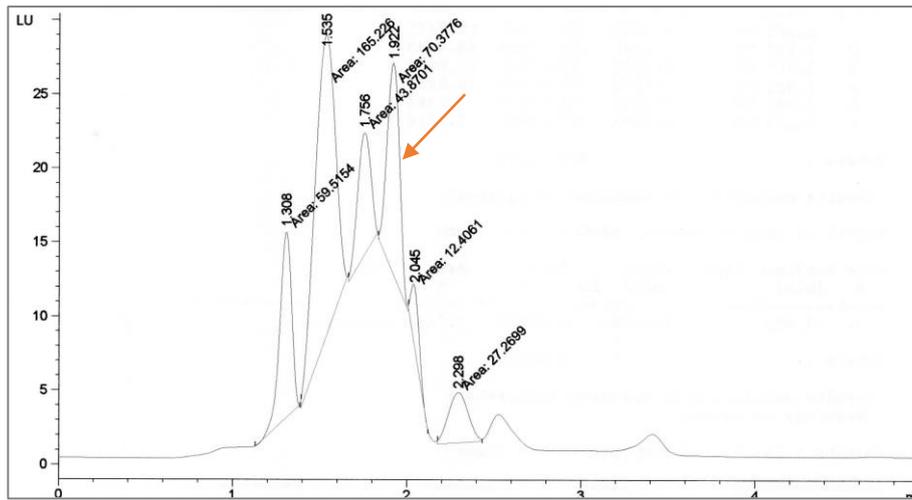


Figura 33: Disolución de asparagina derivatizada en agua. Tiempo de la disolución patrón de asparagina 2 semanas. Condiciones 3.

En **metanol**, al medir las disoluciones preparadas in-situ, en el cromatograma se pueden visualizar dos picos diferentes siendo el compuesto de interés el que posee un tiempo de retención de 1.6 minutos. En los cromatogramas de disoluciones de asparagina preparadas al cabo de dos semanas los picos son muy similares y no aparecen otros picos como ocurría en el caso de las disoluciones acuosas

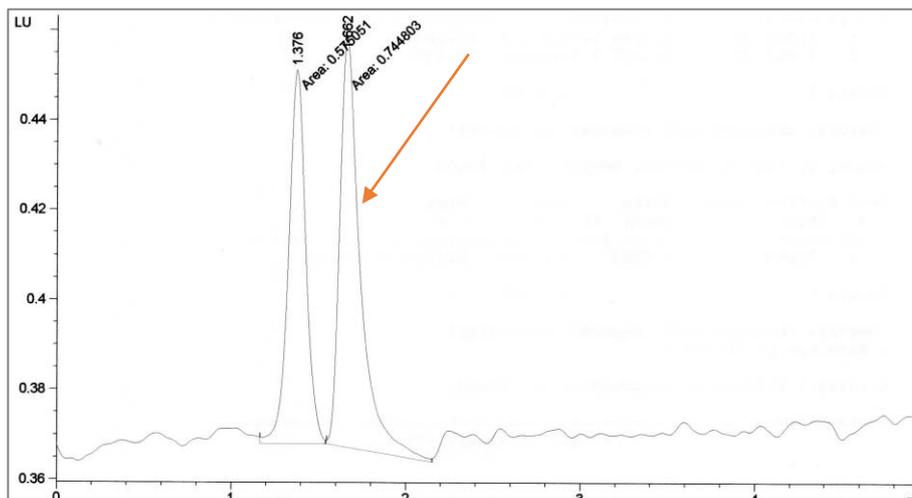


Figura 34: Disolución de asparagina derivatizada en metanol. Tiempo de la disolución patrón de asparagina 2 semanas. Condiciones 5.

LÍNEA DE CALIBRADO DEL DERIVADO ISOINDÓLICO EN AGUA, FASE MÓVIL 3.

Tabla 14: Valores áreas del pico con tiempo de retención 1.9 min. HPLC-FLD, fase móvil 3, asparagina disuelta en agua derivatizada.

Concentración (ppm)	Área pico (LU·s)
0.387	831.15
0.194	349.60
0.048	38.79
0.024	28.96
0.012	24.70

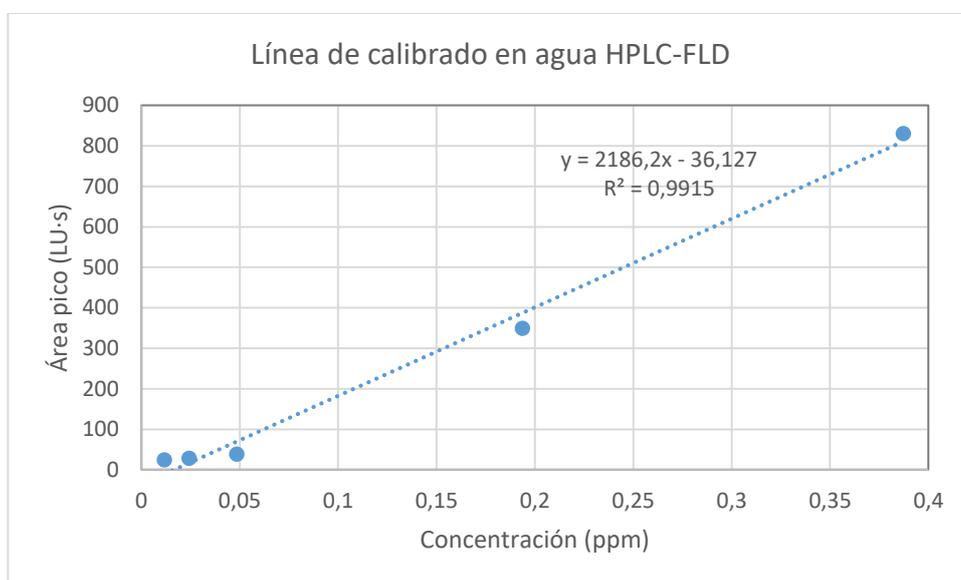


Figura 35: Línea de calibrado del derivado isoindólico en agua. Condiciones 3.

LÍNEA DE CALIBRADO DEL DERIVADO ISOINDÓLICO EN METANOL, FASE MÓVIL 5.

Tabla 15: Valores áreas del pico con tiempo de retención 1.65 min. HPLC-FLD, fase móvil 5, asparagina disuelta en metanol derivatizada.

Concentración (ppm)	Área pico (LU·s)
0.920	1.03
0.368	0.70
0.184	0.62
0.092	0.58
0.046	0.52
0.023	0.49
0.011	0.44

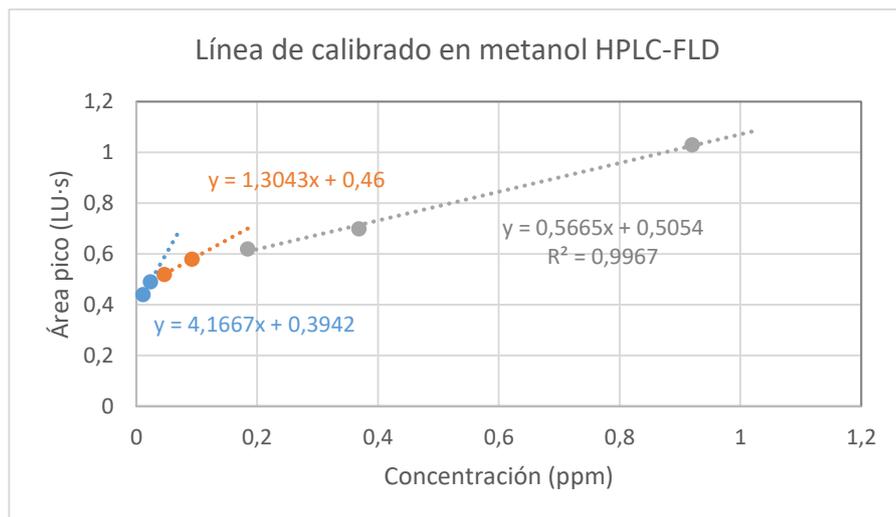


Figura 36: Línea de calibrado del derivado isoindólico en metanol. Condiciones 5.

Como se puede observar en el gráfico, a medida que aumenta la concentración del derivado isoindólico la pendiente de la recta es menor, debido posiblemente a la disminución de la fluorescencia por desactivación por conversión externa.

Los límites de detección (LoD) obtenidos para los patrones en agua y metanol son del orden de 0.01 ppm; mientras que los límites de cuantificación (LoQ) son del orden de 0.03 ppm.

6.4. EXTRACCIONES DE LAS MUESTRAS Y MEDIDAS

6.4.1. EXTRACCIONES

Las muestras que se analizan son: harina de trigo y de arroz, pan rallado, sémola de trigo y espárragos.

Para llevar a cabo el procedimiento, en el primer caso, se toman las muestras previamente trituradas y se llevan a una estufa a temperatura de 100 °C, hasta pesada constante, a continuación se pesan alrededor de cinco gramos de la muestra y se introducen en un cartucho que se tapa con algodón, dicho cartucho se deposita en el recipiente Soxhlet y se procede a la correspondiente extracción con metanol, durante unas seis horas.

En el segundo procedimiento, se repiten los pasos anteriores hasta la etapa del cartucho, este se introduce en un Erlenmeyer con el correspondiente disolvente agua o metanol y se coloca en un baño maría donde se mantiene durante 24 horas a 55 °C.

Hay que tomar la precaución de tapar el erlenmeyer para evitar la rápida evaporación del metanol.

Todos los extractos, previa filtración, se llevan a un matraz y se enrasan con el correspondiente disolvente, a partir de estas disoluciones o sus diluciones, se toman las correspondientes alícuotas para medirlas por las diferentes técnicas anteriormente indicadas.

6.4.2. MEDIDAS

6.4.2.1. MEDIDAS: HPLC-UV/VIS

A continuación, se procede a realizar las medidas de los extractos correspondientes: harina de trigo, harina de arroz, pan rallado, sémola de trigo y espárragos, tanto en medio acuoso como en metanol por HPLC-UV/VIS.

1) HARINA DE TRIGO EN AGUA

Se realizaron las medidas en las condiciones óptimas de trabajo reflejadas en el apartado 6.2.4., los resultados se recogen en la Fig.37. Como se puede observar no existe modificación en los tiempos de retención, sin embargo hay un incremento de picos no identificados posiblemente relacionados con otros constituyentes de la muestra.

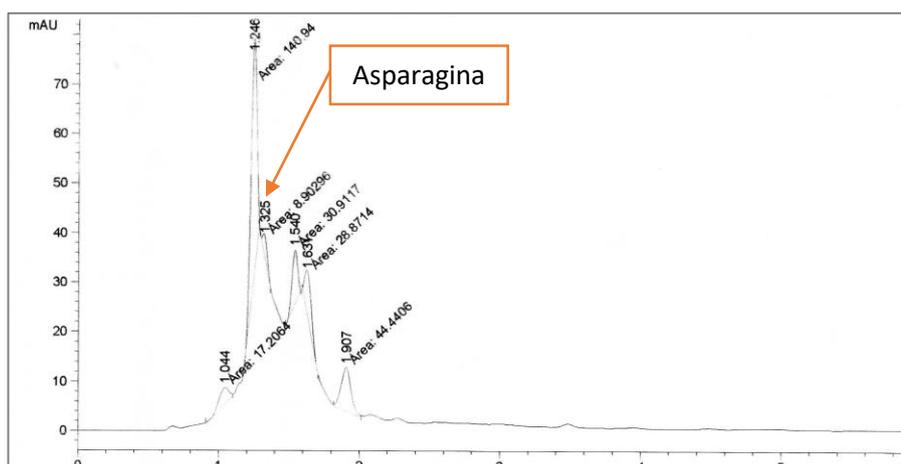


Figura 37: Extracto al baño maría de harina de trigo en agua. Fase móvil 3.

2) HARINA DE TRIGO EN METANOL

La harina de trigo en metanol se extrajo tanto al baño maría como por Soxhlet; en ambos casos las medidas se realizaron en las condiciones reflejadas en el apartado 6.2.4. Se midieron ambas extracciones y en los dos cromatogramas (Fig. 38 y 39) se puede percibir una buena resolución del pico de la asparagina, aunque también aparecen otros picos debidos probablemente, como en el caso anterior a la presencia de otros componentes de la harina entre ellos varios aminoácidos.

a) Extracción al baño maría

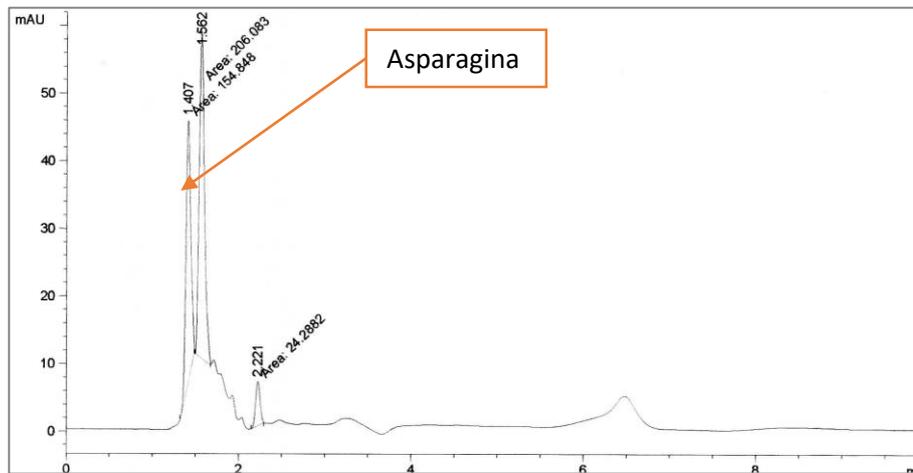


Figura 38: Extracto al baño maría de harina de trigo en metanol. Fase móvil 5.

b) Extracción con Soxhlet

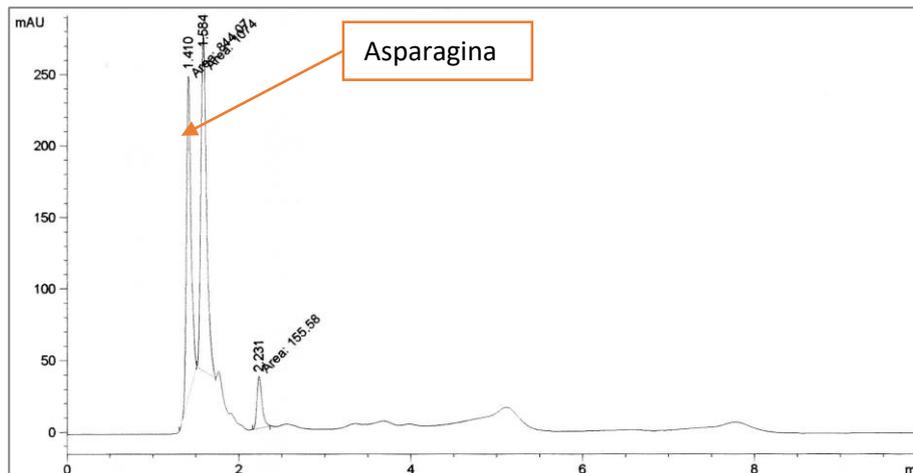


Figura 39: Extracto Soxhlet de harina de trigo en metanol. Fase móvil 5.

Realizar extracciones en metanol tanto al baño maría como por Soxhlet facilita bastante la identificación de cada uno de los analitos, aunque es recomendable la

primera para evitar la formación de acrilamida, según lo indicado en el apartado 6.2.4 (pág. 28).

3) HARINA DE ARROZ EN AGUA

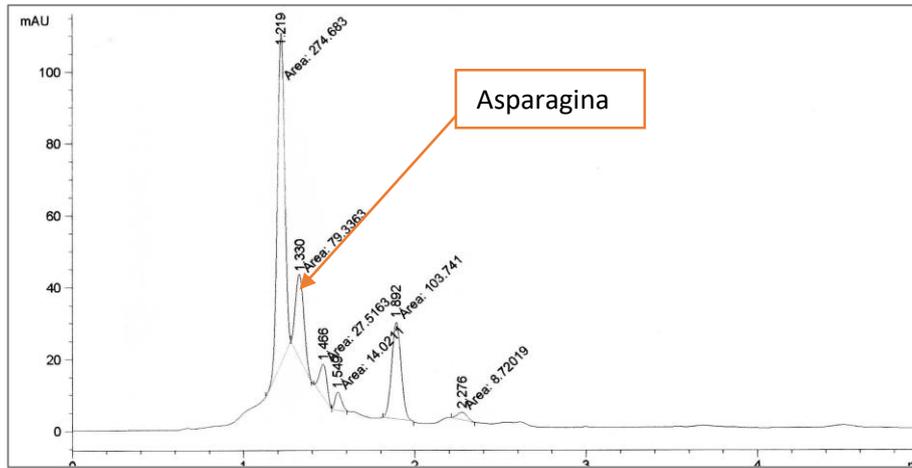


Figura 40: Extracto al baño maría de harina de arroz en agua. Fase móvil 3.

4) HARINA DE ARROZ EN METANOL

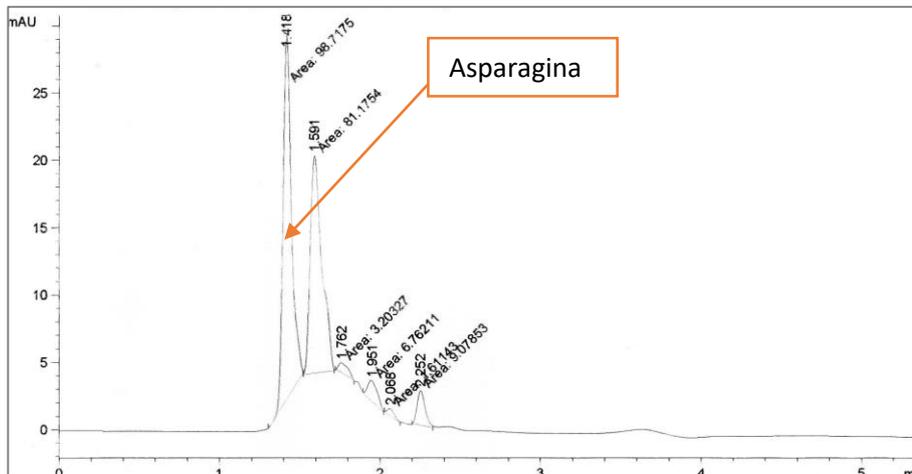


Figura 41: Extracto al baño maría de harina de arroz en metanol. Fase móvil 5.

5) PAN RALLADO EN AGUA

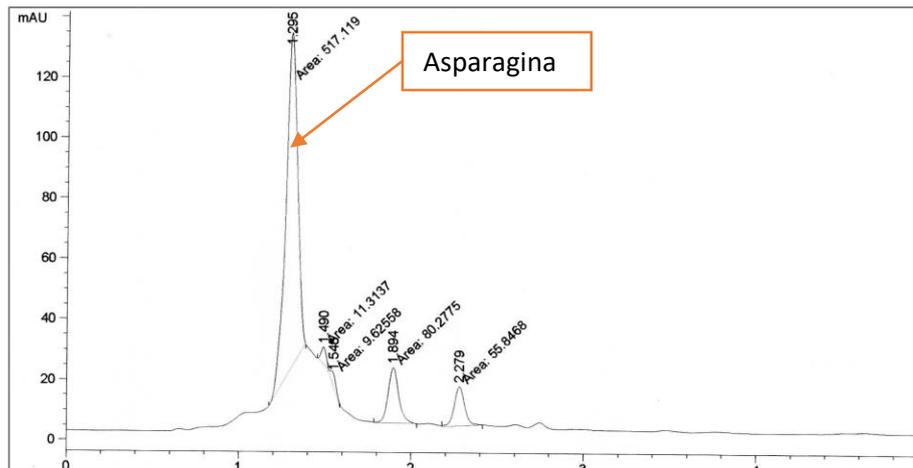


Figura 42: Extracto al baño maría de pan rallado en agua. Fase móvil 3.

6) PAN RALLADO EN METANOL

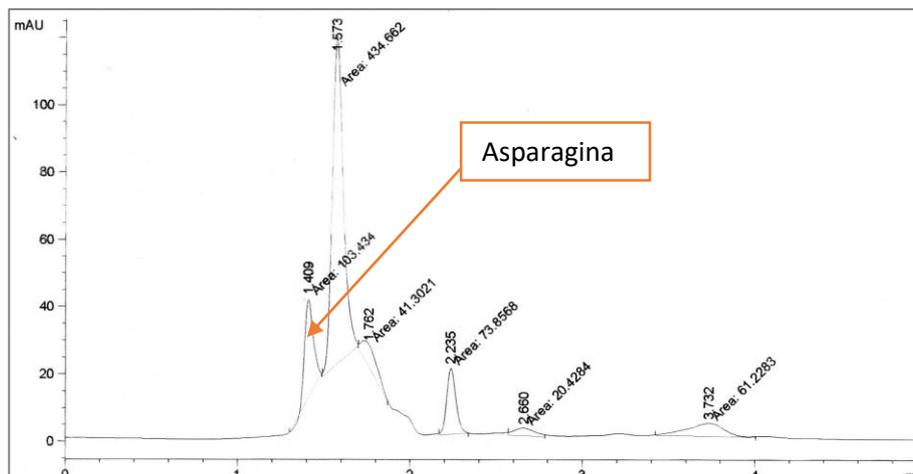


Figura 43: Extracto al baño maría de pan rallado en metanol. Fase móvil 5

7) SÉMOLA DE TRIGO EN AGUA

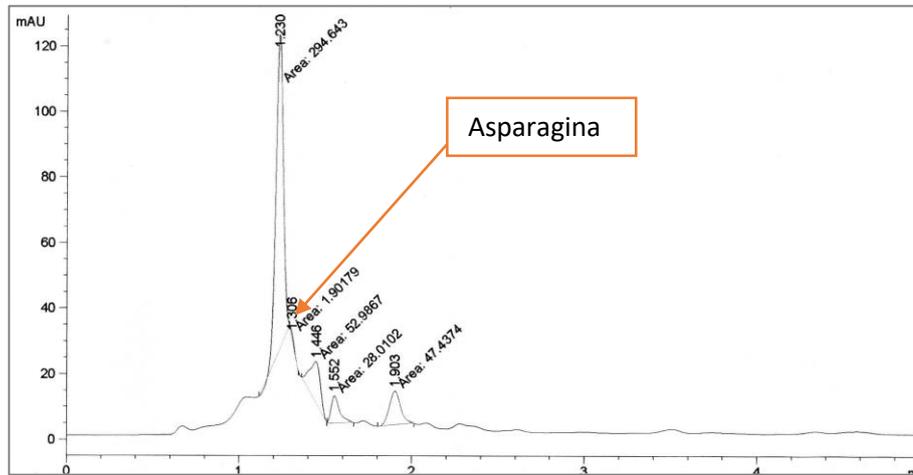


Figura 44: Extracto al baño maría de sémola de trigo en agua. Fase móvil 3.

8) SÉMOLA DE TRIGO EN METANOL

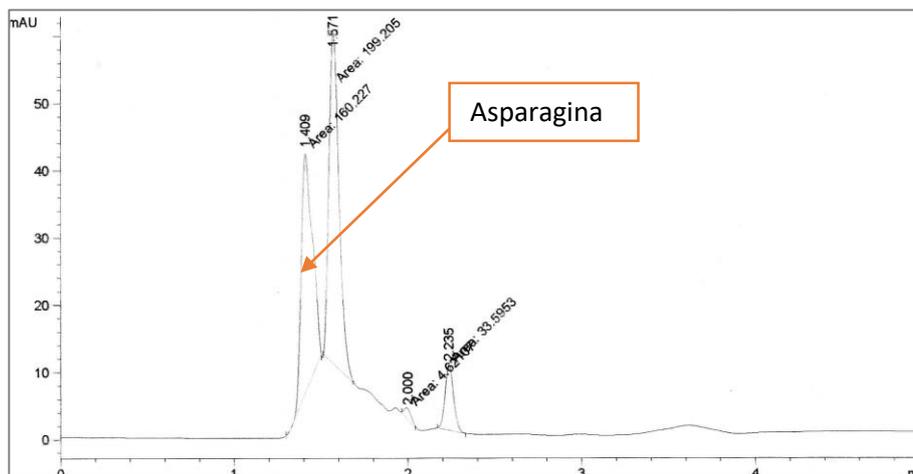


Figura 45: Extracto al baño maría de sémola de trigo en metanol. Fase móvil 5.

9) ESPARRAGOS VERDES EXTRAIDOS CON METANOL

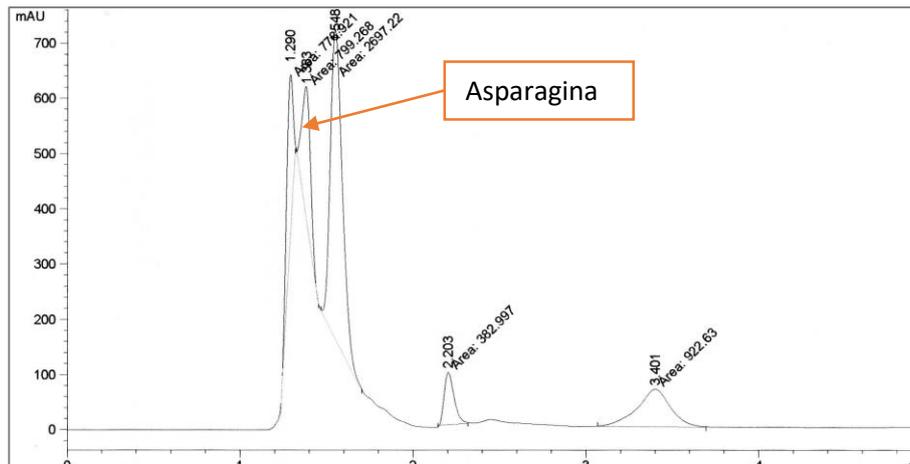


Figura 46: Extracto de espárragos en metanol. Soxhlet. Fase móvil 5

Se detecta en todos los casos el pico correspondiente a la asparagina, aunque con solapamiento de otros picos probablemente debido a la alta presencia de aminoácidos en este alimento, lo que dificulta su determinación.

6.4.2.2. MEDIDAS: HPLC-FLD

Se determinó la asparagina presentes en las muestras por HPLC-FLD, para ello se realiza primeramente su derivatización según lo descrito en el apartado 6.3. Las condiciones de medida fueron; λ de absorción 339 nm, λ de emisión 430 nm y la fase móvil varía según el medio de trabajo, son las referidas en el apartado 6.3.3.

1) HARINA DE TRIGO EN AGUA

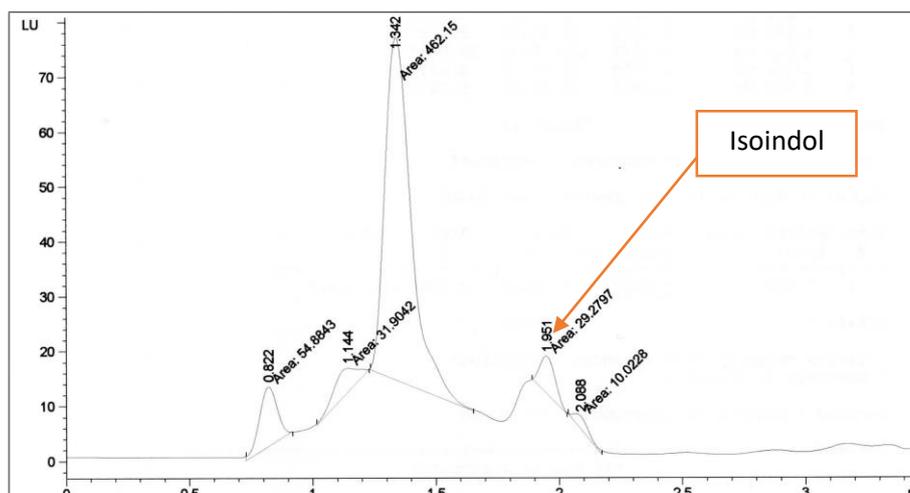


Figura 47: Extracto al baño maría de harina de trigo en agua. Fase móvil 3.

2) HARINA DE TRIGO EN METANOL

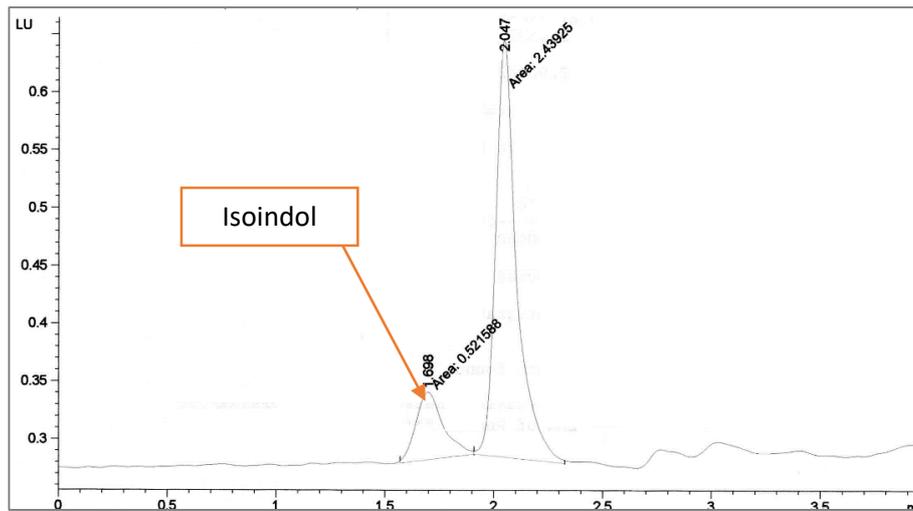


Figura 48: Extracto al baño maría de harina de trigo en metanol. Fase móvil 5.

3) HARINA DE ARROZ EN AGUA

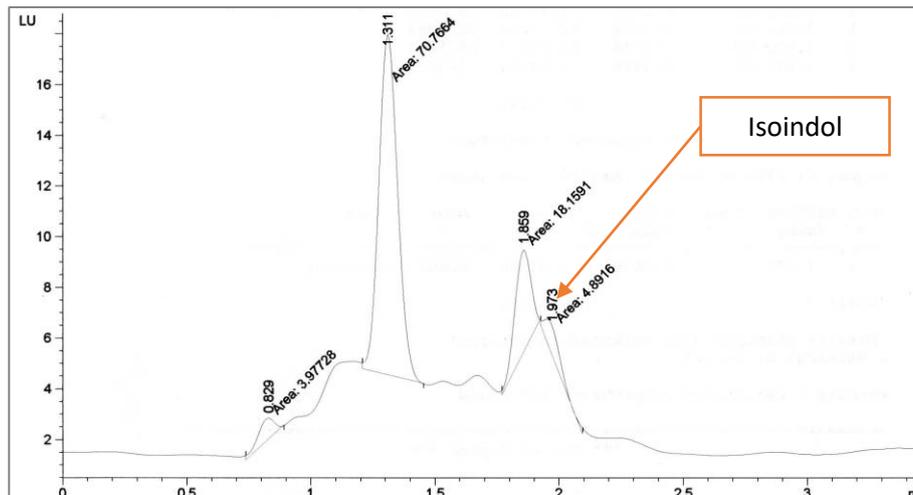


Figura 49: Extracto al baño maría de harina de arroz en agua. Fase móvil 3.

4) HARINA DE ARROZ EN METANOL

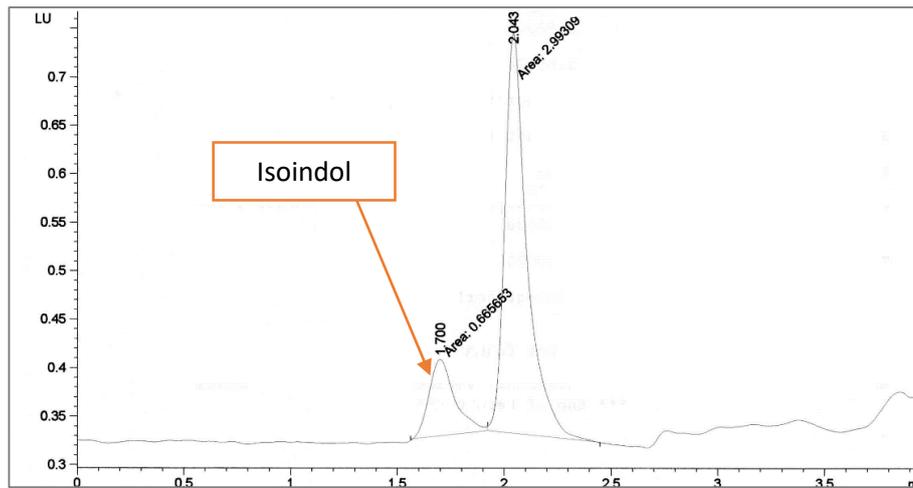


Figura 50: Extracto al baño maría de harina de arroz en metanol. Fase móvil 5.

5) PAN RALLADO EN AGUA

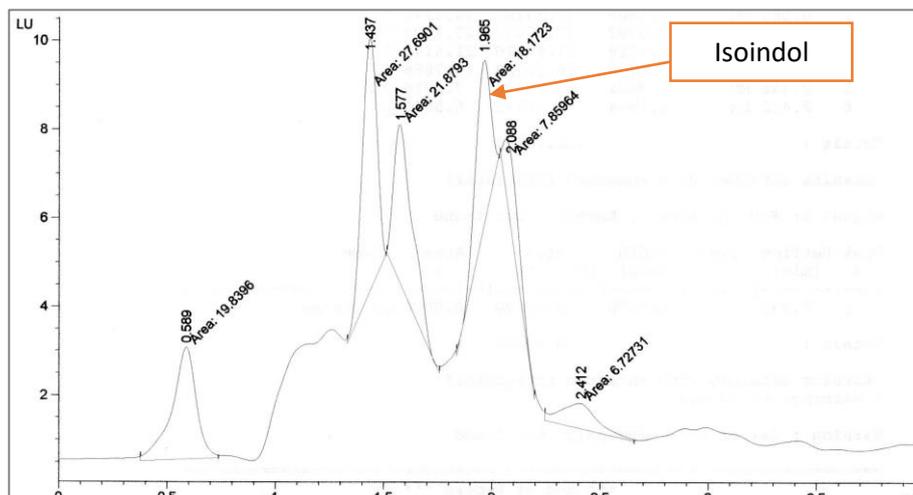


Figura 51: Extracto al baño maría de pan rallado en agua. Fase móvil 3.

6) PAN RALLADO EN METANOL

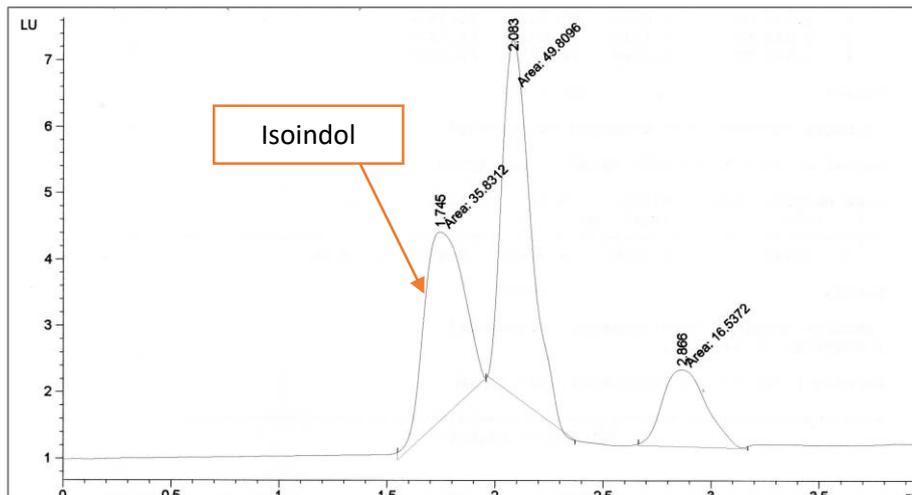


Figura 52: Extracto al baño maría de pan rallado en metanol. Fase móvil 5

7) SÉMOLA DE TRIGO EN AGUA

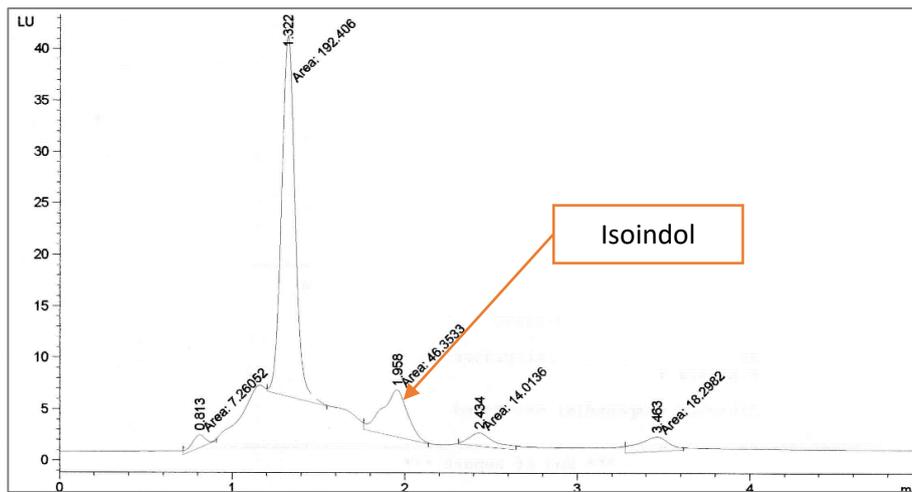


Figura 53: Extracto al baño maría de sémola de trigo en agua. Fase móvil 3.

8) SÉMOLA DE TRIGO EN METANOL

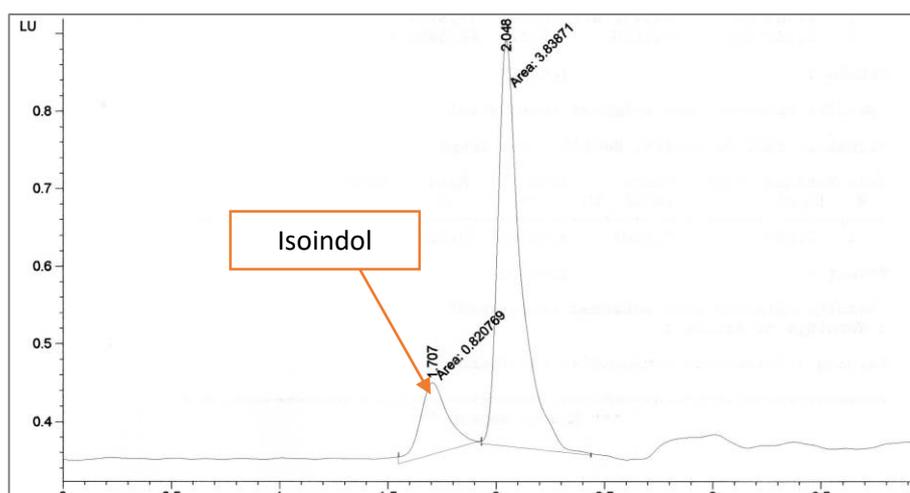


Figura 54: Extracto al baño maría de sémola de trigo en metanol. Fase móvil 5.

9) ESPARRAGOS VERDES EN METANOL

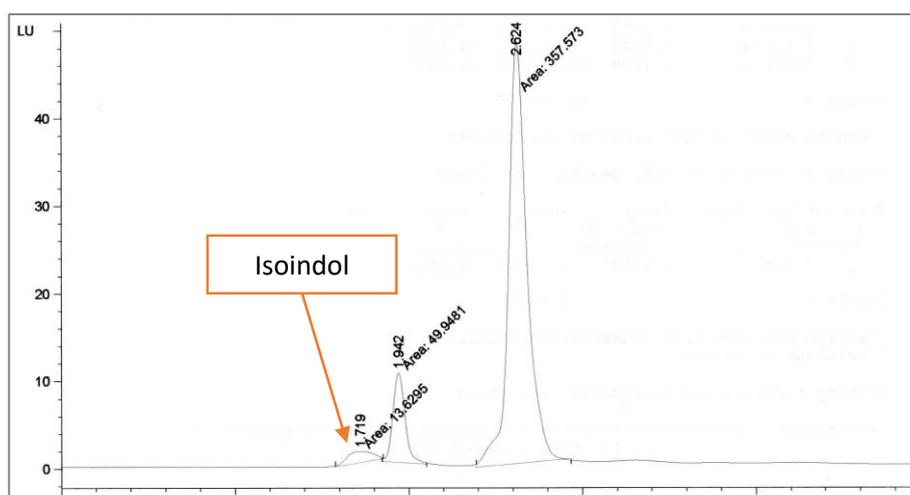


Figura 55: Extracto de espárragos en metanol. Soxhlet. Fase móvil 5

Se detecta en todos los casos el pico correspondiente al derivado isoindólico, aunque en medio acuoso se observa un gran solapamiento con otros picos debido probablemente al efecto matriz de componentes de las distintas muestras. Sin embargo, en metanol este efecto es más leve.

6.4.2.3. CANTIDAD DE ASPARAGINA EN CADA MUESTRA

Para poder cuantificar la asparagina de cada muestra, se procedió a hacer una extrapolación del área del pico en la línea de calibrado resultante de las diferentes técnicas de análisis. Las áreas de los picos de cada muestra y la cantidad de asparagina que ha sido extrapolada se recogen en la tabla 16.

Tabla 16: g Asn/ 100 g muestra.

Muestra	Disolvente	HPLC-UV/VIS		HPLC-FLD	
		Área (mAU·s)	g Asn /100 g muestra	Área (LU·s)	g Asn /100 g muestra
Harina de trigo	Agua	8.90	0.004	29.28	0.000
Harina de trigo	Metanol	154.85	0.136	0.52	0.000
Harina de arroz	Agua	79.34	0.043	4.89	0.000
Harina de arroz	Metanol	96.72	0.055	0.67	0.001
Pan rallado	Agua	----	----	16.17	0.000
Pan rallado	Metanol	103.43	0.061	35.83*	0.206
Sémola de trigo	Agua	1.90	0.001	46.35	0.000
Sémola de trigo	Metanol	160.23	0.145	0.82	0.002
Espárragos	Metanol	799.27	0.305	13.63*	0.022

*Preciso hacer diluciones.

6.4.3. MEDIDAS CON ADICIONES PATRÓN

Dado el efecto matriz, para contrastar los resultados se procede a efectuar a cada muestra adiciones patrón. Para llevar a cabo las adiciones primero se realiza un blanco y posteriormente se procede a las adiciones sobre las muestras. Las condiciones de trabajo óptimas son las mismas que se indicaron en el apartado 6.2.4 y 6.3.3.

6.4.3.1. ADICIONES PATRÓN: HPLC-UV/VIS

A continuación, se presentan los resultados una vez calculado el volumen equivalente. A partir de él se obtiene la concentración de cada una de las muestras (Tabla 17).

Tabla 17: Volúmenes equivalentes y concentración de Asn determinada por HPLC-UV/VIS con adiciones patrón

Muestra	Disolvente	V _{eq} (ml)	V _{eq} – V _{eq, blanco} (ml)	g Asn /100 g muestra
Harina de trigo	Agua	-0.78	-0.51	0.003
Harina de trigo	Metanol	-18.10	-14.68	0.090
Harina de arroz	Agua	-3.49	-3.22	0.021
Harina de arroz	Metanol	-15.92	-12.50	0.078
Pan rallado	Agua	-19.85	-19.58	0.128
Pan rallado	Metanol	-15.72	-12.30	0.072
Sémola de trigo	Agua	-0.23	-0.23	----
Sémola de trigo	Metanol	-59.19	-55.77	0.345
Espárragos	Metanol	-62.69	-59.27	0.267

6.4.3.2. ADICIONES PATRÓN: HPLC-FLD

Igual que en el apartado anterior, se trabajó del mismo modo con las muestras, pero procediendo a su derivatización, los resultados para la determinación de los volúmenes equivalentes y las correspondientes concentraciones de asparagina se recogen en la tabla 18.

Tabla 18: Volúmenes equivalentes y concentración de Asn determinada por HPLC-FLD con adiciones patrón

Muestra	Disolvente	V _{eq} (ml)	V _{eq} – V _{eq, blanco} (ml)	g Asn /100 g muestra
Harina de trigo	Agua	-21.67	-19.89	0.128
Harina de trigo	Metanol	-207.91	-189.12	1.158
Harina de arroz	Agua	-12.92	-11.14	0.073
Harina de arroz	Metanol	-80.42	-61.63	0.373
Pan rallado	Agua	1.53	1.53	----
Pan rallado	Metanol	-22.03	-3.24	0.019
Sémola de trigo	Agua	-32.12	-30.34	0.195
Sémola de trigo	Metanol	-0.10	-0.10	----
Espárragos	Metanol	-4.79	-4.79	----

7. CONCLUSIONES

- 1) Se ha realizado un estudio de la estabilidad de la asparagina en diferentes disolventes. En alcohol, se ha comprobado que la asparagina es inestable, debido a la reacción entre el grupo carboxílico que posee el aminoácido y el alcohol del disolvente. En agua y acetonitrilo las disoluciones de asparagina presentan alta estabilidad. En hexano la asparagina se epimeriza con el paso del tiempo.
- 2) Se analizó la asparagina por absorción molecular UV-VIS para determinar la longitud de onda a la que aparece su máximo de absorción. Las longitudes de onda idóneas para realizar su determinación por HPLC son: 200 nm en acetonitrilo, 204 nm en agua y 210 nm en metanol.
- 3) Se ha determinado la asparagina utilizando como técnica de análisis HPLC-UV/Vis, su separación y determinación se produce a un tiempo de retención de 3.631 min (acetonitrilo), 1.313 min (agua) y 1.403 min (metanol). Los límites de detección obtenidos en agua y metanol son de 0.11 y 0.26 ppm respectivamente.
- 4) Se realizó un breve estudio de la asparagina en metanol por CG-FID llegando a la conclusión, de que esta metodología no es la más adecuada debido a la reacción de esterificación que se lleva a cabo de manera espontánea entre el aminoácido y el disolvente.
- 5) Se procedió a estudiar el derivado isoindólico resultante de la reacción entre la asparagina y el agente derivatizante OPA por espectrometría de fluorescencia; obteniéndose las longitudes de onda óptimas de emisión ($\lambda=430$ nm) y excitación ($\lambda=339$ nm) para su posterior determinación por HPLC/FLD.
- 6) La separación y determinación cromatográfica del compuesto se produce a un tiempo de retención de 1.962 minutos (agua) y 1.598 minutos (metanol) con LoD y LoQ de 0.01 ppm y 0.03 ppm respectivamente en los dos medios.
- 7) En medidas sobre muestras de alimentos el efecto matriz es muy importante por lo que se debe aplicar el método de adicciones patrón.
- 8) Como conclusión general, indicamos que, el mejor método para determinar esta sustancia en alimentos es HPLC-UV/Vis. Presenta mayores ventajas puesto que no se precisa de una derivatización previa, los tiempos de retención son cortos lo que disminuiría el coste por análisis y la separación de los picos es adecuada.

8. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- [1] Vauquelin, L.N. y Robiquet, P.J. La découverte d'un nouveau principe végétal dans le suc des asperges. *Annales de Chimie*, nº 57, 88–93. (1806).
- [2] Euston96. Asparagina. Recuperado de: <https://www.euston96.com/asparagina/>
- [3] Maillard, L. C. Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoidines par voie Méthodique. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* Vol. 154, 66-68. (1912).
- [4] Echeverri, M.L, Jaramillo, L.A., Quiroz J. *ACRILAMIDA: Formación y mitigación en procesamiento industrial de alimentos*. (Trabajo Fin de Grado). Corporación Universitaria Lasallista, Caldas Antioquia. (2014). Recuperado de: http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1573/1/ACRILAMIDA_Formacion_mitigacion_procesamiento_industrial_ali.pdf.
- [5] Hedegaard, R. V., Frandsen, H. y Skibsted L. H. Kinetics of formation of acrylamide and Schiff base intermediates from asparagine and glucose. *Food Chemistry*, Vol. 108, 917-925. (2008).
- [6] Instituto Nacional del Cáncer. Acrilamida y el riesgo de cáncer. (2017). Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/dieta/hoja-informativa-acrilamida>.
- [7] Morillo, M. La acrilamida tiene un “color” especial. (2019). Recuperado de: <https://blog.cartif.com/la-acrilamida-tiene-un-color-especial/>.
- [8] Sociedad Española de Oncología Médica. La repercusión en la prensa española de las noticias relacionadas con el mundo de la Oncología. (2002). Recuperado de: www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/.../26/i26.pdf.
- [9] Ministerio de Salud y Protección Social. Concepto científico acrilamida en panela. (2012). Recuperado de: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Concepto-acrilamida-panela.pdf>.
- [10] Reglamento (UE) 2017/2158 de la Comisión, de 20 de noviembre de 2017, por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos.

- [11] Sáenz, S. *Acrilamida y su presencia en los alimentos*. (Trabajo Fin de Grado). Universidad de Soria, Departamento de enfermería, Soria. (2017).
- [12] Aranda, J. *Desarrollo de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para análisis de aminoácidos en ingredientes utilizados en alimentación animal*. Universidad Autónoma de nuevo León, Facultad de Agronomía, División de estudios de posgrado. (2002). Recuperado de: <http://eprints.uanl.mx/5793/1/1020148806.PDF>.
- [13] Beaver, R.W., Wilson, D.M., Jones, H M. y Haydon, K.D. Amino acid analysis in feeds and feedstuffs using precolumn phenylisothiocyanate derealization and liquid chromatography - Preliminary study. *Journal Association of oficial analytical Chemists*, **Vol.70**, 425- 428. (1987).
- [14] Cavazos, N. *Determinación de aminoácidos libres en jugos de naranja por cromatografía de líquidos de alta resolución*. Universidad Autónoma de nuevo León, Facultad de medicina. Tesis. (1994). Recuperado de: <http://eprints.uanl.mx/7211/1/1020091227.PDF>.
- [15] Liyanaarachchi G.V.V., Mahanama K.R.R., Somasiri H.P.P.S. y Punyasiri P.A.N. Validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of free amino acids in rice using L-theanine as the internal standard. *Elsevier, Food Chemistry*, **Vol. 240**, 196-203. (2018).
- [16] González, M. Reacciones de reconocimiento de proteínas. Química de los alimentos. (2017). Recuperado de: <http://blog.pucp.edu.pe/blog/quimicaalimentos/2017/10/31/reacciones-de-reconocimiento-de-proteinas/>.
- [17] Lindroth, P. y Mopper, K. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Analytical chemistry*. **Vol. 51, nº11**, 1667-1674. (1979).
- [18] Peñafiel, R., Monserrat, F., Solano, F. y Lozano, J.A. Análisis de aminoácidos en muestras biológicas impregnadas en papel de filtro por técnicas fluorimétricas. Aplicación a la detección precoz de errores congénitos del metabolismo. Universidad

de Murcia. Recuperado de: revistas.um.es/analesumciencias/article/download/100871/96161.

[19] Horta, A.I. *Separación de aminoácidos y derivados utilizando resinas impregnadas de extractante*. Universidad de Burgos, Facultad de Ciencias. Tesis Doctoral. (2008).

Recuperado de: http://riubu.ubu.es/bitstream/10259/171/1/Horta_Ronda.pdf.

[20] Omar, M. M. A., Elbashir, A. A. y Schmitz, O. J. Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food. *Elsevier, Food Chemistry*, **Vol. 214**, 300-300. (2017).

[21] Poinsoy, V. Boyle, C. y Couderc, F. Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **Vol.24**, 4047-4062. (2003).

[22] Baker, S. y Baker, G. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. *Angewandte Chemie International Edition*, **Vol. 49**, 6726-6744. (2010).

[23] Sinduja B., John S. A. Sensitive determination of rutin by spectrofluorimetry using carbon dots synthesized from a non-essential amino acid. *Elsevier, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **Vol.193**, 486-491. (2018).

[24] Checa- Moreno, R., Manzano, E., Miran, G. y Capitan Vallvey, L.F. Revisitation of the phenylisothiocyanate- derivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV. *Journal of Separation Science*, **Vol. 31**, 3817-3828. (2008).

[25] Castillo, G., Villar, J., Montano, R., Martínez, C., Pérez, F., Albacete, A., Sanchez, J. y Acosta, M. Cuantificación por HPLC del contenido de aminoácidos presente en el fitomas-E. *ICIDCA, Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, **Vol.45**. (2011).

[26] Knol J. J., Linssen J. P.H. y van Boekel M. A.J.S. Unravelling the kinetics of the formation of acrylamide in the Maillard reaction of fructose and asparagine by multiresponse modelling. *Elsevier, Food Chemistry*, **Vol. 120**, 1047-1057. (2010).

[27] Nielsen N. J., Granby K., Hedegaard R. V. y Skibsted L. H. A liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread. *Elsevier, Analytica Chimica Acta*, **Vol.557**, 211-220. (2006).

- [28] Rosén, J. y Hellenäs, K. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, **Vol. 127**, 880-882. (2002).
- [29] Ioannou A., Daskalakis V., Varotsis C. Detection of Maillard reaction products by a coupled HPLC-Fraction collector technique and FTIR characterization of Cu (II)-complexation with the isolated species. *Elsevier, Journal of Molecular Structure*, **Vol. 1141**, 634-642. (2017).
- [30] Ioannou A. y Varotsis C. Real time monitoring the maillard reaction intermediates by HPLC-FTIR. *Journal of Physical Chemistry and Biophysics*, **Vol. 6**. (2016).
- [31] Guorong D., Yanjun M., Li M., Jun Z. y Yue H. Exploring the use of NIR reflectance spectroscopy in prediction of free-L-Asparagine in solanaceae plants. *Elsevier, International Journal of Biological Macromolecules*, **Vol. 91**, 426-430. (2016).
- [32] Pawlukoj'c, A., Hołderna-Natkaniec K., Batord G., y Natkaniec, I. INS, IR, RAMAN, ¹HNMR and DFT investigations on dynamical properties of L-asparagine. *Elsevier, Vibrational Spectroscopy*, **Vol.72**, 1-7. (2014).
- [33] Moovendaran, K., Srinivasan, B., Sundar, J., Dhas, S. y Natarajan, S. Structural, vibrational and termal studies of a new nonlinear optical material: L-Asparagine- L-tartaric acid. *Elsevier, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **Vol. 92**, 388-391. (2012).
- [34] Callejón R. *Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales*. Universidad de Valladolid, Facultad de Farmacia, Doctorado en enología. Recuperado de: <http://www.fe.urv.cat/media/upload/arxius/winegar/41.pdf>.

9. ANEXOS

9.1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECTOR DE ULTRAVIOLETA

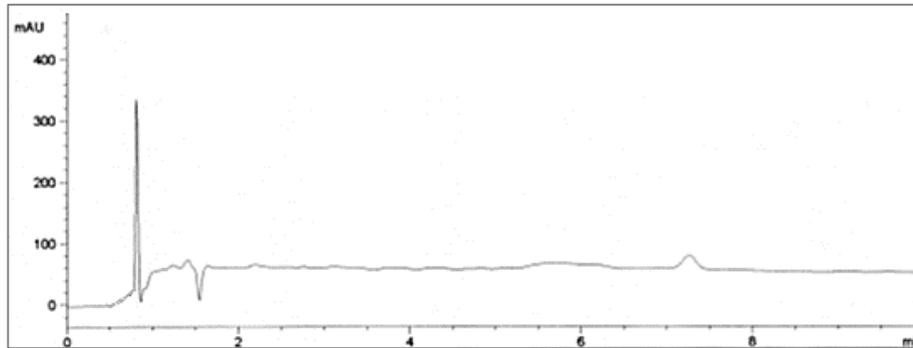


Figura 56: Disolución asparagina en acetonitrilo. Fase móvil 2.

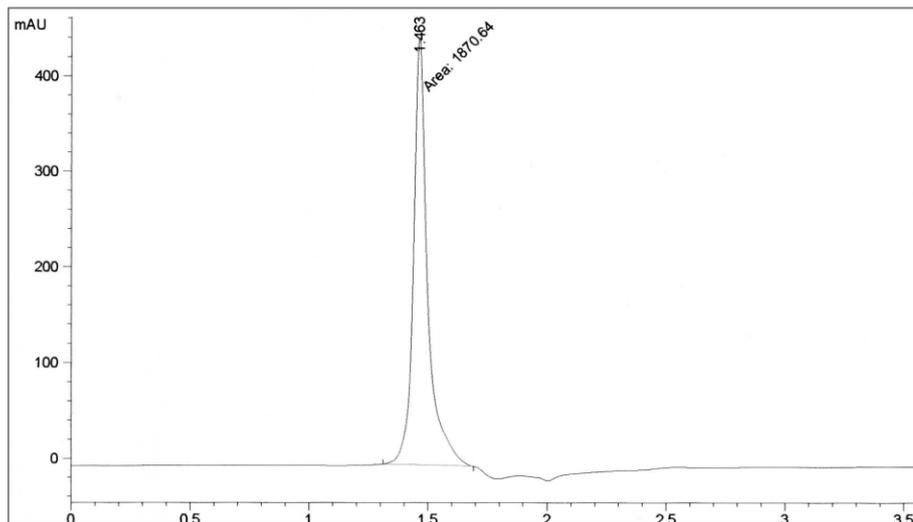


Figura 57: Disolución asparagina en agua, la fase móvil 1.

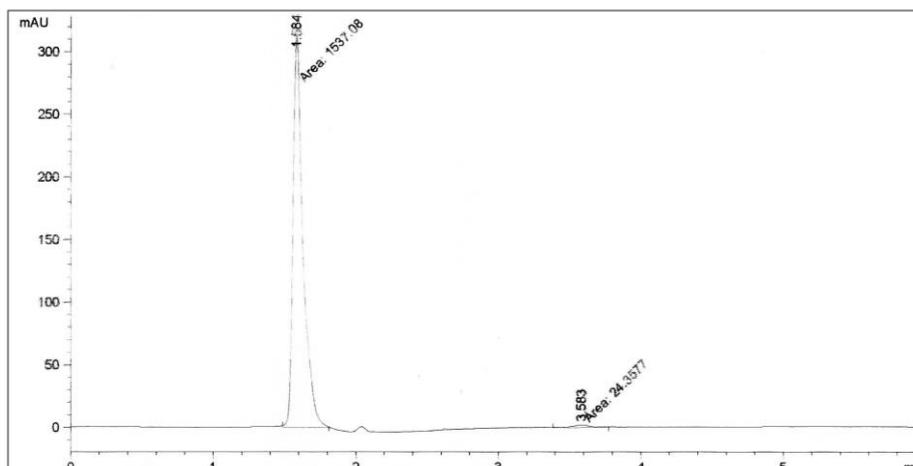


Figura 58: Disolución asparagina en metanol, la fase móvil 1.

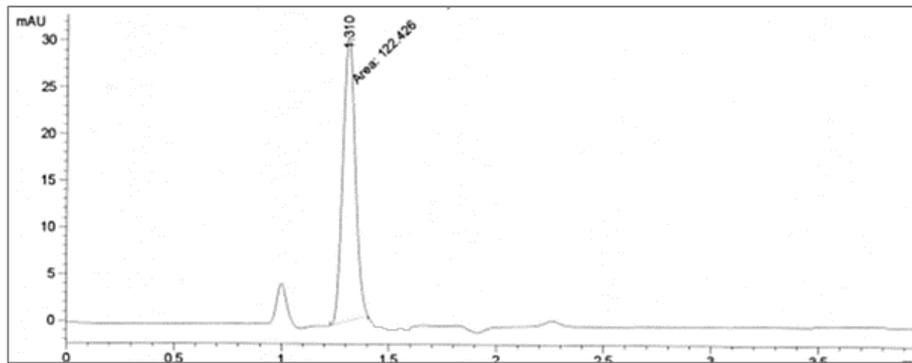


Figura 59: Disolución asparagina en agua, la fase móvil 3.

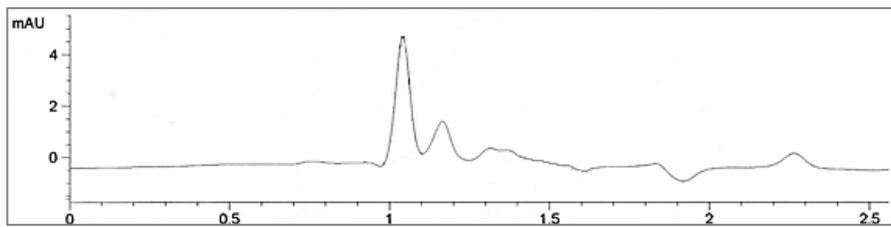


Figura 60: Disolución de asparagina en agua, la fase móvil 3.

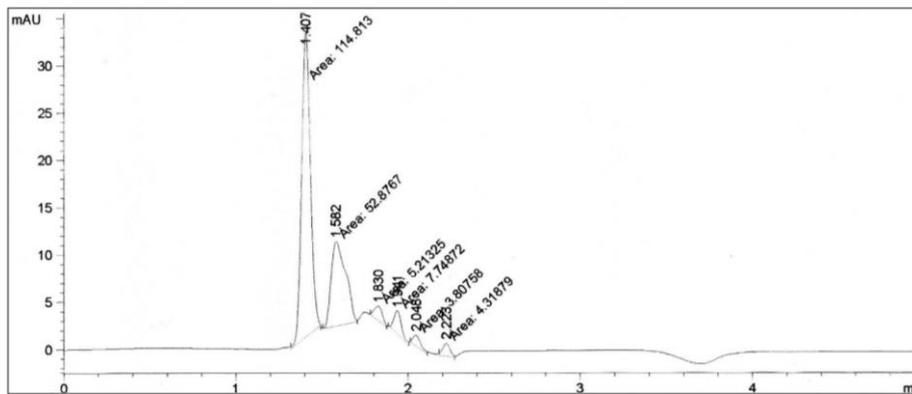


Figura 61: Disolución asparagina en metanol, la fase móvil 4.

9.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA

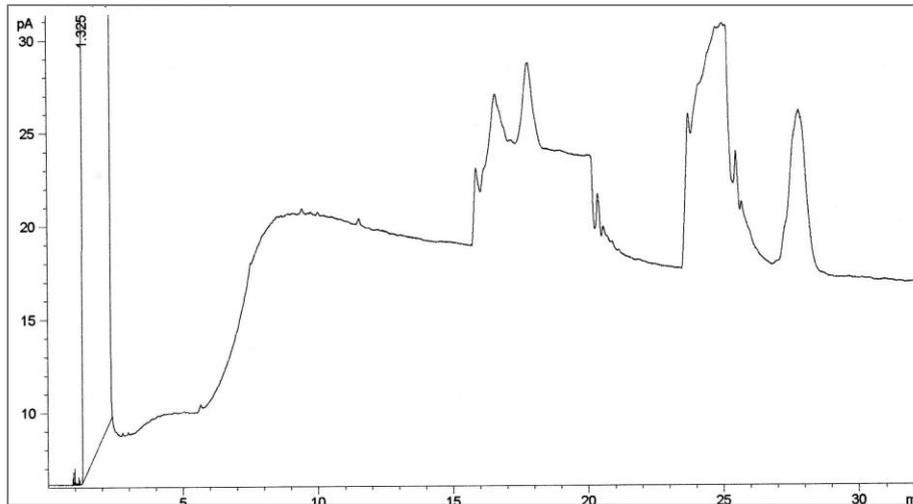


Figura 62: Disolución de asparagina en metanol. Condiciones 1.

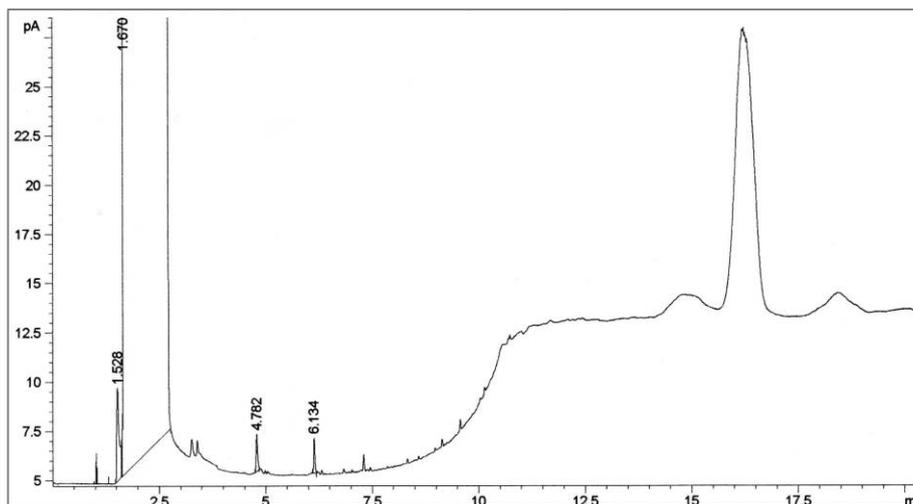


Figura 63: Disolución de asparagina en metanol. Condiciones 2.

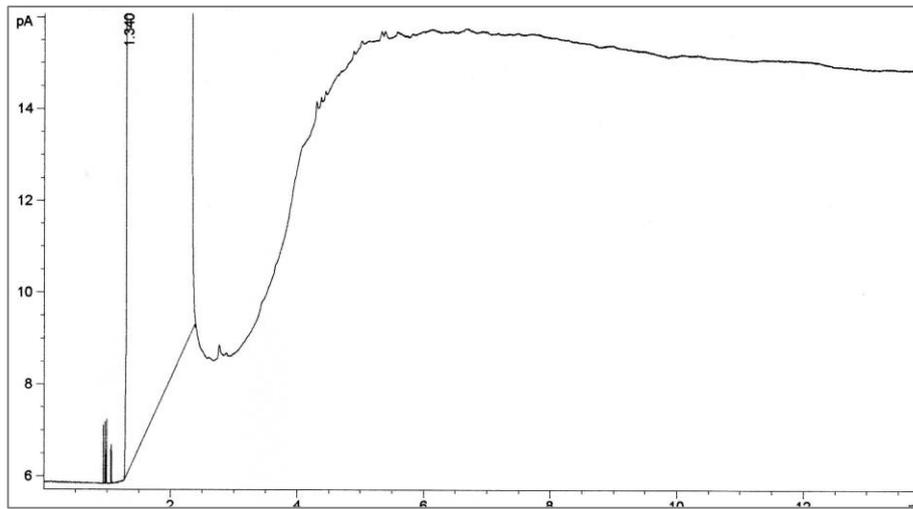


Figura 64: Disolución de asparagina en metanol. Condiciones 3.

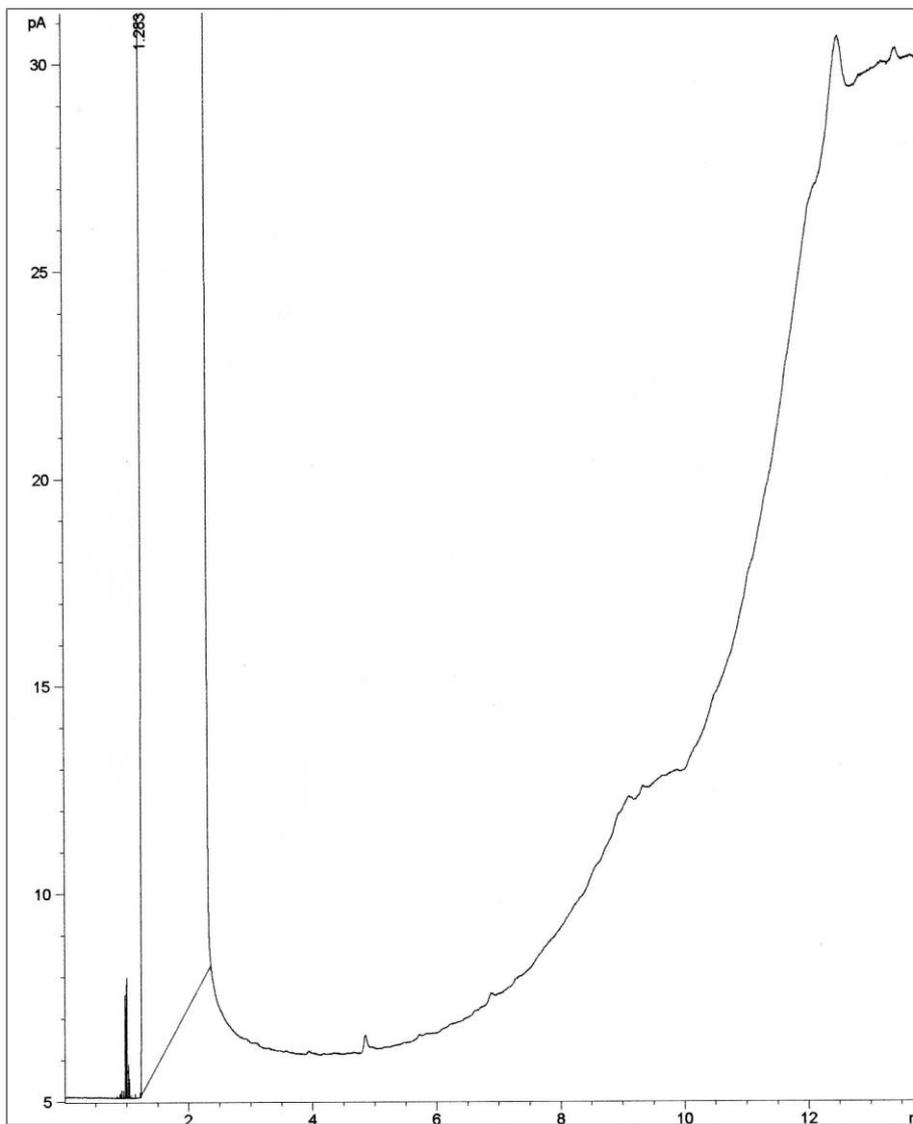


Figura 65: Disolución de asparagina en metanol. Condiciones 5.

9.3. MEDIDAS

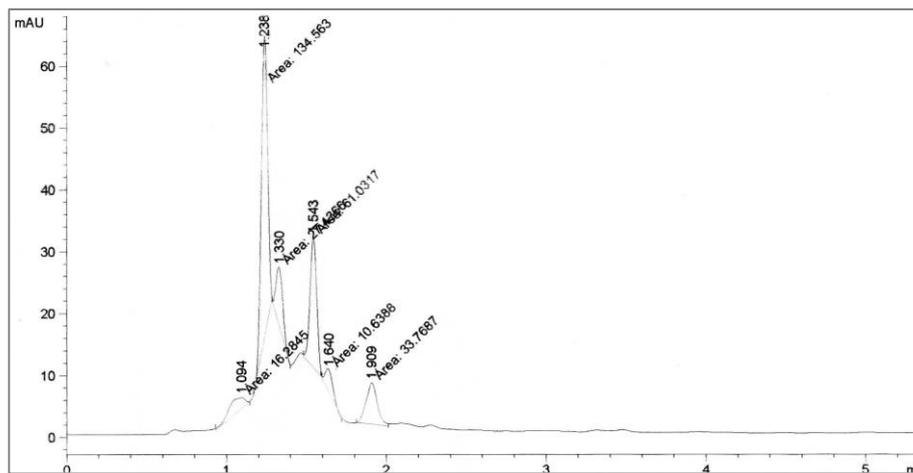


Figura 66: Harina de trigo en agua contaminado con asparagina. Baño maría. Fase móvil 3.

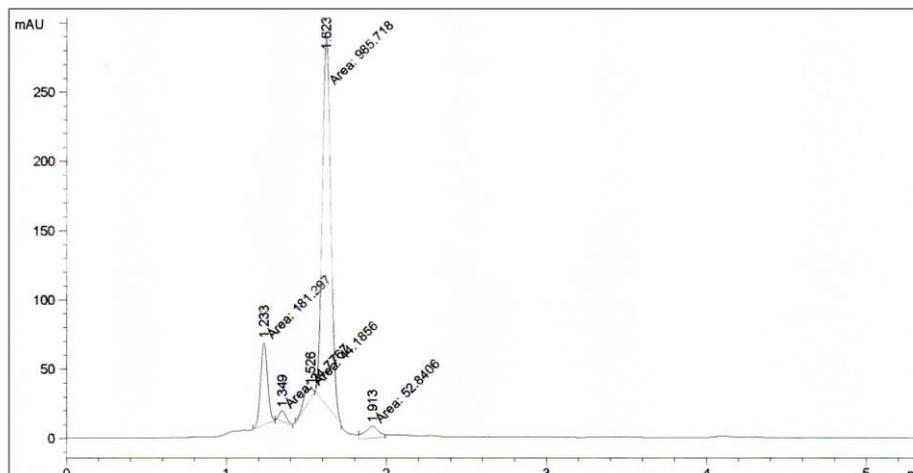


Figura 67: Harina de trigo en agua contaminado con acrilamida. Baño maría. Fase móvil 3.

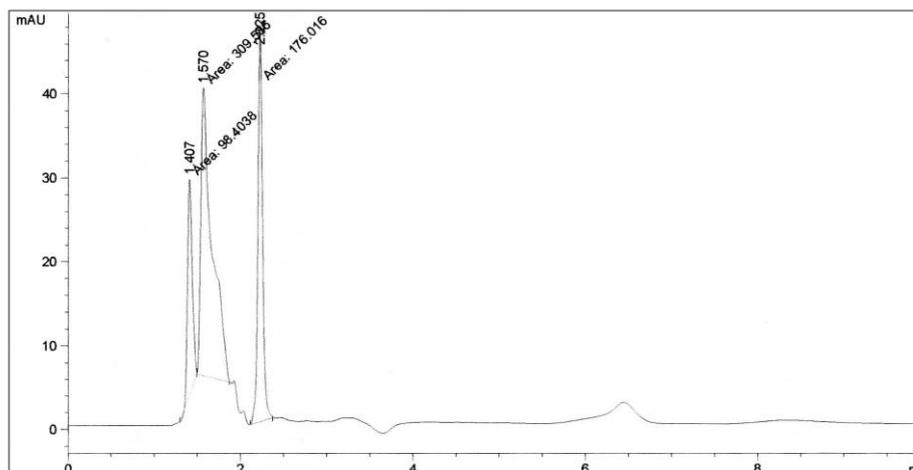


Figura 68: Harina de trigo en metanol contaminada con acrilamida. Baño maría. Fase móvil 5.

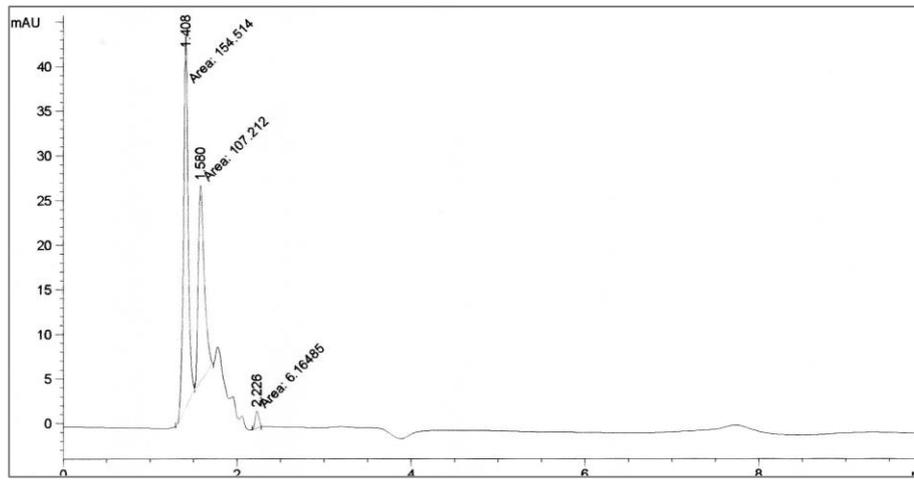


Figura 69: Harina de trigo en metanol contaminada con asparagina. Baño maría. Fase móvil 5.