

VALIDACIÓN DE MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ϵ -CAPROLACTAMA POR UHPLC

M. Giberti, C. Iranzo, G. López Cabana, G. Munizza, G. Fernández
INTI Plásticos
giberti@inti.gov.ar

Introducción

La poliamida 6 (PA 6) es un material usado habitualmente en envases multicapa de carnes y quesos. Puede contener como monómero residual de polimerización a la ϵ -Caprolactama, una sustancia de interés toxicológico que podría migrar hacia el alimento. Para proteger la salud de la población se estableció un límite de migración específica (LME) de 15 *mg/kg de alimento* en la Resolución Mercosur GMC N°02/12 y en el Reglamento de Unión Europea N°10/2011. Los materiales destinados a entrar en contacto con alimentos deben cumplir el LME para ser utilizados, por lo que la PA 6 requiere el ensayo de migración específica de ϵ -Caprolactama.

INTI-Plásticos desarrolló un método para cuantificar ϵ -Caprolactama por cromatografía líquida en muestras de simulantes de alimentos, posteriormente para ultra alta *performance* (UHPLC); en este trabajo se presenta la validación de este último.

Objetivo

Validar el método de determinación por UHPLC de ϵ -Caprolactama. Parámetros: linealidad y rango, límites de detección y cuantificación, repetibilidad, precisión intermedia, veracidad, y corrimientos de tiempos de retención.

Descripción

Se inyectaron en UHPLC por sextuplicado tres curvas de calibración realizadas por distintos operadores, para analizar: linealidad, límites de detección (LD) y cuantificación (LC), y repetibilidad. Para evaluar precisión intermedia y corrimientos de tiempos de retención, se intercalaron por sextuplicado seis muestras, preparadas por dopaje sobre tres simulantes de alimentos en dos extremos del rango. Se utilizó integración automática con revisión manual del operador. Se analizó la veracidad sobre un ensayo interlaboratorio.

Preparación de muestras

Se preparó una solución de 500 *mg/l* de ϵ -Caprolactama en metanol, de la cual se obtuvieron diluciones de 50 y 350 *mg/l*. Cada una de éstas se diluyó 1/25 con tres simulantes: agua grado 1 (A), ácido acético 3 %*v/v* (B) y etanol 95 %*v/v* (D*). Se obtuvieron

tres muestras de 2 *mg/l* y de 14 *mg/l*, y se refrigeraron hasta su uso.

Preparación de curvas de calibración

Cada operador preparó una solución madre de 500 *mg/l* de ϵ -Caprolactama en metanol, luego una dilución intermedia 5/50, y seis diluciones con la fase móvil de trabajo hasta: 2, 4, 6, 10, 14 y 20 *mg/l* (curva de calibración).

Equipos e instrumentos de medición

- Sistema de UHPLC. *Agilent 1260 Infinity*, con: bomba binaria, degasificador, inyector automático, termostatazador, detector *DAD*, y *software Chem Station Rev. B 04 02 SP1*.
- Balanza analítica, mínima división 0,1 *mg*.
- Material de vidrio volumétrico, clase A.
- Equipo de filtración y bomba de vacío.

Reactivos y patrones

ϵ -Caprolactama pureza 99 % (*Sigma Aldrich*); agua grado 1 (IRAM 21322:2006); metanol grado HPLC (*J.T. Baker*); ácido acético glacial (*Merck*); etanol absoluto anhidro (*J. T. Baker*).

Condiciones cromatográficas

Fase móvil: metanol/agua (3:7), flujo:0,5*ml/min*, a 45 °C, inyección de 5 μ l, columna C18, 50 x 4,6 *mm*, 1,8 μ m, 80 Å, y detección λ = 210 *nm*.

Resultados

1. Linealidad y rango

Se realizó una regresión lineal para cada curva de calibración; obteniéndose pendientes con desvíos estándar relativos de 2,2%, menores al límite (8%). Se verificó visualmente la aleatoriedad de los residuos, todos bajo el límite (15 %). **Se verificó el modelo lineal en el rango de trabajo** según la guía EUR 24105.

2. Límites de detección y de cuantificación

Se determinó el LD de ϵ -Caprolactama como el triple de la magnitud del ruido (reportado por el *software* para 1 *minuto* de seis corridas de estándar de 2 *mg/l*): **LD = 0,4 *mg/l***. Se calculó el LC como el doble de LD: **LC = 0,8 *mg/l***.

3. Repetibilidad

Para cada punto de las curvas de calibración se evaluó repetibilidad, realizando de manera consecutiva:

a) Test de *Shapiro-Wilks*: no se rechazó la distribución normal de los datos, con nivel de confianza del 99 % ($\alpha=0,01$).

b) Test de *Grubbs*: no se observaron datos anómalos, con nivel de confianza del 99 %.

c) Cálculos de desvío estándar relativo bajo repetibilidad ($RSD_R\%$):

Concentración (mg/l)	Curva I	Curva II	Curva III	$RSD_R\%$ Horwitz
	$RSD_R\%$	$RSD_R\%$	$RSD_R\%$	
2	0,57	1,12	0,64	9,5
4	0,38	0,68	1,35	8,6
6	0,44	0,72	0,79	8,1
10	0,27	0,44	0,98	7,5
14	0,23	0,58	0,23	7,1
20	0,26	0,33	0,64	6,8

Tabla 1: $RSD_R\%$ (repetibilidad) y criterio de aceptación

Los $RSD_R\%$ cumplen el criterio de *Horwitz*: $RSD_R\% \text{ (repetibilidad)} < \frac{4}{3} \cdot C^{-0,15}$ (expresando la concentración C en fracción másica).

4. Precisión intermedia

Se evaluó la precisión intermedia sobre las seis muestras, cuantificadas por cada curva de calibración, realizando en forma consecutiva:

a) Test de *Shapiro-Wilks*: no se rechazó, con nivel de confianza del 99 %, la distribución normal de datos.

b) Test de *Grubbs*: no se detectaron *outliers* con nivel de confianza del 99 %.

c) Test de *Cochrane*: con nivel de confianza del 99 % no se verificó heterogeneidad de varianzas entre los operadores.

d) ANOVA: no proporcionó evidencias para afirmar que las condiciones de precisión intermedia afectasen los resultados (confianza del 95 %).

f) Cálculos de desvío estándar relativo en condiciones de precisión intermedia ($RSD_R\%$):

$RSD_R\%$	Simulante			$RSD_R\%$ Horwitz
	A	B	D*	
2 mg/l	5,1	3,5	24,5	14,3
14 mg/l	1,0	1,2	5,2	10,7

Tabla 2: $RSD_R\%$ y criterio de aceptación

El criterio de aceptación de *Horwitz* para precisión intermedia, que cambia el factor de 4/3 por 2, fue verificado a excepción de para el simulante D* a 2 mg/l; esto puede deberse a la deformación del pico por efecto matriz.

5. Veracidad de la medición

Se analizaron los valores de z-score del ensayo interlaboratorio de DRRR, ronda RVEP 13425:

Simulante	z score
A (agua bidesmineralizada)	0,42
B (ácido acético 3 %p/v)	0,04
C10% (etanol 10 %v/v)	0,09
C20% (etanol 10 %v/v)	0,38
C50%(etanol 10 %v/v)	-0,33
D* (etanol 95 %v/v)	-0,66

Tabla 3: Valores de z-score (RVEP 13425).

Los resultados fueron muy satisfactorios.

6. Corrimientos de tiempos de retención (t_R)

El t_R medio para los patrones fue 2,567 min. El desvío estándar máximo para todas las réplicas de las seis muestras fue 0,026 min.

Conclusiones

La validación del método de determinación de ϵ -Caprolactama ofreció evidencias de su aplicabilidad, permitió generar criterios de aseguramiento de la calidad, y propuestas de ampliación y de tratamiento de muestras.

Se definió el límite de variación aceptable entre duplicados cuantificados: 1,5 %, a partir del análisis repetibilidad. La precisión intermedia cumplió el criterio de *Horwitz* a excepción del simulante D* a 2 mg/l, lo que concordó con efecto matriz observado y el mayor desvío en la exactitud (interlaboratorio). **Se planteó diluir las muestras de D* al 1/2 con fase móvil y además repetir el análisis de precisión intermedia, y determinar el LC en patrones diluidos en simulante D*.** Finalmente, como **criterio de corrimiento de tiempo de retención se dispuso 0,06 minutos**, por ser el doble del máximo desvío hallado. Este valor es más exigente al indicado en la Guía EUR 24105 como variación aceptable entre curva de calibración y muestra (+/- 5 %).

La validación del método fue concluida para simulantes A y B, y planteó la repetición de ciertos ensayos para D*.

Bibliografía

- MERCOSUR RES/GMC N° 02-12. Disponible en: http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_02-12.pdf (consulta: 17/05/17)
- REGLAMENTO (UE) N° 10/2011. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:012:0001:0089:ES:PDF> (consulta: 17/05/17)
- EUR 24105 EN (2009). Disponible en: <http://publications.jrc.europa.eu/repository/handle/JRC53034> (consulta: 17/05/17)
- Horwitz, W., Albert, R. (1997). A Heuristic Derivation of the Horwitz Curve. *Analytical Chemistry*, 69 (4), 789-790.