

Cuantificación de hidroximetilfurfural en totopos aplicando la extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos de alta eficacia

S. G. Ceballos Magaña¹, M. A. Rodríguez Pérez², S. Salvatierra Virgen², V. del C. Salvatierra Stamp², R. Muñiz Valencia².

¹ Facultad de Ciencias, Universidad de Colima, Calle Bernal Díaz del Castillo 340, Villa San Sebastián, C.P. 28045, Colima. Tel: +52 (312) 3 16 11 55

² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima, Km 9, Carretera Colima-Coquimatlán, s/n, Coquimatlán, P.D. 28400, Coquimatlán, Colima. e-mail: ale_rodriguez@uclm.mx.

RESUMEN: Este trabajo se desarrolla método analítico un rápido, sensible y amigable con el medio ambiente para la cuantificación de Hidroximetilfurfural (HMF) en totopos de maíz utilizando HPLC-DAD. La separación cromatográfica dio como resultado una separación para HMF en 3,7 min. El tratamiento de la muestra para las muestras de totopo de maíz involucró primero un proceso de lixiviación con agua y luego una extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos poliméricos HLB-Oasis. La optimización del tratamiento de la muestra se realizó mediante el diseño factorial fraccional de Box-Behnken y la metodología de superficie de respuesta para examinar los efectos de cuatro variables (peso de la muestra, pH, tiempo de sonicación y volumen de elución) en la extracción HMF de totopos de maíz. El método SPE-HPLC-DAD fue validado. Los límites de detección y cuantificación fueron 0.82 y 2.20 mg/kg, respectivamente. La precisión del método se evaluó en términos de repetibilidad y reproducibilidad como desviación estándar relativa (RSD) utilizando tres niveles de concentración. Para la repetibilidad, los valores de RSD fueron 6.9, 3.6 y 2.0%; y para reproducibilidad 18.8, 7.9 y 2.9%. Para el estudio de robustez, se aplicó el Test de Yuden y el resultado demostró que el método es robusto. El método fue aplicado exitosamente a diferentes muestras de chips de maíz.

Palabras clave: Hidroximetilfurfural, HPLC-DAD, totopos de maíz.

ABSTRACT: This paper provides a rapid, sensitive and environmentally-friendly analytical method for the quantification of Hydroxymethylfurfural (HMF) in totopos using HPLC-DAD. Chromatographic separation for HMF was achieved in 3.7 min. Sample treatment for corn chip samples first involved a leaching process using water and afterwards a solid-phase extraction (SPE) using HLB-Oasis polymeric cartridges. Sample treatment optimization was carried out by means of Box-Behnken fractional factorial design and Response Surface Methodology to examine the effects of four variables (sample weight, pH, sonication time and elution volume) on HMF extraction from corn chips. The SPE-HPLC-DAD method was validated. The limits of detection and quantification were 0.82 and 2.20 mg/kg, respectively. Method precision was evaluated as repeatability and reproducibility using three concentration levels. For repeatability, RSD values were 6.9, 3.6 and 2.0%; and for reproducibility 18.8, 7.9 and 2.9%. For a ruggedness study the Yuden test was applied and the result demonstrated the method as robust. The method was successfully applied to different corn chip samples.

Keywords: Corn chips, HPLC-DAD, Hydroxymethylfurfural.

Área: Otros

INTRODUCCIÓN

Los tratamientos térmicos aplicado a los alimentos producen la reacción de Maillard, siendo en parte los responsables del sabor y color que éstos presentan (Edeas et al., 2010). Sin embargo, alimentos ricos en carbohidratos generan productos como el hidroximetilfurfural (HMF) y la acrilamida, con probada actividad mutagénica y carcinogénica (Capuano y Fogliano, 2011). Los “totopos” (tortilla mexicana frita) son consumidos de manera cotidiana ya que es una base importante para la alimentación de la población mexicana y presentan una elevada probabilidad de contener HMF (Edward, 2015). Existen algunos métodos para la determinación de este compuesto, pero involucran el uso de compuestos tóxicos (Czerwonka et al., 2018); es por ello que el objetivo de la presente

investigación fue desarrollar un método analítico libre del empleo de compuestos tóxicos, empleando además mínimas cantidades de disolventes orgánicos (Salvatierra-Virgen et al., 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

El pretratamiento de la muestra se realizó homogenizando y triturando los totopos con ayuda de un mortero. Se lixivió 1 gramo de la muestra homogenizada con 30 mL de agua ultrapura, empleando la sonicación por 15 minutos. La parte sobrenadante se decantó y se centrifugó a 4000 RPM a 15°C durante 15 minutos. De este proceso se descartó la parte oleosa, y de la parte acuosa se tomó 20 mL para ser sometidos a la extracción en fase sólida (SPE).

La SPE se realizó empleando cartuchos HLB Oasis, en los cuales pasaron los 20 mL resultantes del paso anterior a un flujo de 2 mL/min. Posteriormente se realizó la elución con 1 mL de metanol (extracto final).

Esta muestra concentrada se analizó en un equipo de cromatografía del líquido de alta eficacia acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) empleando una columna Varían C18 (5 μ m, 4.6 x 25 mm) a un flujo de 1.2 mL/min, a 35°C en modo isocrático. La fase móvil estuvo constituida por Agua ultrapura/Acetonitrilo, 82:18 (%V/V).

La validación del método se realizó evaluando la selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez y límites de detección y cuantificación (Eurachem, 2014).

Finalmente se aplicó el método en diversas muestras comerciales de consumo popular en la región y un totopo especialmente diseñado para contener menor cantidad de HMF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se preparó una solución madre de HMF a 1000 μ g/mL en metanol y se almacenó a 4°C. La curva de calibración se realizó de 0.1 a 200 mg/mL a partir de esta solución madre. La identificación del pico cromatográfico del HMF se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros UV en un rango de 200 a 280 nm entre la muestra y el estándar. El tiempo de retención obtenido fue de 3.7 minutos a 283 nm, tal como se puede observar en la Figura 1.

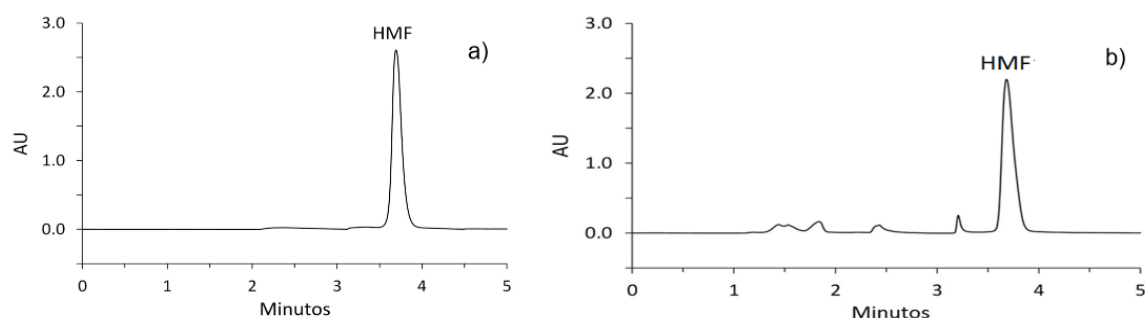


Figura 1. Cromatogramas de a) una solución estándar de HMF a 100 mg/mL, y b) una muestra de totopo enriquecido con 100 mg/mL, ambos obtenidos a 283 nm en los que se muestra que el HMF tiene como tiempo de retención 3.7 minutos.

Preparación de muestra.

Se realizó un diseño experimental (DoE) de modo factorial fraccional, L^{k-1} , para examinar los efectos de las cuatro variables en la determinación de HMF en tres niveles (Eurachem, 2014), donde L son los niveles probados y K las variables elegidas. Las cuatro variables independientes en este experimento fueron el volumen de elución-SPE, pH, peso de la muestra (g) y tiempo de sonicación (min), con cada

variable en tres niveles. Las superficies de respuesta obtenidas que se pueden observar en la Figura 2. Los niveles elegidos para volumen de elución fueron 1, 2 y 3 ml; para el pH fueron 1.0, 5.2 y 7.0; para el peso de la muestra fueron 1, 2 y 3 gramos; para el tiempo de sonicación se evaluó a 10, 15 y 20 minutos.

Los mejores parámetros para obtener una mayor recuperación fueron: 1 ml de volumen de elución de metanol, trabajando la muestra a pH 5.5, con 1 gramo sometido a sonicación durante 10 minutos.

Validación del método.

La validación del método se realizó evaluando la selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez y límites de detección y cuantificación. Toda la información obtenida de la validación se presenta en la Tabla I.

Selectividad.

Se realizó mediante inspección visual observando la presencia del HMF tanto en la solución estándar como en la muestra enriquecida con HMF (Figura 1). Además, también podemos ver en la figura que no hay interferencias en el tiempo de retención correspondiente a la muestra de totopo enriquecida.

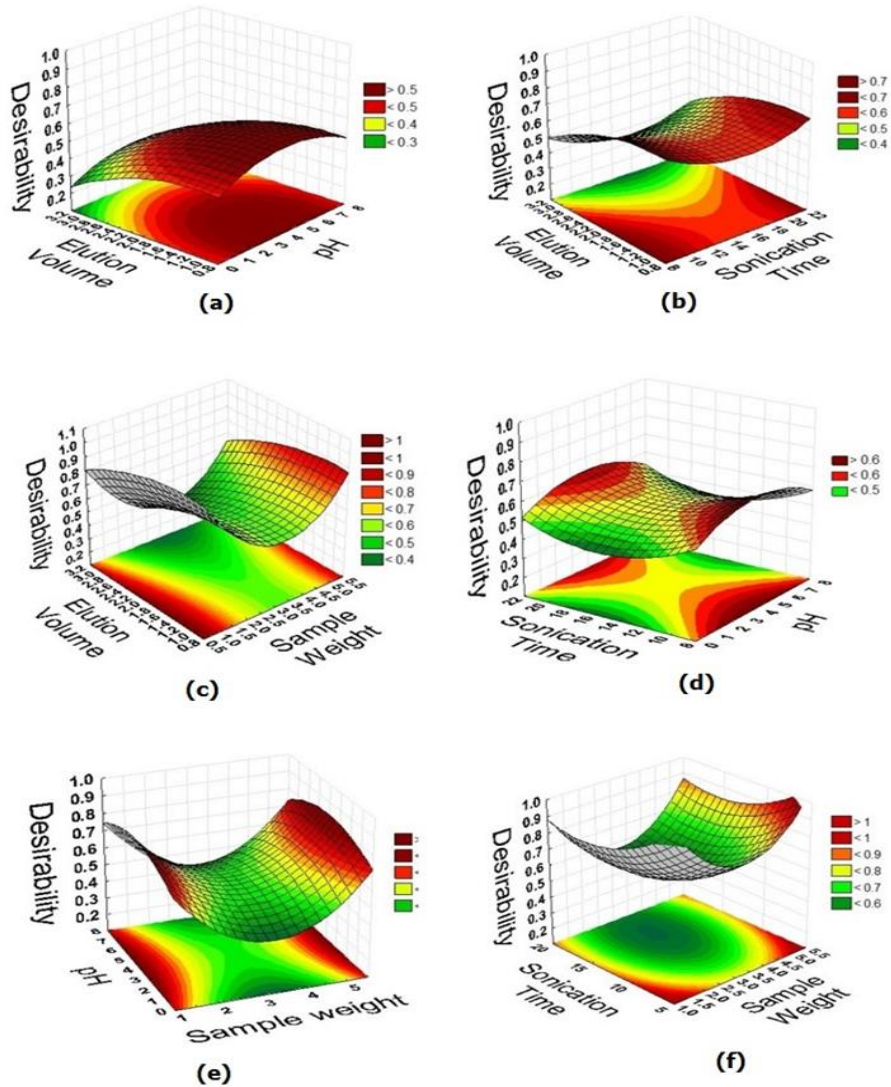


Figura 2. Superficies de respuesta obtenidos empleando el DoE mostrando los efectos de los parámetros de operación sobre la deseabilidad: a) Volumen de elución y pH; b) Volumen de elución y tiempo de sonicación; c) Volumen de elución y peso de la muestra; d) Tiempo de sonicación y pH; e) pH y peso de la muestra; f) peso de la muestra y tiempo de sonicación.

Linealidad: Se evaluó a 10 niveles de concentración, por triplicado. Las muestras de totopo fueron enriquecidas a 5, 10, 20, 50, 80, 100, 120, 140, 180, y 200 mg/kg de HMF. Se obtuvieron coeficientes de regresión lineal superiores a 0.99.

Límites de detección (LD) y cuantificación (LC): Se evaluaron empleando muestras blanco, empleando un factor de 3 para LD y 10 para LC considerando la desviación estándar de los blancos.

Precisión y exactitud: Se evaluaron a tres niveles: 5, 100 y 200 mg/kg.

Tabla I. Resultados de la validación del método para HMF, usando SPE-HPLC-DAD

Rango lineal (mg/kg)	LD ^a (mg/kg)	LC ^b (mg/kg)	Precisión (RSD ^c , %)						Exactitud		
			Repetibilidad			Reproducibilidad			Recuperación (%)		
			C ₁ ^d	C ₂ ^e	C ₃ ^f	C ₁ ^d	C ₂ ^e	C ₃ ^f	C ₁ ^d	C ₂ ^e	C ₃ ^f
5-200	0.8	2.2	6.9	3.6	2.0	18.8	7.7	2.9	101.6	92.8	100.8

^aLímite de detección; ^blímite de cuantificación; ^cdesviación estándar relativa; ^dnivel bajo de concentración del rango lineal mg kg⁻¹, ^enivel media de concentración del rango lineal 100 mg kg⁻¹, ^fnivel alto de concentración del rango lineal 200 mg kg⁻¹.

Robustez: Se realizó bajo el Test de Youden evaluando las 7 variables con respecto a la preparación de muestra (ver Tabla II). En la Tabla II se puede observar el efecto de cada una de las variables mediante un concepto de “diferencia”, la cual se estimó restando el resultado promedio obtenido de cada variable en el valor nominal indicado por una letra mayúscula, del resultado promedio obtenido de cada variable en el valor cambiado indicado por la letra minúscula correspondiente, por ejemplo, para la variable A la diferencia se calcula con la ecuación: $D_a = A - a = [\sum(A_i)/4] - [\sum(a_i)/4]$.

Tabla II. Test de Youden para la evaluación de la Robustez: variables, combinaciones factoriales y diferencias.

Variables.	Variación		Combinación factorial									Diferencia (Di)*
	Experto	Nuevo	S	T	U	V	W	X	Y	Z		
Operador (A/a)	1	2	A	A	A	A	a	a	a	a	2.0	
Peso de muestra (g) (B/b)	1	2	B	B	b	b	B	B	b	b	1.6	
Tiempo sonicación (min) (C/c)	10	20	C	c	C	c	C	c	C	c	8.0	
Temperatura de centrifugación (°C) (D/d)	15	25	D	D	d	d	d	d	D	D	3.8	
pH de la muestra (E/e)	5	1	E	e	E	e	e	E	e	E	2.1	
Lavado la muestra (F/f)	Si	No	F	f	f	F	F	f	f	F	1.3	
Volumen de elución (mL) (G/g)	1	2	G	g	g	G	g	G	G	g	3.5	

Si una variable tiene un efecto negativo, la diferencia será mayor que las diferencias de las otras variables. Para cada variable, se calcula la diferencia (Di). La desviación estándar de las diferencias Di (SDi) se evalúa utilizando las diferencias obtenidas y la siguiente ecuación: $s_{Di} = \sqrt{2 \times \sum \left(\frac{D_i^2}{7} \right)}$. De manera que, cuando S_{Di} es significativamente mayor que la desviación estándar del método en condiciones de reproducibilidad, se debe concluir que todos los factores juntos tienen un efecto en el resultado, incluso si cada factor no muestra una influencia significativa y que el método no es lo suficientemente sólido contra las modificaciones elegidas (Decisión 2002/657/CE de la Comisión). Como puede verse en la Tabla 2, las diferencias más altas (Di) corresponden a las variables: tiempo de sonicación y lavado de la muestra. Sin embargo, la desviación estándar de las diferencias (SDi) fue del 14.4%, lo que demuestra que todos los factores juntos no tienen una influencia negativa en los resultados; por lo tanto, el método evaluado puede considerarse robusto.

La aplicación del método se desarrolló probando 4 muestras de totopo de marcas comerciales y 6 muestras de totopo preparados expreso para disminuir su cantidad de HMF, bajo diferentes formulaciones. Las concentraciones de HMF encontradas en muestras comerciales fueron: 103.4, 88.2, 104.3 y 88.6 mg/kg; mientras que para las muestras de totopos diseñados, todas se encontraron por debajo de los límites de detección.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico robusto, sensible, rápido y ambientalmente amigable para la extracción, separación y cuantificación de HMF a partir de muestras de totopo. Es importante

mencionar que éste compuesto aún no ha sido reportado en muestras de totopo, pero se sabe que debido a su preparación casera e industrial tiene una elevada probabilidad de contenerlos, tal como se ha demostrado en la presente investigación. La etapa de la extracción en fase sólida permite la limpieza adecuada de la muestra y proporciona un buen rendimiento. EL LD y LC fueron 0.8 y 2.2 mg/kg, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Capuano E., Fogliano V. 2011. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 793–810.
- Czerwonka M., Opilka M, J., Tokarz A. 2018. Evaluation of 5-hydroxymethylfurfural content in non-alcoholic drinks. *European Food Research and Technology*. 244, 11-18.
- Edeas M., Attaf D., Mailfert A-S, Nasu M., Joubet R. 2010. Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress: Potential role of antioxidants. *Pathologie Biologie*, 58, 220–225.
- Edward W. 2015. Iowa and Mexico: The corn connection. Digital Repository of Iowa State University. 9, 5-6.
- Eurachem 2014 Eds: Magnusson B., Örnemark U. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, (2nd ed.), Eurachem Guide.
- Salvatierra Virgen S, Ceballos-Magaña S, Salvatierra-Stamp V, Sumaya-Martínez M, Martínez-Martínez F, Muñiz-Valencia R. 2017. HPLC-DAD method development and validation for the quantification of hydroxymethylfurfural in corn chips by means of response surface optimisation, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34:12, 2101-2110