

COMBINACIÓN DE HPLC-FLD Y MCR-ALS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HAPs EN PIMENTÓN

O. Monago Maraña¹, R. Laura Pérez², G. M. Escandar², A. Muñoz de la Peña¹, T. Galeano Díaz¹

¹ Universidad de Extremadura e IACYS, Avenida de Elvas, s/n, Badajoz, 06006, España, olgamonago@unex.es

² Instituto de Química de Rosario (CONICET-UNR), Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, Rosario, Argentina

Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son ampliamente conocidos por ser un grupo de compuestos que pueden presentar propiedades carcinogénicas, mutagénicas y bioacumulativas [1]. Suelen formarse en procesos térmicos (ahumado, horneado, asado...) y llegar al ser humano mediante tres fuentes, inhalación, contacto cutáneo e ingestión [2, 3].

Se trata de una práctica común someter a algunos alimentos a un proceso de ahumado para su obtención. Este es el caso, por ejemplo, del Pimentón de La Vera (Extremadura), el cual se encuentra reconocido por la Unión Europea como Denominación de Origen Protegida (DOP) desde 2005. Este se obtiene mediante un sistema de secado del pimiento al humo, que podría conferir al pimentón unas características antioxidantes superiores a las de otros pimentones [4]. No obstante, debido a este sistema de secado, puede contener este tipo de compuestos.

Para el análisis de estos compuestos en alimentos, en los últimos años, se ha empleado, generalmente, la cromatografía de líquidos acoplada a la detección fluorescente (HPLC-FLD) [5, 6, 7]. Cuando se lleva a cabo un análisis cromatográfico se espera que se produzca una buena separación de los picos. Sin embargo, en algunas ocasiones ocurren solapamientos muy difíciles de evitar. En estos casos, el análisis multivariante puede ser utilizado para identificar los analitos y cuantificarlos incluso en presencia de interferentes, siendo esto último una ventaja de los algoritmos de segundo orden. Por ello, hoy en día, el uso de herramientas quimiométricas, en la determinación analítica de componentes minoritarios en alimentos, se está incrementando. En este sentido, las técnicas separativas acopladas a algoritmos de segundo orden, como es la resolución multivariante de curvas y mínimos cuadrados alternantes (MCR-ALS), han sido empleadas por varios autores para cuantificar ácidos fenólicos en aceite de oliva [8, 9], pesticidas en agua [10] o en alimentos [11], etc.

Teniendo en cuenta todo esto, el principal objetivo de este estudio fue llevar a cabo la identificación y cuantificación de ocho HAPs (fluoreno, fenantreno, antraceno, criseno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y benzo(a)pireno) en dos grupos de pimentones, uno perteneciente a la DOP "Pimentón de La Vera" y otro no perteneciente a la DOP, mediante HPLC-FLD haciendo uso de algoritmos quimiométricos en el caso de que fuera necesario en las muestras reales.

Desarrollo experimental

El método cromatográfico desarrollado para la identificación y cuantificación de estos analitos consistió en la retención de los analitos en una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 10 mm x 1.8 μm) y su posterior elución en modo isocrático, con un flujo constante de 0.8 mL min^{-1} , utilizando una fase móvil ACN:H₂O (65:35, %v/v). La detección se llevó a cabo mediante un detector fluorescente fijando la longitud de onda de excitación en 280 nm y las de emisión en 312 y 420 nm. De la misma manera se programó la ganancia del detector fluorescente debido a la diferencia entre unos analitos y otros, en cuanto a órdenes de magnitud en la muestra.

Para llevar a cabo la cuantificación, se construyeron las rectas de calibrado de patrones externos (calibración univariante) para todos los analitos objeto de estudio (fluoreno, fenantreno, antraceno, criseno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y benzo(a)pireno), obteniéndose los parámetros analíticos correspondientes para la validación del método analítico.

Por otro lado, en el caso de la calibración con MCR-ALS se emplearon dos sets de muestras, uno de calibración y otro de validación. El primero consistió en las mismas muestras patrón empleadas para la calibración univariante y el segundo set se encontraba formado por varios patrones mezcla y varias muestras de pimentón enriquecidas con concentraciones conocidas de los analitos que se pretendían cuantificar mediante esta estrategia. Las matrices de datos, obtenidas en el sistema cromatográfico, se recogieron utilizando longitudes de onda de emisión desde 300 a 460 nm cada 1 nm, empleando una longitud de onda de excitación de 260 nm. Así, estas matrices de segundo orden de tamaño 161 x 283 (datos espectrales x tiempo) obtenidas se utilizaron para el análisis de los datos.

En cuanto al procedimiento de extracción de los analitos desde la matriz, éste se llevó a cabo como se detalla a continuación. En primer lugar, se pesaron 0.2 g de pimentón y se extrajeron con 10 mL de diétil éter durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos. Posteriormente, el extracto fue centrifugado y evaporado a sequedad, siendo reconstituido finalmente en 5 mL de iso-hexano. Esta fracción de iso-hexano fue cargada en un cartucho de silica y los analitos fueron eluidos con 7 mL adicionales de iso-hexano. Así, ambas fracciones, la inicial de 5 mL, junto a este extracto, fueron combinadas, evaporadas y reconstituidas en 5 mL de ACN para su posterior análisis cromatográfico.

Resultados y discusión

En primer lugar, se optimizaron las condiciones cromatográficas probando diferentes modos de elución, tanto isocráticos como en gradiente, y se observó que en todos los casos probados los analitos eran perfectamente separados en las muestras patrón. Sin embargo, en la matriz algunos de ellos co-eluían con otros interferentes, concretamente, fluoreno, pireno y benzo(b)fluoranteno, tal como puede observarse en la figura 1. De ahí que se decidiese emplear la elución isocrática anteriormente mencionada con el fin de evitar los cambios de presión consecuentes de la elución en gradiente y el

posterior acondicionamiento de la columna cromatográfica. Para resolver las interferencias presentes en la matriz se optó por emplear el algoritmo quimiométrico MCR-ALS que permite trabajar con datos que pueden perder la trilinearidad (como es el caso de la cromatografía en el que los tiempos de retención pueden variar de unas inyecciones a otras).

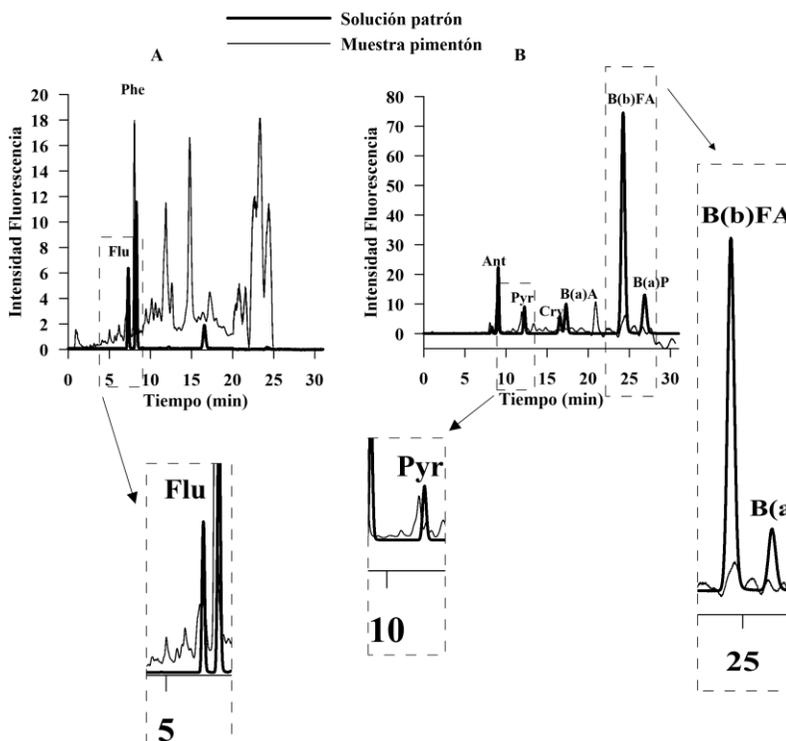


Figura 1. Cromatogramas correspondientes a una solución estándar (línea negra oscura) y un pimentón perteneciente a la Denominación de Origen Protegida (línea negra) obtenidos con las condiciones finales elegidas ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 260/352$ nm (A) and $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 260/420$ nm (B)). Flu: fluoreno, Phe: fenantreno, Ant: antraceno, Pyr: Pireno, Cr: criseno, B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)FA: benzo(b)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno.

En cuanto a la cuantificación, se llevó a cabo la construcción de las rectas de calibrado de cada uno de los analitos y se obtuvieron los correspondientes parámetros de calidad para validar el método en términos de linealidad, precisión y exactitud, límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ). La linealidad obtenida en todos los casos fue buena, con coeficientes de correlación (r^2) superiores a 0.99. En cuanto a los límites de detección estuvieron comprendidos entre 0.3 y 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ y los límites de cuantificación entre 1 y 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. La evaluación de la precisión se llevó a cabo mediante varias soluciones estándar medidas en el mismo día y en días diferentes, en distintos niveles de concentración, obteniéndose en todos los casos una desviación estándar relativa (RSD) menor de 7.5 %.

Para el análisis llevado a cabo con MCR-ALS, cabe señalar que las matrices de datos fueron divididas en tres regiones de tiempo, conteniendo cada una de estas regiones a uno de los analitos de interés. Para cada región de tiempo, se aplicó el algoritmo MCR-ALS para construir la matriz aumentada correspondiente, en la dirección del tiempo de elución. El número de componentes fue estimado mediante el análisis de componentes principales y se asignó teniendo en cuenta los analitos y los posibles interferentes presentes. Para comprobar la validez de la metodología se ensayó esta estrategia con el set de validación descrito anteriormente y se observaron buenos resultados de recuperación. Además, el test de la elipse (EJCR) mostró una buena precisión, ya que la región elíptica incluía, en el caso de los tres analitos, los valores teóricos esperados para la pendiente y la ordenada, es decir, estaba incluido el punto (1,0) en dicha región elíptica.

Una vez validadas ambas metodologías, se llevó a cabo la extracción de los analitos desde la muestra y se sometió el extracto al procedimiento de limpieza descrito anteriormente mediante cartuchos de sílica. Este procedimiento también fue validado realizando ensayos de recuperación en los cuales se evaluó tanto la efectividad del procedimiento completo como la repetitividad del mismo, obteniéndose para todos los analitos una recuperación superior al 82 % y una desviación estándar relativa (RSD, n=6) inferior a 7 % en todos los casos.

En cuanto al contenido de estos compuestos en las muestras reales de Pimentón de La Vera se observó que las concentraciones totales eran muy elevadas, sin embargo, en el caso de las que no pertenecían a la DOP no ocurría lo mismo. En particular, en el caso de los cuatro hidrocarburos aromáticos policíclicos regulados por la Comisión Europea [12] para otras especias (criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y benzo(a)pireno) las concentraciones encontradas también eran muy superiores en las muestras de la DOP. No obstante, tal como viene recogido en dicha regulación [12], se hace notar que los métodos tradicionales de ahumado y transformación aplicados al pimentón ahumado dan lugar a niveles elevados de HAPs. Sin embargo, dado que el consumo de esta especia es bajo, no debería suponer un riesgo para la salud, y, para que pueda permanecer en el mercado, queda eximida del cumplimiento de los niveles máximos.

Referencias

- [1] Ahmadvand, M., Sereshti, H. & Parastar, H. (2015) *Journal of Chromatography A*, 1413, 117 – 126.
- [2] Wegryn, E., Grzeńkiewicz, S., Popławska, W. & Glod, B.K. (2006) *Acta Chromatographica*, 17, 233 – 249.
- [3] Purcaro, G., Moret, S. & Conte, L.S. (2013) *Talanta*, 105, 292 – 305.
- [4] Pereira Jiménez, C., Aranda Media, E., Córdoba Ramos, M.G. & Bartolomé García, T. (2010). Estudio del papel antioxidante del pimentón de La Vera. In *Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales, Escuela de Ingenierías Agrarias (Eds.), La Agricultura y la Ganadería Extremeña* (pp. 165 – 178). Caja de Badajoz, Badajoz.
- [5] Kulikovskii, A.V., Vostrikova, N.L., Chernukha, I.M. (2014) *Analytical Chemistry*, 69, 219 – 224.

- [6] Gul, O., Dervisoglu, M., Mortas, M., Aydemir O., Ilhan, E., Aksehir, K. (2015) *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 82 -86.
- [7] Fasano, E., Yebra-Pimentel, I., Martínez-Carballo, E. (2016) *Food Control*, 59, 581 – 590.
- [8] Pérez, R., Escandar, G.M. (2016) *Environmental Pollution*, 209, 144 – 122.
- [9] Godoy-Caballero, M.P., Culzoni, M.J., Galeno-Díaz, T. (2013) *Analytica Chimica Acta*, 763, 11 – 19.
- [10] Marini, F., D'Aloise, A., Bucci, R., Buiarelli, F., Magri, A.L., Magri, A.D. (2011) *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 106, 142 – 149.
- [11] Boeris, V., Arancibia, J.A., Olivieri, A.C. (2014) *Analytica Chimica Acta*, 814, 23 – 30.
- [12] EC (European Commission), 2015. Commission regulation (EU) N° 2015/1933, of 27 October 2015, amending regulation (EC) N° 1881/2006.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de EyC de España (Proyecto CTQ2014-52309-P) y al Gobierno de Extremadura (GR15090-Grupo de Investigación FQM003), ambos co-financiados por los fondos europeos FEDER, por el apoyo financiero. O. Monago agradece al Ministerio de E,CyD de España por una beca FPU (número de referencia FPU13/02249). R. L. Pérez agradece a la Universidad Nacional de Rosario y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).