



Análisis de especiación de arsénico en muestras de arroz por cromatografía líquida de alta performance y espectrometría de masa con plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS)

Simonetto, Candela¹

¹PRINARC-FIQ-UNL
Directora: Magni, Diana
Codirectora: Sigrist, Mirna
Área: Ciencias Exactas

Palabras claves: arroz, arsénico, HPLC-ICP-MS.

INTRODUCCIÓN

El aumento de las necesidades alimentarias básicas en el mundo hace del arroz un alimento insustituible, lo que enfatiza la importancia de su inocuidad. Los granos de arroz tienen la particularidad de acumular aproximadamente diez veces más arsénico (As) que otros cereales (SUN, G. et al., 2008). Además, este As puede estar presente como las formas orgánicas ácido dimetilarsínico (DMA) y ácido monometilarsónico (MMA), o en formas inorgánicas (iAs) como arsenito (As(III)) y arseniato (As(V)), siendo estas últimas las más tóxicas. Una gran variación se encuentra en la especiación de arsénico del arroz, dependiendo de una combinación de factores que incluyen el genotipo del arroz y factores ambientales como la composición del suelo.

El concepto de especiación resulta extremadamente importante dentro de los estudios nutricionales y toxicológicos, puesto que aporta información relacionada con la biodisponibilidad y toxicidad de un dado elemento y ha permitido demostrar que no solo dependen de la naturaleza del mismo y el nivel de concentración, sino también de las formas y combinaciones químicas que el mismo presenta en el sistema bajo estudio. Es evidente que la determinación de las diferentes formas químicas en las que se puede presentar un elemento es fundamental y necesaria para obtener información adecuada sobre el riesgo de exposición a elementos tóxicos y establecer por otra parte requerimientos nutricionales de elementos esenciales.

La creciente preocupación de distintos organismos de seguridad alimentaria, plasmada en las regulaciones internacionales más recientes (Unión Europea, 2015), resalta la necesidad de disponer de métodos selectivos, sensibles y robustos para la determinación de las especies de arsénico en alimentos. Una de las técnicas hífenadas más frecuentemente empleadas en este tipo de estudios es HPLC-ICP-MS. Por un lado, el poder de separación que presenta la técnica HPLC brinda extrema selectividad y por otro, la gran sensibilidad de ICP-MS permite cuantificar muy bajas concentraciones, frecuentes en análisis de especiación.

Título del Proyecto: Análisis de especiación de elementos de interés toxicológico y nutricional
Instrumento: CAID
Año convocatoria: 2016
Organismo financiador: UNL
Director/a: Magni, Diana Margarita

OBJETIVOS

- Desarrollar y optimizar metodologías analíticas modernas para la determinación y separación de las distintas formas químicas de compuestos orgánicos e inorgánicos de arsénico en matrices complejas de interés toxicológico atendiendo a las necesidades regionales.
- Optimizar como metodología de análisis una técnica hifenada HPLC-ICP-MS:
 - Evaluar la eficiencia de diferentes fases móviles.
 - Optimizar las variables operativas del sistema.
 - Estudiar metodologías de extracción de las diferentes especies de arsénico y evaluar la recuperación sobre muestras de arroz adicionadas.

METODOLOGÍA

Evaluación de la eficiencia de diferentes fases móviles

En primera instancia, se evaluaron distintos ácidos orgánicos como potenciales fases móviles para la separación, por cromatografía de intercambio aniónico fuerte, de las cuatro especies de As mencionadas anteriormente. Los ácidos estudiados fueron ácido oxálico, malónico, succínico, tartárico, cítrico y ascórbico, a un pH de 5,8; el cual permite la separación de las especies de As estudiadas debido a las diferencias de pKa entre ellas. Se evaluó el efecto de los distintos ácidos en la separación en condiciones isocráticas a una concentración de 10 mmol L^{-1} , observándose marcadas diferencias entre ellos. A su vez, se definieron gradientes de concentración para optimizar la separación.

Se utilizaron estándares multiespecie acuosos de As(III), As(V), DMA y MMA a una concentración de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. A su vez, se utilizaron estándares acidificados con HNO_3 ($0,075 \text{ mol L}^{-1}$), ya que gran parte de los análisis de especiación requieren extracciones en medio ácido. Mediante estos estándares acidificados, se evaluó la reproducibilidad de los tiempos de retención de las especies en inyecciones sucesivas, para cada fase móvil.

Ensayos de extracción y evaluación de la recuperación sobre muestras de arroz adicionadas

La extracción se llevó a cabo en medio ácido con radiación microondas, usando 10 ml de solución extractante sobre 1 g de muestra previamente molida y tamizada a un tamaño de partícula $< 0,5 \text{ mm}$. Se realizaron duplicados y recuperados de cada muestra, éstos últimos con el objetivo de evaluar la posible interconversión de especies.

Preliminarmente se estudiaron dos ácidos reportados en bibliografía como soluciones de extracción: HNO_3 (Jen-How Huang, Gunter Ilgen and Peter Fecher, 2010) y ácido trifluoroacético (TFA) (Raber, G., Stock, N., Hanel, P., Murko, M., Navratilova, J., & Francesconi, K. A., 2012), ambos en concentraciones de $0,075$ y $0,28 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente se llevaron a cabo diseños de experimentos para realizar una optimización multi-variable de las condiciones de temperatura (desde 90 hasta 150°C) y concentración de la solución extractante (desde $0,07$ hasta $0,28 \text{ mol L}^{-1}$) con el objetivo de obtener la máxima eficiencia de extracción, evitando la interconversión de especies y minimizando la concentración de ácido necesaria.

A su vez se estudió el efecto de la introducción de metanol al plasma con el objetivo de aumentar la sensibilidad del sistema frente al As, lo cual ha sido previamente reportado en bibliografía (Grindlay, G., Mora, J., de Loos-Vollebregt, M., & Vanhaecke, F., 2013). Para ello, se compararon las señales obtenidas para un estándar acuoso en tres condiciones: sin metanol, adicionando metanol a la salida de la columna y adicionando metanol en la fase móvil.



Aplicación a muestras de arroz

Una vez ajustadas todas las condiciones de trabajo, se llevó a cabo el análisis preliminar de algunas muestras de arroz comercial de distintas variedades, y con distintos niveles de procesamiento industrial, como arroces integrales, parbolizados y pulidos, tanto de variedad largo fino como doble carolina y corto japonés.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En cuanto a las fases móviles evaluadas, se observó que el ácido cítrico tiene un gran poder de elución, lo que permite obtener una adecuada separación usándolo en concentraciones muy bajas. Sin embargo, en estas condiciones, si las muestras se encuentran en medio ácido, esta fase móvil no posee capacidad buffer para mantener los tiempos de retención, inyección tras inyección. En cambio, los ácidos oxálico, malónico y succínico tienen menor poder de elución, por lo que pudieron ser usados en concentraciones más elevadas, permitiendo lograr una excelente reproducibilidad de los tiempos de retención en muestras acidificadas. Con los ácidos malónico y succínico se observó un efecto de tailing notorio en el pico correspondiente al As(V), especialmente con el ácido succínico. En cambio en la separación con el ácido oxálico se obtuvieron picos mejor definidos. El ácido ascórbico, resultó tener muy bajo poder de elución, requiriéndose concentraciones demasiado elevadas para la elución de las cuatro especies.

A su vez, debido a la elevada capacidad buffer exhibida por el ácido oxálico, se evaluaron condiciones de mayor acidez. Aumentando el pH de la fase móvil, pudo obtenerse reproducibilidad en los tiempos de retención incluso con concentraciones de HNO_3 de 0,14 y 0,28 mol L^{-1} (Figura 1)

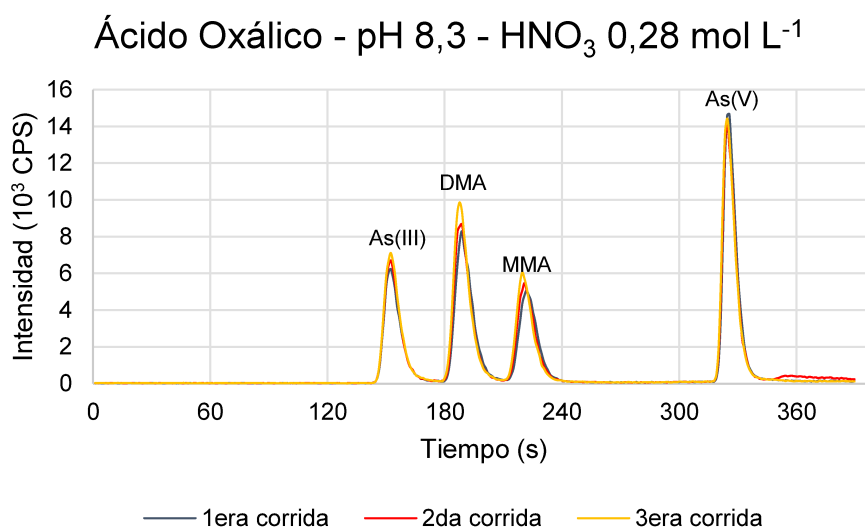


Figura 1. Separación obtenida en tres inyecciones sucesivas con gradiente de elución de Ácido Oxálico para un estándar de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ acidificado con HNO_3 0,28 mol L^{-1} .

En cuanto a la extracción de arsénico de las muestras de arroz, no se observaron diferencias entre el uso de HNO_3 y TFA. Los diseños de experimentos realizados mostraron que las variables temperatura y concentración de ácido no presentaron significancia estadística en el rango estudiado, obteniéndose eficiencias de extracción similares para las

distintas condiciones evaluadas. Sin embargo, se observó que a concentraciones de ácido demasiado bajas los extractos resultan en suspensiones turbias difíciles de centrifugar, por lo que se tomó una solución de compromiso, llevando a cabo la extracción a 125°C y con HNO_3 0,14 mol L⁻¹.

Con respecto a la adición de metanol al plasma se verificó un marcado aumento de la sensibilidad al incorporar 1% de metanol, tanto a través de la fase móvil como post-columna. Finalmente, el análisis de muestras de arroz comercial mostró la presencia de las cuatro especies estudiadas en distintas concentraciones, obteniéndose a su vez recuperaciones satisfactorias (Figura 2). Las concentraciones halladas se encuentran por debajo de los límites establecidos por las distintas agencias internacionales de seguridad alimentaria, demostrando la inocuidad de los arroces analizados.

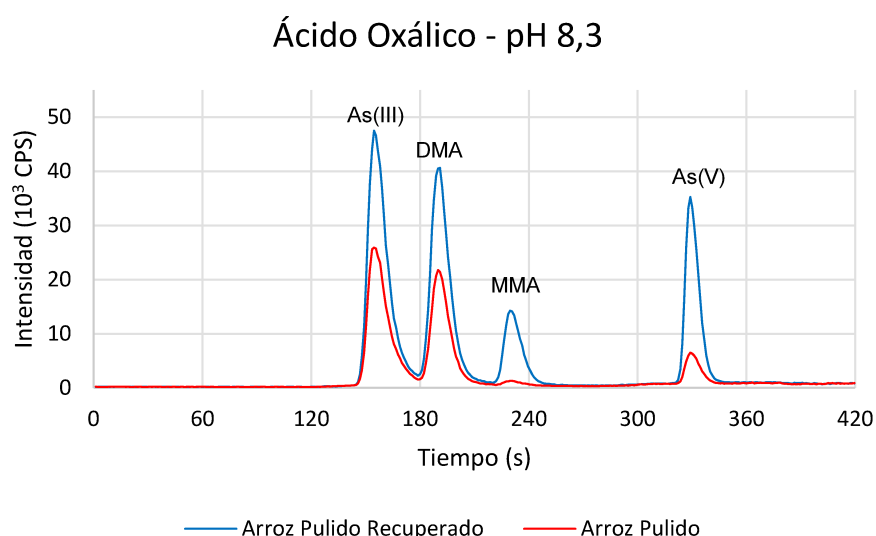


Figura 2. Separación obtenida con gradiente de elución de Ácido Oxálico para dos muestras de arroz pulido, una de ellas fortificada con estándar multiespecie en una concentración de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Grindlay, G., Mora, J., de Loos-Vollebregt, M., & Vanhaecke, F. (2013). A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 86, 42-49.
- Jen-How Huang, Gunter Ilgen and Peter Fecher. (2010). Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains. *J. Anal. At. Spectrom.*, 25, 800–802.
- Raber, G., Stock, N., Hanel, P., Murko, M., Navratilova, J., & Francesconi, K. A. (2012). An improved HPLC–ICP–MS method for determining inorganic arsenic in food: application to rice, wheat and tuna fish. *Food chemistry*, 134(1), 524-532.
- SUN, G. et al. (2008). Inorganic Arsenic in Rice Bran and Its Products Are an Order of Magnitude Higher than in Bulk Grain. *Environmental Science & Technology*, 42, 7542-7546.
- Unión Europea. (2015). *Reglamento Unión Europea*.