

RENDIMIENTO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN ESPECTROMETRÍAS ATÓMICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO INORGÁNICO EN ARROZ

Mirna Sigrist¹; Jonatan Schlotthauer²; Lucila Brusa³; Claudia Liberman⁴; Alberto Livore⁵; Mariano Durand⁶

Palabras clave: arsénico inorgánico, métodos analíticos, espectrometrías atómicas.

INTRODUCCIÓN

Los límites máximos de arsénico (As) inorgánico en arroz y productos de arroz han sido discutidos por la Comisión del *Codex Alimentarius* [1] y establecidos por la legislación de la Unión Europea en 2016 [2], debido a su reconocida asociación con problemas a la salud [3]. El cumplimiento de estos límites ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ para el caso de arroz pulido) necesita de métodos analíticos robustos, confiables y, preferentemente, accesible a los laboratorios de análisis de rutina. Además de las formas o especies químicas inorgánicas (arsenito o As^{+3} y arseniato o As^{+5}) el arroz contiene especies orgánicas de As (principalmente ácido dimetilarsínico o DMA y ácido monometilarsínico o MMA), siendo las especies de As inorgánico y DMA las mayoritarias [4]. A diferencia de lo que sucede con la medición de As total en alimentos, la determinación de As inorgánico requiere de su diferenciación a partir de los compuestos de As orgánico. Esto puede llevarse a cabo básicamente mediante: a) separación cromatográfica seguido por la determinación de las especies inorgánicas y orgánicas separadas en forma individual mediante espectrometrías atómicas o de masa y b) generación de hidruros gaseosos volátiles (arsina o AsH_3) mediante la reducción/reacción selectiva de las especies inorgánicas usando borohidruro de sodio (NaBH_4) en medio ácido optimizado.

En nuestro trabajo hemos comparado los rendimientos en términos de parámetros de calidad analítica y tiempos de análisis entre una metodología basada en Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Fluorescencia Atómica con Generación de Hidruros (HPLC-HGAFS), la cual permite la determinación individual de las especies (As^3 , As^{+5} , DMA y MMA) y una metodología más simple basada en Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros (HGAAS), la cual permite la determinación selectiva de As inorgánico minimizando la respuesta de DMA [5]. Ambas presentan costos de operación y de inversión mucho más bajos (aproximadamente 10 veces) que HPLC acoplado a ICPMS (Espectrometría de Masa con Plasma Inductivo Acoplado), la herramienta actualmente más poderosa para el análisis de especiación elemental. Las metodologías fueron verificadas mediante material de referencia certificado.

MATERIAL Y MÉTODOS

a) Equipos:

- Espectrómetro de Absorción Atómica de Llama marca Perkin Elmer modelo AAnalyst 200 acoplado a un Sistema de Generación de Hidruros marca Perkin Elmer modelo FIAS 100 operados en forma automática mediante programa Syngistix PE.

¹ Doctora en Química, Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos PRINARC Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2654 CP 3000 Santa Fe, Argentina, msigrist@fiq.unl.edu.ar.

² Licenciada en Química, PRINARC Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

³ Estudiante de Licenciatura en Química, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

⁴ Especialista - Licenciada, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA, Argentina.

⁵ Doctor Ingeniero Agrónomo, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA, Argentina.

⁶ Ingeniero Agrónomo, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA, Argentina.

- Espectrómetro de Fluorescencia Atómica con Generación de Hidruros marca Rayleigh modelo AF-640A acoplado a Sistema de Cromatógrafo Líquido de Alta Presión con bomba SY-8100 y válvula inyectora 7725i marca Rheodyne operado en forma automática mediante programa Pro Hyphen Workstation marca Rayleigh.
- Horno microonda para preparación de muestras marca Millestone modelo Ethos One con control automático de temperatura. Rotor con vasos de Teflón® para extracción.

b) Materiales:

- Solución estándar de As^{+3} 1000 mg L^{-1} a partir de trióxido de As (Riedel-de Haën).
- Solución estándar de As^{+5} 1000 mg L^{-1} en ácido nítrico 0,5 mol L^{-1} (Merck).
- Solución estándar de DMA 1000 mg L^{-1} a partir de reactivo sólido (Chem Service).
- Solución estándar de MMA 1000 mg L^{-1} a partir de reactivo sólido (Chem Service).
- Ácido nítrico (HNO_3) para análisis de trazas metálicas (Merck)
- Ácido clorhídrico (HCl) para análisis de trazas metálicas (Merck).
- Borohidruro de sodio (NaBH_4) (Sigma Aldrich).
- Solución buffer de fosfatos de potasio $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Merck) a pH 6.
- Solución pre-reductora de ioduro de potasio 5% (m/v) - ácido ascórbico 5% (m/v).
- Solución antiespumante en base a dimetilpolisiloxano (Perkin Elmer).
- Columna para HPLC de intercambio aniónico Hamilton PRP-X100 250 x 4,1 mm con columna de guarda Hamilton PRP-X100 10 x 4,1 mm.
- Filtros de membrana de acetato de celulosa (Microclar) tamaño de poro 0,45 μm .
- Material de referencia certificado de arroz ERM® - BC211 (valores certificados en $\mu\text{g/kg}$: As inorgánico 124 ± 11 ; DMA 119 ± 13 ; As total 260 ± 13).

c) Métodos:

Extracción de las especies: 1,00 g de muestra triturada (< 350 μm) adicionados de 10 mL de HNO_3 0,28 M (mol L^{-1}) en horno microondas a 90°C durante 30 minutos.

i) Preparación del extracto para análisis por HPLC-HGAFS: 1 mL de sobrenadante adicionado de 1 mL de agua destilada-deionizada y filtrado a 0,45 μm . Curvas de calibrado para cada una de las especies (As^{+3} ; As^{+5} ; DMA y MMA) en el rango de 0-30 $\mu\text{g L}^{-1}$ en HNO_3 0,14 M.

ii) Preparación del extracto para análisis por HGAAS: 2 mL de sobrenadante adicionados de 4,5 mL de HCl concentrado, 1 mL de solución pre-reductora (As^{+3} es la especie más reactiva en la generación de hidruros con borohidruro de sodio) y dilución a 10 mL con HNO_3 0,28 M. Curva de calibrado de As inorgánico en el rango de 0-10 $\mu\text{g L}^{-1}$ realizando la pre-reducción en HCl 5,4 M. Reposar 45 minutos.

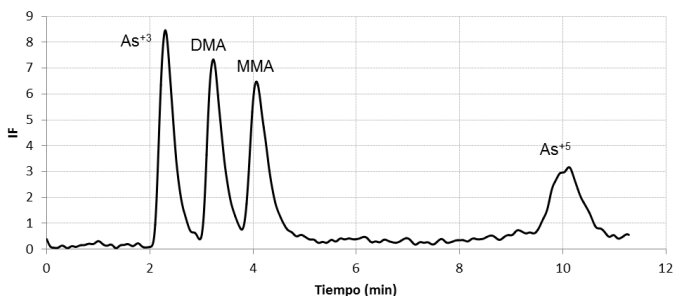
Determinación de las especies inorgánicas y orgánicas por HPLC-HGAFS:

Tabla 1. Condiciones operacionales e instrumentales del sistema utilizado

HPLC	
Temperatura de columna de intercambio aniónico	Temperatura ambiente
Fase móvil	Buffer $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 15 mM a pH 6
Flujo de fase móvil	1,2 mL min^{-1}
Volumen de inyección de muestra	200 μL
HG	
Flujo de solución de ácido clorhídrico (1,2 M)	1,5 mL min^{-1}
Flujo de solución de borohidruro de sodio (1,2%) en hidróxido de sodio 0,025% (m/v)	4 mL min^{-1}
Flujo de Argón	800 mL min^{-1}
AFS	
Longitud de onda	193,7 nm
Corriente de lámpara de HCL	60 mA
Tiempo de lectura	25 seg

Las especies son separadas según su afinidad por la columna y la fase móvil ingresando al sistema HGAFS donde se generan sus hidruros y se detecta la respuesta espectrométrica (IF intensidad de fluorescencia) en función del tiempo de retención cromatográfico.

Gráfico 1. Cromatograma correspondiente a un nivel de concentración de $20 \mu\text{g L}^{-1}$



Determinación de arsénico inorgánico por HGAAS:

Tabla 2. Condiciones operacionales e instrumentales del sistema utilizado

FI-HG	
Flujo de solución de ácido clorhídrico (1,2M)	10 mL min^{-1}
Flujo de solución de borohidruro de sodio (0,1% m/v) en hidróxido de sodio 0,025% (m/v)	5 mL min^{-1}
Flujo de Nitrógeno	50 mL min^{-1}
Volumen de inyección de muestra	$500 \mu\text{L}$
AAS	
Longitud de onda	193,7 nm
Corriente de lámpara de EDL	400 mA
Tiempo de lectura	18 seg

La muestra se inserta en la corriente de solución de ácido clorhídrico y se une a la solución de borohidruro de sodio para generar el hidruro (arsina AsH_3) mediante un sistema de inyección en flujo (FIAS). El hidruro generado es arrastrado hasta la celda de atomización y se detecta la respuesta espectrométrica para el As inorgánico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 3 se muestran los siguientes parámetros de calidad analítica obtenidos para ambas metodologías utilizando muestras de arroz pulido. Los valores obtenidos para As^{+3} y As^{+5} por HPLC-HGAFS fueron estadísticamente comparables.

Tabla 3: Parámetros de calidad analítica

	Límite de cuantificación As inorgánico ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Precisión (RSD%)* (n=3)	Recuperación** (%) (n=3)
HPLC-HGAFS	75	15	85
HGAAS	50	5	100

* RSD%: Desviación Estándar Relativa Porcentual

** Ensayos de fortificación de As inorgánico sobre muestras al nivel de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$

La metodología basada en HGAAS presentó un límite de cuantificación inferior a HPLC-HGAFS, para el cual corresponde un valor de $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ para la suma de ambas especies inorgánicas. La precisión y la recuperación de ambas metodologías fueron aceptables para

el análisis al nivel de concentración de ultratrazas. En cuanto al tiempo de análisis, la velocidad de muestreo resultó ampliamente superior para HGAAS (50 muestras por hora) que para HPLC-HGAFS (4 muestras por hora), considerando medidas por simplificado.

Tabla 4: Resultados del análisis de material de referencia certificado ERM[®] - BC211

	Valor certificado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	HPLC-HGAFS	HGAAS
		Valor hallado ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (n=3)	Valor hallado ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (n=3)
Arsénico total	260 ± 13	257 ± 11	261 ± 10
Arsénico inorgánico	124 ± 11	133 ± 15	118 ± 11
DMA	119 ± 13	124 ± 15	-

Ambas metodologías mostraron valores estadísticamente comparables a los valores certificados. El análisis por HPLC-HGAFS permitió observar que el contenido de As inorgánico corresponde sólo a As^{+3} .

CONCLUSIONES

La metodología evaluada basada en HGAAS mostró un mejor rendimiento que HPLC-HGAFS en términos de menor límite de cuantificación, menor tiempo de análisis, mayor simplicidad dado que prescinde del uso de la cromatografía y todas las operaciones relacionadas como estabilización y limpieza de columna. Por otro lado, también disminuye el costo operativo debido a la cantidad significativamente menor de borohidruro de sodio utilizada. El límite de cuantificación alcanzado, menor a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, permite su utilización en alimentos para bebés y niños cuyo límite máximo de As inorgánico es $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ [2].

AGRADECIMENTOS

UNL y MinCyT, Argentina, por el soporte financiero mediante proyectos de investigación (CAID 2011 y PICT 2015) y de infraestructura y equipamiento (FINSET 2013).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Codex Alimentarius Commission. Report of the Eighth Session of the Codex Committee on Contaminants in Foods, CL 2014/11, p. 46., April 2014.
- [2] European Union (EU) Regulation 2015/1006 amending Regulation (EC) No 1881/2006. Maximum levels of inorganic arsenic in foodstuffs, June 2015.
- [3] European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Arsenic in Food. EFSA Panel Contam. Food Chain, Journal 7(10), p. 1-199, 2009.
- [4] NARUKAWA, T. et al. Determination of Sixteen Elements and Arsenic Species in Brown, Polished and Milled Rice. A. Anal. Sci., v. 30, p. 245-250, 2014.
- [5] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB, Methode Nr. L 15.06-2 Bestimmung von anorganischem Arsen in Reis mit Atomabsorptionsspektrometrie-Hybridtechnik (Hybrid-AAS) nach Säureextraktion, January 2013