



# Determinación de hidroximetilfurfural (HMF) en café mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

<b>Apellidos, nombre</b>	Fuentes López, Ana (anfuelo@upvnet.upv.es) Fernández Segovia, Isabel (isferse1@tal.upv.es) Fuentes López, Cristina (crifuelp@upvnet.upv.es)
<b>Departamento</b>	Departamento de Tecnología de los Alimentos
<b>Centro</b>	Universitat Politècnica de València

## 1 Resumen de las ideas clave

El empleo de altas temperaturas en alimentos puede dar lugar a sustancias potencialmente tóxicas como los compuestos derivados de la reacción de Maillard, entre los que se encuentra el hidroximetilfurfural (HMF).

La presencia de este compuesto es utilizada como control de calidad de diversos alimentos procesados; sin embargo, la variabilidad detectada entre los diferentes estudios y el importante potencial tóxico del HMF sobre la salud, señalan la necesidad de optimizar su determinación, lo que permitirá estimar de manera fiable la ingesta diaria de HMF entre la población. El método analítico más utilizado para su determinación es la cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV) debido a su bajo coste, alta resolución y versatilidad y elevada sensibilidad.

## 2 Introducción

Los tratamientos térmicos son aplicados a los alimentos con el objetivo de obtener productos con unas características sensoriales determinadas, asegurar su estabilidad microbiológica o inhibir la actividad enzimática. Sin embargo, el empleo de altas temperaturas puede dar lugar a ciertas reacciones entre los constituyentes del alimento y generar nuevos compuestos, algunos de los cuales pueden tener un efecto nocivo para la salud. Entre las sustancias potencialmente tóxicas que se forman como consecuencia de la aplicación de este tipo de tratamientos destacan; los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cloropropanoles y sus ésteres, así como los contaminantes derivados de la Reacción de Maillard como las aminas heterocíclicas, el furano, el hidroximetilfurfural y la acrilamida<sup>[1]</sup>.

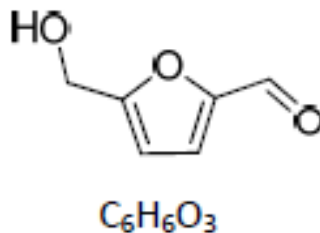


Figura 1. Fórmula estructural del hidroximetilfurfural (HMF)

El hidroximetilfurfural, HMF o 5-(Hidroximetil)-2-furfural es un aldehído cíclico, intermediario en la reacción de Maillard, que también se forma por la deshidratación de azúcares a elevadas temperaturas (caramelización). La reacción de Maillard es una reacción de pardeamiento no enzimático responsable de la formación del sabor, color y aroma en diferentes alimentos procesados. La presencia de HMF se ha identificado en una amplia variedad de alimentos procesados incluyendo leche, zumos, café, bebidas alcohólicas y miel<sup>[3]</sup>. Tradicionalmente, el contenido en HMF ha sido empleado como parámetro de calidad en determinados alimentos procesados, como frutas procesadas, café, miel y leche, y también para el control de los tratamientos térmicos aplicados a

derivados de cereales, como son los procesos de secado de la pasta, horneado y tostado de pan o la extrusión de cereales infantiles y de desayuno<sup>[3]</sup>.

Diferentes estudios han demostrado que el HMF a elevadas concentraciones presenta efecto citotóxico y provoca irritación en ojos, tracto respiratorio superior, piel y mucosas<sup>[2]</sup>. Sin embargo, el principal riesgo para la salud derivado de la presencia del HMF en los alimentos se debe a que el HMF es transformado *en el organismo* a 5-sulfoximetilfurfural (SMF) por sulfonación de su grupo funcional hidroxilo alílico por acción de las enzimas sulfotransferasas. Este derivado del HMF es un compuesto con demostrado efecto genotóxico y mutagénico:<sup>[2]</sup>.

Existen estudios dónde se cuantifica la concentración de HMF en diferentes tipos de alimentos y se evalúa la exposición real de la población a esta sustancia. Sin embargo, existe cierta variabilidad entre los datos obtenidos en estos estudios, por lo que algunos autores han sugerido que estas diferencias podrían deberse, en parte, al empleo de técnicas de análisis diferentes<sup>[4]</sup>. La variabilidad detectada entre los diferentes estudios y los nuevos hallazgos sobre el potencial tóxico del HMF sobre la salud, señalan la necesidad de determinar el contenido real de HMF en los alimentos y optimizar los límites de detección de estas determinaciones, lo que permitiría estimar de manera fiable la ingesta diaria de HMF entre la población. Las técnicas cromatográficas son probablemente las técnicas analíticas más adecuadas para alcanzar este objetivo por su elevada sensibilidad, selectividad, resolución y rapidez.

### 3 Objetivos

Este artículo tiene como objetivo que el alumno sea capaz de:

- Llevar a cabo la determinación de HMF empleando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV).
- Calcular la concentración de HMF en una muestra de café a partir de los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico.

### 4 Desarrollo

A continuación, describiremos el procedimiento de extracción de HMF en una muestra de café y posterior análisis empleando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Finalmente, veremos un ejemplo práctico dónde calcularemos la concentración de HMF en una muestra café.

#### 4.1 Fundamento

Existen diferentes métodos para la determinación de HMF en alimentos. En matrices simples, como miel o zumos de frutas, el empleo de un método espectrofotométrico en la región ultravioleta basado en la reacción del HMF con bisulfito de sodio es un procedimiento sencillo para su cuantificación. Sin embargo, la reacción de otras sustancias presentes en el alimento podría dar lugar a una sobreestimación del contenido en HMF en determinados tipos de productos<sup>[5]</sup>. En este sentido, el empleo de las técnicas cromatográficas para la determinación de HMF en alimentos es una técnica esencial cuando se trata de matrices complejas o cuando es necesario detectar concentraciones muy bajas de este compuesto en el alimento. La



cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) ha sido empleada para el análisis e HMF en muestras de café con resultados satisfactorios<sup>[5]</sup>. Antes del análisis cromatográfico, es necesario realizar una extracción del HMF de la muestra con agua y una clarificación del extracto empleando los reactivos Carrez (I y II) o ácido tricloroacético<sup>[3]</sup>.

## 4.2 Materiales y reactivos

### Material e instrumentación:

- Balanza analítica
- Tubo Falcon de 50 mL
- Micropipetas
- Jeringa y filtros de jeringa de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$
- Matraces aforados de 10 mL
- Viales de inyección
- Equipo cromatográfico: HPLC con detector UV-visible

### Reactivos químicos:

- Agua calidad HPLC
- Metanol calidad HPLC
- Ácido fórmico
- Disolución estándar de hidroximetilfurfural a 1000 ppm
- Solución Carrez I: Disolver 1,5 g de ferrocianuro de potasio trihidratado ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ) y diluir con 10 mL de agua destilada
- Solución Carrez II: Disolver 3 g de acetato de zinc dihidratado ( $\text{Zn}(\text{AcO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) y disolver a 10 mL con agua destilada

## 4.3 Procedimiento experimental

Podemos encontrar en la bibliografía diferentes procedimientos para la extracción y análisis de HMF en alimentos. A continuación, vamos a detallar el procedimiento para el análisis del contenido de HMF en una muestra de café empleando cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta (HPLC-UV)<sup>[1]</sup>.

### 1. Preparación de las disoluciones patrón

Partimos de una disolución patrón de hidroximetilfurfural (HMF) de 1000 mg cafeína/L, a partir de la cual prepararemos una serie de disoluciones patrón que serán empleadas para la elaboración de la recta de calibrado. Las disoluciones de hidroximetilfurfural obtenidas a partir de esta disolución madre son 1, 2.5, 5, 10 y 25 ppm de HMF (mg HMF/L disolución patrón).

### 2. Preparación del extracto de la muestra

Para la extracción de HMF en la muestra de café se procede del siguiente modo:

1. En un tubo de centrifuga de 10 mL se pesan 500 mg de la muestra de café a los que se incorporan 5 mL de una disolución de ácido fórmico al 0.1%. La mezcla se agita vigorosamente durante 1 minuto y se clarifica añadiendo 250 mL de los reactivos Carrez (I y II).
2. Esta disolución se centrifuga a 4500 g durante 10 minutos a 4 °C.



3. Tras la centrifugación, el sobrenadante se recoge en un matraz aforado de 10 mL y la extracción se repite dos veces añadiendo 2 mL de la disolución de ácido fórmico al 0.1% en cada extracción.
4. Finalmente, los sobrenadantes obtenidos en cada extracción se combinan en un matraz aforado, el cual se enrasa hasta un volumen de 10 mL con la disolución de 0.1% de ácido fórmico.

### 3. Análisis de los extractos y patrones

Los extractos de las muestras, y los patrones se filtran empleando un filtro de jeringa de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y se trasvasan a un vial de cromatografía. Finalmente, los viales se introducen en el muestreador automático del equipo cromatográfico y se inyectan 20  $\mu\text{L}$  de cada uno de ellos para su análisis.

#### Condiciones cromatográficas

- Columna C18 (1540 x 4,6 mm y 5  $\mu\text{m}$ ) con pre-columna
- Fase móvil A: Acetonitrilo
- Fase móvil B: Agua acidificada con ácido fórmico al 0.1%
- Modo de elución: isocrático  
5%: Acetonitrilo: 95% agua acidificada (0.1% ácido fórmico)
- Detector: UV-vis a  $\lambda=280$  nm
- Volumen de inyección: 20  $\mu\text{L}$

### 4. Identificación y cuantificación del HMF presente en la muestra

La identificación del HMF en la muestra se lleva a cabo comparando los cromatogramas de las muestras con los cromatogramas de los patrones. Para ello, en primer lugar, se identifica el HMF en los cromatogramas de los patrones y se determina su tiempo de retención ( $t_R$ ). La comparación de los  $t_R$  de los picos obtenidos en el cromatograma de las muestras y de los patrones permite identificar el HMF en las muestras.

La cuantificación del HMF se realiza mediante el método del estándar externo. Para ello, se calcula el área del pico correspondiente al HMF en los cromatogramas de las disoluciones patrón. A continuación, se representan los valores de estas áreas frente a su concentración correspondiente y finalmente, se construye una recta de calibrado que nos permitirá calcular la concentración de HMF en los extractos de las muestras inyectados en el equipo cromatográfico.

## 4.4 Caso práctico

Durante el tostado del café, las reacciones de Maillard dan lugar a un conjunto de sustancias que aportan aroma y color al café, pero también a otras sustancias nocivas como el HMF. Existen numerosos trabajos donde se indica la alta variabilidad del contenido en HMF de los cafés comerciales, con contenidos que oscilan entre 100 y 1900 mg/kg<sup>[2]</sup>. Estos estudios parecen indicar que el café, junto con el pan, es el alimento que contribuye en mayor medida a la ingesta de HMF entre la población, debido a su elevado consumo<sup>[6]</sup>.

Siguiendo el protocolo de análisis descrito, vamos a ver un ejemplo donde se determina la concentración de HMF en una muestra de café.

En primer lugar, y tal y como se ha indicado en el apartado anterior, el análisis cromatográfico de las disoluciones patrón nos permite identificar el pico del cromatograma que corresponde al HMF en nuestra muestra de café. En este caso, tal y como se observa en la figura 2, el tiempo de retención para el HMF es 2.80 min.

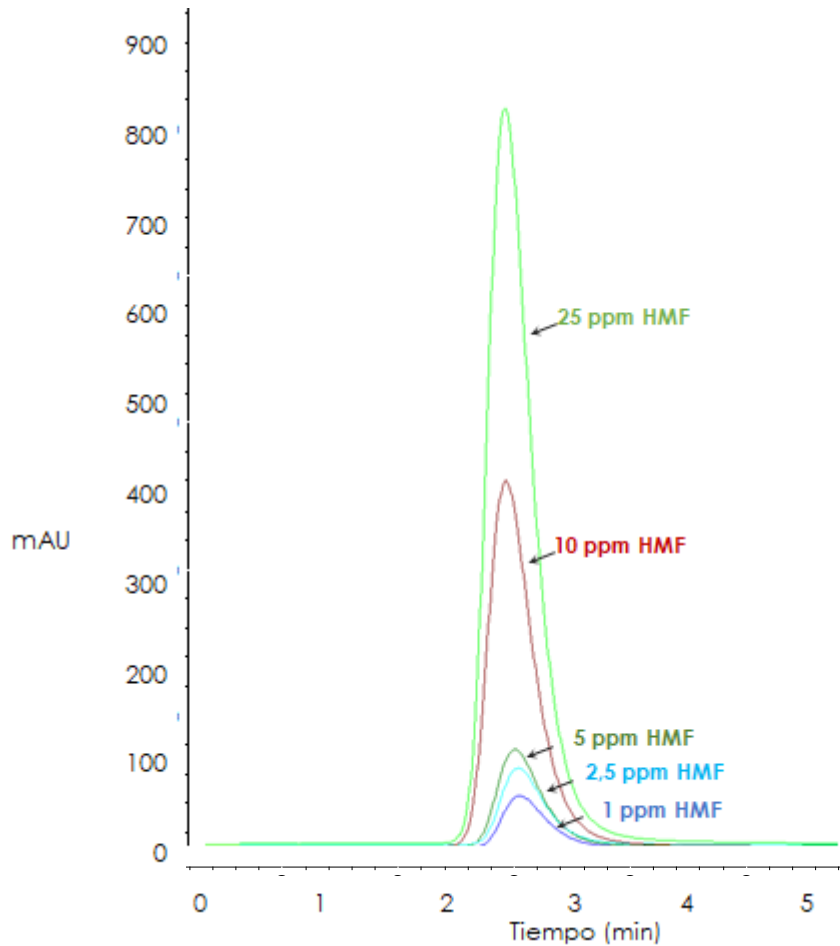


Figura 2. Cromatograma de las disoluciones patrón de HMF

La integración de los cromatogramas de los patrones nos permite obtener las áreas correspondientes al pico de HMF en cada una de estas disoluciones (Tabla 1).

Patrón (mg HMF/L)	$t_R$	Área
1	2,793	684786
2,5	2,797	1536964
5	2,800	2632150
10	2,803	4959272
25	2,782	12913425

Tabla 1. Tiempo de retención y área de los picos obtenidos a partir de los cromatogramas de los patrones de HMF.

La figura 3 muestra la representación de los valores del área del pico correspondiente al HMF frente a su concentración en cada una de las disoluciones patrón. El ajuste lineal de estos valores permite obtener la ecuación que será empleada para calcular la concentración de HMF en las muestras a partir de su análisis cromatográfico.

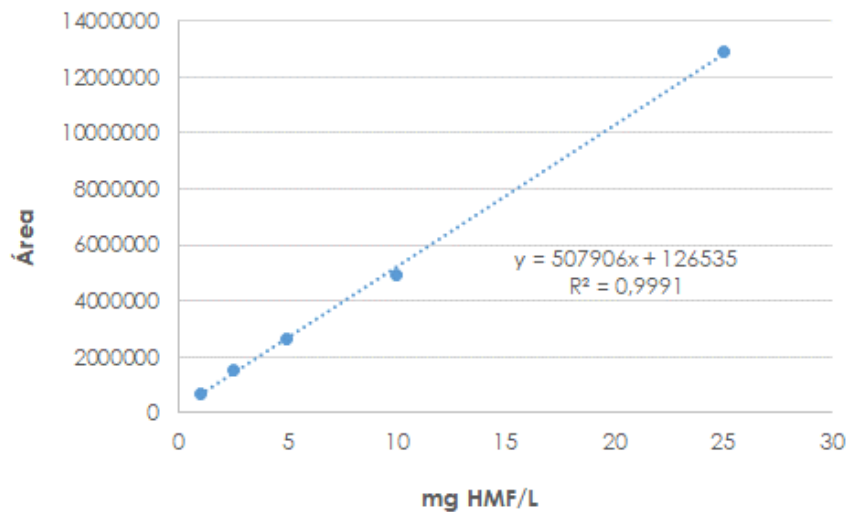


Figura 3. Recta de calibrado obtenida con los datos de la Tabla 1

Para identificar el pico correspondiente al HMF en nuestra muestra tendremos que comparar los tiempos de retención, e identificar el pico cuyo tiempo de retención será aproximadamente de 2.8 min.

La integración del pico correspondiente al HMF en la muestra nos da el valor del área para este compuesto. Al sustituir el valor del área obtenida en la ecuación del ajuste lineal (Figura 3), podemos calcular la concentración de HMF en el extracto que ha sido analizado en el equipo cromatográfico:

$$\text{Área (y)} = 3905202 \rightarrow y = 508906x + 126535 \rightarrow \text{concentración (x)} = 7,435 \text{ mg/L}$$

Para determinar la concentración de HMF en la muestra de café tenemos que volver al procedimiento empleado para preparar la muestra.

$$\text{HMF} = 7.435 \text{ mg/L} \times \left( \frac{10 \text{ mL disolución}}{0.5 \text{ g muestra}} \right) \times \left( \frac{10^3 \text{ g}}{\text{kg}} \right) \times \left( \frac{1 \text{ L}}{10^3 \text{ mL}} \right) = 148,705 \text{ mg/kg}$$

## 5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto cómo se determina la concentración de hidroximetilfurfural (HMF) en una muestra de café mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta (HPLC-UV). Con



ayuda de un ejemplo, hemos puesto en práctica cómo identificar el HMF en el cromatograma y cómo cuantificar su concentración en una muestra de café molido.

## 6 Bibliografía

[1] Arribas-Lorenzo, G., Morales, F.J. (2010). "Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population". *Food and Chemical Toxicology*, 48, 644-649.

[2] 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.

[3] Ramírez-Jiménez, A., García-Villanova, B., & Guerra-Hernández, E. (2001). "Effect of toasting time on the browning of sliced bread". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 513-518.

[4] Zappalà, M., Fallico, B., Arena, E., Verzera, A. (2005). Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*, 16, 273-277.

[5] Murkovic, M., Pichler, N. (2006). "Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine". *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 842-846.

[6] Morehouse, K. M., Nyman, P. J., McNeal, T. P., Dinovi, M. J., Perfetti, G. A. (2008). Survey of furan in heat processed foods by headspace gas chromatography/mass spectrometry and estimated adult exposure. *Food Additives and Contaminants*, 25, 259-264.