



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 246 698**

② Número de solicitud: 200401143

⑤ Int. Cl.

G01N 30/88 (2006.01)

B01D 15/32 (2006.01)

A23L 1/31 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **12.05.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2006**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.02.2006

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Alcalá
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Castro Rubio, Florentina;
García López, María Concepción y
Marina Alegre, María Luisa**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento de determinación de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de determinación de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa.

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de determinación de proteínas de soja. Este procedimiento que consiste en la realización de dicha cromatografía mediante la aplicación de un gradiente lineal y binario en tres pasos usando acetonitrilo-agua-ácido trifluoroacético, a un flujo de 3 mL/min, a una temperatura constante y con inyección del extracto proteico obtenido por solubilización de las proteínas de soja del producto cárnico desgrasado y seco utilizando un tampón Tris-HCl 30 mM (pH=8) con 0,5% (v/v) de 2-mercaptoetanol, permite determinar proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa. Se obtiene una cuantificación de proteínas de soja con un procedimiento más sencillo y económico.

ES 2 246 698 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de determinación de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa.

5

Este método analítico de cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa permite determinar proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor disponibles comercialmente. Esta invención supone un gran avance para el análisis rutinario de control de calidad de estos productos.

10 Estado de la técnica

Aunque existen propuestas en la bibliografía para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos utilizando distintas técnicas (incluida la cromatografía líquida de alta eficacia), hasta la fecha ninguna de ellas permite obtener contenidos fiables. Los pocos intentos para la determinación directa de proteínas de soja en carnes por cromatografía líquida de alta eficacia se han centrado en carnes crudas o mezclas sintéticas soja-carne y no en productos cárnicos comerciales. Por otra parte, existe un método de la AOAC basado en un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas, método ELISA, para medir proteínas de soja en productos cárnicos crudos y procesados con calor. Sin embargo, este método es complejo, costoso y largo y además ha sido considerado como semicuantitativo.

Por lo tanto, para análisis rutinarios de control de calidad, sería necesario disponer de métodos de análisis rápidos, sencillos y económicos para la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor. En consecuencia, se ha diseñado un método de análisis que permite realizar dicho control en unos pocos minutos y cuyas características son el objetivo de la presente invención.

25 Descripción de la invención

El método analítico que permite la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) de perfusión en fase inversa se lleva a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta presión que permite realizar gradientes de composición de fase móvil y que tiene acoplado un detector de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) de diodos en fila. La columna cromatográfica utilizada es una columna con un relleno de perfusión en la modalidad de fase inversa.

El método consiste en un gradiente lineal y binario en tres pasos, cuyo volumen (Flujo x Tiempo de gradiente) es de 6,6 mL. Para un flujo de 3 mL/min (velocidad lineal de flujo de 1058 cm/hr), el gradiente diseñado es el siguiente: de 5 a 25% de fase móvil (FM) B en 0,80 min, de 25 a 42% FM B en 0,80 min y de 42 a 50% de FM B en 0,6 min. Este gradiente va seguido de otro gradiente lineal e inverso de 50 a 5% FM B en 0,5 min y 0,5 min a 5% de FM B para reequilibrar la columna en las condiciones iniciales. La utilización de este gradiente a otros flujos es posible manteniendo el volumen de gradiente constante. Las fases móviles que se utilizan son: FM A, agua de grado CLAE con un 0,05% (v/v) de ácido trifluoroacético; FM B, acetonitrilo de grado CLAE con un 0,05% (v/v) de ácido trifluoroacético. Las fases móviles se filtran a través de membranas de nylon de 0,45 μm y se desgasifican antes y/o durante su utilización.

La separación se lleva a cabo a una temperatura de columna constante e igual a 50°C y la detección se realiza a una longitud de onda de 280 nm.

45

El protocolo para la preparación de la muestra se puede dividir en dos etapas:

En una primera etapa se somete al producto cárnico a un tratamiento para la eliminación de la grasa por el siguiente procedimiento: una muestra de 10 gramos del producto cárnico se tritura en un molinillo automático, se homogeneiza con 25 mL de acetona (3 min) en una mezcladora Ultraturrax, se agita (15 min), y se centrifuga para la eliminación del sobrenadante (3362g, 30 min). El residuo se somete de nuevo a otra extracción con otros 25 mL de acetona siguiendo el mismo procedimiento y se seca durante una noche en estufa a 60°C.

En una segunda etapa se pesa el producto cárnico desgrasado y seco (según la etapa anterior), se añade el tampón Tris-HCl 30 mM (pH=8) conteniendo un 0,5% (v/v) de 2-mercaptoetanol, se agita, se sonica (10 min, 50°C), se centrifuga para recoger el sobrenadante (3362g, 20 min), y se inyecta el sobrenadante (extracto proteico) en el sistema cromatográfico.

El método de análisis inventado permite la detección de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor disponibles comercialmente. Asimismo, este método también permite determinar el contenido de proteínas de soja de estos productos. El cromatograma correspondiente a una disolución de un extracto proteico preparada a partir de un producto cárnico de cerdo tratado con calor que contiene proteínas de soja (Figura 1) consta de 8 picos, de los cuales los picos 2, 3, 5, 6 y 7 corresponden a las proteínas de soja y los picos 1, 4 y 8 son mezcla de proteínas de soja y proteínas cárnicas. La asignación de estos picos se hizo por comparación de sus tiempos de retención con los que se obtienen cuando se inyectan en el sistema cromatográfico y en las mismas condiciones disoluciones de un producto cárnico de cerdo tratados con calor sin soja desgrasado y seco y un aislado de proteína de soja.

ES 2 246 698 A1

Las ventajas de la utilización de este método y lo que aporta respecto del estado anterior de la técnica se citan a continuación:

- 5 - El método objeto de la invención se puede realizar con una instrumentación básica y es, por tanto, accesible a la mayor parte de los laboratorios de análisis.
- El gradiente utilizado (tres pasos) permite la separación de las proteínas de soja y de las proteínas cárnicas.
- 10 - Se trata de un método sencillo, que implica eliminación de la grasa del producto cárnico con acetona y solubilización de proteínas de soja del producto cárnico seco y desgrasado en el tampón Tris-HCl 30 mM (pH=8) conteniendo un 0,5% (v/v) de 2-mercaptoetanol. Las disoluciones obtenidas se inyectan directamente en el sistema cromatográfico, sin necesidad de utilizar filtros, lo cual también reduce tiempo de análisis y coste.
- 15 - Este método de análisis permite la separación ultrarrápida de estos dos tipos de proteínas y la determinación de proteínas de soja, haciéndolo ideal en su aplicación industrial. Así, por ejemplo si la separación se realiza a un flujo de 3 mL/min, el tiempo de análisis es de 2,2 min (a los que hay que sumar 1 min para re-equilibrar la columna a las condiciones iniciales).
- 20 - Este método permite la detección de adiciones ilegales de proteínas de soja a productos cárnicos de cerdo tratados con calor. Esto resulta muy interesante puesto que la adición de las proteínas de soja a productos cárnicos con tratamiento térmico esta sujeta a normativas que regulan tanto las cantidades máximas permitidas que se pueden adicionar como el etiquetado de estos productos. La legislación española permite adicionar proteínas de soja a productos cárnicos tratados con calor en una proporción igual o inferior al 3% del producto acabado (Legislación Alimentaria de Aplicación en España (Clasificación por Alimentos). Carne, aves, caza y derivados: norma genérica de calidad para productos cárnicos tratados por el calor, Eypasa: Madrid, 2002).
- 25 - Este método permite la determinación cuantitativa de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor, lo cual constituye una ventaja importante frente al método de la AOAC basado en el ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) cuya utilidad en valoraciones cuantitativas es limitada.
- 30 - El método desarrollado permite determinar el contenido de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor disponibles comercialmente. Esto resulta muy interesante ya que anteriormente los pocos trabajos encontrados que aplican la cromatografía líquida de alta eficacia se centran en carnes crudas o mezclas sintéticas soja-carne y no en productos cárnicos comerciales.
- 35

Descripción de las figuras

40 Figura 1: Cromatograma obtenido al inyectar el extracto proteico de un producto cárnico de cerdo tratado con calor que contiene aislado de proteína de soja en su formulación en el sistema cromatográfico. Condiciones experimentales: Flujo, 3 mL/min; Temperatura de columna, 50°C; Gradiente, 5-25% FM B en 0,8 min, 25-42% FM B en 0,8 min, 42-50% FM B en 0,6 min (tiempo de gradiente de 2,20 min), seguido de un gradiente lineal inverso de 50 a 5% FM B en 0,5 min y 0,5 min a 5% FM B para re-equilibrar la columna a las condiciones iniciales; Fases móviles, 0,05% (v/v) ácido trifluoroacético en agua (FM A) y 0,05% (v/v) ácido trifluoroacético en acetonitrilo (FM B); Volumen de inyección, 20 μ L; Detección, 280 nm. Preparación de la muestra: extracción de la grasa con acetona seguido por la solubilización de las proteínas del producto cárnico desgrasado y seco en el tampón Tris-HCl 30 mM (pH=8) conteniendo 0,5% (v/v) de 2-mercaptoetanol (extracto proteico).

50

Modo de realización

A continuación se citan dos ejemplos de utilización de este método

55 *Detección de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor de tipo chopped o mortadela disponibles comercialmente*

El método se aplicó a la detección de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor que contenían proteína de soja en su formulación. Se eligieron como representativas muestras tipo chopped o mortadela disponibles comercialmente.

60

Se preparan disoluciones de los productos cárnicos pesando entre 0,3 y 0,7 gramos del producto desgrasado y seco (que correspondería a concentraciones entre 12 a 31 mg/mL). Estas disoluciones se agitan, se sonicán a 50°C durante 10 min y se centrifugan durante 20 min a 3362g para recoger el sobrenadante (disolución del extracto proteico) que se inyecta por triplicado en el cromatógrafo. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

65

- Columna: Relleno de perfusión; tamaño de partícula de 10 μ m; dimensiones: 50 mm de longitud y 4,60 mm de diámetro interno.

ES 2 246 698 A1

- Gradiente: de 5 a 25% FM B en 0,80 min; de 25 a 42% FM B en 0,8 min; de 42 a 50% FM B en 0,6 min (tiempo de gradiente 2,2 min), seguido de un gradiente lineal inverso de 50 a 5% FM B en 0,5 min y 0,5 min a 5% FM B para re-equilibrar la columna a las condiciones iniciales.

5 - Flujo: 3 mL/min

- Fases móviles: FM A, agua de grado CLAE con 0,05% (v/v) de ácido trifluoroacético; FM B, acetonitrilo de grado CLAE con 0,05% (v/v) de ácido trifluoroacético.

10 - Temperatura de la columna: 50°C

- Volumen de inyección: 20 µL

- Detección: 280 nm

15 Cuando se inyectaron estas disoluciones de extracto proteico en el sistema cromatográfico se obtuvieron cromatogramas en los que aparecían los picos correspondientes a las proteínas de soja lo cual indicaba la presencia de proteínas de soja en la muestra.

20 *Determinación cuantitativa de las proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo con tratamiento térmico*

Se preparan disoluciones de un patrón de soja (aislado de proteína de soja) de concentraciones comprendidas entre 0,5 y 6,0 mg/mL en el tampón Tris-HCl 30 mM (pH=8) conteniendo 0,5% (v/v) de 2-mercaptoetanol. Estas disoluciones se agitan, se sonicán a 25°C durante 5 min y se centrifugan a 3362g durante 10 min. El contenido de proteína de cada disolución patrón utilizada en el calibrado se determina teniendo en cuenta la pureza y la humedad de éste. La humedad del patrón se determina secando éste a 130°C en una estufa, hasta peso constante.

Una vez preparadas las disoluciones patrón se procede a realizar el calibrado por el método del patrón externo, para lo cual se inyectan por triplicado cada una de las disoluciones patrón en las mismas condiciones cromatográficas especificadas en el apartado anterior.

30 *Calibrado*

La recta de calibrado se obtiene representando el área correspondiente a la suma de las áreas de los picos del aislado de proteína de soja que aparecen a los mismos tiempos de retención que los picos 5 y 6 de la muestra (y) en función de la concentración inyectada del patrón (aislado de proteína de soja) correspondiente (corregido teniendo en cuenta la pureza y la humedad) (x). El análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales del calibrado que se ajustan a un modelo lineal dio lugar a los siguientes resultados:

40 $y = 7,13(0,14)x - 0,49(0,14); r^2 = 0,9990; n = 6;$

error estándar de la recta = 0,5032(0,124)

La ecuación de la recta indicada es el resultado de la media de dos rectas de calibrado que son las que se han utilizado para analizar los productos. Entre paréntesis se indican las desviaciones estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen de la recta.

El intervalo de linealidad y límites de detección y cuantificación del método analítico se muestran en la Tabla 1

50 TABLA 1

Intervalo de linealidad	0.50-12,50 mg/mL de proteína de soja
Límite de detección	0.20 mg/mL (0,07%(p/p)) ^a de proteína de soja
Límite de cuantificación	0.68 mg/mL (0.25%(p/p)) ^a de proteína de soja

^aLímites de detección y cuantificación en unidades de p/p determinados con respecto a un gramo de muestra

60

Determinación del contenido de proteína de soja en las muestras

Una vez obtenida la recta de calibrado, se inyecta la disolución del extracto proteico obtenido a partir del producto cárnico de cerdo tratado con calor tipo chopped o mortadela desgrasado y seco.

65

En los cromatogramas obtenidos para las muestras aparecen los picos 2, 3, 5, 6 y 7 correspondientes a las proteínas de soja, sin embargo, para el análisis cuantitativo se utiliza la suma de las áreas de los picos 5 y 6. Tras interpolar dicha

ES 2 246 698 A1

área en la recta de calibrado para cuatro productos cárnicos de cerdo tratados con calor tipo chopped o mortadela se obtienen los resultados que aparecen en la Tabla 2. Además, se han incluido en dicha tabla los resultados obtenidos por el método de la AOAC de inmunoabsorción con enzimas ligadas, ensayo ELISA.

5

TABLA 2

Producto cárnico	Concentración de proteína de soja (mg/100 mg muestra) ^a	
	ELISA ^b	HPLC de perfusión ^c
Producto cárnico A ^e	1,04	1,10(0,20) ^d
Producto cárnico B ^e	1,67	1,67(0,22) ^d
Producto cárnico C ^e	1,80	1,42(0,06) ^d
Producto cárnico D ^e	0,85	0,96(0,11) ^d

10

15

^aResultados referidos a producto inicial.

^bDeterminado siguiendo el método de la AOAC 998.10.

20

^cDeterminado por el método de calibración del patrón externo siguiendo el método propuesto.

^dMedia de dos determinaciones individuales. Desviación estándar entre paréntesis.

^eProductos cárnicos tratados con calor.

25

Aplicación industrial

Para control de calidad y seguridad alimentaria, interesa tanto al fabricante como a la administración certificar que los organismos reguladores avalan este contenido.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de determinación de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa, que consiste en la eliminación de la grasa, utilizando como disolvente la acetona, y solubilización de las proteínas de soja del producto cárnico desgrasado y seco con un tampón Tris-HCl 30 mM (pH=8) conteniendo un 0,5% (v/v) de 2-mercaptoetanol (extracto proteico).

10 2. Procedimiento de determinación de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa, según la reivindicación 1, que consiste en la inyección de la disolución del extracto proteico en el sistema cromatográfico que se caracteriza por la utilización de una columna de perfusión de fase inversa a una temperatura de 50°C, que tiene una longitud de 50 mm y un diámetro interno de 4,6 mm y el tamaño de partícula es de 10 μ m. aplicando un gradiente lineal que permite una separación ultrarrápida de proteínas de soja y proteínas cárnicas contenidas en el extracto.

15 3. Procedimiento de determinación de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque en la realización de dicha cromatografía se usan dos fases móviles: FM A: agua con ácido trifluoroacético y FM B: acetonitrilo ácido trifluoroacético, dichas fases móviles contienen ácido trifluoroacético en una proporción de 0,05% (v/v), porque el gradiente utilizado para un flujo de 3 mL/min es el siguiente: 5-25% de FM B en 0,8 min, 25-42% de FM B en 0.8 min y 42-50% de FM B en 0,6 min, seguido de una etapa de equilibrado de la columna a las condiciones iniciales.

20 4. Procedimiento de determinación de proteínas de soja en productos cárnicos de cerdo tratados con calor por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa. según las reivindicaciones 1, 2 y 3, **caracterizado** por la detección de proteínas de soja utilizando una longitud de onda de 280 nm y posterior cuantificación para obtener el contenido de proteínas de soja mediante la interpolación de la suma de las áreas de los picos 5 y 6 correspondientes a las proteínas de soja en la recta calibrado obtenida utilizando como patrón un aislado de proteína de soja.

30

35

40

45

50

55

60

65

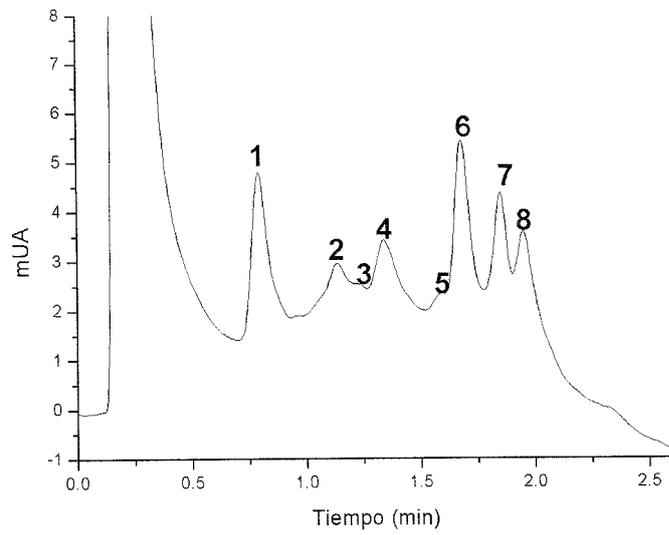


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 246 698

② Nº de solicitud: 200401143

③ Fecha de presentación de la solicitud: 12.05.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2167191 A1 (UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES) 01.05.2002, todo el documento.	1-4
X	ESPEJA, E. et al.: "Fast Detection of Added Soybean Proteins in Cow's, Goat's, and Ewe's Milk by Perfusion Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography", J. Sep. Sci. (2001), Vol. 24, pp.: 856-864, todo el documento.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

16.01.2006

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 30/88 (2006.01)

B01D 15/32 (2006.01)

A23L 1/31 (2006.01)