

Análisis simultáneo de aflatoxinas y ocratoxina A en compost por HPLC-MS

H. Navajas¹, F. Broto-Puig¹, M. Agut², L. Comellas¹

¹Departament de Química Analítica, ²Departament de Bioenginyeria.
IQS, Universitat Ramon Llull. Via Augusta, 390. 08017 Barcelona

Simultaneous analysis of aflatoxins and ochratoxin A in compost by HPLC-MS

Anàlisi simultània d'aflatoxines i ocratoxina A en compost per HPLC-MS

Recibido: 15 de diciembre de 2009; revisado: 1 de junio de 2010; aceptado: 10 de junio de 2010

RESUMEN

Las aflatoxinas y ocratoxina A son las micotoxinas más estudiadas debido a su elevada toxicidad y amplia distribución.

En este trabajo se describe un método de análisis simultáneo de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y la ocratoxina A en compost por HPLC-MS. El método consiste en una extracción de las toxinas con MeOH:H₂O, posterior purificación de la muestra con cartuchos de extracción en fase sólida y posterior análisis cromatográfico en 18 minutos utilizando una columna XTerra (2.1x100mm, 3.5mm).

En este trabajo se demuestra que no hay presencia de las toxinas de interés a concentraciones superiores a 0,2mg/kg.

Palabras clave: Micotoxinas. Aflatoxinas. Ocratoxina A. Compost. Compostaje. HPLC-MS.

SUMMARY

Aflatoxins and ochratoxin A are the most studied mycotoxins due to its high toxicity and wide distribution. This paper describes a method for the simultaneous analysis of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ and ochratoxin A in compost by HPLC-MS. Mycotoxins were extracted with a mixture

of MeOH and H₂O and then it was purified by solid-phase clean-up cartridges. Toxins were analyzed by HPLC on an XTerra column (2.1x100mm, 3.5mm) in 18 minutes. This paper demonstrates that these toxins were not detected in the samples at a concentration level of 0,2mg/kg.

Key words: Mycotoxins, Aflatoxins, Ochratoxin A, compost, composting, HPLC-MS

RESUM

Les aflatoxines i l'ocratoxina A són les micotoxines més estudiades a causa de la seva elevada toxicitat i àmplia distribució. El present treball descriu un mètode d'anàlisi simultani de les aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂ and ocratoxina A en compost per HPLC-MS. El mètode consisteix en una extracció de les toxines amb MeOH:H₂O, posteriorment es purifica la mostra amb cartutxos d'extracció en fase sòlida i posterior anàlisi cromatogràfic en 18 minuts utilitzant una columna XTerra (2.1x100mm, 3.5mm). El present treball demostra que no hi ha presència de les toxines d'interès a concentracions superiors a 0,2mg/kg.

Mots clau: Micotoxines, Aflatoxines, Ocratoxina A, compost, compostatge, HPLC-MS

INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas y la ocratoxina A son las micotoxinas más comunes a las que está expuesto el ser humano⁽¹⁾. Las aflatoxinas las producen especialmente *Aspergillus flavus* y forman una familia de compuestos derivados de la difuranocumarina. Actualmente, existen 16 tipos de aflatoxinas entre las que las más tóxicas y más frecuentes en alimentos son la aflatoxina B₁, aflatoxina B₂, aflatoxina G₁ y la aflatoxina G₂. Sus estructuras químicas son las que se muestran en la figura 1.



Figura 1. Estructuras químicas de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂.

La ocratoxina A (OTA) es producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La molécula de OTA está formada por una isocumarina clorada unida a través de un grupo carboxílico a la L-fenilalanina mediante un enlace amido. Su estructura química se muestra en la figura 2.

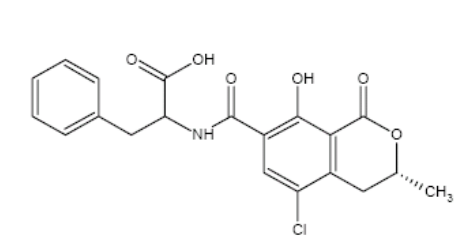


Figura 2. Estructura química de la ocratoxina A.

Durante muchos años, la investigación de las micotoxinas se ha centrado en el campo de la alimentación ya que se creía que la única vía de contaminación para el ser humano era a través de la ingesta, pero algunos estudios muestran la existencia de otras fuentes de exposición⁽²⁾. Una de estas fuentes es por inhalación de aire contaminado por toxinas procedentes de hongos, sobretodo en ambientes donde la concentración de esporas fúngicas puede ser elevada⁽³⁾. Por ejemplo, es probable que los trabajadores de silos inhalen junto con el polvo del grano, esporas fúngicas que pueden transportar micotoxinas con ellas. Otro ambiente de trabajo contaminado podría ser las plantas de compostaje, donde pueden crecer diferentes géneros de hongos potencialmente productores de toxinas. Como estas toxinas son termoresistentes, no se des-

truirán durante el proceso de compostaje. Además, el uso del compost como abono organomineral podría transferir las toxinas a las plantas que se cultivaran en los terrenos tratados.

Debido a la ausencia de publicaciones sobre la presencia de estas toxinas en el compost, el objetivo de este trabajo se centra en desarrollar un método simultáneo para la detección de estas toxinas, aplicable a compost para poder estudiar las posibles contaminaciones comentadas anteriormente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Patrones y disolventes

Se dispone de patrones puros de las aflatoxinas B₁, G₁, B₂, G₂ y de la ocratoxina A. Estos productos han sido suministrados por Scharlab, S.L. (Barcelona)

Los disolventes utilizados son metanol y acetonitrilo suministrados por VWR (West Chester, Pennsylvania).

Muestras

Se analizan muestras de 3 tipos de compost producido a partir de fango de depuradora: dos procedentes de la depuradora de Blanes recogidas en los años 2002 y 2007, donde el compostaje se realiza a través de pilas estáticas aireadas y una tercera muestra procedente de la depuradora de Manresa recogida el año 2007, donde el compost se obtiene en canales abiertos

Tratamiento de las muestras de compost hasta obtener el extracto para inyectar en HPLC-MS.

Debido a la estabilidad y no volatilidad de estas toxinas a temperaturas altas^{(5),(6)} se decide secar el compost en la estufa a 105°C hasta peso constante, ya que la cantidad de agua en las muestras es muy diferente entre ellas y podría alterar la extracción de las toxinas (realizada con MeOH:H₂O, 70:30). Los valores de humedad calculados para las muestras son los que se muestran en la tabla I.

TABLA I

Humedad calculada para las diferentes muestras analizadas.

Año	Humedad Blanes (% peso)	Humedad Manresa (% peso)
2002	34	M.N.A.
2007	20	23

M.N.A.: Muestra no analizada

A continuación, se trata 1g de muestra seca con 50mL de MeOH:H₂O (70:30), se deja 30 minutos en agitación magnética y se filtra. A una alícuota de 4mL de la mezcla se añaden 1,6mL de agua para alcanzar un contenido del 50% en agua y posteriormente se purifica la muestra con un cartucho OASIS HLB (3cc/60mg). El cartucho se acondiciona previamente con 2mL de acetonitrilo y se equilibra con 2mL de agua. Después, se carga la muestra y se lava el cartucho con 2mL de agua (5% acetonitrilo). Las toxinas

se eluyen posteriormente con 2mL de acetonitrilo. A continuación, se evapora el acetonitrilo hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno. Finalmente, se reconstituye con 1mL de fase móvil.

Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas se resumen a continuación: el sistema de detección utilizado consta de dos detectores en serie. El primero es un DAD (Diode Array Detector) y el segundo es un espectrómetro de masas con ionización por electroespray.

- Equipo: Waters Alliance 2690 + ZMD.
- Columna: Waters XTerra MS C18 (2.1x100mm, 3.5 mm).
- Temperatura columna: 30°C
- Fase móvil:
 - A: Metanol (MeOH)
 - B:H₂O (0,1% HCOOH)
- Vol. Inyección: 10mL
- Flujo: 0,2mL/min
- Gradiente de elución: se describe en la tabla II.

TABLA II
Gradiente de elución cromatográfico.

Tiempo/min	%A	%B
0	40	60
6	85	15
9	85	15
10	40	60
16	40	60

A: Metanol B: Agua

-Detector DAD: Trabajando a una $\lambda=350\text{nm}$.

Condiciones del espectrómetro de masas.

Las condiciones del espectrómetro de masas son las que se describen a continuación:

-Detector espectrómetro de masas: ZMD micromass

PARÁMETROS DEL TUNE

- Voltaje del capilar: 3 kV (modo positivo), 2,5 kV (modo negativo).
- Voltaje de extracción: 7 V
- Voltaje de cono: de 5 a 120 V
- Lentes de radio frecuencia: 0,5 V
- Temperatura de la fuente: 100°C
- Temperatura de desolvatación: 350°C

PARÁMETROS DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS:

- Energía del ión: 0,5 V.
- Resolución a masas altas: 12,5.
- Resolución a masas bajas: 12,5.
- Flujo de gas de desolvatación: 500 l/h.
- Flujo de gas de cono: 30 l/h.
- Fotomultiplicador: 650.

La detección se realiza en modo SIR (Monitorización de un ión, Single Ion Recording) aplicando ESI (Ionización por

electrospray, Electro spray Ionization) positivo de 0 a 9,5 minutos donde se detecta las aflatoxinas G₁, B₁, G₂, B₂ y ESI negativo de 9,5 a 14 minutos para la detección de la ocratoxina A. Los iones que se utilizan para la cuantificación e identificación de cada toxina se describen en la tabla III. El ión primario corresponde a la masa de la molécula protonada en el caso de ESI positivo y desprotonada en el caso de ESI negativo y el ión secundario es el aducto con sodio para las cuatro aflatoxinas. En el caso de la ocratoxina A corresponde a una fragmentación de la molécula.

TABLA III

Iones primarios y secundarios (m/z) de cada toxina, voltajes de cono(V) y tiempo de retención(tr) para cada toxina.

Toxina	ESI	ión primario (m/z)	Voltaje cono ión primario (V)	ión secundario (m/z)	Voltaje cono ión secundario (V)	tr (min)
AFB ₁	Positivo	313.1	20	335.0	40	7.09
AFG ₁	Positivo	329.1	20	351.0	40	5.54
AFB ₂	Positivo	315.1	40	337.0	40	6.35
AFG ₂	Positivo	331.0	40	353.0	40	4.46
OTA	Negativo	402.3	20	358.1	40	10.82

Validación del método analítico

Para validar el método de análisis, se determinaron los siguientes parámetros: a) linealidad, b) límite de detección y límite de cuantificación. La validación se ha realizado tanto para el detector DAD como para el espectrómetro de masas.

a) Linealidad

Detector DAD: Se preparan diferentes patrones de una mezcla de las aflatoxinas B₁, G₁, G₂, B₂ y ocratoxina A de 200mg/L, 300mg/L, 500mg/L y 1 mg/L (correspondiente a 2,5mg/kg y 12,5mg/kg en muestra) en fase móvil. Se ha decidido estudiar este rango de linealidad porque el trabajo se centra en muestras de compost. Evidentemente, para muestras alimentarias este rango debería ser de concentración sensiblemente menor. (7)

Cada disolución con los cinco patrones de las toxinas se ha inyectado 6 veces. Una vez analizadas las áreas de los picos de cada cromatograma se ha obtenido un comportamiento lineal desde 2,5mg/kg hasta 12,5mg/kg para cada una de las toxinas de interés.

Las figuras 1 a 5 corresponden a las rectas de calibrado para cada una de las toxinas obtenidas con el detector DAD.

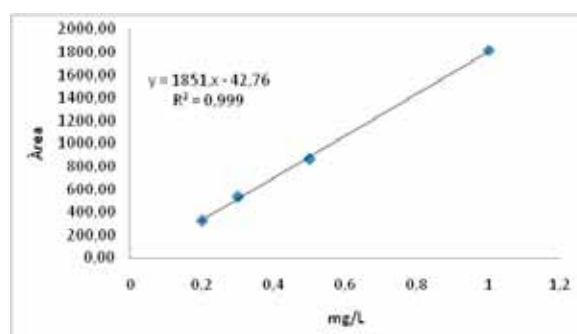


Figura 1. Recta de calibrado para la aflatoxina G₂

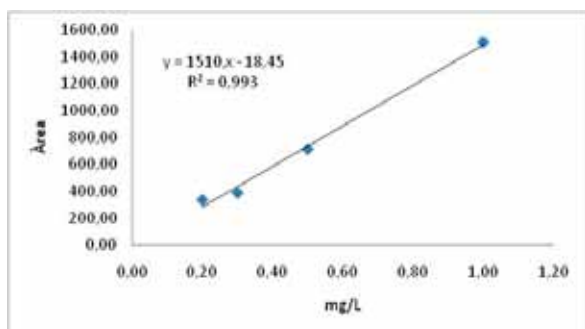


Figura 2. Recta de calibrado para la aflatoxina G₁

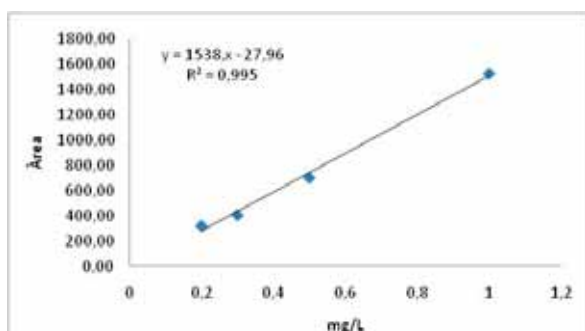


Figura 3. Recta de calibrado para la aflatoxina B₂

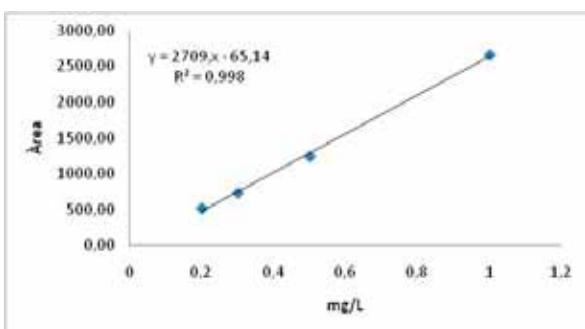


Figura 4. Recta de calibrado para la aflatoxina B₁

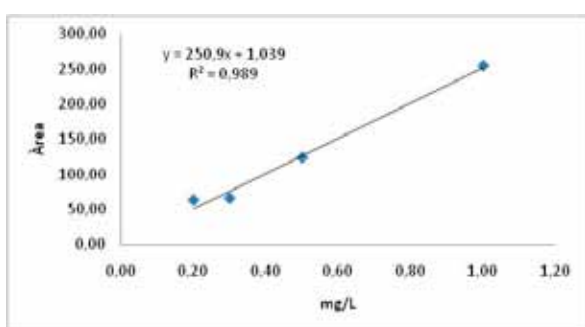


Figura 5. Recta de calibrado para la ocratoxina A

Espectrómetro de masas: Se preparan diferentes patrones de una mezcla de las aflatoxinas B₁, G₁, G₂, B₂ y ocratoxina A de 100mg/L, 200mg/L, 300mg/L, 500mg/L y 1 mg/L (entre 1,25mg/kg y 12,5mg/kg en muestra) en fase móvil. En este caso el rango de linealidad puede ser inferior ya que el espectrómetro de masa es más sensible que el detector de UV.

Cada uno de los patrones se ha inyectado 6 veces, se observa un comportamiento lineal entre 0,1mg/L y 0,5mg/L

para las aflatoxinas G₂ y B₁ y entre 0,2mg/L y 1mg/L para las aflatoxinas G₁, B₂ y para la ocratoxina A entre 0,1 mg/L y 1mg/L. Las figuras 6 a 10 corresponden a las rectas de calibrado para cada una de las toxinas obtenidas con el espectrómetro de masas.

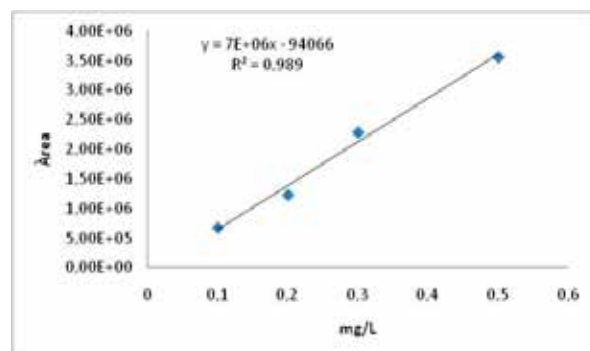


Figura 6. Recta de calibrado para la aflatoxina G₂

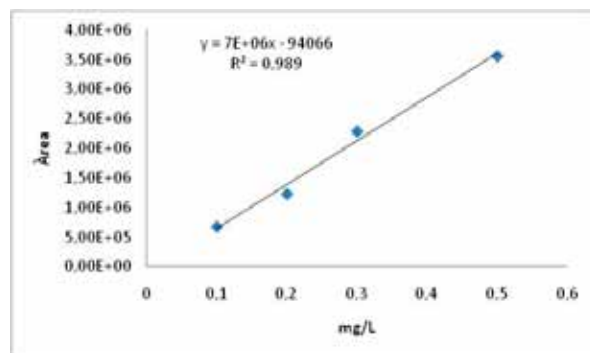


Figura 7. Recta de calibrado para la aflatoxina B₂

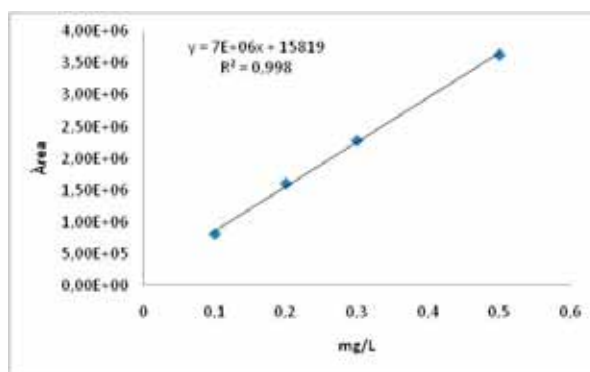


Figura 8. Recta de calibrado para la aflatoxina B₁

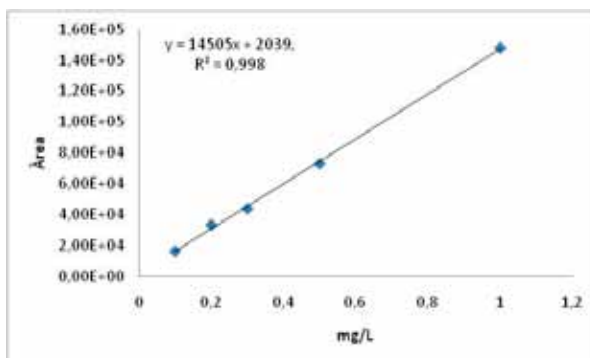


Figura 9. Recta de calibrado para la aflatoxina G₁

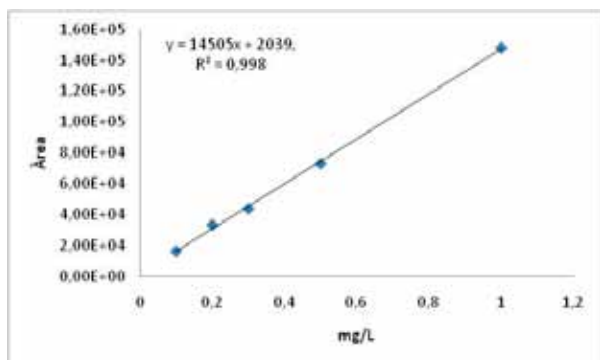


Figura 10. Recta de calibrado para la ocratoxina A

b) Recuperaciones

Se ha aplicado el método de extracción de las toxinas a 1g de compost, al que se ha añadido 5mg de cada una de las toxinas de interés. Es decir en muestra representa 5mg/kg y se ha calculado las recuperaciones de cada una de las toxinas individualmente. Como se puede apreciar la concentración de esta adición en muestra se encuentra dentro del margen de linealidad estudiado anteriormente.

Se han preparado 3 muestras y se han calculado las recuperaciones de las toxinas. A continuación en la tabla IV se muestra el promedio de las recuperaciones.

TABLA IV

Promedio de las recuperaciones de las 3 muestras

5mg/kg muestra	AFG ₂	AFG ₁	AFB ₂	AFB ₁	OTA
promedio recuperaciones	61,8%	40,5%	88%	67,3%	73,1%

c) Límite de detección y límite de cuantificación del espectrómetro de masas:

El límite de cuantificación es la mínima cantidad de analito que el sistema es capaz de determinar en el margen de trabajo. Se calcula como la cantidad de sustancia que equivale a un pico de altura igual a diez veces la altura del ruido. El límite de detección se define como la mínima cantidad de analito que el sistema es capaz de detectar, es decir, que proporciona una señal diferenciable del ruido. Se calcula como la cantidad de sustancia que equivale a un pico de altura igual a tres veces la altura del ruido.

Los cálculos del límite de detección y de cuantificación se han realizado con un patrón de 10mg/L de las toxinas de interés, en la siguiente tabla se muestra la relación señal ruido para cada una de las toxinas calculado con este patrón.

TABLA IV

Relación señal ruido para cada una de las toxinas calculado con un patrón de 10mg/L

Toxina	Aflatoxina G ₂	Aflatoxina G ₁	Aflatoxina B ₂	Aflatoxina B ₁	OTA
S/N	2,77	1,7	1,3	2,5	21

Esta relación señal ruido permite estimar un límite de detección para las aflatoxinas de 0,2mg/kg (10 veces inferior al límite de detección de interés) y un límite de cuantificación de 0,9mg/kg. En el caso de la ocratoxina A se puede estimar un límite de detección de 0,012mg/kg y un límite de cuantificación de 0,06mg/kg.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 11, se muestra un cromatograma correspondiente a un patrón de 0,4mg/L de las cinco toxinas de interés, correspondiente a una longitud de onda de 350nm.

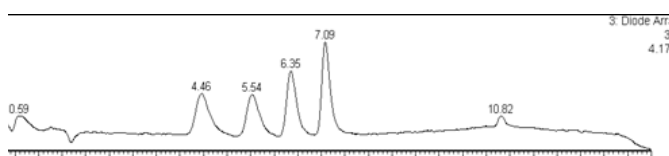


Figura 11. Cromatograma de un patrón de las toxinas de interés. El orden de elución es aflatoxina G₂, G₁, B₂, B₁, y ocratoxina A detección UV a 350nm.

La figura 12, corresponde a los cromatogramas de masas obtenidos en modo SIR positivo y negativo para un patrón de concentración de 0,4mg/L para cada toxina.

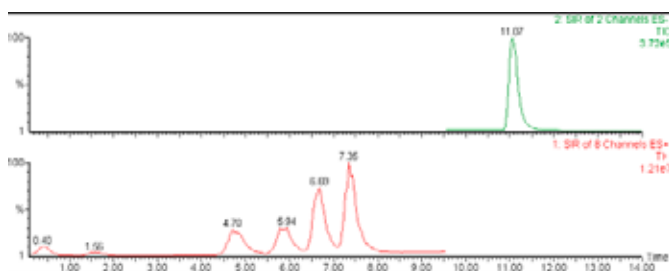


Figura 12. Cromatograma en modo SIR positivo y negativo para un patrón de las cinco toxinas de interés.

Los cromatogramas obtenidos para las tres muestras de compost de las distintas plantas de compostaje son los que se muestran entre las figuras 13 y 15.

Tras analizar 1g de la muestra de compost procedente de Blanes recogido el año 2002 se obtienen los cromatogramas de la figura 13.

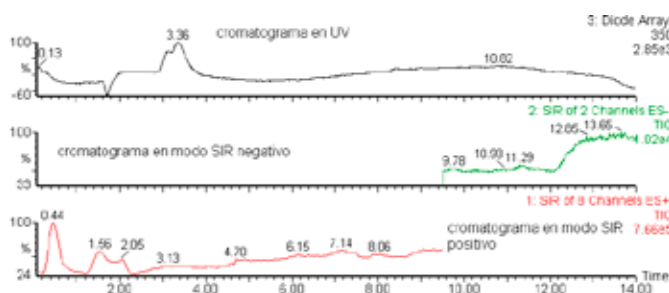


Figura 13. Cromatograma en UV a 350nm, cromatograma en modo SIR negativo y cromatograma en modo SIR positivo para 1g de compost.

En la figura 14, se muestra el cromatograma de UV a 350nm de un patrón de 0,8mg/L de las toxinas comparado con una muestra de compost procedente de Blanes recogido el año 2007.

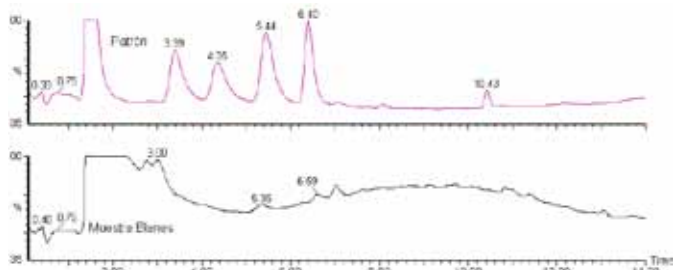


Figura 14. Cromatograma en UV a 350nm para un patrón de las toxinas y una muestra de 1g compost procedente de Blanes del 2007.

Finalmente, en la figura 15, se muestra el cromatograma de UV a 350nm de un patrón de 0,8mg/L de las toxinas comparado con una muestra de compost procedente de Manresa recogido el año 2007.

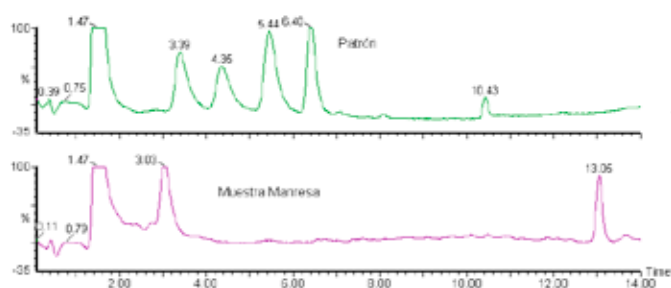


Figura 15. Cromatograma en UV a 350nm para un patrón de las toxinas y una muestra de 1g compost procedente de Manresa del 2007.

Observando los cromatogramas anteriores se puede afirmar que, en las muestras analizadas de compost procedente de Blanes recogido el año 2002 y 2007 y en el compost procedente de Manresa del 2007, no hay presencia de las toxinas de interés a concentraciones superiores a 0,2 mg/kg.

CONCLUSIONES

El método puesto a punto en este trabajo ha permitido asegurar que en las muestras de compost de la depuradora de Blanes obtenidas el año 2002 y 2007 y el compost de Manresa obtenido el año 2007, no hay presencia de las aflatoxinas G₂, G₁, B₂, B₁ ni la ocratoxina A a una concentración superior de 0,2mg/Kg.

Se seguirá investigando en esta línea para determinar si el compost es un sustrato adecuado para que los mohos produzcan toxinas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión del proyecto "Determinación de nonil-

fenoles y micotoxinas en lodos de depuradora y suelos tratados" (Plan Nacional nº proyecto CTM 2006-14163-CO02-02/TECNO) que ha permitido financiar este trabajo. Asimismo, los autores quieren agradecer a las Estaciones de Aguas Residuales de Blanes y Manresa el suministro de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

1. International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993) Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans
2. Erica Bloom, Karol Bal, Eva Nyman, Aime Must, and Lennart Larsson Applied and environmental microbiology, July 2007, p. 4211-4217 Mass Spectrometry-Based Strategy for Direct Detection and Quantification of Some Mycotoxins Produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in Indoor Environments
3. Gregg M. Recer, Marilyn L. Browne, Edward G. Horn, Kenneth M. Hill & William F. Boehler. *Aerobiologia* 17: 99-108, 2001. Ambient air levels of *Aspergillus fumigatus* and thermophilic actinomycetes in a residential neighborhood near a yard-waste composting facility.
4. Isabelle Déportes, Serge Krivobok, Françoise Seigle-Murandi, Denis Zmirou. *J. Agric. Food Chem* (1997), 45, 2788-2792. Aflatoxins in Municipal Solid Wastes Compost? A First Answer
5. Encyclopedia of Food Mycotoxins, 2001 M. Weidenbörner, Ed. Springer, Germany
6. Romani, S. G. Sacchetti, C. Chaves López, G. Gaetano Pinnavaia i M. dalla Rosa. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. *J. Agric. Food Chem* (2000) 48 (8), 3616-3619.
7. M. Ventura, A. Gómez, I. Anaya, J. Díaz, F. Broto-Puig, M. Agut, L. Comellas. *J. Chromatography A*. (2004) 1048, 25-29. Analysis of aflatoxins B₁, G₁, B₂, G₂ in medicinal herbs by liquid chromatography tandem mass spectrometry.