

Validación de un método por UPLC-MS/Ms-ESI+ para la cuantificación de aflatoxinas en yerba mate elaborada

Silvia Caballero, Laura Mereles *, Patricia Piris, Eva Coronel, Lourdes Wiszovaty, Rocío Villalba, Alci Medina.

*Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Dirección de Investigaciones, Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

*Correspondencia: lauramereles@qui.una.py

INTRODUCCIÓN

La seguridad e inocuidad alimentaria constituye un tema prioritario dentro de los Objetivos del Desarrollo sostenible (ODS2), en sus tres dimensiones económica, social y ambiental, en este contexto y a fin de tomar medidas eficaces en la evaluación del riesgo y el monitoreo de contaminantes en alimentos, es necesario establecer métodos validados de probada precisión y exactitud por parte de los laboratorios de análisis. La demanda de métodos que sean rápidos, selectivos y confiables es alta en el sector regulatorio de contaminantes como las aflatoxinas, y sustentan las bases para el establecimiento de normativas y estrategias de monitoreo de alimentos como la yerba mate elaborada, de suma importancia en la alimentación tradicional y la economía del Paraguay.

El objetivo del trabajo fue validar un método de análisis de aflatoxinas en matriz yerba mate elaborada, mediante la evaluación y descripción de los parámetros de desempeño como linealidad, efecto matriz, veracidad o recuperación, precisión y límites de detección y cuantificación, según las directrices de validación de análisis de contaminantes en alimentos.

METODOLOGÍA

- Para la optimización de los parámetros del método de masas se utilizó el software IntelliStart™ con estándares de concentración conocida de las diferentes aflatoxinas (B₁, G₁, B₂, G₂) de 10-100 ng/mL.

Extracción de las aflatoxinas

- 50 gr. de la muestra a temperatura ambiente + 200 mL metanol/agua (8:2) + 50 ml hexano y 5g NaCl
- Homogeneizado por 3 min a alta velocidad en Ultratraxx a 800 rpm.
- Filtración al vacío con papel de filtro cuantitativo dos veces.
- Dilución del extracto con una solución tampón PBS.

Purificación de las muestras

- El extracto se hizo pasar por columnas de inmunofinidad Aflatest (VICAM) con PBS.
- Lavado con agua (grado HPLC), elución con metanol HPLC, a sequedad a Temp. 50°C.
- Se retomaron los residuos con 1% Ac. Fórmico en Metanol.
- Homogeneización en ultrasonido por 1 min., filtrado con filtro de celulosa (0,22µm).
- Inyección en el equipo UPLC/Ms-Ms (Waters), con detector de masas con un método de ionización por electrospray positivo (ESI+).

Sistema cromatográfico: Columna LC-C18 Phenomenex Kinetex OOD-4462-AN 2.6 µm C18 x100 Å x 100mm x 2,1mm. Fase Móvil; A; 0,1% Ácido Fórmico en agua. B; 0,1% Ácido fórmico en Metanol. Gradiente: 10% B, hasta 2 min, 45% B hasta 4.01 min., 10% B hasta 5 min. Flujo: 0,7 min. Tiempo corrida: 10 min. Detector de masas (XevoTQD): Voltaje de capilar; 2 kV. Gas de desolvatación; Nitrogeno, 999 L/Hr, 500°C. Gas del cono; Nitrogeno (51 L/Hr). Temperatura de la fuente: 150°C. Temperatura de desolvatación: 500°C.

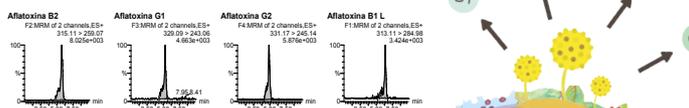
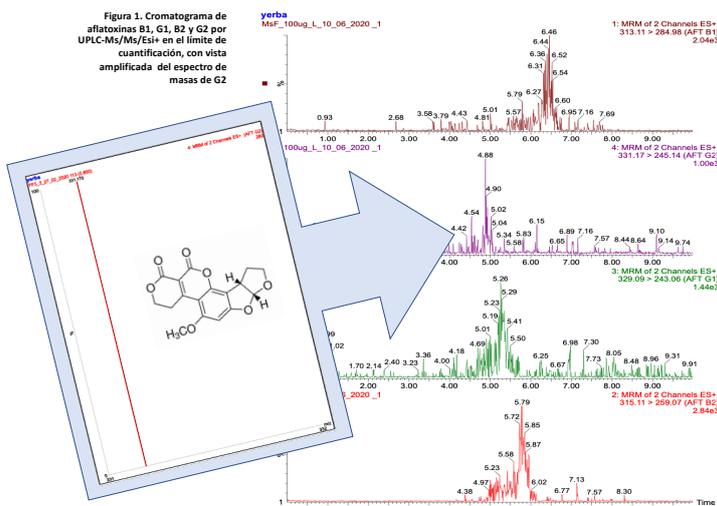
- Los datos fueron adquiridos usando el programa MassLynx™, v 4.1. modo de adquisición: Multiple Reaction Monitoring (MRM).
- Paralelamente a la detección de masas, se utilizó un detector de fluorescencia en tándem. Los datos se procesaron con el programa TargetLynx™ Application Manager.

Tratamiento estadístico

Los análisis estadísticos de las variables analizadas fueron llevados a cabo en un software GraphPad Prism 8.3.0. mediante estadística descriptiva a 95% de intervalo de confianza.

RESULTADOS

Figura 1. Cromatograma de aflatoxinas B₁, G₁, B₂ y G₂ por UPLC-MS/Ms-ESI+ en el límite de cuantificación, con vista ampliada del espectro de masas de G₂



Compound name: Aflatoxina B1
Correlation coefficient: $r = 0.999583$, $r^2 = 0.999165$
Calibration curve: $18.9123 \cdot x + 152.372$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

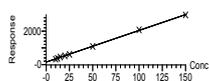


Figura 1. Cromatograma de iones de cuantificación de aflatoxinas B₂, G₁, G₂ y B₁ (UPLC-MS/Ms-ESI+) y curva de calibración de B1

Tabla 1. Resumen de parámetros de desempeño del método analítico para la cuantificación de aflatoxinas B₁, G₁, B₂ y G₂ por UPLC-MS/Ms-ESI+

Parámetro	Criterio de aceptación	B1	G1	B2	G2
Ámbito de Linealidad	$r \geq 0,99$	1-30 ng/mL	4-120 ng/mL	1-30 ng/mL	4-120 ng/mL
Selectividad	Ion de cuantificación	313.10 > 284.98	329.09 > 243.06	315.11 > 259.07	331.17 > 245.14
Efecto Matriz (%)	EM $\pm 20\%$	-9,70	-22,50	4,10	13,2
Repetibilidad RSDr (%)	RSD _r $\leq 20\%$	2,22	0,86	2,5	1,19
Precisión intermedia (%)	RSD _R $\leq 20\%$	4,69%	9,33%	3,04%	3,68%
Límite de detección (ng/g)	LD < 1/5 LMP	0,4	0,38	1,57	1,96
Límite de cuantificación (ng/g)	LOQ < 2/5 LMP	1,32	1,28	5,25	6,55
Recuperación \pm DE (%)		70-120	98,09 \pm 3,65	99,16 \pm 6,61	100,12 \pm 2,93

Referencias: Directrices SANCO (2011), Guía MAPA (2011) y (Duffau et al, 2010).

CONCLUSIÓN

En las condiciones experimentales utilizadas, se ha desarrollado un método de cuantificación de aflatoxinas en matriz yerba mate elaborada con buenos parámetros de desempeño como precisión, exactitud, selectividad y especificidad. La sensibilidad del método determinada por los límites de detección y cuantificación son aceptables para el uso propuesto. A partir de estos resultados se pueden desarrollar diseños observacionales y experimentales para la determinación de estos contaminantes en yerba mate elaborada en apoyo al sector productivo y la inocuidad alimentaria.

AGRADECIMIENTOS: