

# 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](mailto: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 (B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub>) 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.

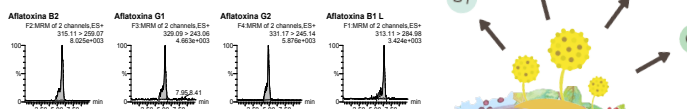
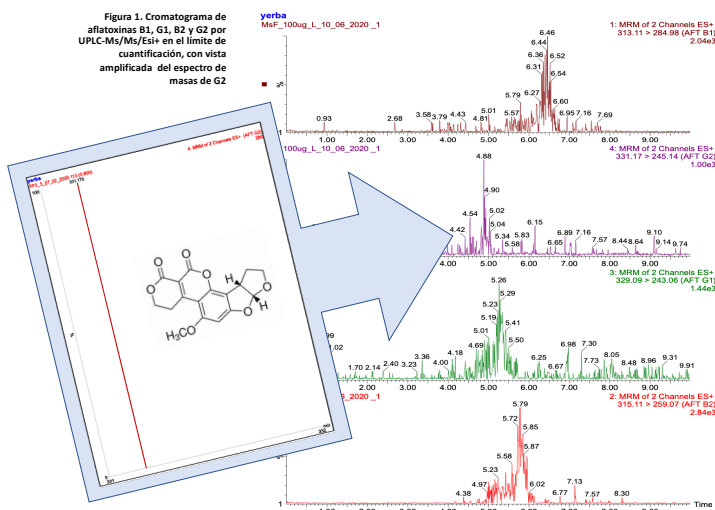
- Los datos fueron adquiridos usando el programa MassLynx™, v 4.1. modo de adquisición: Multiple Reaction Monitoring (MRM).
- Paralelamente a la detección de masas, se utilizó un detector de fluorescencia en tándem. Los datos se procesaron con el programa TargetLynx™ Application Manager.

### 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 B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> por UPLC-MS/Ms/ESI+ en el límite de cuantificación, con vista ampliada del espectro de masas de G<sub>2</sub>



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

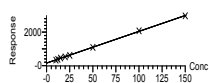


Figura 1. Cromatograma de iones de cuantificación de aflatoxinas B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> (UPLC-MS/Ms/ESI+) y curva de calibración de B1

Tabla 1. Resumen de parámetros de desempeño del método analítico para la cuantificación de aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> 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 <sub>r</sub> $\leq 20\%$	2,22	0,86	2,5	1,19
Precisión intermedia (%)	RSD <sub>R</sub> $\leq 20\%$	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: