

Análisis de microcistinas. Últimos avances analíticos

Cintia Flores, Josep Rivera y Josep Caixach

Laboratori d'Espectrometria de Masses, Dept. d'Ecotecnologies, IIQAB-CSIC,
C/Jordi Girona 18, 08034 Barcelona

En las últimas décadas, las cianobacterias han vuelto a atraer la atención debido a su presencia cada vez más frecuente en aguas superficiales. En aguas eutrofizadas y en condiciones favorables para su crecimiento se observa una proliferación masiva (afloramiento o *bloom*) de cianobacterias de modo similar a los *blooms* de algas marinas conocidos como mareas rojas. Estos *blooms* suelen aparecer de forma periódica debido a que las cianobacterias producen esporas capaces de permanecer varios meses e incluso años en los sedimentos. La aparición de estos *blooms* supone un problema importante para la calidad del agua, no sólo por los problemas de gusto y olor asociados a las cianobacterias, sino porque ciertas especies son capaces de producir toxinas. Las microcistinas son una familia de más de setenta péptidos hepatotóxicos producidos por diferentes géneros de cianobacterias (*Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix-Oscillatoria* y *Nostoc*). Se acepta a priori que con la muerte de la cianobacteria se produce la lisis de sus células y las microcistinas son liberadas al agua. Consciente de ello, la OMS publicó en 1998 un valor guía provisional de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para la microcistina-LR (MC-LR). En este contexto el "R.D. 140/2003 por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano" recoge este mismo valor para las microcistinas, sin especificar para cual/cuales microcistinas o si es un valor total. En la Fig. 1 se muestra la estructura de estos compuestos y en particular de las microcistinas más tóxicas y frecuentes (MC-LR, RR e YR). Todo esto ha provocado un gran aumento del interés sobre la presencia de estos analitos en aguas de abastecimiento, haciendo necesaria la puesta a punto de una metodología analítica fiable que permita su análisis.

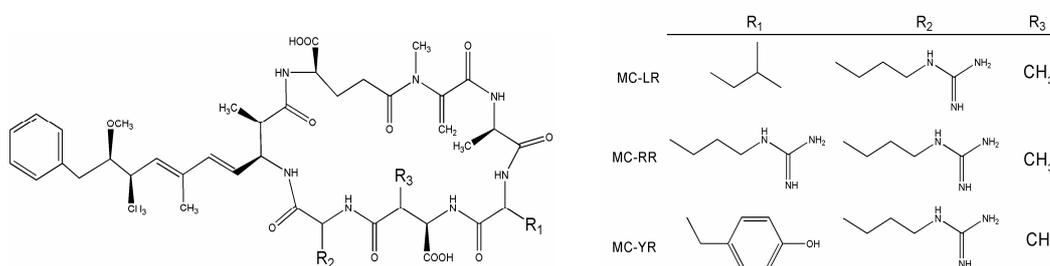


Figura 1. Estructura química de las microcistinas.

En nuestro laboratorio se ha realizado el análisis cualitativo y cuantitativo de las diferentes variantes de microcistina presentes en *blooms* de cianobacterias observadas desde 1998 en aguas continentales de diferentes puntos de la geografía española [1]. En una primera fase del trabajo se puso a punto un método para la determinación de microcistinas por HPLC/UV. Sin embargo, la falta de especificidad de la detección UV, dificulta la identificación de estos compuestos en presencia de interferencias procedentes de la materia orgánica natural del agua. Este inconveniente también es propio de las técnicas biológicas de screening más utilizadas para la detección de microcistinas, el inmunoensayo (ELISA) y el ensayo de inhibición de la protein fosfatasa (PPA). La cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC/MS) permite la separación, identificación y determinación cuantitativa de las diferentes variantes de microcistinas aisladas y caracterizadas. Por ello, en una segunda fase se optimizó el análisis de microcistinas por LC/ESI-MS [2]. Finalmente se ha puesto a punto su análisis por cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC/ESI-MS/MS) [3] para aumentar la especificidad, selectividad y sensibilidad del método analítico. En este trabajo se presenta una comparativa de los resultados obtenidos con cuatro instrumentos diferentes triple cuadrupolo (QqQ) de las casas comerciales habituales en espectrometría de masas (Applied Biosystems, Thermo Electron Corporation, Varian y Waters Micromass MS Technologies). Se han comparado las especificaciones y parámetros de calidad de los cuatro equipos para el análisis de los compuestos objeto de este estudio. Encontrando diferencias significativas en los resultados obtenidos debido a las diferencias existentes entre los QqQ (fuentes de ionización electrospray, geometría de los analizadores de masa cuadrupolares, disposición de la celda de colisión y gas de colisión utilizado).

Actualmente, se está trabajando en la automatización del método de extracción en fase sólida (SPE) on-line acoplado a LC/ESI-MS/MS con el sistema Environmental Quantitation (EQUAN) de Thermo Fisher Scientific. Este sistema consiste en: un inyector automático (HTC PAL de CTC Analytics); dos bombas de líquidos (Surveyor LC Pump Plus y Surveyor MS Pump Plus de Thermo Fisher Scientific); dos columnas, una de pre-concentración para la SPE y una analítica acoplada al triple cuadrupolo TSQ Quantum; y dos válvulas de 6 puertos. En las Figs. 2(a) y 2(b) se puede ver un esquema del sistema y una foto del equipo montado en nuestro laboratorio. Con esta metodología se ha conseguido reducir el volumen de agua a extraer hasta 1 mL, disminuyendo consecuentemente el tiempo de análisis y obteniendo unos límites de detección inferiores a 14 ng L^{-1} para todos los analitos estudiados (nodularina, MC-LR, RR e YR).

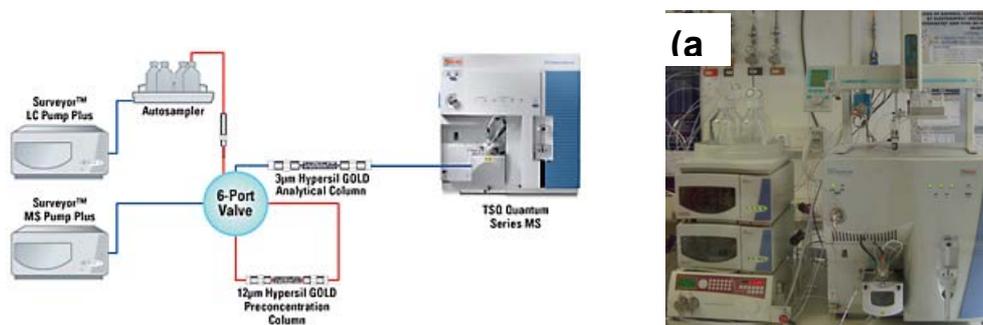


Figura 2. Sistema SPE on-line EQUAN acoplado a LC/ESI-MS/MS.

Agradecimientos

Se agradece a Thermo Fisher Scientific por facilitar la disponibilidad de un sistema de SPE on-line EQUAN en nuestro laboratorio.

Referencias

- [1] Barco, M., C. Flores, J. Rivera, J. Caixach. 2004. Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS. *Toxicon*. 44: 881-886.
- [2] Barco, M., J. Rivera, J. Caixach. 2003. Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1020:103-111.
- [3] Flores, C., J. Rivera, J. Caixach, 2004. Electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry for the analysis of multiple environmental pollutants in water samples. 21st LC/MS Montreux Symposium, 10-12 November 2004, Montreux, Switzerland.