

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA, FACULTAD DE
MEDICINA, UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON,
APDO. POSTAL 1563, MONTERREY, MEXICO.

DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN MAIZ Y PRODUCTOS
DERIVADOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA
RESOLUCION.

* M. Fernández Alonso, R. Rebolledo Castillo y C. Montemayor Gaytán.

RESUMEN

Se presenta un estudio sobre la extracción de aflatoxinas de maíz y productos derivados contaminados, así como su análisis por cromatografía líquida de alta resolución. La extracción se lleva a cabo en un sólo paso moliendo la muestra, empacándola en una columna y percolando cloroformo a través de ella. En esta forma se logran unos porcentajes de recuperación mucho más altos que por los métodos tradicionales. El análisis se efectuó por *cromatografía líquida en fase inversa, y detección por fluorescencia, con formación pre-*via de derivados de las aflatoxinas.

SUMMARY

A study is presented about the extraction and analysis of aflatoxins in contaminated corn and corn products. The extraction is carried out in a single step grounding the sample, packing it in a glass column and pouring chloroform through it. On this way high recoveries are obtained. The quantitation is made by reserve phase H.P.L.C. using fluorescence detection of derivatives of the aflatoxins.

INTRODUCCION

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Aspergillus* que crecen fundamentalmente en semillas y productos gramíneos en condiciones de temperatura y humedad que son frecuentes en muchos almacenes de estos productos. (1 y 2).

El estudio de contaminación de alimentos por aflatoxinas, ha presentado gran interés en estos últimos años por haberse comprobado que son agentes carcinógenos tanto para animales como para seres humanos. (3 y 4).

En la mayoría de los países existen regulaciones respecto al contenido máximo de aflatoxinas que pueden contener los alimentos. Los valores permitidos dependen del país y del tipo de aflatoxina, pero en todos los casos los límites están en el orden de decenas de partes por billón, (Microgramos por kilogramo).

El maíz constituye una de las gramíneas más susceptibles de contaminación por aflatoxinas y siendo una fuente básica de alimentación de América latina, es importante disponer de métodos analíticos confiables para estos contaminantes. El presente estudio fue realizado como base analítica para el desarrollo de un proyecto global encaminado a evaluar los niveles de aflatoxinas existentes en productos de consumo popular.

La extracción y cuantificación de aflatoxinas presenta una especial dificultad por la baja concentración en que se encuentran, por la inestabilidad de estos compuestos y adicionalmente por la presencia en las muestras de multitud de compuestos que pueden interferir tanto en su extracción como en su determinación.

Los métodos existentes para el análisis de aflatoxinas son esencialmente cromatográficos. Los métodos oficiales utilizan cromatografía en capa fina y son en general lentos y de resultados semicuantitativos aunque reproducibles (5). Muy extendidos y populares han sido los métodos de minicolumna, los cuales son muy subjetivos, poco reproducibles y nada cuantitativos (6). Los métodos más fiables son sin duda los de cromatografía líquida de alta resolución, (H.P.L.C.) (7).

Los procedimientos publicados para extracción y limpieza de las aflatoxinas son en general muy largos y con un gran número de etapas de purificación, este es el caso por ejemplo del método oficial de la A.O.A.C. Esta extensa manipulación es causa de pérdidas en los compuestos, inclusive cuando intervienen analistas experimentados y en general los % de recuperación son bajos.

El presente trabajo se encaminó al desarrollo de un método de extracción más rápido, y eficiente que los existentes, que pudiese utilizarse en conjunción con H.P.L.C. para la determinación del contenido de aflatoxinas en productos de maíz.

PARTE EXPERIMENTAL:

APARATOS

Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo Altex modelo 334, con dos bombas y programador de flujos y gradientes. Para la separación se utilizó una columna de fase unida, de Octadecildimetilsilil (C 18), de partículas de 5 micras y 25 cm. de longitud y 4 mm. de diámetro.

La detección se hizo con un detector de fluorescencia marca Varian, Fluorichrom modelo 430020-02 con filtros de excitación y emisión a 365 y 436

mm. respectivamente. Los cromatogramas se obtuvieron en un integrador Al-tex modelo C-RIA. Las determinaciones de purezas de los patrones de aflatoxinas se hicieron en un espectrofotómetro UV-Visible marca Beckman.

MATERIALES Y REACTIVOS

Los patrones de aflatoxinas B₁, G₁, B₂ y G₂ y el ácido Trifluoroacético fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., P.O. Box 14508, St. Louis, USA.

Los solventes usados para cromatografía de líquidos fueron de grado analítico, desgasificados y filtrados previamente a su uso.

PROCEDIMIENTOS:

Determinación de pureza y concentración de los patrones de aflatoxinas:

A los patrones se les efectuaron ensayos de pureza por cromatografía en capa fina, determinación de absortividades molares y relaciones de absorción a distintas longitudes de onda, siguiendo los procedimientos del manual de la A.O.A.C. (5). Asimismo la concentración de los patrones se determinó siguiendo el método espectrofotométrico de la A.O.A.C.

Extracción de Aflatoxinas:

Se toman 50 gramos de muestra, se muelen hasta que pasen una malla 14, a continuación se empaican en una columna de vidrio y se percola cloroformo a través de la muestra hasta recoger exactamente 100 ml.

Derivación con ácido Trifluoroacético:

Se toman 5 ml. del extracto del apartado anterior y se llevan a sequedad haciendo pasar sobre el recipiente una corriente de nitrógeno. Una vez seca la muestra se le añaden 0.1 ml. de ácido trifluoroacético, se lleva de nuevo a sequedad con nitrógeno y se diluye a continuación hasta un volumen de 10 ml. con una mezcla de Metanol-agua (10:90).

Separación y análisis por cromatografía de líquidos:

Se inyectan 20 microlitros de la solución de muestra derivada en la columna cromatográfica e instrumento previamente descritos. Como fase móvil se utilizó una mezcla Metanol-agua (45:55) a un flujo de 1 ml./minuto.

RESULTADOS Y DISCUSION:

Extracción de las aflatoxinas:

Para llevar a cabo la extracción se evaluó originalmente el método oficial de la A.O.A.C., para ello se tomaron muestras de maíz en buen estado de conservación, que dieron ensayos negativos de aflatoxinas, se contaminaron con niveles conocidos de las 4 aflatoxinas B₁, B₂, G₁ G₂ y se procedió a extraerlas

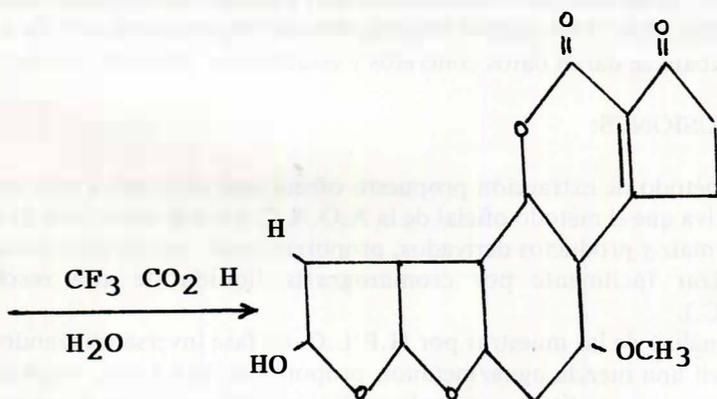
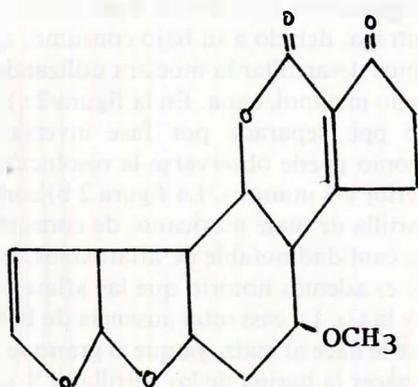
por el método oficial. Los extractos se analizaron por cromatografía de líquidos, encontrándose resultados muy bajos aunque reproducibles (recuperación inferior al 30% de las aflatoxinas añadidas). En vista de estos resultados se procedió a examinar paso por paso el método con la intención de localizar dónde se perdían las aflatoxinas y tratar de modificar algún paso. Al hacer esta búsqueda encontramos pérdidas en varios pasos especialmente, retenciones en la tierra de diatomáceas y en la columna de gel de sílice.

Al encontrar tan bajos resultados en el método de la A.O.A.C. se hicieron ensayos con diferentes solventes y adsorbentes, hasta llegar al método de extracción directa del aceite con cloroformo sobre una columna empacada, descrito en los procedimientos. Efectuando la extracción en la forma aquí propuesta las recuperaciones son muy eficientes y los otros compuestos extraídos junto con las aflatoxinas no interfieren posteriormente durante el proceso cromatográfico. En la tabla I se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para cada una de las aflatoxinas por el método propuesto, como pueden observarse oscilan entre el 85% y 95%, los cuales son muy satisfactorios, teniendo en cuenta el bajo nivel en que se encuentran estas toxinas.

La figura 1 muestra comparativamente el cromatograma de la misma muestra de maíz contaminada con un total de 20 ppb, extraída por el método aquí propuesto y por el método de la A.O.A.C. La superioridad del método propuesto para la extracción es evidente al comparar los cromatogramas.

Preparación de la muestra y análisis por cromatografía líquida de alta resolución:

Las aflatoxinas absorben en la región del U.V. cercano y por ello pudieron detectarse con un espectrómetro UV-Visible a la salida de la columna, sin embargo los límites de detección con esta técnica son del orden de los nanogramos y son demasiado altos para las cantidades que normalmente se encuentran presentes en la muestra inyectada donde suele haber del orden de decenas de picogramo. Por ello se hace imprescindible una técnica de detección más sensible, siendo fluorescencia actualmente la única elección. Las aflatoxinas B₂ y G₂ son altamente fluorescentes, sin embargo la B₁ y G₁ lo son en menor medida, pero mediante un procedimiento de derivación consistente en hidratar el doble enlace furánico de estas aflatoxinas, utilizando ácido Trifluoroacético como catalizador, se obtienen productos mucho más fluorescentes y susceptibles de detección en muy bajas concentraciones. La reacción de derivación es la siguiente:



Las aflatoxinas B₂ y G₂ son inertes a esta reacción por no tener enlaces fu-ránicos.

Los límites de detección de las aflatoxinas B₂ y G₂ y de los derivados fluo-rescentes de B₁ y G₁ son del orden de un picogramo por lo que la detección por fluorescencia es la recomendable para este tipo de análisis.

La casi totalidad de los trabajos sobre aflatoxinas por H.P.L.C. utiliza mezclas de acetonitrilo/agua como fase móvil; dado el alto costo del acetonitrilo y las demoras en entrega, debido a su bajo consumo, que existen en muchas localidades, decidimos desarrollar la muestra utilizando una mezcla más barata y asequible tal como metanol/agua. En la figura 2 a) se presenta el cromatograma total de 35 ppb separada por fase inversa con una mezcla metanol/agua (45:55), como puede observarse la resolución es excelente y el tiempo de análisis es inferior a 8 minutos. La figura 2 b) corresponde al análisis de una muestra de tortilla de maíz mexicano, de consumo popular, en dicha muestra aparece una cantidad notable de aflatoxinas, superior a los límites permitidos (20 ppm); es además notorio que las aflatoxinas presentes son fundamentalmente la B₂ y la G₂. La casi total ausencia de B₁ y G₁ puede ser debida al tratamiento que se le hace al maíz, ya que el grano se muele y se le trata en caliente con cal para hacer la harina de las tortillas.

En la tabla 2 se presentan los resultados de la aplicación de los métodos aquí propuestos a diferentes muestras. Cabe destacar que la mayoría de las muestras de maíz en grano analizadas hasta ahora en nuestro laboratorio presentan un contenido de aflatoxinas muy superior al límite permitido. Sin embargo en los productos derivados de consumo humano, el contenido disminuye considerablemente y en general están dentro de rangos aceptables. En un posterior trabajo se darán datos concretos y estadísticos de dichos valores.

CONCLUSIONES:

El método de extracción propuesto ofrece una alternativa más rápida y cuantitativa que el método oficial de la A.O.A.C. para la extracción de aflatoxinas de maíz y productos derivados, proporcionando un extracto que se puede analizar fácilmente por cromatografía líquida de alta resolución (H.P.L.C.).

El análisis de las muestras por H.P.L.C. en fase inversa utilizando como fase móvil una mezcla agua/metanol, proporciona una buena resolución de las aflatoxinas en un tiempo corto de análisis y con las ventajas de ser los reactivos de bajo costo y muy accesibles.

La fluorescencia como propiedad analítica de detección de las aflatoxinas es más sensible que la absorción U.V.-Visible y permite detectar los bajos niveles en que normalmente se encuentran efectuando una rápida derivación de la muestra previamente a su análisis.

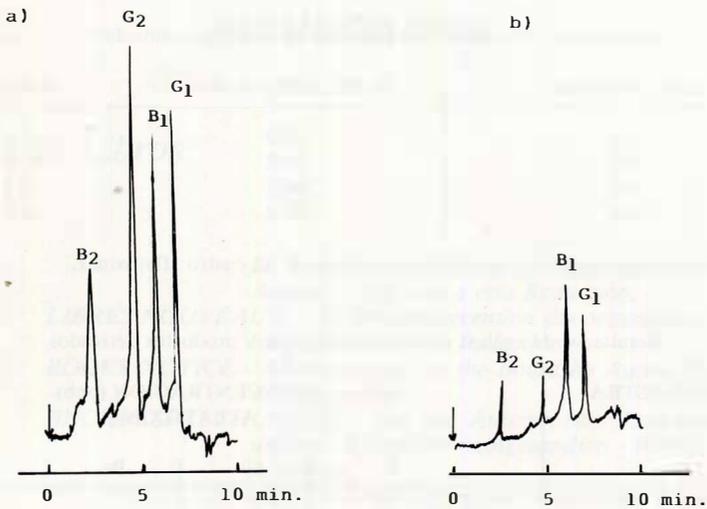


Fig. 1.- Cromatogramas de muestra de maíz contaminada con 20 ppb totales de aflatoxinas. a) Muestra extraída por elución directa con cloroformo. b) Muestra extraída por el método oficial de la A.O.A.C.

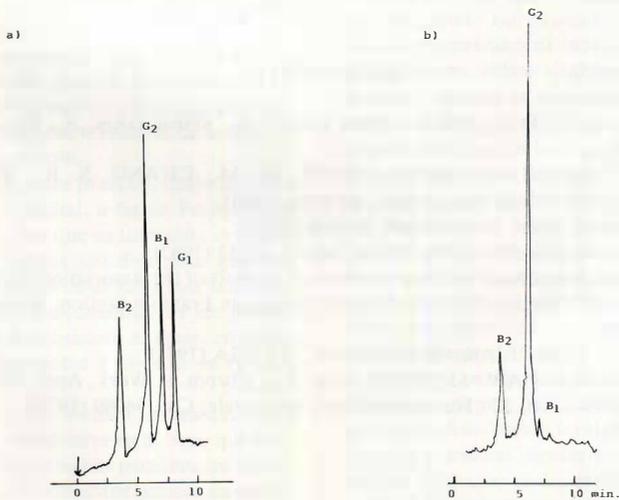


Fig. 2.- a) Cromatograma de mezcla patrón de aflatoxinas (35 ppb en total). b) Cromatograma de muestra de maíz preparada y analizada según el método propuesto en el trabajo.

Tabla I.- Recuperación de aflatoxinas extraídas de maíz contaminado*.

AFLATOXINA	% RECUPERACION	RANGO
B1	89.0	± 6.0
G1	95.2	± 5.7
B2	84.3	± 5.9
G2	85.2	± 5.1

*Resultados de cinco repeticiones con 20 ppb totales de las cuatro aflatoxinas.

Tabla II.- Resultados de análisis de muestras de maíz y productos derivados.

TIPO DE MUESTRA	CONCENTRACION (ppb) AFLATOXINA			
	B1	G1	B2	G2
MAIZ A	100	56	33	14
MAIZ B	87	13	8	9
ALIMENTO INFANTIL	TRAZAS	---	---	---
TORTILLA DE MAIZ A	2	TRAZAS	40	86
TORTILLA DE MAIZ B	1	---	13	28

BIBLIOGRAFIA

- (1) NESBITT, B. F., O'KELLY, J., SARGEANT, K., SHERIDAN, A., Nature, 195:1062 (1962).
- (2) ASAO, T., BUCHI, G., ABDEL-KADER, M. M., CHANG, S. B., WICK, E. L., EOGAN, G. N. J. Am. Chem. Soc., 85:1706 (1963).
- (3) DEGER, G. E., Ann. of Int. Med., 85:204 (1976).
- (4) GREEN, C. E., Rice O.N., Fd. Chem. Toxic., 20:53 (1982).
- (5) HORWING, W., editor, "Official Methods of analysis of the Association of official Analytical Chemist", Seccion 26. P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington, D.C. 20044. 1980.
- (6) HOLADAY, C. E., J. Am. Oil Chem. Soc., 58:927A (1981).
- (7) JOHNSON, E. L. y ABU-SHUMAY, S. A., Liq. Chrom. at Work, Appl. Note 48, Varian Instrument Division, 220 Humboldt Court, Sunnyvale, Cal. 94089 (1977).