

SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ E G₂ POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO *

Myrna SABINO **
Maria Ângela P. ZORZETTO **

RIALA6/579

SABINO, M. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e quantificação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):101-108, 1984.

RESUMO: É descrito um método para determinação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por cromatografia líquida de alta resolução. As aflatoxinas foram extraídas, cromatografadas em coluna de fase reversa, e detectadas no ultravioleta a 350 nm. Nos testes efetuados, a recuperação variou de 92 a 106%. O método foi aplicado em dez amostras de farelo de amendoim e em amendoim em grão. O limite de detecção foi de 2 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

DESCRIPTORIOS: aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, determinação; amendoim, farelo de amendoim, determinação de aflatoxinas; cromatografia líquida de alta resolução.

INTRODUÇÃO

Cromatografia líquida de alta resolução (CLAR) está sendo usada para separação e quantificação de aflatoxinas em vários tipos de alimentos, tais como grãos^{6,9}, amendoim e pasta de amendoim^{2,7}, milho¹¹, vinhos¹² e em culturas de fungos^{10,12}. Isto porque esta técnica veio solucionar diversos problemas analíticos por apresentar maior velocidade de análise, maior resolução e maior sensibilidade⁵.

Durante a última década, a pesquisa de aflatoxinas em produtos agrícolas tem sido expandida para várias espécies. O método analítico empregado tem sido a cromatografia em camada delgada, que se baseia na separação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em placas de sílica gel, quantificadas por comparação visual da intensidade de fluorescência das manchas da amostra e padrão, ou por fluordensitometria do cromatograma¹.

Essas técnicas são sensíveis; entretanto, o recente avanço em CLAR mostrou que melhor separação e quantificação podem ser obtidas por esta última técnica^{4,10}.

Os métodos disponíveis para determinar aflatoxinas por CLAR, referidos na literatura, são abundantes e a maioria deles utiliza como detetor a fluorescência.

O método por nós proposto é uma combinação da técnica de PREGNOLATTO & SABINO⁸, com modificação na extração, utilizando CLAR com detetor ultravioleta a 350 nm. As aflatoxinas são resolvidas por cromatografia líquida de fase reversa (RP 18, tendo como fase móvel acetonitrila — água (35 + 65%).

O objetivo de nosso trabalho foi estabelecer e padronizar uma técnica por CLAR para separar e determinar as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, visto que oferece as vantagens de velocidade, boa resolução, precisão, e sensibilidade.

MATERIAL

Foram utilizadas dez amostras de amendoim e de farelo de amendoim para testar o método.

* Realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Solventes

Metanol p.a.
Clorofórmio p.a.
Solução de cloreto de sódio a 4%
Hexano p.a.
Metanol Lichrosolv
Acetonitrila Lichrosolv

Água destilada, filtrada em filtro *Millipore* em membrana filtrante de 0,8 μ de poro (47 mm de diâmetro) ref. AAWP, 04700.

Soluções-padrão das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ em metanol Lichrosolv

Fase móvel

A — água destilada
B — acetonitrila + metanol (3 + 2)

sendo $\begin{cases} A = 65\% \\ B = 35\% \end{cases}$

Aparelho

Cromatógrafo automático líquido de alta resolução, com injetor automático (variável), mod. 1084 A, com sistema gradiente, acoplado com detetor variável, U.V., visível, H.P., mod. 1030 B, com programador mod. 79850 A-LC, terminal HP

Coluna: Lichrosorb RP 18 — 10 um (Merck)

Frasco: de 2 ml HP

MÉTODO

A determinação das aflatoxinas envolve as seguintes operações:

a) Preparo da amostra

Descascar (se for o caso) e triturar a amostra. Proceder a uma perfeita homogeneização da mesma.

b) Extração das aflatoxinas

Pesar 30 g da amostra e transferir para um frasco Erlenmeyer de 250 ml com tampa esmerilhada. Adicionar à amostra 10 ml de água e homogeneizar com bastonete de vidro; adicionar 100 ml de clorofórmio, fechar o frasco e agitar violentamente durante 30 segundos. Continuar agitando em agitador mecânico por 30 minutos ou mais. Filtrar o extrato em papel de filtro Whatman n.º 1 ou equivalente. A filtração de certos materiais, particularmente amendoim, pode ser muito lenta e difícil. Para evitar este problema, é conveniente filtrar através de uma camada de terra diatomácea, tal como "Celite". Minimizar a evaporação do clorofórmio cobrindo o funil com vidro de relógio e folha de papel de alumínio. Evaporar o filtrado até o resíduo. Dissolver este resíduo em 50 ml de metanol p.a., transferir para funil de

separação de 500 ml. Adicional 50 ml de cloreto de sódio a 4% e agitar. Extrair com 3 porções de 50 ml de hexano cada para remover a gordura. Desprezar o hexano. Extrair com duas porções de 50 ml de clorofórmio. Evaporar o extrato clorofórmico até o resíduo. Transferir o resíduo quantitativamente com clorofórmio para frasco de 2 ml, evaporar sob gás de nitrogênio até resíduo. Guardar em geladeira, sob proteção da luz, até o momento de usar.

c) Cromatografia líquida de alta resolução

Dissolver o resíduo obtido e transferir para o frasco do próprio aparelho com 2 ml de metanol Lichrosolv. Injetar esta solução no cromatógrafo para identificação e quantificação das aflatoxinas.

Programação de operação-coluna (RP 18)

Fase móvel acetonitrila-metanol (3+2)
— água (35+65%)

Detetor: U.V. (350 nm)

Fluxo: 2,0 ml/minuto

Injeção: 50 μ l

Sensibilidade: 0,05

Atenuação: ATTN 2

Temperatura do forno: ambiente

As aflatoxinas são detectadas por absorção no U.V. a 350 nm, e quantificadas pela área dos picos obtidos comparada à área dos picos das soluções-padrão.

As aflatoxinas são detectadas por absorção no U.V. a 350 nm, e quantificadas pela área dos picos obtidos comparada à área dos picos das soluções-padrão, segundo a fórmula:

$$\frac{A_x \times X \times C_s \times V_s \times X \times S_D}{A_s \times X \times V_x \times X \times W} = \text{aflatoxinas } (\mu\text{g/kg})$$

A_x = área integrada da aflatoxina (B₁, B₂, G₁, G₂)

C_S = concentração da aflatoxina-padrão ($\mu\text{g/ml}$)

V_s = μl da solução-padrão injetada

S_D = diluição final do extrato da amostra em μl

A_s = área integrada da solução-padrão

V_x = μl do extrato da amostra injetada

W = peso da amostra representado pelo volume do extrato utilizado por CLAR

RESULTADOS

As 4 aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram resolvidas por CLAR em 15 minutos e detectadas no U.V. a 350 nm. Os 4 compostos

puderam ser medidos com boa resolução e precisão.

Inicialmente foi injetada, no cromatógrafo, cada uma das aflatoxinas-padrão a fim de ser determinado o tempo de retenção (TR), como está demonstrado na tabela 1 e figuras 3 e 4. Posteriormente, foi injetada a mistura das aflatoxinas-padrão (fig. 1).

O método foi avaliado em amostras de farelo de amendoim (fig. 5) e em amendoim em grão; os resultados estão na tabela 2. Testes de recuperação foram efetuados, variando esta de 92 a 106%. Tanto a amos-

tra como os padrões foram dissolvidos em metanol Lichrosolv e o pico do solvente não interferiu no TR de cada uma das aflatoxinas analisadas (fig. 2).

A precisão de resolução e quantificação por CLAR foi determinada por múltiplas injeções das soluções-padrão e do extrato das amostras. O tempo de retenção e área dos picos foram calculados por integração eletrônica. Não houve problemas de interferência, pois outros picos existentes nas amostras não apresentavam o mesmo TR das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ ou G₂.

TABELA 1

Tempo de retenção das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

Aflatoxina	RT*	Média
B ₁	10 min 70 s	10 min 74 s
	10 min 79 s	
B ₂	8 min 59 s	8 min 54 s
	8 min 49 s	
G ₁	7 min 57 s	7 min 56 s
	7 min 54 s	
	7 min 58 s	
G ₂	6 min 10 s	6 min 05 s
	6 min 09 s	

* RT = tempo de retenção.

TABELA 2

Quantificação das aflatoxinas analisadas (µg/kg)

Amostras	Aflatoxina (µg/kg)			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1. ^a — Farelo de amendoim	448	310	235	299
2. ^a — Farelo de amendoim	193	N.D.*	N.D.*	430
3. ^a — Amendoim em grão	605	530	633	766

* N.D. = não aparecimento do pico no cromatograma.

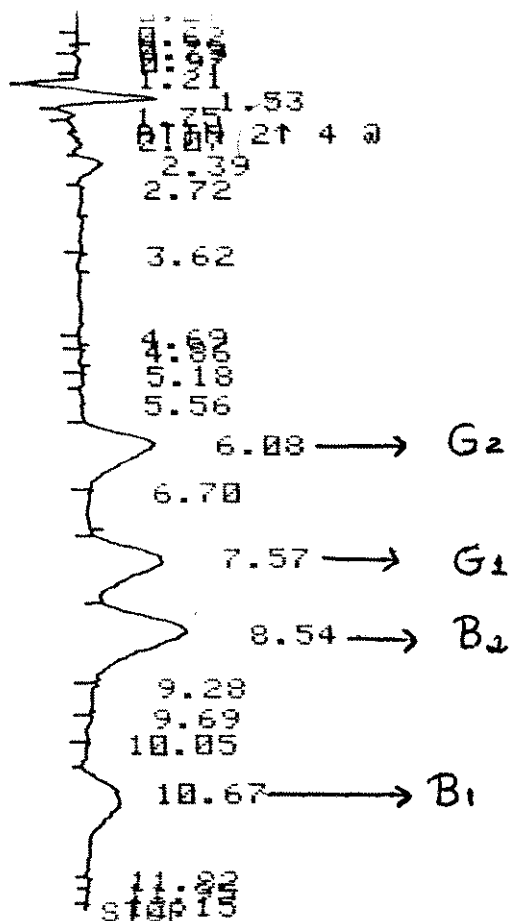


FIGURA 1 — Separação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

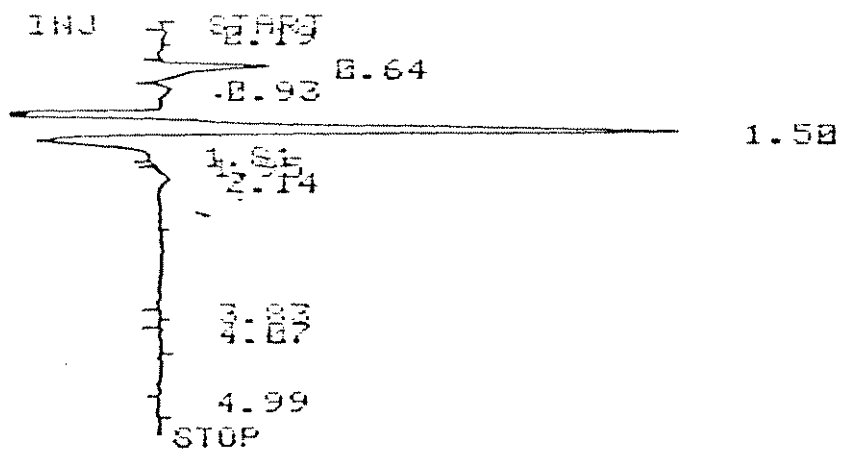


FIGURA 2 — Cromatograma do solvente (metanol).

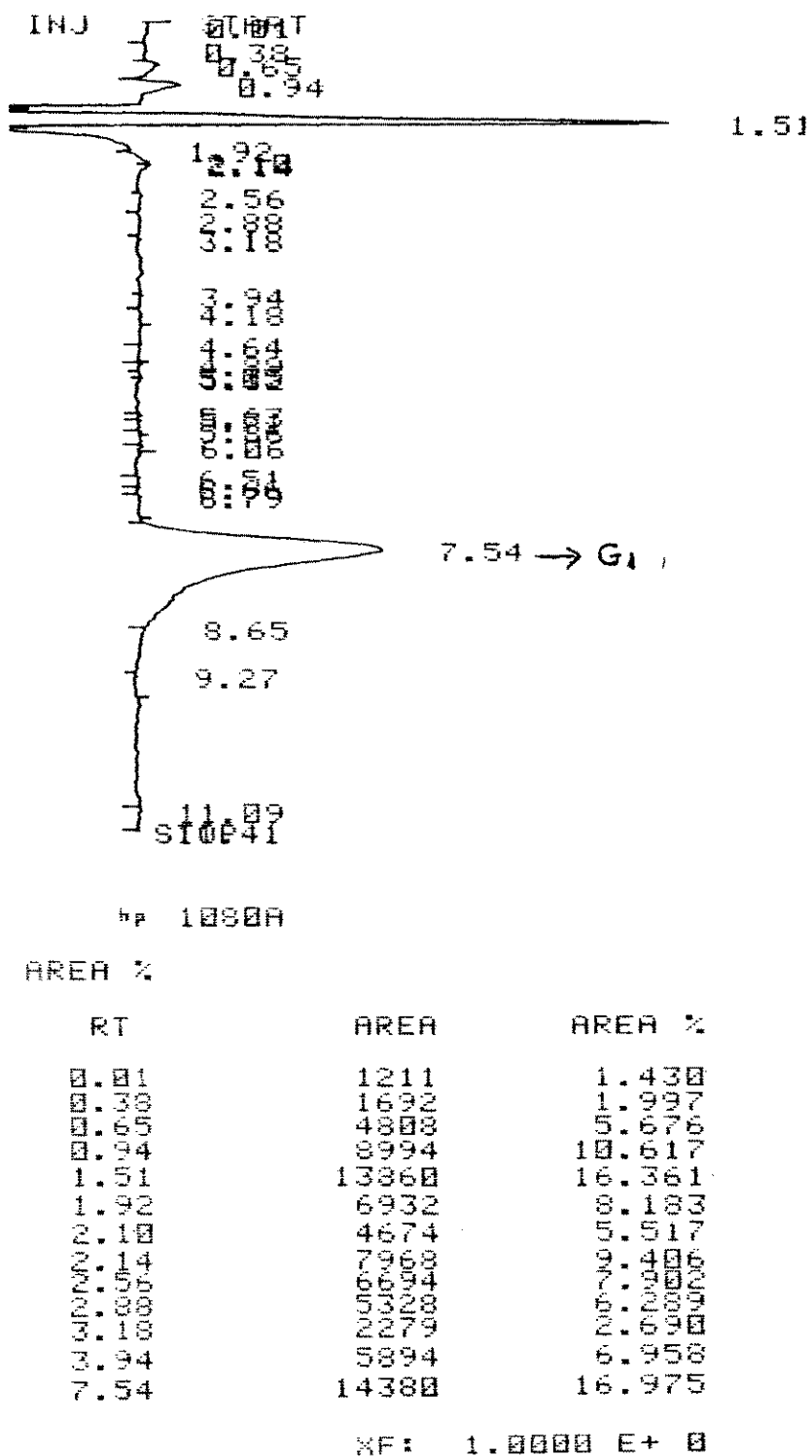
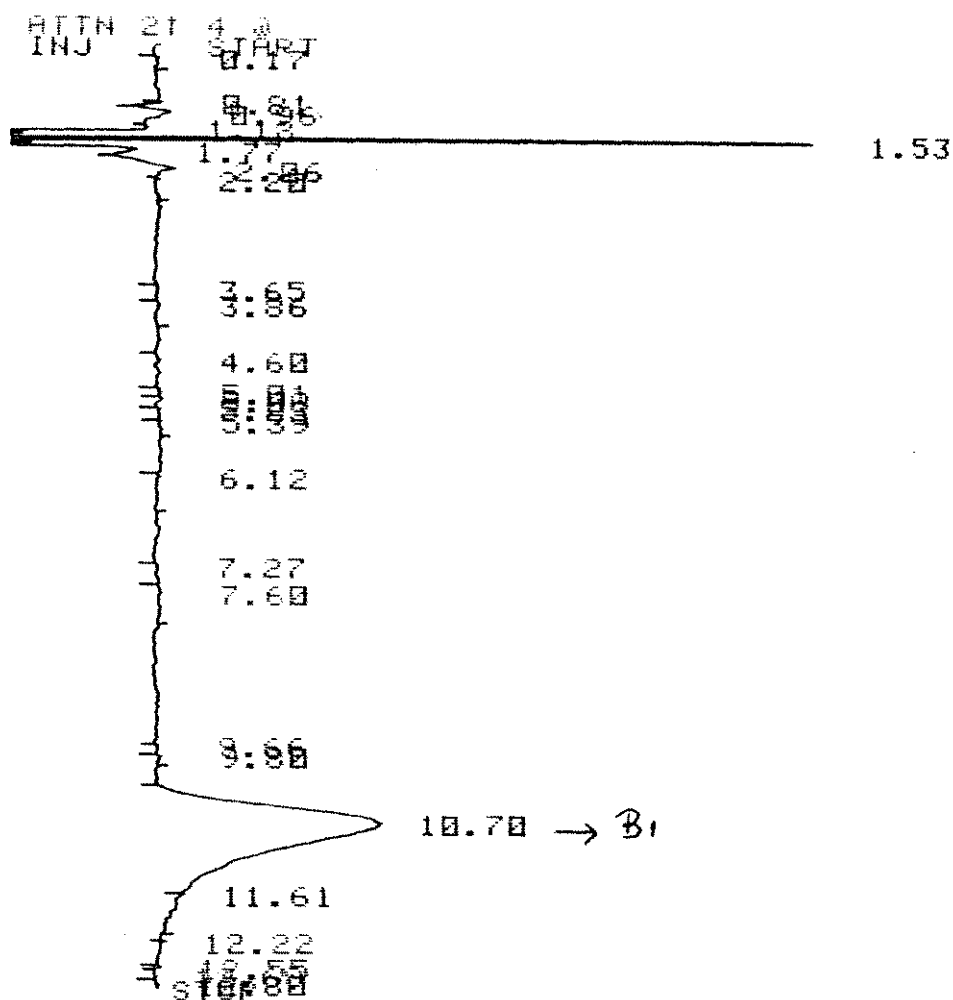


FIGURA 3 — Cromatograma da aflatoxina G₁ padrão.



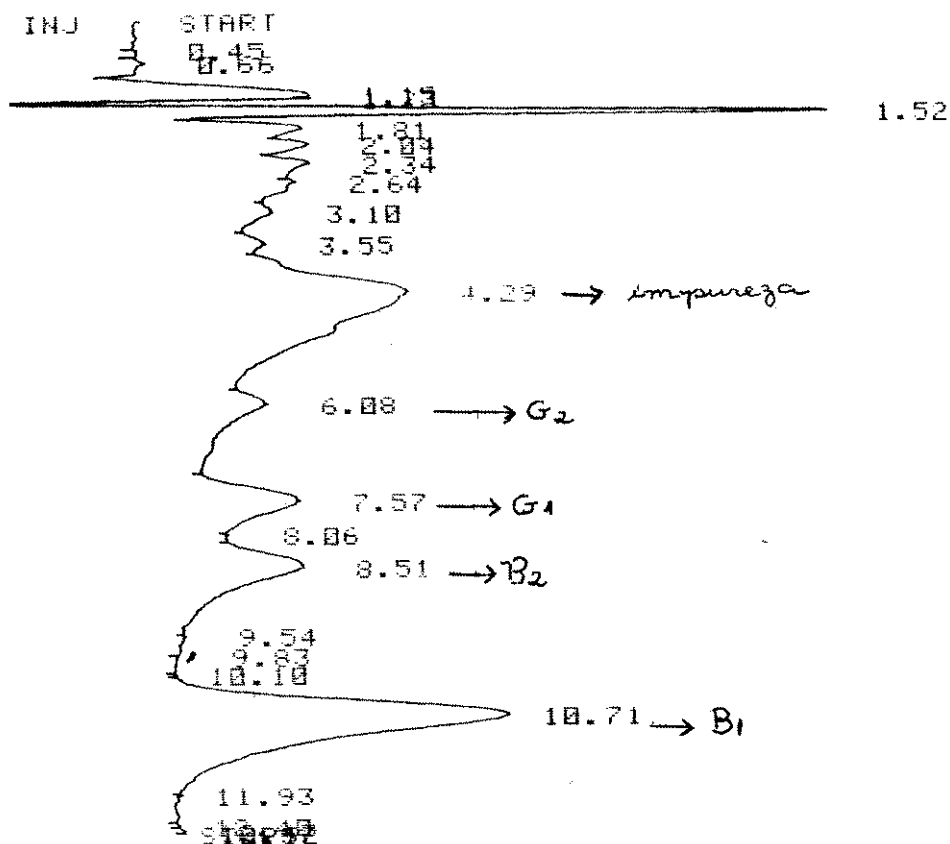
hp 10800

AREA %

RT	AREA	AREA %
0.96	4817	10.510
1.18	3490	7.615
1.53	16420	35.827
1.77	2881	6.286
2.06	2924	6.380
10.70	15300	33.383

XF: 1.0000 E+ 0

FIGURA 4 — Cromatograma da aflatoxina B₁ padrão



hp 1080A

AREA %	RT	AREA	AREA %
0.493	0.45	1645	0.493
0.133	0.55	2004	0.133
0.500	1.19	2100	0.500
5.190	1.81	17030	5.190
2.765	2.04	9230	2.765
2.013	2.34	6690	2.013
3.607	2.64	12040	3.607
3.640	3.10	12150	3.640
3.930	3.55	13120	3.930
3.047	4.29	10170	3.047
22.790	6.08	76100	22.790
10.656	7.57	35570	10.656
8.238	8.06	27500	8.238
0.380	8.51	1267	0.380
11.021	8.51	36790	11.021
2.512	9.54	8386	2.512
1.478	9.83	4935	1.478
0.305	10.10	1017	0.305
14.368	10.71	47960	14.368

XF: 1.0000 E+ 0

FIGURA 5 — Cromatograma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

DISCUSSÃO

Alguns autores preferem a detecção das aflatoxinas por fluorescência, por ser muito mais sensível do que por absorção no ultravioleta. NESHEIM³ relatou que quando empregou detector ultravioleta em CLAR obteve bons resultados com 2 — 10 ng das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por injeção. Posteriormente, através do uso de fluorescência como detector, quantificou, na concentração de 0,2 ng, as aflatoxinas B₂ e G₂ diretamente, e B₁ e G₁, após conversão para B₂ e G_{2a}.

CONCLUSÃO

Os resultados foram considerados bons, reproduzíveis, apesar de ter sido utilizado como detector o ultravioleta. O limite de detecção foi de 2 ppb.

O método CLAR foi satisfatório. Não se justifica porém a substituição da cromatografia em camada delgada, que produz bons resultados e não requer equipamento e acessórios de alto custo, por CLAR que está fora de nossa realidade.

RIALA 6/579

SABINO, M. ZORZETTO, M.A.P. — A method for the separation and determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ by high-performance liquid chromatography. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):101-108, 1984.

ABSTRACT: A method for determining aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ through high-performance liquid chromatography is described. The aflatoxins were extracted and passed through a reverse-phase chromatography with detection in the ultraviolet spectrum at 350 nm. Recoveries of 92 to 106% were obtained. The method was employed in ten samples of peanut flour. The detection limit was 2 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

DESCRIPTORS: aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂, determination; peanut, peanut flour, determination of aflatoxins; high-performance liquid chromatography, use for determining aflatoxins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12nd ed. Washington, AOAC, 1975. p. 467-471.
2. HURST, W.J. & TOOMEY, P.B. — Determination of aflatoxins in peanut products using reverse phase HPLC. *J. Chromatogr. Sci.*, 16:372-6, 1978.
3. NESHEIM, S. — Methods of aflatoxin analysis. In: MATERIALS RESEARCH SYMPOSIUM, 9th, Gaithersburg, Md., 1978. *Trace organic analysis: a new frontier in analytical chemistry*. Proceedings, edited by H.S. Hertz & S.N. Shesler, Washington, D.C., National Bureau of Standards, 1979. p. 355-72. (NBS special pub. 519)
4. PANALAKS, T. & SCOTT, P.M. — Sensitive silica gel-packed flowcell for fluorometric detection of aflatoxins by high-pressure liquid chromatography. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:583-9, 1977.
5. PONS, W.A., Jr. — Resolution of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ by high-pressure liquid chromatography. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 59:101-5, 1976.
6. PONS, W.A., Jr. & FRANZ, A.O., Jr. — High performance liquid chromatography of aflatoxins in cottonseed products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:89-95, 1977.
7. PONS, W.A., Jr. & FRANZ, A.O., Jr. — High pressure-liquid chromatographic determination of aflatoxins in peanut products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 61:793-800, 1978.
8. PREGNOLATTO, W. & SABINO, M. — Pesquisa e dosagem de aflatoxina em amendoim e derivados e em outros cereais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:65-71, 1970.
9. RAO, G.H.R. & ANDES, M.W. — Aflatoxin detection by high-speed liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 84:402-6, 1973.
10. SEIBER, J.N. & HSIEH, D.P.H. — Application of high-speed liquid chromatography to the analysis of aflatoxins. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 56:827-30, 1973.
11. SEITZ, L.M. — Comparison of methods for aflatoxin analysis by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 104:81-9, 1975.
12. TAKAHASHI, D.M. — High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in wines and other liquid products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:799-804, 1977.

Recebido para publicação em 8 de fevereiro de 1984.