

Análisis y cuantificación de micotoxinas en cereales utilizando MRM^{HR}

En el sistema SCIEX X500R QTOF con SCIEX OS Software

Yang Zong¹, Cheng Haiyan¹, Zhong Hongjian², Li Lijun¹, Jin Wenhai¹, Phil Taylor³

¹SCIEX, China; ²Henan Academy of Agricultural Sciences; China; ³SCIEX, UK

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos en condiciones favorables que pueden causar enfermedades agudas y crónicas en humanos y animales.¹ Las micotoxinas más comunes que amenazan la salud humana incluyen aflatoxina (AF), desoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA), fumonisina (FB), zearalenona (ZEN) y toxina T-2 (T2),² que se encuentran ampliamente en muchos granos, aceites, y sus productos. Hasta la fecha, muchos países y regiones han establecido límites estrictos de micotoxinas³ y China ha revisado su Ley de Seguridad Alimentaria en 2015 para incluir explícitamente biotoxinas en contaminantes de gran preocupación por primera vez. China también ha establecido límites para las micotoxinas como el deoxinivalenol (DON), la zearalenona (ZEN), la aflatoxina B1 (AFB1) y la ocratoxina (OTA); por ejemplo, el estándar estatal de seguridad alimentaria para cereales establece el límite para ZEN en 60 µg / kg, aflatoxina B1 (AFB1) en 5-20 µg / kg y OTA en 5 µg / kg.⁴



Las condiciones climáticas anormales y los daños causados por insectos han causado una gran contaminación del grano por micotoxinas en los últimos años, lo que ha provocado daños graves y enormes pérdidas. Como ejemplo, en China, 31 millones de toneladas de grano están contaminadas con micotoxinas anualmente durante la producción, el almacenamiento y el transporte; esto representa aproximadamente el 6.2% de la producción total de granos. Los métodos de detección de micotoxinas rápidos, de alto rendimiento y altamente precisos con pretratamiento de muestra simple son críticos para garantizar la calidad y la seguridad de los suministros de granos, fortalecer el monitoreo de micotoxinas en los granos y proteger la salud humana y animal.

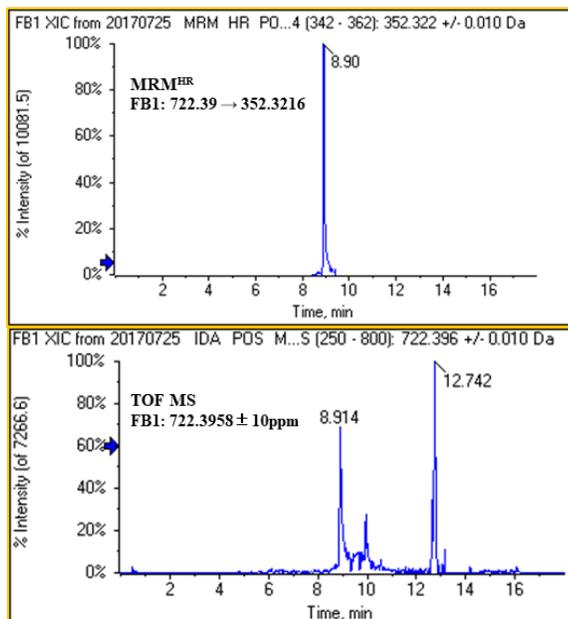


Figura 1. Comparación de la selectividad entre Scheduled MRM^{HR} contra TOFMS para AFB1. Se demuestra una mayor selectividad al monitorear la transición de iones usando MRM^{HR} en comparación con el monitoreo únicamente del ion precursor objetivo y se reduce el potencial de falsos negativos o la integración incorrecta de picos de la matriz.

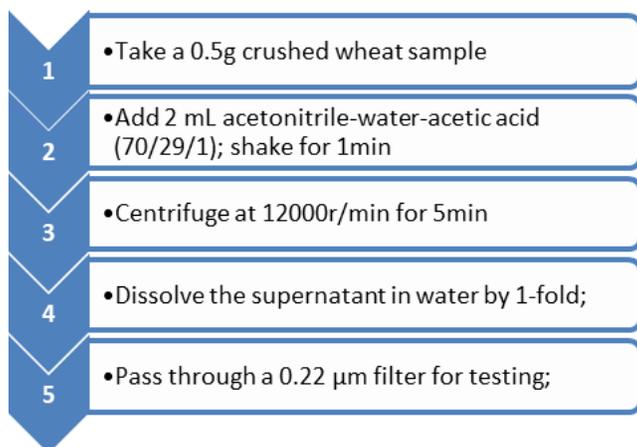
Ventajas Principales de MRM^{HR} para Micotoxinas

- El pretratamiento de la muestra es simple y rápido, solo 10 minutos desde la preparación de la muestra hasta la prueba
- Quince micotoxinas comunes se incluyen en el panel, utilizando la biblioteca espectral MS/MS de alta resolución para identificación sin productos de referencia
- El uso del flujo de trabajo MRM^{HR}, con programación del tiempo de retención, parámetros optimizados de MS y MS/MS de alta resolución reducen las interferencias de la matriz y aumentan la reproducibilidad y precisión del método
- El método se aplica fácilmente, ahorrando tiempo y costos de desarrollo

Métodos

Preparación de la muestra: este método de preparación de la muestra es simple, rápido y es adecuado para trigo, maíz, arroz y sésamo; Se recolectó un total de 10 muestras de granos de diferentes regiones de producción. El flujo de trabajo de preparación de la muestra se describe en la Figura 2.

Figura 2. Flujo de trabajo de preparación de muestra .



Análisis LC-MS/MS: Después del procesamiento, las muestras se inyectaron en un sistema de ExionLC™ acoplado a un sistema SCIEX X500R QTOF LC-MS/MS. La separación cromatográfica se optimizó para proporcionar la mejor separación e ionización de las micotoxinas. El análisis de espectrometría de masas se realizó utilizando ionización por electrospray positiva y negativa. La información del compuesto se ingresó utilizando el Editor de métodos MRM^{HR} importando las tablas de métodos⁵ que contienen el precursor m/z y los tiempos de retención, m/z para 5 iones de fragmentos, así como configuraciones específicas de MS, como el potencial de reducción (DP) y la energía de colisión (CE). La ventana Importar y Autocompletar se muestra en la Figura 3.

Procesamiento de datos: los datos se procesaron con el software SCIEX OS. Los cromatogramas de iones extraídos después de la adquisición se generaron usando una ventana de extracción de ± 10 ppm.

Flujo de trabajo MRM^{HR} dirigido

El sistema X500R QTOF puede realizar un flujo de trabajo cuantitativo dirigido similar a un sistema de triple cuadrupolo, donde el ion precursor del analito objetivo está aislado y fragmentado para el análisis a través del tiempo de retención esperado del analito. Con el flujo de trabajo MRM^{HR}, se recopila una exploración completa MS/MS a alta resolución en los iones de fragmentos que permite generar cromatogramas de iones de

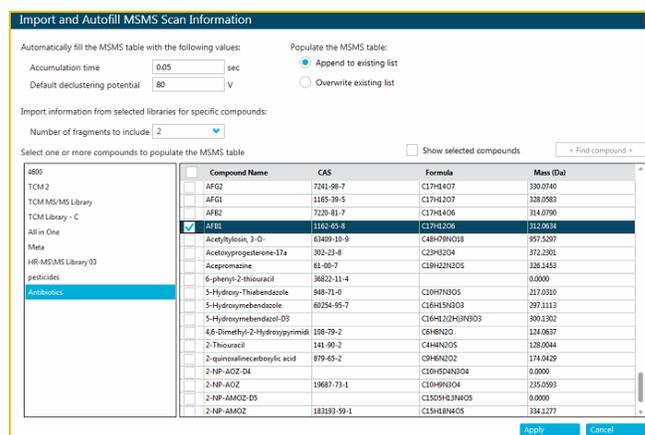


Figura 3. Importar y autocompletar información de exploración MS/MS. Interfaz simple para agregar información compuesta detallada en el método específico.

extracción de alta resolución después de la adquisición, proporcionando especificidad y sensibilidad.

Optimización de fase móvil

La comparación de la influencia de las fases móviles con diferentes proporciones de modificador en la ionización de varias micotoxinas muestra que el acetato de amonio causa un aumento de señal más obvio que el formiato de amonio, mientras que una menor concentración de sal (2 mmol / L de acetato de amonio) tiene un efecto más fuerte que las concentraciones más altas. (5 mmol / L y 10 mmol / L). FB1 y FB2 muestran un fuerte efecto sobre la producción de señal cuando se agrega ácido fórmico. Finalmente, se seleccionó un eluyente acuoso débil que contenía ácido fórmico y poca sal como la fase móvil A.

Selección de iones objetivo

Este estudio optimiza los efectos de los iones aductos de varias toxinas de manera detallada. Por ejemplo, la toxina T-2 tiene picos para aductos de hidrógeno, amonio y sodio; dado que el pico de sodio no es frágil, este estudio comparó los picos de aductos de hidrógeno y amonio y descubrió que la señal del pico de amonio era 30 veces mayor que la del pico protonado (Figura 5). Además, los efectos del aducto de ácido fórmico en NIV y DON fueron mayores que los de los picos de deshidrogenación (Figuras 4 y 5).

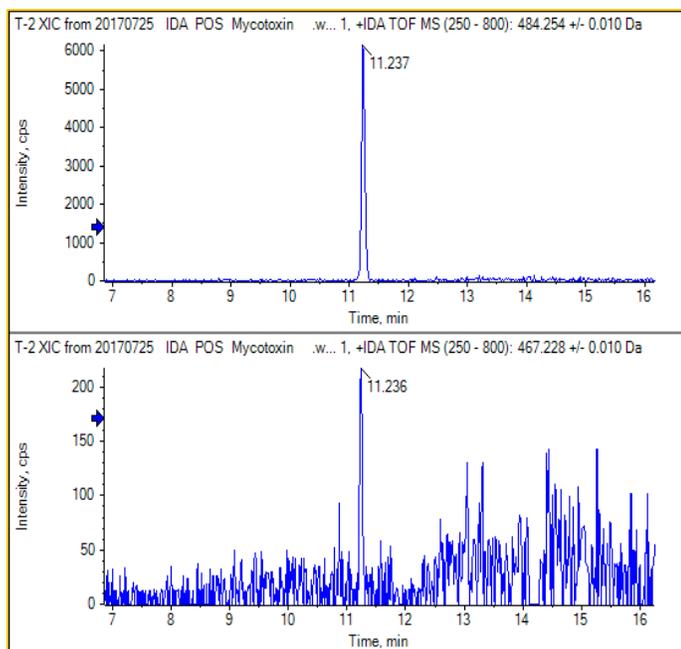


Figura 4. Estudios de optimización de fase móvil. Se muestran los cromatogramas de T-2 bajo diferentes pruebas de cromatografía. El aducto de amonio (arriba) produjo una señal absoluta mayor frente al precursor protonado (abajo).

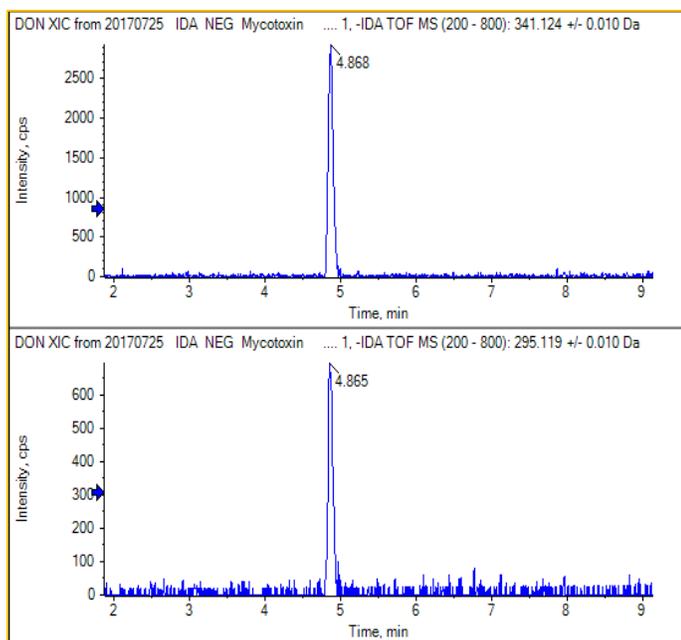


Figura 5. Cromatograma de DON. En este caso, el aducto de formiato (arriba) produjo una señal absoluta mayor que el ion precursor deshidrogenado (abajo).

Fuerte resistencia a la interferencia de la matriz

La preparación de la muestra implicó una simple extracción y dilución líquido-líquido, que no elimina mucha matriz de muestra de fondo y, por lo tanto, puede dejar la muestra sujeta a efectos de interferencia. Se evaluaron cuatro matrices de granos para determinar los efectos de la matriz en función de la proporción de las áreas del objetivo en el disolvente en blanco y el disolvente de la matriz. A medida que la proporción se acercaba al 100%, los efectos de la matriz se volvieron insignificantes; los efectos de matriz superiores al 100% se consideraron "mejora"; por debajo del 100% hubo supresión matricial. También se compararon los efectos matriciales del escaneo primario de alta resolución y el escaneo MRM^{HR}. **Cuando se realizó el escaneo TOF MS de 15 micotoxinas, los efectos de la matriz oscilaron entre 43.1% y 125.6%, y cuando se realizó el escaneo MRM^{HR}, los efectos de la matriz variaron entre 88.5% y 109.2%.** Los resultados mostraron que la exploración MRM^{HR} es mucho más selectiva y resistente a la interferencia de la matriz que la exploración primaria TOF MS. Las Figuras 1 y 6 muestran que después de la adición de la matriz de maíz a la fumonisina B1, hubo una fuerte interferencia con la exploración primaria TOF MS, mientras que la exploración MRM^{HR} mostró menos ruido y una mayor selectividad. La aflatoxina AFB1 es altamente sensible y los efectos de inhibición de la matriz son mínimos cuando se realiza la exploración TOF MS. Por lo tanto, este estudio muestra que la exploración MRM^{HR} es más

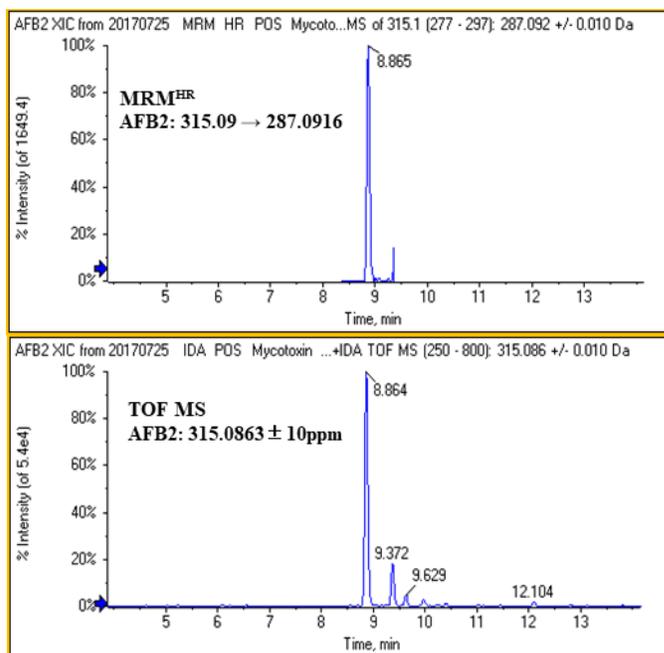


Figura 6. Selectividad MRM^{HR} programada para AFB2 en comparación con TOF MS. Una mayor selectividad con MRM^{HR} reduce el potencial de falsos negativos o la integración incorrecta de diferentes picos.

selectiva y resistente a la inhibición de la matriz, lo que aumenta la precisión y la reproducibilidad del método, lo que a su vez puede disminuir en gran medida los resultados positivos y falsos negativos.

Cuantificación y calificación simultáneas

A concentraciones de 0.05 a 50 ng/mL, hubo fuertes respuestas lineales para todas las micotoxinas (Figura 7). Los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,99, cumpliendo plenamente los requisitos de análisis cuantitativos.

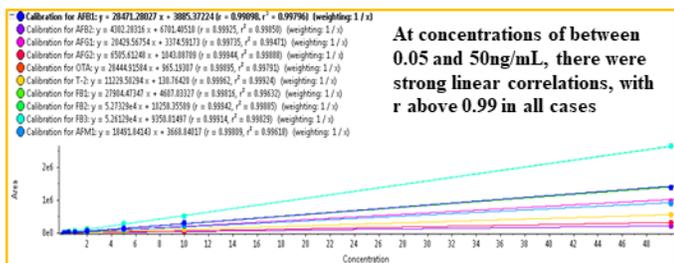


Figura 7. Las calibraciones de regresión de micotoxinas.

El software SCIEX OS calcula las relaciones de abundancia de iones de manera similar a los dispositivos de cuadrupolo, y los diferentes compuestos tienen diferencias cualitativas y cuantitativas en términos de relaciones de abundancia de iones. Las regulaciones internacionales y de la UE (Tabla 3) se pueden usar para determinar el rango de relaciones.

Cuando se analizaron los datos de las muestras reales, como se muestra en la Figura 9, se procesaron rápida y fácilmente, y la interfaz fue intuitiva. El resultado mostró una curva estándar, una muestra, una matriz adicionada, una relación de abundancia de iones, precisión, concentración de muestra y tiempo de retención. Uno puede determinar intuitivamente que el trigo producido en un área determinada contiene aflatoxina B1 (AFB1) en base a una relación de abundancia de iones de

Configure the confidence levels for the ion ratios, as applicable

Ion Ratios

Constant Tolerance

Variable Tolerance

Qualitative Rule		Acceptable % Difference	Marginal % Difference	Unacceptable % Difference
Ion Ratio Lower Limit	Ion Ratio Upper Limit	(Tolerance levels based on expected ion ratio calculation)		
0	0.1	< 50	< 50	>= 50
0.101	0.2	< 30	< 30	>= 30
0.201	0.5	< 25	< 25	>= 25
0.501	1	< 20	< 20	>= 20
		< 20	< 20	>= 20

Figura 8. Los límites de tolerancia de la relación MRM^{HR} pueden ser definidos por el usuario en el software SCIEX OS.

MS detector / characteristics	Typical systems (examples)	Acquisition	Requirements for identification	
			minimum number of ions	other
Unit mass resolution	quadrupole, ion trap, TOF	full scan, limited m/z range, SIM	3 ions	
MS/MS	triple quadrupole, ion trap, Q-trap, Q-TOF, Q-Orbitrap	selected or multiple reaction monitoring (SRM, MRM), mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 product ions	S/N ≥ 3 ^{a)} Analyte peaks in the extracted ion chromatograms must fully overlap.
Accurate mass measurement	High resolution MS: (Q)-TOF (Q)-Orbitrap FT-ICR-MS sector MS	full scan, limited m/z range, SIM, fragmentation with or without precursor-ion selection, or combinations thereof	2 ions with mass accuracy ≤ 5 ppm ^{a), c)}	Ion ratio within ±30% (relative) of average of calibration standards from same sequence
		combined single stage MS and MS/MS with mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 ions: 1 molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion with mass acc. ≤ 5 ppm ^{a)} plus 1 MS/MS product ion ^{d)}	

^{a)} preferably including the molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion
^{b)} including at least one fragment ion
^{c)} < 1 mDa for m/z < 200
^{d)} no specific requirement for mass accuracy
^{e)} in case noise is absent, a signal should be present in at least 5 subsequent scans

Table 3. Regulaciones de la UE del documento SANTE / 11945/2015.

muestra de 0.357, una relación de abundancia de iones de matriz de 0.343 y una concentración de 2.5 µg / kg. Este estudio examinó 10 muestras, incluyendo trigo, maíz, etc., de varias provincias. Consulte la Tabla 3 para ver los resultados de la detección.

Resumen

Este informe describe el uso del sistema X500R QTOF para establecer técnicas para la detección de micotoxinas comunes en muestras de granos. El flujo de trabajo MRM^{HR} objetivo permite la recopilación de espectros MS/MS de alta resolución con alta sensibilidad, tanto para la detección cuantitativa de iones del producto (área de pico) como para la confirmación cualitativa (relaciones de abundancia de iones) a velocidades de escaneo ultra rápidas. Debido a que esta capacidad es selectiva y resistente a la interferencia de la matriz, las técnicas de preparación de muestras pudieron simplificarse aún más, disminuyendo los pasos de trabajo intensivo y mejorando la eficiencia del trabajo. Como las muestras de referencia de micotoxinas son caras y difíciles de obtener, se creó una biblioteca secundaria de micotoxinas de alta resolución. Esto elimina la necesidad de muestras de referencia y permite una fácil identificación de especies de micotoxinas en una muestra. En resumen, este método es sensible, cumple con los requisitos internacionales y de la UE para los límites de micotoxinas y cumple totalmente con los requisitos analíticos del cliente. Puede servir como referencia valiosa en la aplicación de instrumentación de alta resolución para la detección de micotoxinas en muestras de granos.

Este estudio incluyó un total de 10 muestras de trigo y maíz de diferentes regiones de producción. Las pruebas mostraron que AFB1, DON, NIV, ZEN, 3-AcDON y 15-AcDON se distribuyeron

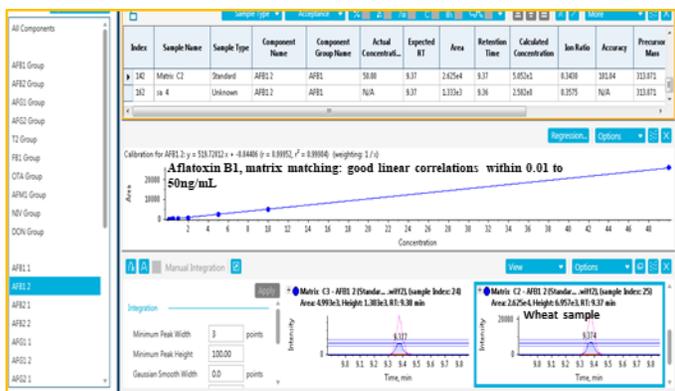


Figura 9. Resultados de cuantificación para AFB1 en trigo tal como aparecen en la interfaz de usuario del software SCIEX OS.

ampliamente en toda la muestra de trigo y maíz, lo que ilustra la prevalencia de la contaminación por micotoxinas de las muestras de granos y destaca la necesidad de un mayor monitoreo y supervisión.

Tabla 4. Contenido de micotoxinas en trigo (n = 6) y maíz (n = 4) de diferentes regiones. Un espacio en blanco en la tabla indica que no se detectó.

	Trigo						Maíz			
µg/kg	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
AFB1	1.6	1.1	0.6	2.5	2.1	1.9	2.2	6.2	2.1	0.8
AFB2				0.2		0.5		0.9		
AFG1										
AFG2										
OTA										
T-2										
DON	331.0	498	210.2	112.2	999	120.2	989	769	881	120.3
FB1										
FB2										
FB3										

References

- Hussein H S, Brasel J M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, (2001) **167(2)**: 101-134.
- Sulyok M, Berthiller F, Kraska R, et al. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom*, (2006) **20(18)**: 2649-2659.
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006, Setting Maximum Level for Certain Contaminants in Food Stuffs
- GB2761-2011, People’s Republic of China State Standard for Mycotoxin Limits in Food Products

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries.

© 2018 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-8863-A. AB SCIEX™ is being used under license.



Headquarters
 500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA
 Phone 508-383-7700
sciex.com

International Sales
 For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at sciex.com/offices