

Método LC-MS/MS quantitativo para 15 micotoxinas em ração animal à base de milho

Autores: Laura E. Burns, Dwayne E. Schrunk, Laboratório de Diagnóstico Veterinário, Iowa State University, Ames, IA

Palavras-chave: Micotoxinas, espectrômetro de massa triplo quadrupolo TSQ Altis, alimento de milho, validação, método de quantificação multiclasse

Objetivos

Desenvolver um método de quantificação abrangente para detectar micotoxinas relevantes em ração animal à base de milho com o uso de LC-MS/MS.

Introdução

Micotoxinas são compostos tóxicos produzidos por fungos. Elas são comumente encontradas no milho, no trigo e em outros grãos durante o crescimento ou o armazenamento.¹ Estes produtos são utilizados para produzir alimentos para consumo humano e misturados à ração animal. O teste da ração animal é importante no manejo da nutrição animal, prevenindo a toxicose, e prevenindo perdas financeiras na indústria da produção animal.^{1,2} Os diferentes tipos de micotoxinas resultam em diversos efeitos tóxicos em equinos, bovinos, aves e suínos.^{1,2,3} Com frequência é solicitado que Laboratórios Diagnósticos Veterinários analisem a ração animal em relação à micotoxinas antes que o alimento seja distribuído ao rebanho para consumo.² O método analítico mais comum utilizado pelos Laboratórios Diagnósticos Veterinários para a análise do alimento é a LC-MS/MS. O método aqui apresentado quantifica 15 micotoxinas que são monitoradas na ração animal à base de milho com o uso de extração líquido-líquido e LC-MS/MS. Este método utiliza uma abordagem *dilute-and-shoot* para rapidamente obter informações diagnósticas veterinárias precisas.



Experimental

Analitos-alvo:

Um total de 15 micotoxinas foi analisado com este método. A Tabela 1 apresenta uma lista de todos os analitos-alvo, junto com o seu tempo de retenção, valores de RF, e íons quantificadores e qualificadores. Todos os analitos padrão foram preparados a 1 mg/mL em acetonitrila a 100%, com exceção de fumonisinas e nivalenol, que foram preparados em acetonitrila/água a 50/50 em virtude da solubilidade. Todos os padrões analíticos foram adquiridos de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Todos os padrões foram misturados em um volume total de 100 mL. Todos os 8 padrões internos foram adquiridos pré-elaborados de Romer Labs GmbH (Tulln, Áustria).

Tabela 1. Tabela de analitos alvo e SRM

Composto	Tempo de Retenção (min)	Polaridade	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Íon Produto (m/z)	Íon Produto (m/z)	Lente de RF (V)
Nivalenol	2,74	[M+H] ⁺	313,1	175,1	177,1	205,0	68
Desoxinivalenol	3,09	[M+H] ⁺	297	177,1	203,2	249,0	55
3-Acetil-Desoxinivalenol	4,06	[M+H] ⁺	339	203,1	213,1	231,1	51
Aflatoxina B1	5,21	[M+H] ⁺	313	213,0	241,1	285,1	124
Aflatoxina B2	5	[M+H] ⁺	315	243,1	259,1	287,1	133
Aflatoxina G1	4,72	[M+H] ⁺	329	200,1	243,1	311,0	123
Aflatoxina G2	4,5	[M+H] ⁺	331,1	245,1	285,1	313,1	133
T-2	6,52	[M+NH4] ⁺	484,2	185,1	215,1	305,2	59
HT-2	5,98	[M+NH4] ⁺	442,2	215,1	263,2	323,2	49
Fumonisina B1	6,43	[M+H] ⁺	722,4	34,3	352,3		118
Fumonisina B2	7,3	[M+H] ⁺	706,3	336,2	512,3		107
Fumonisina B3	6,89	[M+H] ⁺	706,3	318,3	354,3		113
α-Zearalenol	6,95	[M-H] ⁻	319	160,0	187,9	275,2	96
Zearalenona	7,04	[M-H] ⁻	316,9	131,1	175,0	273,2	99
Ocratoxina A	6,97	[M+H] ⁺	404	221,0	239,0	358,1	66
13C ₃₄ Fumonisina B1	6,43	[M+H] ⁺	756,4	356,3	374,3		114
13C ₃₄ Fumonisina B2	7,3	[M+H] ⁺	740,5	358,3	722,5	340,4	110
13C ₃₄ Fumonisina B3	6,89	[M+H] ⁺	740,5	376,4	540,3		133
13C ₁₅ Desoxinivalenol	3,09	[M+H] ⁺	312,1	245,2	263,2	276,2	42
13C ₁₇ Aflatoxina B1	5,21	[M+H] ⁺	330	255,1	284,1	301,2	147
13C ₂₄ T-2	6,52	[M+NH4] ⁺	508,2	198,2	229,2	322,2	62
13C ₂₀ Ocratoxina A	6,97	[M+H] ⁺	424,2	145,2	203,1	232,1	82
13C ₁₈ Zearalenona	7,04	[M-H] ⁻	335	140,1	185,1	290,2	112

Preparo de amostra

O milho na espiga foi adquirido em uma loja local e foi debulhado e moído. Ele foi analisado anteriormente ao uso como um controle, para assegurar que estivesse livre de contaminação por micotoxina. 5 g ($\pm 1\%$) foram pesados em um tubo cônico de 50 mL para cada ponto de calibração, controle de qualidade (CQ) e branco matriz. Foi preparada uma curva de calibração de oito pontos, além de um conjunto de três amostras de controle CQ. A Tabela 2 lista a variação linear efetiva junto com a concentração das amostras CQ para cada analito. Em todos os pontos de calibração e CQ foram determinadas realizadas adições de uma mistura de padrões de micotoxina e padrões internos. O *spiking* foi baseado em um nível de concentração alvo de triagem (STC) específico para cada analito. Uma mistura de metanol/água a 70/30 + solução de ácido fórmico a 0,1% foi adicionada a cada amostra, para proporcionar o volume total de 20 mL. Foi preparado um branco de solvente com *spike* com padrões internos, em um total de 20 mL.

Todas as amostras foram colocadas em um misturador vórtex (Fisher Scientific) para agitação a 2000 rpm por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos (Sorvall ST40 Thermo Fisher Scientific). Uma micropipeta Eppendorf® de 200 μ L foi utilizada para transferir uma alíquota de 150 μ L de extrato para um tubo com tampa destacável de 1,5 mL, e em seguida houve a diluição a 1:5 com branco solvente da extração. Isto foi repetido para todos os pontos de calibração, amostras de CQ e o branco da matriz.

Todos os tubos foram centrifugados a 6500 rpm por 10 minutos (Eppendorf 5417C). Uma micropipeta Eppendorf de 1000 μ L foi utilizada para transferir 800 μ L de extrato do tubo para um frasco de LC de vidro âmbar de 1,5 mL. Isto foi repetido para todas as amostras de calibração, CQs e brancos da matriz. Todos os frascos foram colocados no amostrador automático de LC para análise. Todos os dados foram processados e adquiridos com o uso do software Xcalibur™ da Thermo Scientific™.

Tabela 2. Variação linear e limite inferior de quantificação (LLOQ) dos analitos salvo

Composto	Variação Linear (ng/g)	CQ Amostras (ng/g)	R ² Valor	LLOQ (ng/g)
3-Acetil Desoxinivalenol	30-150	36, 90, 132	0,996	30
Aflatoxina B1	0,5-2,5	0,6, 1,5, 2,2	0,999	0,5
Aflatoxina B2	0,5-2,5	0,6, 1,5, 2,2	0,997	0,5
Aflatoxina G1	0,5-2,5	0,6, 1,5, 2,2	0,999	0,5
Aflatoxina G2	0,5-2,5	0,6, 1,5, 2,2	0,999	0,5
α-Zearalenol	30-150	36, 90, 132	0,988	30
Desoxinivalenol	40-200	48, 120, 176	0,992	40
Fumonissina B1	30-150	36, 90, 132	0,987	30
Fumonissina B2	30-150	36, 90, 132	0,990	30
Fumonissina B3	30-150	36, 90, 132	0,988	30
HT-2	10-50	12, 30, 44	0,997	10
Nivalenol	75-375	90, 225, 330	0,994	75
Ocratoxina A	5-25	6, 15, 22	0,986	5
T-2	5-25	6, 15, 22	0,999	5
Zearalenona	30-150	36, 90, 132	0,983	30

Cromatografia Líquida

LC: Sistema Vanquish™ Flex da Thermo Scientific™, bomba binária, amostrador automático, válvula de ligação, e compartimento duplo de coluna. O aquecedor de coluna foi configurado a 40°C com o uso de ar forçado.

Condições LC	
Coluna	Thermo Scientific™ Hypersil GOLD aQ, 100 x 2,1 mm (1,9 µm)
Fase móvel A	Água + Metanol a 2% + 5 mM de Formiato de Amônio + Ácido Fórmico a 0,1% + Ácido Acético a 0,1%
Fase móvel B	Metanol + Água a 2% + 5 mM de Formiato de Amônio + Ácido Fórmico a 0,1% + Ácido Acético a 0,1%
Gradiente de LC	A uma velocidade de fluxo de 0,3 mL/min, iniciar a B a 0% e manter por 0,5 minuto, transferir para B a 30% e iniciar um gradiente linear até B a 100% por 8 minutos, manter por um minuto, diminuir para B a 0% e equilibrar por três minutos, para um tempo de operação total de 12 minutos

Espectrometria de massa

Um espectrômetro de massa quadrupolo triplo TSQ Altis™ da Thermo Scientific™ foi utilizado para toda a análise. Estes dados foram adquiridos no modo SRM em função do tempo.

Configurações de fonte	
Voltagem do spray no modo positivo	3500 V
Voltagem do spray no modo negativo	2000 V
Gás da bainha	42
Gás auxiliar	17
Sweep gas	1
Temperatura do transfer tube	350°C
Temperatura do vaporizador	300°C

Configurações MS	
Resolução de Q1 e Q3	0,7 FWHM
Pressão do gás CID	2 mTorr
Largura do pico cromatográfico	4 s
Tempo de ciclo	0,4 s

Resultados e discussão

A Figura 1 é uma sobreposição dos cromatogramas de todas as micotoxinas no método. O número na base de cada pico identifica qual analito corresponde ao pico.

Todos os dados foram analisados com o uso de calibração interna com um fator de ponderação de 1/x. A Tabela 2 lista a variação linear efetiva e o LLOQ de cada analito em ng/g. O LLOQ foi definido como o padrão de calibração inferior, para o qual foi alcançado um viés de ± 20% e um coeficiente de variação (CV) de ≤ 20%. Todas as curvas de calibração apresentam linearidade excelente, conforme evidenciado pelos valores de R² demonstrados na Tabela 2. A Figura 2 demonstra as curvas de calibração representativas de quatro analitos no método.

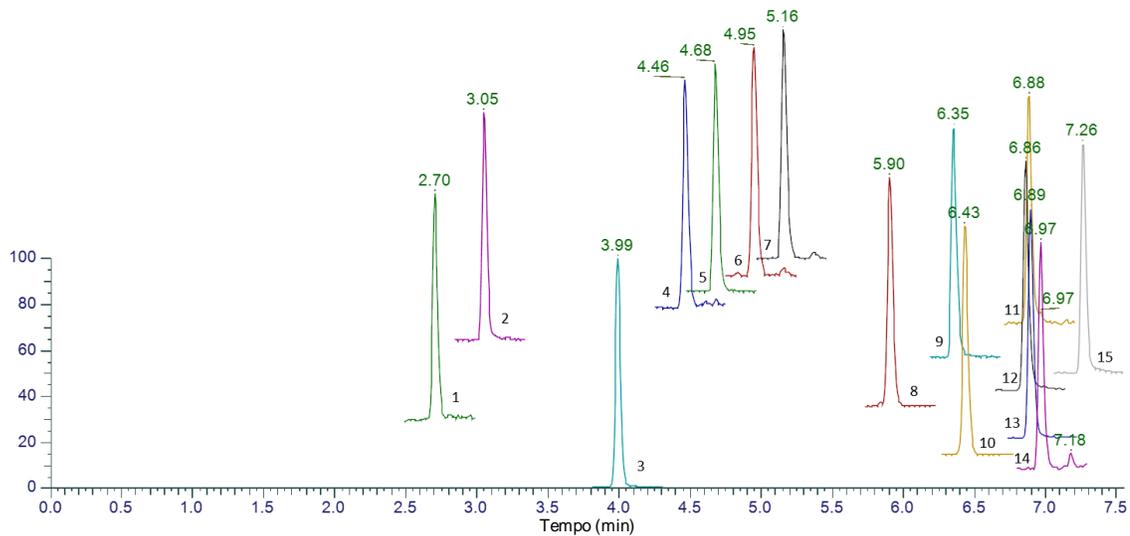


Figura 1. Cromatograma contendo todos os 15 compostos no método de micotoxina. Cada número corresponde aosanalitosa seguir: 1. Nivalenol 2. Desoxinivalenol 3. 3-Acetil-Desoxinivalenol 4. Aflatoxina G2 5. Aflatoxina G1 6. Aflatoxina B2 7. Aflatoxina B1 8. HT-2 9. Fumonisina B1.10. T-2 11. α -Zearalenol 12. Fumonisina B3 13. Ocratoxina A 14. Zearalenona 15. Fumonisina B2

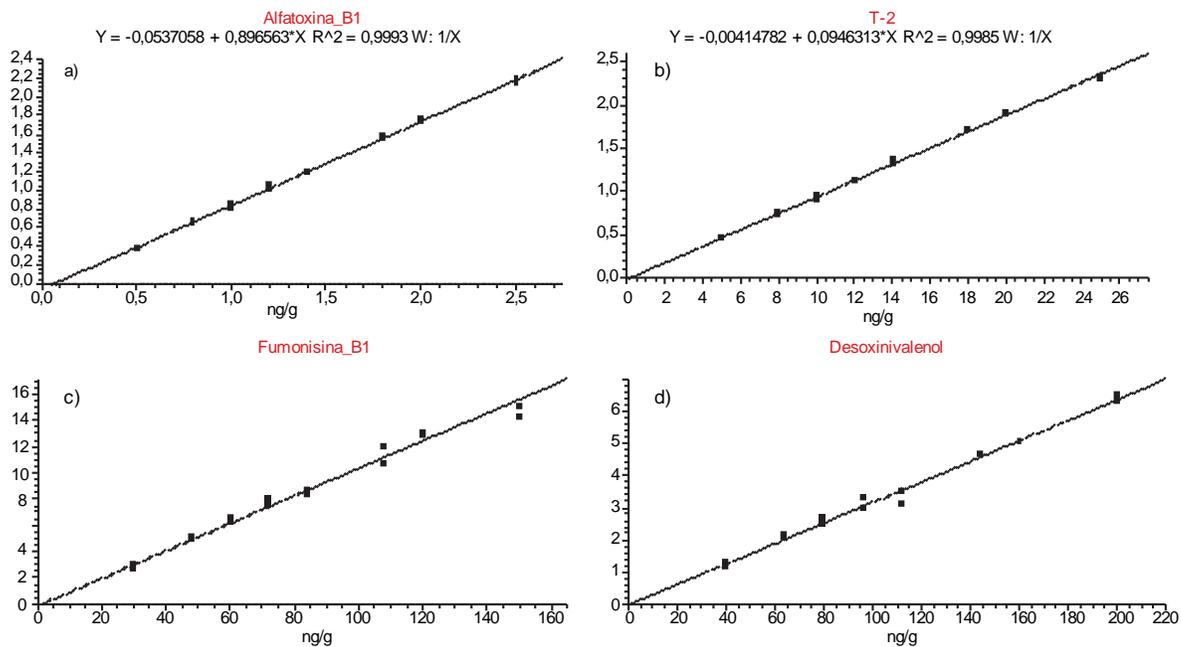


Figura 2. Curvas de calibração representativas de a) Aflatoxina B1 b) Toxina T-2 c) Fumonisina B1 d) Desoxinivalenol

A Tabela 3 demonstra a recuperação média (%) e o efeito da matriz (ME %) para cada analito no alimento de milho. A recuperação foi determinada em três níveis de calibração diferentes para todos os analitos. A média da recuperação nos três níveis está demonstrada na Tabela 3. A recuperação de todos os analitos variou de 86 a 100%. O efeito da matriz foi calculado dividindo-se a área de sinal média do composto *spiked* na matriz pela área de sinal média no solvente *spiked* e multiplicando-se por 100. Isto foi realizado para o sinal de cada composto em três níveis de calibração diferentes. O efeito da matriz médio em todos os três níveis está relatado na Tabela 3. O efeito da matriz variou entre 31 e 173%. Fumonisina B1, B2 e B3 demonstram intensificação do sinal, enquanto todos os outros analitos são suprimidos em no mínimo 68%.

A tendência e a precisão para cinco réplicas de cada analito em um nível de QC baixo, médio e alto, junto com o LLOQ, são fornecidos na Tabela 4. Todos os analitos demonstram tendência inferior a 15% nos níveis de CQ baixo, médio e alto, exceto Aflatoxina B2 e Nivalenol. A tendência no LLOQ para todos os analitos é inferior a 20%. Os valores na Tabela 4 demonstram que o método apresenta medidas exatas e precisão confiável. Todos os analitos apresentam um CV inferior a 15% em todos os níveis, incluindo o LLOQ. A precisão da Aflatoxina B1 no CQ de nível médio (1,5 ppb) ao longo do curso de três operações analíticas é de 11,3%. Este valor é inferior a 15% e ilustra a robustez do método, com um total de N = 15 réplicas ao longo de múltiplas operações analíticas.

Tabela 3. Recuperação e efeito da matriz

Nome do composto	Recuperação média (%)	ME médio (%)
3-Acetil-Desoxinivalenol	93	46,4
Aflatoxina B1	86	41,0
Aflatoxina B2	90	41,0
Aflatoxina G1	91	43,9
Aflatoxina G2	90	46,6
α -Zearalenol	99	31,2
Desoxinivalenol	92	42,5
Fumonisina B1	94	154,8
Fumonisina B2	88	173,1
Fumonisina B3	100	144,3
HT-2	100	58,8
Nivalenol	95	46,3
Ocratoxina A	89	65,8
T-2	95	67,5
Zearalenona	93	32,6

Tabela 4. Exatidão e precisão

Nome do composto	Nível	Tendência (%)	CV (%)
3-Acetil-Desoxinivalenol	LLOQ	-0,50	2,10
	Baixo	-2,09	6,17
	Médio	0,31	1,93
Aflatoxina B1	Alto	2,05	3,91
	LLOQ	-2,17	2,83
	Baixo	2,19	8,99
Aflatoxina B2	Médio	8,10	1,75
	Alto	10,63	1,60
	LLOQ	-3,26	3,51
Aflatoxina G1	Baixo	> 15	9,00
	Médio	> 15	2,19
	Alto	> 15	4,21
Aflatoxina G2	LLOQ	-5,96	4,39
	Baixo	-4,87	5,96
	Médio	-0,20	1,59
α -Zearalenol	Alto	2,05	1,55
	LLOQ	-2,74	4,07
	Baixo	-8,46	3,16
Desoxinivalenol	Médio	-1,46	3,16
	Alto	-0,15	3,02
	LLOQ	15,17	8,40
Fumonisina B1	Baixo	6,00	3,16
	Médio	2,55	5,83
	Alto	3,09	11,43
Fumonisina B2	LLOQ	-0,30	5,04
	Baixo	-2,22	2,83
	Médio	-1,04	2,21
Fumonisina B3	Alto	-0,22	1,94
	LLOQ	-3,27	3,87
	Baixo	-4,17	7,04
HT-2	Médio	-4,86	1,62
	Alto	0,06	2,94
	LLOQ	7,56	6,46
Zearalenona	Baixo	-5,93	7,06
	Médio	-2,17	2,38
	Alto	-0,75	6,05
Ocratoxina A	LLOQ	3,30	12,44
	Baixo	-10,41	5,56
	Médio	0,65	4,07
Nivalenol	Alto	1,14	6,51
	LLOQ	-4,18	4,18
	Baixo	-5,09	5,20
T-2	Médio	-1,53	3,39
	Alto	1,85	1,86

Tabela 4: (Cont.)

Nome do composto	Nível	Viés (%)	CV (%)
Nivalenol	LLOQ	2,10	4,33
	Baixo	> 15	5,54
	Médio	> 15	2,31
	Alto	> 15	2,82
Ocratoxina A	LLOQ	-0,91	5,41
	Baixo	-3,40	9,49
	Médio	-2,71	4,90
	Alto	-5,31	3,79
T-2	LLOQ	-3,42	3,21
	Baixo	-4,13	4,25
	Médio	0,52	1,79
	Alto	-0,38	1,97
Zearalenona	LLOQ	4,47	7,93
	Baixo	7,46	4,49
	Médio	2,51	10,65
	Alto	3,40	9,01

Conclusão

Este é um método rápido e confiável para quantificar 15 micotoxinas de interesse em misturas de ração animal à base de milho. O método utiliza uma abordagem de extração líquido-líquido simples de *dilute-and-shoot*, que resulta em alta recuperação de analitos e quantificação confiável. A robustez do método foi demonstrada por meio de validação em laboratório, com quatro corridas analíticas, das curvas de calibração em duplicata, junto com 5 réplicas de cada uma das amostras de controle de nas concentrações baixa, média e alta. Excelentes RSDs (%) para os analitos alvo foram obtidos ao longo do curso das operações analíticas. Este método é importante para aplicações diagnósticas veterinárias na medicina da criação animal para alimentos.

Referências e agradecimentos

1. Cheeke, P. R.; Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants, 2nd ed.; Interstate Publishers: Danville, IL, 1998; pp 87-136.
2. Osweiler, G. D.; Mycotoxins: Contemporary Issues of Food Animal Health and Productivity. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2000, 16 (3), 511-530, DOI 10.1016/S0749-0720(15)30084-0.
3. Klaassen, C. D.; Casarett, L. J.; Doull, J. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, 8th ed.; McGraw-Hill: New York, 2013; pp 1139.

Saiba mais em thermofisher.com/ToxinAnalysis