

# LC/MS/MS - El nuevo método de referencia para la detección de micotoxinas?

Fuente: [www.engormix.com](http://www.engormix.com)

## **Requisitos de las técnicas modernas de análisis de micotoxinas**

Las micotoxinas más importantes son: aflatoxinas, tricotecenos, zearalenona y sus derivados, fumonisinas, ocratoxinas, alcaloides del ergot y patulina.<sup>1</sup>

Varias micotoxinas pueden ocurrir en forma simultánea, dependiendo de las condiciones ambientales y el tipo de sustrato. Considerando esta coincidencia en la producción, es más acertado decir que tanto los humanos como los animales están más expuestos a mezclas de micotoxinas que a estos compuestos en forma individual. Recientemente se han reportado ocurrencias naturales de micotoxinas enmascaradas, donde las toxinas se encuentran formando conjugados, requiriéndose principios de detección cada vez más sensibles y más selectivos.<sup>1,2,3</sup>

La mayoría de los métodos analíticos detectan una sola micotoxina o una clase de micotoxinas, y por lo tanto, incluyen solamente un número limitado de analitos químicamente relacionados. Pero como se han observado efectos aditivos y sinérgicos, concernientes a la peligrosidad para la salud que poseen las micotoxinas, se han incrementado los esfuerzos para desarrollar métodos para multitoxinas, para un screening en simultáneo de diferentes clases de micotoxinas. La cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) y la cromatografía gaseosa (GC) son tradicionalmente los sistemas de elección de los analistas cuando se requieren resultados sensibles, confiables y con una variabilidad mínima. La mayor desventaja del análisis de micotoxinas a través de GC, es la necesidad de derivatización, que insume mayor tiempo de análisis y puede inducir a un mayor error, por esto, los métodos de GC se utilizan cada vez con menor frecuencia. El HPLC puede acoplarse a una variedad de detectores, esto es, detectores espectrofotométricos (UV-Vis, arreglo de diodos), refractómetros (RI), detectores de fluorescencia (FLD), detectores electroquímicos, detectores de radioactividad y espectrómetros de masas.

Particularmente la combinación de la cromatografía líquida (LC) y la espectrometría de masas (MS), provee un gran potencial para el análisis de micotoxinas, debido a que no es necesaria la derivatización pre o postcolumna de la muestra. Por esto, ninguna otra técnica en el área analítica instrumental para toxinas

ambientales, se ha desarrollado tan rápidamente en los últimos 10 años.

## **Cromatografía Líquida**

La tecnología de la cromatografía líquida – espectrometría de masas (LC/MS) abre una nueva perspectiva para los análisis espectrométricos eficientes en laboratorios de rutina, para la gran mayoría de las muestras. Esta técnica, que en muchos casos utiliza detectores espectrométricos multi-masas, puede ser utilizada potencialmente, para medir un amplio rango de analitos, sin limitaciones de masa molecular, con una preparación de la muestra en forma simple, sin necesidad de una derivatización química, y debido a la robustez de los instrumentos, un mantenimiento limitado. Así, la cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS), y particularmente la LC acoplada a espectrómetros de masa en tándem (LC/MS/MS), se volvieron muy populares en el análisis de micotoxinas. Recientemente, se ha descrito y validado un método de cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem para 39 micotoxinas en trigo y maíz; los analitos determinados fueron: tricotecenos de grupo A y B y sus metabolitos, zearalenona y sus derivados, fumonisinas, eniانتinas, alcaloides del ergot, ocratoxinas, aflatoxinas y moniliformina.<sup>1</sup>

El desarrollo de métodos LC/MS para la determinación de micotoxinas, tiene determinadas limitaciones, por la diversidad química de los analitos, y la complejidad de las condiciones para la preparación de las muestras.<sup>1</sup>

Considerando el amplio rango de polaridades de los analitos que pueden someterse a una detección tan sensible como la del MS/MS, puede percibirse erróneamente que las interferencias de las matrices pueden eliminarse efectivamente y se pueden obtener resultados cuantitativos con poca o ninguna limpieza de la muestra y una pequeña separación cromatográfica. Desafortunadamente, los componentes propios de la matriz presentes en el extracto, pueden influir en la eficiencia de la ionización del analito en forma positiva o negativa, perjudicando la repetibilidad y exactitud de la técnica analítica.<sup>1</sup>

Como consecuencia, solo unos pocos abordajes describen una inyección exitosa de extractos crudos, y la mayoría de las publicaciones describen una limpieza o purificación de la muestra, previa a la inyección al cromatógrafo líquido, con extracción en fase sólida (SPE) como el procedimiento más eficiente, y en particular la

utilización de columnas Mycosep<sup>®</sup> como la manera más directa y eficaz.<sup>4,5,6,7,8,9</sup>

### **Análisis de Dilución de Isótopos Estables (Stable Isotope Dilution Assay – SIDA)**

Para minimizar los efectos de las matrices y sus problemas relacionados con la cuantificación, la recomendación es calibrar con matrices externas para cada producto a ser analizado, pero esto insume demasiado tiempo, y está probado de que no es muy práctico en las condiciones de rutina, donde se confronta con varias matrices cada día. Como una alternativa, se ha introducido recientemente la utilización de patrones internos marcados con isótopos [estables].<sup>10</sup>

Estas sustancias no están presentes en las muestras en forma natural, pero tienen propiedades idénticas a las de los analitos. Los patrones internos son sustancias muy similares a los analitos buscados, es decir, su estructura molecular debe ser lo más parecida posible al analito en cuestión, mientras que el peso molecular debe ser diferente. Durante el proceso analítico, el patrón se adiciona tanto a la solución calibrante como a las muestras analíticas, y por comparación del ratio del área bajo la curva del patrón interno y del analito, puede determinarse la concentración del analito. El patrón interno ideal es una molécula del propio analito marcada con un isótopo, que normalmente se prepara por síntesis orgánica intercambiando algunos átomos de hidrógeno por deuterio, o reemplazando átomos de carbono [<sup>12</sup>C] por átomos de carbono [<sup>13</sup>C]. Las propiedades fisicoquímicas de estas sustancias, y especialmente, los potenciales de ionización son muy parecidas o están muy cerca de las del analito que ocurre en forma natural, pero es posible la distinción entre el analito y el patrón interno por el peso molecular más elevado (debido a la incorporación de isótopos). Las variaciones que ocurren durante la preparación de la muestra y la purificación de los extractos, así como aquellas durante la ionización, se ven compensadas en aquellos métodos analíticos que pueden desarrollarse con gran exactitud y precisión. Lo óptimo, es que aquellos análogos marcados con isótopos posean una masa molecular lo suficientemente grande para anular los efectos de la abundancia natural de isótopos pesados en el analito. Esta diferencia de masa dependerá, generalmente, del peso molecular del analito; en el caso de moléculas con un peso molecular entre 200 y 500, se requiere un mínimo de masa tres veces mayor.

Los patrones marcados con isótopos provistos por Biopure, están completamente marcados, suministrando así una diferencia de masas óptimas entre el patrón marcado y el analito blanco. Por ejemplo, el patrón [<sup>13</sup>C<sub>15</sub>]-DON disponible como calibrante líquido (25mg l<sup>-1</sup>) fue

caracterizado de manera minuciosa por Häubl et al.<sup>9</sup> con respecto a la pureza, la distribución y sustitución del isótopo, siendo esta última, cercana al 99%.

Experimentos de fortificación con maíz, prueban que la utilización de [<sup>13</sup>C<sub>15</sub>]-DON como patrón interno es apropiada, indicando un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,9977 y una tasa de recuperación de 101% +/- 2.4%. El mismo análisis sin considerar el patrón interno, resultó con un  $R^2=0.9974$  y una tasa de recuperación de 76% +/- 1.9%, resaltando con éxito, la compensación de las pérdidas debidas a la preparación de la muestra y a los efectos de supresión iónica por patrones internos marcados con isótopos.

## Conclusiones

El acoplamiento directo entre una técnica de separación en fase líquida como la cromatografía líquida y la espectrometría de masa, ha sido reconocido como una poderosa herramienta para análisis de mezclas de gran complejidad. Las principales ventajas incluyen bajos límites de detección, la posibilidad de generar información estructural, los requerimientos mínimos de preparación de las muestras y la posibilidad de cubrir un amplio rango de analitos de polaridades diferentes. Dependiendo de la interfase técnica aplicada, un gran número de compuestos orgánicos pueden ser detectados y pueden manejarse flujos de hasta 1,5 ml/min. A pesar de su alta sensibilidad y selectividad, los instrumentos LC/MS/MS se ven limitados, debido a diferencias inducidas por las matrices, en la eficiencia de la ionización y la intensidad de la señal entre los calibrantes y los analitos, la supresión/realce de los iones debido a los componentes de las matrices, que ingresan al espectrómetro de masas conjuntamente con los analitos, limitan incluso la robustez y exactitud y son fuentes potenciales de errores sistemáticos.

Los patrones internos marcados con isótopos estables, suministran un solución a estos problemas, así como también compensan las fluctuaciones debido a la preparación de la muestra, es decir en la extracción y la limpieza. Numerosos métodos de LC/MS/MS para la determinación de micotoxinas se han desarrollado y publicado en estos últimos años, sin embargo, solamente hay unos pocos basados en analitos marcados con isótopos estables, principalmente debido a su limitada disponibilidad y calidad. Sólo recientemente, se han introducido micotoxinas marcadas completamente con [<sup>13</sup>C], abriendo así un amplio campo de aplicaciones y mejoras en el análisis de micotoxinas. Por lo tanto, el desarrollo en particular de métodos unificados multi-toxinas apropiados para la determinación de varias combinaciones analitos/matrices, se vuelve un desafío para el futuro.

### El efecto isótopo

El efecto isótopo se origina por la diferencia de las propiedades químicas y físicas de las sustancias que contienen diferentes isótopos. Este fenómeno se produce debido a la variación en la velocidad de reacción de una reacción química. Es más pronunciado cuando la variación de la masa es mayor. Por lo tanto, el cambio de un átomo de hidrógeno por uno de deuterio representa un incremento del 100 % en la masa, mientras que en el reemplazo del carbono-12 con carbono-13, el incremento de la masa es solo del 8%. La velocidad de reacción que involucra ligaduras C-H, típicamente es 6 a 10 veces más rápida que la correspondiente a uniones C-D, mientras que la reacción con  $^{12}\text{C}$  es solamente  $\sim 1,04$  veces más rápida que la reacción correspondiente al  $^{13}\text{C}$  (siempre y cuando que, en ambos casos, haya un único isótopo de masa atómica unitaria más pesada). Además los enlaces de hidrógeno y otras interacciones inter e intramoleculares se ven afectadas, y presentan diferencias marcadas, como ser el tiempo de retención en los métodos de separación cromatográficos.

## References

1. Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R. 2006. 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.* 20, 2649-2659.
2. Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G., Krska, A.R. 2005. Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* 53, 9, pp. 3421-3425.
3. Schneewis, I., Meyer, K., Engelhardt, G., Bauer, J. 2002. Occurrence of zearalenone-4- $\beta$ -D-glucopyranoside in wheat. *J. Agric. Food Chem.* 50 (6), pp. 1736-1738. 4
4. Biancardi, A., Gasparini, M., Dall'Asta, C., Marchelli, R. 2005. A rapid multiresidual determination of type A and type B trichothecenes in wheat flour by HPLC-ESI-MS. *Food Additives and Contaminants*, 22 (3), pp. 251-258
5. Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G., Krska, R. 2005b. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatog. A*, 1062, 2, pp. 209-216.
6. Biselli, S., Hummert, C. 2005. Development of a multicomponent method for Fusarium toxins using LC-MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. *Food Add. Contam.* 22 (8), pp. 752-760.
7. Tanaka, H., Takino, M., Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T. 2006. Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (9), pp. 1422-1428.
8. Milanez, T.V., Valente-Soares, L.M. 2006. Gas chromatography - Mass spectrometry determination of trichothecene mycotoxins

- in commercial corn harvested in the State of Sao Paulo, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17 (2), pp. 412-416.
9. Klötzel, M., Gutsche, B., Lauber, U., Humpf, H.-U. 2005. Determination of 12 Type A and B Trichothecenes in Cereals by Liquid Chromatography- Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatog.* 53, 8904-8910.
  10. Häubl, G., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R. 2005. Suitability of a <sup>13</sup>C isotope labeled internal standard for the determination of the mycotoxin Deoxynivalenol by LC-MS/MS without clean-up. *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (3), pp. 692-696.
  11. Häubl, G., Berthiller, F., Rechthaler, J., Jaunecker, G., Binder, E.M., Krska, R., Schuhmacher, R. 2006. Characterisation and application of isotope-substituted (<sup>13</sup>C<sup>15</sup>)-deoxynivalenol (DON) as an internal standard for the determination of DON. *Food Add. Contam.* In print.
  12. Sakairi, M., Kato, Y. 1998. Multiatmospheric pressure ionization interface for liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography A*, 794, 391-406.

**Autor:** Dra. Eva Maria Binder, Directora Científica Romer Labs