

Lourdes Gil Pagà

**DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE DE CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS
ACOBBLADA A UN ESPECTRÒMETRE DE MASSES EN TÀNDEM PER A LA
DETERMINACIÓ DE TETRODOTOXINES**

TREBALL DE FI DE GRAU

dirigit per Dr. Pablo de la Iglesia

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2014

Agraïments

Gràcies a tot el personal de la SMM de l'IRTA per la vostra dedicació i l'ajuda que m'heu donat cada dia, en especial a Jorge Diogène, a Pablo de la Iglesia i a Vanessa del Rio; però també gràcies a Núria, Laura, Mònica, Laia, Diana, Sandra, Aitor, Vanessa, Margarita, Daniel, Maria... També agraeixo a la resta de personal del centre en especial a Kruno i Elvira, però els segueix una llarga llista.

Com no, agrair a la meva tutora de la URV Pilar Salagre pel seu temps.

Per enviar mostres de forma desinteressada gràcies al National Reference Laboratory of Marine Biotoxins de Grècia en especial a Panagiota Katikou; i a l'Institute of Agri-Food and Land Use, School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, de Belfast en especial a Katrina Campbell.

Per a finalitzar, a la família per totes les petites coses.

Gràcies a tots.

Índex general

1. Introducció.....	5
1.1. Descripció de l'empresa.....	5
1.2. Importància de la optimització del mètode.....	5
1.3. Tetrodotoxines.....	6
2. Objectius.....	8
3. Fonament teòric.....	8
3.1. Cromatografia de líquids acoblada a un detector de masses en tàndem	8
3.1.1. Detector d'espectrometria de masses.....	8
3.1.2. ESI.....	9
3.1.3. HILIC	9
4. Part experimental.....	9
4.1. Materials i mètodes.....	9
4.1.1. Estàndards.....	9
4.1.2. Reactius i solvents.....	10
4.1.3. Gestió de residus.....	11
4.1.4. Equips i software.....	11
4.1.5. Mostres	12
4.2. Tractament de la mostra	12
4.2.1. Dissecció del peix globus.....	12
4.2.2. Extracció.....	13
4.2.3. Filtració.....	13
4.3. Cromatografia.....	14
5. Resultats i discussió.....	14
5.1. Optimització de les condicions del detector.....	14
5.1.1. Condicions inicials del detector	14
5.1.2. Optimització del potencial de desagrupació.....	15
5.1.3. Optimització de la temperatura.....	15
5.1.4. Optimització del gas cortina.....	16
5.1.5. Optimització del gas de col·lisió.....	16
5.1.6. Optimització del voltatge de l'esprai d'ions.....	17
5.1.7. Condicions del detector optimitzades	17
5.1.8. Mètode per a mostres.....	17
5.2. Optimització de les condicions cromatogràfiques.....	18
5.2.1. Condicions cromatogràfiques inicials.....	18
5.2.2. Optimització de la fase mòbil.....	19
5.2.3. Optimització del gradient.....	21
5.2.4. Volum de punxada i dissolvent de la mostra	21
5.3. Validació del mètode	22
5.3.1. Linealitat i rang.....	23
5.3.2. Límits.....	23
6. Aplicació de la metodologia desenvolupada a mostres reals.....	24
6.1. Mostres analitzades.....	24
6.2. Anàlisi cromatogràfic	24
6.3. Identificació	24
6.4. Resultats	26
7. Aspectes econòmics	29
8. Conclusions.....	29
9. Projectió del treball.....	30
10. Referències	30
11. Glossari	32
12. Annex.....	32

Índex de taules

Taula 1: Estructura de tres tipus d'anàlegs de la TTX inclosos al mètode	7
Taula 2: Toxicitat i manipulació dels productes utilitzats	10
Taula 3: Pesos de les parts del peix globus de la costa catalana	13
Taula 4: Paràmetres d'ESI inicials que s'optimitzaran	14
Taula 5: Mètode MRM inicial	14
Taula 6: Paràmetres del detector optimitzats	17
Taula 7: Mètode MRM per a mostres	17
Taula 8: Temps de retenció de les TTXs	24
Taula 9: Resultats experimentals del peix globus de Grècia en µg/Kg	27
Taula 10: Resultats experimentals del cargol d'Irlanda en µg/Kg	28
Taula 11: Resultats experimentals del peix globus pescat a Palamós en µg/Kg	28

Índex de figures

Figura 1: Migració lessepiana	6
Figura 2: Tetrodotoxina (TTX)	6
Figura 3: Esquema de l'interior d'un detector MS/MS	8
Figura 4: Fases estacionàries amida i diols de www.waters.com	9
Figura 5: Sistema cromatogràfic HPLC-MS/MS	12
Figura 6: <i>Sphoeroidees Pachygaster</i> procedent de la costa catalana	12
Figura 7: Gràfic resultat de la optimització del potencial de desagrupació	15
Figura 8: Gràfic resultat de la optimització de la temperatura del detector	15
Figura 9: Gràfic resultat de la optimització del gas cortina	16
Figura 10: Gràfic resultat de la optimització del gas de col·lisió	16
Figura 11: Gràfic resultat de la optimització de l'esprai d'ions	17
Figura 12: Gradient del mètode MRM inicial	18
Figura 13: Gràfics de la optimització del tipus de sal i la quantitat a les FM	19
Figura 15: Equació de Henderson-Hasselbalch	20
Figura 14: Cromatogrames de 4 GI track en la columna òptima (Amida) a diferents pH.	20
Figura 16: Gradient òptim per al mètode	21
Figura 17: Formula de la resolució	21
Figura 18: Gràfics de la optimització del solvent de la mostra, dalt HAc i baix MeOH	22
Figura 20: Recta de calibratge del mètode	23
Figura 21: LOD a l'esquerra i LOQ a la dreta.	23
Figura 21: EPI m/z 320 a la dreta de la mostra 4 GI track, a l'esquerra de l'estàndard.	25
Figura 22: Cromatograma òptim del 4 GI track amb les diferents TTXs a la dreta	25

Abstract

Tetrodotoxins are potent neurotoxins that can affect people to consume fish. In the present work, a method has been developed for the determination of tetrodotoxins in puffer fish and sea snail samples by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry technique (LC-MS/MS). The conditions of detector were optimized, for example the curtain gas and the ion electrospray temperature. The chromatographic conditions to obtain a good separation of peaks were also optimized.

The samples from fish and sea snail have been extracted according to the Japanese official method, filtered and loaded onto a hydrophilic interaction (HILIC) chromatographic column. As main result have been detected tetrodotoxins on all samples; enhanced the presence in a puffer fish captured in Catalonia, but at poor concentrations.

Resum

Les tetrodotoxines són neurotoxines molt potents que poden afectar a les persones per consumir peix. En el present treball, s'ha desenvolupat un mètode per a la determinació de tetrodotoxines en peix globus i cargol de mar per cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS). S'han optimitzat les condicions del detector, per exemple el gas cortina i la temperatura de la font d'ions. També s'han optimitzat les condicions cromatogràfiques per a obtenir una bona separació dels pics.

Les mostres de peix i cargol s'han extret segons el mètode oficial japonès, s'han filtrat i punxat al cromatògraf. Com a resultat principal s'han detectat tetrodotoxines en totes les mostres; es ressalta la presència en un peix capturat a Catalunya, però a concentracions baixes.

1. Introducció

1.1. Descripció de l'empresa

El lloc on s'ha realitzat aquest treball de fi de grau és l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentari (IRTA) de Sant Carles de la Ràpita. Al programa d'Aqüicultura i subprograma de Seguiment del Medi Marí (SMM).

L'IRTA és un institut d'investigació de la Generalitat de Catalunya, adscrit al Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. La seva missió és contribuir a la modernització, competitivitat i desenvolupament sostenible dels sectors agrari, alimentari i aquícola, proveir d'aliments sans i de qualitat per als consumidors i, millorar el benestar de la població.

Els seus objectius generals són els d'impulsar la investigació i el desenvolupament tecnològic dintre de l'àmbit agroalimentari, facilitar la transferència dels avanços científics i valorar els avanços tecnològics propis sense deixar de procurar la màxima coordinació i col·laboració amb el sector públic i privat.

L'IRTA de Sant Carles de la Ràpita es localitza a les proximitats del Parc Natural del Delta de l'Ebre, entre els centres urbans de Sant Carles de la Ràpita i de Poble Nou del Delta. Les instal·lacions del centre es troben davant de la Badia dels Alfacs. Des de la seva fundació, al 1999, aquest centre s'ha especialitzat en un programa d'investigació i desenvolupament d'aqüicultura, amb dos subprogrames:

- *Subprograma de cultius experimentals*: Recerca bàsica i aplicada orientada a promoure el cultiu d'espècies marines (zootècnia larvària, reproducció, nutrició, domesticació de noves espècies...)
- *Subprograma de seguiment del medi marí*: Recerca en l'àmbit de la qualitat del medi marí, oceanografia seguretat alimentària dels productes del mar.

A partir de 2005, aprofitant que el centre es troba proper al Parc Natural del Delta de l'Ebre, es va crear el programa d'*Ecosistemes Aquàtics* per la conservació del medi natural. (1)

1.2. Importància de la optimització del mètode

L'estudi s'ha realitzat degut a que a la costa catalana s'han trobat exemplars de peixos globus (2) (3) que són espècies no originàries del Mediterrani i són potencialment tòxiques. Aquestes espècies han pogut entrar al Mediterrani per la "migració lessepiana" (4).

La migració lessepiana és un fenomen de migració d'espècies del mar Roig cap al mar Mediterrani degut a l'obertura artificial del canal de Suez el 1869. Aquesta migració és sempre en la direcció indicada a la figura 1, ja que el mar Mediterrani és més ric en nutrients que el mar Roig; a més a més de que la barrera natural d'elevada salinitat del Gran Llac Amarg s'ha anat reduint paulatinament al llarg dels anys per l'aportació continua d'aigua per les vies del canal, deixant que algunes espècies d'animals puguin saltar la barrera on s'han instal·lat, posant en perill l'equilibri ecològic (4).

Aquesta arribada d'espècies noves i en concret de peixos globus al mar Mediterrani ha causat ja diverses intoxicacions. Sobretot a l'est, més a prop del canal, i en més mesura als països d'Àfrica per la seva situació (5) (6). Els casos d'intoxicació ja eren comuns a Àsia, especialment al Japó, on aquests peixos són un aliment tradicional; allí la mortalitat ha baixat degut a que els peixos de cultiu no són tòxics, en canvi, els salvatges si (7).



Figura 1: Migració lessepiana

Degut a que aquestes espècies poden suposar un risc potencial per a la salut dels habitants pel seu possible contingut en tetrodotoxines i la desconexença d'aquest per la població catalana, s'ha decidit realitzar la posta a punt del mètode.

1.3. Tetrodotoxines

La tetrodotoxina (TTX) (figura 2) és la neurotoxina coneguda més antiga i una de les toxines no proteiques més potents. La solen contenir animals marins i alguns amfibis, però especialment la contenen els peixos globus. Es va anomenar així perquè aquests peixos procedeixen de l'ordre dels Tetradontiformes, però ara es creu que és d'origen bacterià (7).

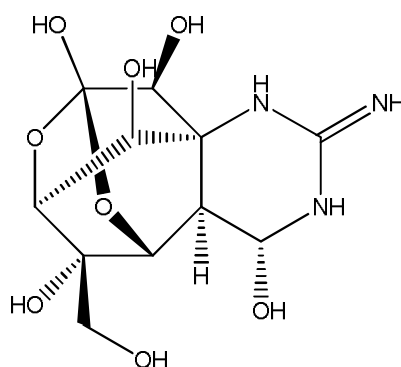


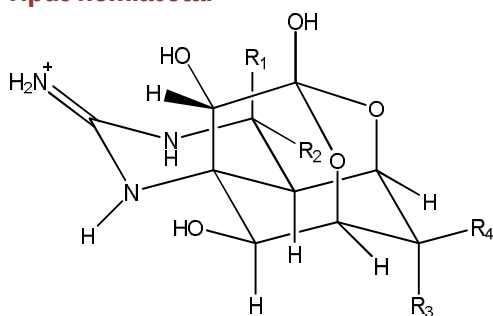
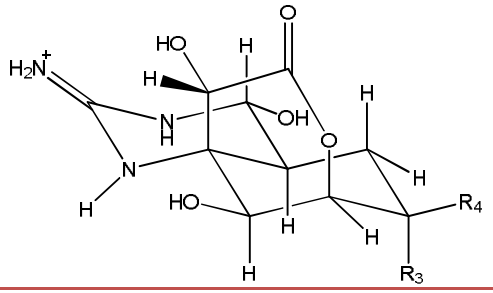
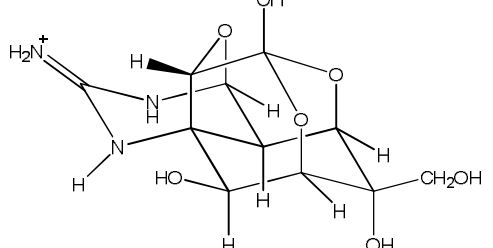
Figura 2: Tetrodotoxina (TTX)

La tetrodotoxina s'anomena "Octahidro-12-(hidroximetil)-2-imino-5,9:7,10a-dimetano-10aH [1,3]dioxocino[6,5-d]pirimidina-4,7,10,11,12-pentol" amb número CAS¹ 4368-28-9, té una fórmula molecular tal que $C_{11}H_{17}N_3O_8$. La massa mitjana és de 319,268005 Da però per a desenvolupar el present estudi s'ha utilitzat la massa monoisotòpica més abundant 319,101563 Da (8). És un compost heterocíclic hidrofílic (polar).

En aquest estudi no només s'ha analitzat la TTX sinó que s'ha desenvolupat un mètode multiresidu per a analitzar diversos derivats de la TTX, es troben resumits a la taula 1.

¹ El número CAS és una identificació numèrica única per a compostos químics, polímers, seqüències biològiques, preparats i aleacions de la Societat Americana de Química.

Taula 1: Estructura de tres tipus d'anàlegs de la TTX inclosos al mètode

Estructura	TTXs	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	MH ⁺ (m/z)
Tipus hemiacetal 	TTX	H	OH	OH	CH ₂ OH	320
	4-epiTTX	OH	H	OH	CH ₂ OH	320
	11-deoxyTTX	H	OH	OH	CH ₃	304
	11-norTTX-6(S)-ol	H	OH	OH	H	290
	11-norTTX-6(R)-ol	H	OH	H	OH	290
	6,11-dideoxyTTX	H	OH	H	CH ₃	288
Tipus lactona 	5-deoxyTTX			OH	CH ₂ OH	304
	5,6,11-trideoxyTTX			H	CH ₃	272
Tipus 4,9-anidro 	4,9-anidroTTX					302

En humans la LD₅₀ (dosi letal 50%) s'estima aproximadament en 2 mg de TTX, s'ha suposat que per a una persona de 60Kg. La TTX és resistent al calor i no descompon amb la cocció. La intoxicació genera símptomes a la víctima que depenen de la quantitat ingerida, l'edat i la salut. Hi ha quatre graus d'intoxicació:

1. Síntomes neuromusculars (parestèsia dels llavis, llengua i faringe; alteració del gust, mareig, mal de cap, sudoració, constricció pupil·lar); gastrointestinals (salivació, nàusees, vòmits, hiperemesi, hematèmesi, hipermotilitat, diarrea, dolor abdominal)
2. Síntomes neuromusculars addicionals (parestèsies generals avançada; paràlisi de les falanges i les extremitats, dilatació pupil·lar, canvis en els reflexos)
3. Augment dels símptomes neuromusculars (disàrtria; disfàgia, afàgia, letargia; incoordinació, atàxia, sensació de flotar, paràlisi dels nervis cranials; fasciculacions a la musculatura); cardiovasculars/pulmonars (hipo o hipertensió, bloqueig vasomotor, arítmies, asistòlia, taquicàrdia, anomalies auriculoventriculars, cianosi, pal·lidesa, dispnea); dermatològics (dermatitis exfoliativa, petèquies, ampolles)
4. Fallada respiratòria, facultats mentals alterades, hipotensió extrema, convulsions, pèrdua de profunditat del tendó i dels reflexos espinals (7).

Hi ha varies tècniques disponibles per a treballar en toxines a banda de la cromatografia de líquids usada. Com ara l'electroforesi, l'espectroscòpia ultravioleta, assajos en cèl·lules, el bioassaig ratolí o l'immunoassaig ELISA (Assaig per immunoabsorció lligat a enzims), etc.

2. Objectius

- Desenvolupament i optimització d'un mètode de cromatografia de líquids basat amb interacció hidrofílica acoblat a espectrometria de masses (LC-MS/MS) per a la detecció de tetrodotoxines (TTXs) en mostres reals.
- Aplicació de la metodologia desenvolupada a mostres de peix globus trobats a Catalunya, entre altres.
- Contribució a l'anàlisi dels resultats i definició del risc potencial per al consumidor de Catalunya de la presència d'aquestes espècies de peix invasores al Mediterrani.
- Recull del mètode en un procediment normalitzat de treball (PNT) de l'IRTA.

3. Fonament teòric

3.1. Cromatografia de líquids acoblada a un detector de masses en tàndem

Unir la cromatografia líquida amb el detector d'espectrometria de masses aporta una injecció d'extractes líquids directa, i una alta sensibilitat. A més a més, aquesta combinació LC/MS-MS produeix una "doble separació": una per l'afinitat dels analits amb la fase estacionària de la columna i l'altra basada en la relació massa/càrrega (m/z) i això fa que hi hagi una gran selectivitat.

Cal dir que també té desavantatges com la quantificació, que pot tenir efecte matriu i fa necessari l'ús d'estàndards interns augmentant el temps d'anàlisi; l'elevat cost és una altra desavantatge.

3.1.1. Detector d'espectrometria de masses

L'espectrometria de masses en tàndem consisteix en l'acoblament en sèrie dels dos analitzadors de masses (figura 3). El detector del què es disposa en aquest estudi és un espectròmetre de masses en tàndem (MS/MS) QTrap d'AB/Sciex. Aquest està basat amb el camí del feix d'ions d'un espectròmetre triple quadrupol convencional, però el tercer quadrupol (Q3) es pot utilitzar com a quadrupol o com a trampa d'ions lineal.

El mode d'adquisició més utilitzat als triple quadrupols és l'MRM (Multiple Reaction Monitoring). Aquest mode permet obtenir cromatogrames altament selectius, amb elevada sensibilitat, però amb pocs ions. És molt útil als processos que es requereix analitzar substàncies molt concretes, de les quals es coneix el pes molecular i el patró de fragmentació.

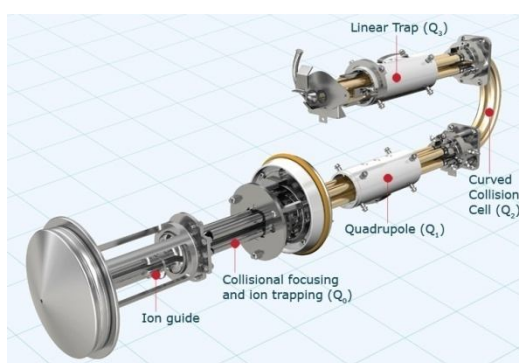


Figura 3: Esquema de l'interior d'un detector MS/MS

3.1.2. ESI

Tenir un detector de masses acoblat a la cromatografia de líquids implica un canvi d'estat de líquid a gas. Ara per ara, la major part dels instruments dissenyats per a LC-MS utilitzen interfases on la ionització es realitza a pressió atmosfèrica (API). Els més destacats són: la ionització química a pressió atmosfèrica (APCI), la fotoionització a pressió atmosfèrica (APPI) i la ionització per electroesprai (ESI), que és la que empra l'equip utilitzat per a aquest estudi.

A l'electronebulitzador ESI per un capil·lar entra el flux que surt de la columna. S'introdueix a un nebulitzador al qual se li aplica una càrrega elèctrica elevada que fa que a la sortida es generi un aerosol de gotes microscòpiques carregades. A continuació es produeix l'evaporació fins que la mida de les gotes es tal que existeix una densitat de càrrega suficient per a què s'alliberen ions de la mostra de la superfície de les gotes. Aquests ions amb una o més càrregues elèctriques s'introdueixen a l'analitzador de masses on es sotmeten a un buit molt elevat.

3.1.3. HILIC

S'han utilitzat tres columnes HILIC (cromatografia d'interacció hidrofílica) diferents, són considerades com una part de la fase normal (NPLC, non polar liquid chromatography). Les columnes estan especificades a l'apartat 4.1.3.

Aquest tipus de cromatografia, no tant comú, funciona al contrari que la cromatografia en fase reversa. El tipus de separació, la selectivitat i la manera de treballar són diferents. La particularitat d'aquest tipus de columnes és la seva fase estacionària polar. En mode HILIC es retenen els compostos de més a menys polars, per això es requereixen fases mòbils altament orgàniques (no polars). Normalment s'utilitzen fases estacionàries químicament lligades, com diols, nitrils, amino i grups nitro.

De les columnes utilitzades dos d'elles han sigut HILIC amb fase estacionària de sílica (SiO_2) i amb grups diols, una de cada marca comercial. La tercera columna té grups amida com a fase estacionària (figura 4).

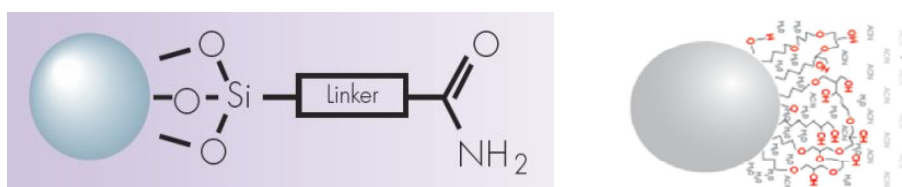


Figura 4: Fases estacionàries amida i diols de www.waters.com

4. Part experimental

4.1. Materials i mètodes

4.1.1. Estàndards

Tetrodotoxina BML-NA120-0001 amb puresa $\geq 98\%$ 1mg d'ALEXIS Corporation. (<http://www.axxora.com>).

4.1.2. Reactius i solvents

Els productes utilitzats per a preparar les fases mòbils, dissolvents d'extracció... estan enumerats a continuació, i a la taula 2 es pot observar la seva toxicitat i la seva manera de manipular-los (9).

- Aigua ultra pura (H₂O Mili-Q): Aigua grau Mili-Q, resistivitat >18 MW·cm produïda mitjançant un sistema Millipore (Bedford, MA, USA).
- Acetonitril (ACN) hipergrau per a LC-MS de Fisher Scientific (10).
- Acetonitril (ACN) grau gradient de Merck KGaA (11).
- Metanol (MeOH) grau gradient de J.T Baker (12).
- Metanol (MeOH) hipergrau per a LC-MS de Merck KGaA (13).
- Àcid acètic de J.T Baker (14).
- Formiat d'amoni per a MS de Fluka (9).
- Acetat d'amoni de Sigma-Aldrich (9).
- n-Hexà grau gradient de VWR (15).

Taula 2: Toxicitat i manipulació dels productes utilitzats

Producte	Toxicitat	Manipulació ²
H ₂ O	-	-
CH ₃ CN	Inflamable Nociu per inhalació Tòxic per ingestió Molt tòxic per contacte en la pell Irritant	Sota campana extractora Guants
MeOH	Inflamable Tòxic per inhalació Tòxic per ingestió Tòxic per contacte en la pell	Sota campana extractora Guants
CH ₃ COOH	Inflamable Corrosiu	Sota campana extractora Guants Ulleres de seguretat
HCOO ⁻ NH ₄ ⁺	Irritant	Guants Ulleres de seguretat
CH ₃ COO ⁻ NH ₄ ⁺	Tòxic per al medi ambient	Guants Ulleres de seguretat
CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	Inflamable Perillós per al medi ambient Nociu per inhalació Irritant Tòxic per a la fertilitat	Sota campana extractora Guants Ulleres de seguretat
C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₈	Neurotòxic	Guants Ulleres de seguretat

² Als laboratoris d'IRTA s'han de portar sempre equips de protecció individual (EPIs): sabates de seguretat, bata, guants, ulleres de seguretat.

4.1.3. Gestió de residus

Al laboratori de química de l'IRTA els residus no es tracten de forma directa sinó que es separen en diferents contenidors i s'envien a una altra empresa per a que els tracten. Tot això es fa per a generar un mínim impacte per al medi ambient. Segons la seva naturalesa i propietats físico-químiques es separen de la següent manera:

- Àcids: s'hi posa qualsevol solució àcida en la qual el dissolvent majoritari sigui aigua.
- Bases: s'hi posa qualsevol solució bàsica en la qual el dissolvent majoritari sigui aigua.
- Compostos no halogenats: engloba totes aquelles dissolucions les quals el dissolvent utilitzat es dissolvent diferent a l'aigua i no conté en la seva estructura halògens.
- Compostos halogenats: es dipositen totes aquelles solucions que continguin com a dissolvent un compost halogenat com el CHCl_3 o bé algun reactiu que contingui halògens en la seva estructura.
- Tòxics: en aquest contenidor es dipositen tots els residus que han estat en contacte o contenen toxines, normalment material fungible.
- Paper: serveix per recollir tota classe de paper que no ha estat contaminat per cap producte del laboratori.
- Vidre: es separen totes les ampolles de vidre de dissolvents netes i vidre trencat del laboratori no contaminat.
- Plàstic: es recullen tots els plàstics procedents d'embalatges i material no contaminat.
- Guants i porexpan: els guants utilitzats i les espumes que arriben amb els paquets es reciclen per separat en aquest contenidor.
- Residus urbans: es diposita tot el que no es pot reciclar.

4.1.4. Equips i software

- Vòrtex MS2 Minishaker de IKA Labortechnik.
- Balança analítica Sartorius model 1702.
- Evaporador per corrent de nitrogen TurboVap LV, Caliper LifeSciences.
- pHmetre cyberscan pH1100 EUTECH instruments de XS instruments.
- Centrífuga MR23i de Thermo Scientific.
- Ultra-turrax T25 basic de IKA-WERKE.
- Vòrtex DVX-2500 Multi-Tube Vortexer de VWR.
- Placa calefactora de labbox.
- Centrífuga d'ependorfs MiniSpin plus.
- Bany d'ultrassons 5510 de BRANSON.

Sistema cromatogràfic

El sistema cromatogràfic, que es pot veure a al figura 5, consta de les següents parts:

- Cromatògraf Agilent 1200 LC system d'Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) amb bomba binària (G1312B), desgasificador de quatre canals (G1379B), autosampler termostatzat (G1367C+G1330B) i forn per a columna (G1316B).
- Columna Phenomenex Luna HILIC 200Å 100 x 2,00 mm, 3 µm (16).
- Columna Waters XBridge HILIC 2,1 x 100 mm, 3,5 µm.
- Columna Waters XBridge Amida 2,1 x 100 mm, 3,5 µm (17).
- Espectròmetre de Masses en tandem, Triple quadrupol 3200 Q TRAP amb font ESI TurboV d'Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).
- Software "Analyst" d'Applied Biosystems.

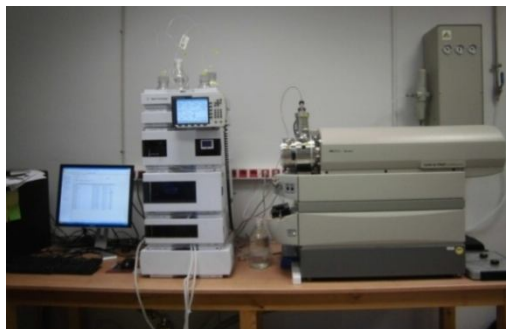


Figura 5: Sistema cromatogràfic HPLC-MS/MS

4.1.5. Mostres

S'ha disposat de tres tipus de mostres diferents. Per una banda, un exemplar de peix globus trobat al litoral català, i per l'altra, mostres de cargol d'Irlanda i mostres de Grècia d'una altra espècie de peix globus.

L'exemplar de peix globus de la costa catalana procedeix de Palamós (Girona) i s'ha identificat com *Sphoeroides pachygaster*. Dacord amb la guia d'espècies Mediterrànies de la FAO (18) (19), *Sphoeroides pachygaster* és un peix potencialment tòxic. És una espècie no originària del Mediterrani; alguns treballs la recullen com a invasora del Mediterrani (20).

Des d'Irlanda han enviat diverses mostres de cargols de mar *Charonia lampas lampas* que en principi contenen toxines, però en baixa quantitat, ja que usualment són comestibles.

I Des de Grècia han enviat els extractes (amb el mateix procediment que s'ha seguit aquí) d'un exemplar femella i de dos grups diferents de 15 peixos petits de *Lagocephalus sceleratus*, també recollits del Mediterrani. Aquestes mostres són les més tòxiques de les quals s'ha disposat i, per tant, les utilitzades per a la posta a punt d'algunes parts del mètode com a control positiu.

4.2. Tractament de la mostra

4.2.1. Dissecció del peix globus

L'exemplar de peix globus *Sphoeroides pachygaster* (figura 6) s'ha disseccionat separant-lo en diferents parts per tal d'analitzar-les per separat ja que no tots els teixits i òrgans tenen la mateixa quantitat de toxina acumulada. A la taula 3 es mostren els pesos dels òrgans que s'han guardat a -20°C per a realitzar l'extracció.



Figura 6: *Sphoeroides Pachygaster* procedent de la costa catalana

El peix s'ha dividit en: múscul, fetge, cor, pell, tracte intestinal, gònades i ulls. S'ha disseccionat el més congelat possible degut a que les tetrodotoxines són toxines hidrofíliques i per tant poden migrar entre els teixits una vegada descongelats (4).

Taula 3: Pesos de les parts del peix globus de la costa catalana

Parts	pes (g)
Múscul (M)	24,1742
Fetge (F)	13,1970
Cor (C)	0,7409
Pell (P)	18,4919
Tracte intestinal (TI)	9,6633
Gònades (G)	4,4277
Ulls (U)	4,0515

4.2.2. Extracció

El primer pas per a realitzar les extraccions ha sigut homogeneïtzar les diferents mostres amb l'Ultraturrax. Les mostres són les diferents parts del *Spherooides pachygaster* disseccionat, i 12 de les mostres de *Charonia lampas lampas* enviades per Katrina Campbell (21).

Posteriorment s'han realitzat dos extraccions consecutives que ara s'expliquen en detall. Aquestes extraccions es poden escalar (4).

1ra extracció:

- Pesar $10 \pm 0,1$ g de teixit en un tub de centrífuga de 50 mL prèviament tarat. Anotar la massa exacta en grams.
- Addicionar 25 mL d'àcid acètic al 0,1%.
- Extraure durant 2 minuts a nivell 2500 l/min amb el vòrtex.
- Bullir durant 10 minuts al bany Maria amb la placa calefactora.
- Extraure en calent durant 2 minuts a nivell 2500 l/min amb el vòrtex.
- Refredar amb un bany d'aigua amb gel.
- Centrifugar a 4500 rpm durant 5 minuts, a 4°C.
- Retirar el sobrenedant en un tub de centrífuga de 50 mL.

2na extracció:

- Addicionar 25 mL d'àcid acètic al 0,1% a l'extracte restant.
- Extraure durant 2 minuts a nivell 2500 l/min amb el vòrtex.
- Centrifugar a 4500 rpm durant 5 minuts, a 4°C.
- Retirar el sobrenedant i addicionar al sobrenedant anterior.
- Tornar a centrifugar a 4500 rpm durant 10 minuts a 20°C els dos extractes junts.
- Transvasar el sobrenedant i enrasar a fins a 50mL amb àcid acètic al 0,1%.

4.2.3. Filtració

Una vegada es tenen els extractes es filtren amb filtres de 0,45 µm de nylon per a guardar. Durant la filtració han sorgit alguns problemes degut a la complexitat i varietat de les matrius; per exemple al fetge es va tenir que fer una extracció líquid-líquid amb hexà abans de filtrar degut a la grassa.

Per a l'hora de punxar al HPLC s'ha fet una filtració addicional amb filtres de tamís molecular de 3000 M. Després s'han evaporat els extractes a sequedat i redissolt en MeOH sense diluir, s'ha posat al vòrtex i s'ha centrifugat a 12000 rpm un minut. Finalment, el sobrenedant s'ha filtrat amb filtres de 0,2 µm i passat a vials de vidre àmbar per a punxar a l'equip.

4.3. Cromatografia

El mètode d'anàlisi utilitzat per a les tetrodotoxines ha estat la cromatografia de líquids HILIC amb detector d'espectrometria de masses en tàndem descrit a l'apartat 4.1.3.

Tota la part d'optimització del mètode es troba desenvolupada a l'apartat següent de resultats i discussió. S'ha cregut convenient per a que resulti més entenedor, ja que, per a variar els paràmetres a optimitzar s'ha necessitat interpretar resultats.

5. Resultats i discussió

5.1. Optimització de les condicions del detector

5.1.1. Condicions inicials del detector

Les condicions inicials, que estan resumides a la taula 4 i a la taula 5, s'han obtingut a partir d'una infusió directa al detector MS/MS de l'estàndard de tetrodotoxina diluït en àcid acètic 10mM. Amb aquest mateix estàndard diluït en àcid acètic s'ha realitzat tota la optimització de les condicions del detector.

L'equip ha buscat les condicions inicials ell mateix però igualment s'han canviat els paràmetres per a veure si es poden millorar.

Taula 4: Paràmetres d'ESI inicials que s'optimitzaran

PARÀMETRE D'ESI	MODE POSITIU
Potencial de desagrupació (DP)	51 (V)
Temperatura (TEM)	300 (°C)
Gas cortina (CUR)	20 (psi)
Gas de col·lisió (CAD)	4 (unitats arbitràries)
Voltatge del spray d'ions (IS)	5500 (V)
Gas nebulitzador (GAS1)	50 (psi)
Gas calefactor (GAS2)	50 (psi)

Taula 5: Mètode MRM inicial

Q1 (uma)	Q3 (uma)	Temps (ms)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
320,1	302,1	100	51	12	20	29	4
320,1	162,2	100	51	12	20	53	4
320,1	284,1	100	51	12	20	31	4
320,1	77,1	100	51	12	20	87	4
320,1	178,1	100	51	12	20	43	4
320,1	60,1	100	51	12	20	59	4
320,1	134,2	100	51	12	20	61	4
320,1	95,1	100	51	12	20	65	4
320,1	81,1	100	51	12	20	87	4

5.1.2. Optimització del potencial de desagrupació

El potencial de desagrupació, *declustering potential* (DP), és un paràmetre que controla la diferència de potencial entre el potencial de terra i l'orifici del plat. S'utilitza per minimitzar el clúster d'ions, però si és massa elevat pot arribar a fragmentar l'ió desitjat. El rang de treball del DP és de 0-100 V normalment però amb el 3200 Q TRAP pot arribar fins a 400 V.

Degut als resultats experimentals que es poden veure a la figura 7 s'ha decidit no provar el DP més enllà de 100 V, ja que no tenim intensitat. A la figura 7 podem veure d'esquerra a dreta els diferents potencials aplicats de: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 i 100 V. S'ha escollit el valor que dona una millor senyal absoluta, 50 V. Com aquest és proper a 51 s'ha decidit deixar el potencial de desagrupació tal com el detector el va optimitzar amb la infusió.

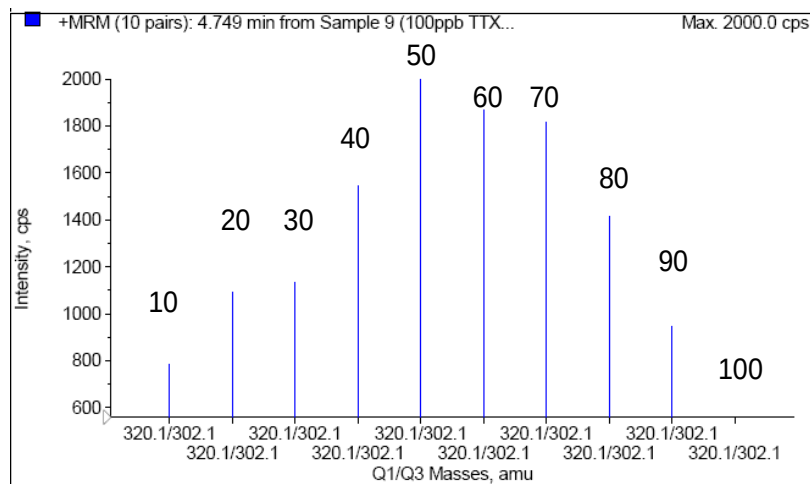


Figura 7: Gràfic resultat de la optimització del potencial de desagrupació

5.1.3. Optimització de la temperatura

La temperatura òptima del nebulitzador depèn tant de l'analit com de la fase mòbil: com més solvent orgànic, menys temperatura es necessita. El nostre instrument no pot superar els 750°C i per no acurtar la vida útil de la font no s'ha arribat al límit permès.

Així doncs, s'ha provat el següent rang de temperatures: de 250 a 600 de 50 en 50°C. A la figura 8 es pot veure el resultat obtingut de l'àrea del pic en relació a la temperatura provada i els diferents ions de la TTX. La temperatura escollida com a òptima és 600°C.

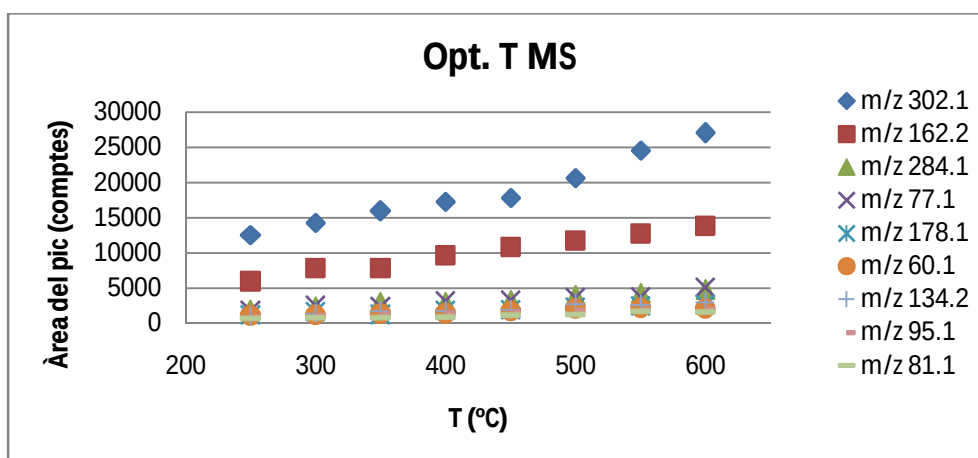


Figura 8: Gràfic resultat de la optimització de la temperatura del detector

5.1.4. Optimització del gas cortina

El gas cortina, *curtain gas* (CUR), utilitzat és el N₂. S'empra com a barrera de gas d'ultra alta puresa, que ajuda en la desagrupació d'ions i manté les espècies no ionitzades fora de l'orifici i la regió de l'analitzador de l'espectròmetre de masses API. El paràmetre CUR s'ha de mantenir sempre el més alt possible per tal de protegir el detector sense perdre sensibilitat.

Per a optimitzar aquest paràmetre s'han creat quatre mètodes diferents variant només la pressió del CUR. Tal com es mostra a la figura 9 s'ha provat a 10, 20, 30, i 40 psi. Els diferents ions no mostren diferències significatives i el CUR de la infusió ha sigut de 20 psi (taula 4). S'ha decidit canviar el gas cortina a 30 psi degut a que no baixa la sensibilitat i s'augmenta la protecció de la font.

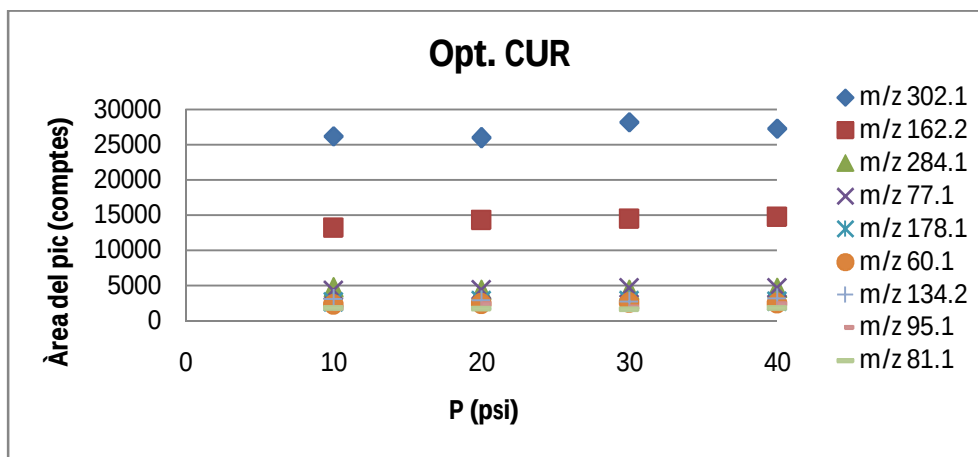


Figura 9: Gràfic resultat de la optimització del gas cortina

5.1.5. Optimització del gas de col·lisió

El gas de col·lisió (CAD) utilitzat és el N₂. S'empra per a induir la dissociació activada de la col·lisió o fragmentació, a la cel·la de col·lisió de l'analitzador de l'espectròmetre de masses API.

Per a optimitzar aquest paràmetre s'han creat sis mètodes diferents variant només les unitats del CAD. Tal com es mostra a la figura 10 s'ha provat a 2, 4, 6, 8, 10 i 12 unitats arbitràries internes del detector. Els diferents ions no mostren diferències significatives excepte al de 2 que és massa baix i el CAD de la infusió ha sigut de 4 (taula 4). S'ha decidit no variar el gas de col·lisió i mantenir-lo a 4.

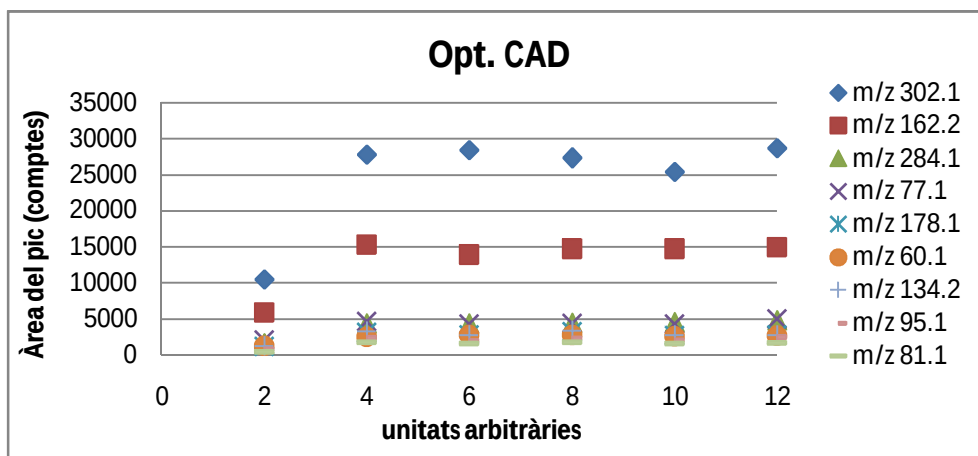


Figura 10: Gràfic resultat de la optimització del gas de col·lisió

5.1.6. Optimització del voltatge de l'esprai d'ions

Variant l'electroesprai (IS) que utilitza el gas nebulitzador es poden millorar la formació de gotes, és útil a majors fluxos i alt contingut aquós. A la figura 11 es mostra el resultat de la optimització de l'esprai d'ions, l'inicial (taula 4) és de 5500 V. Degut a que no es mostren diferències significatives de l'àrea del pic en comptes s'ha decidit deixar-lo tal com estava.

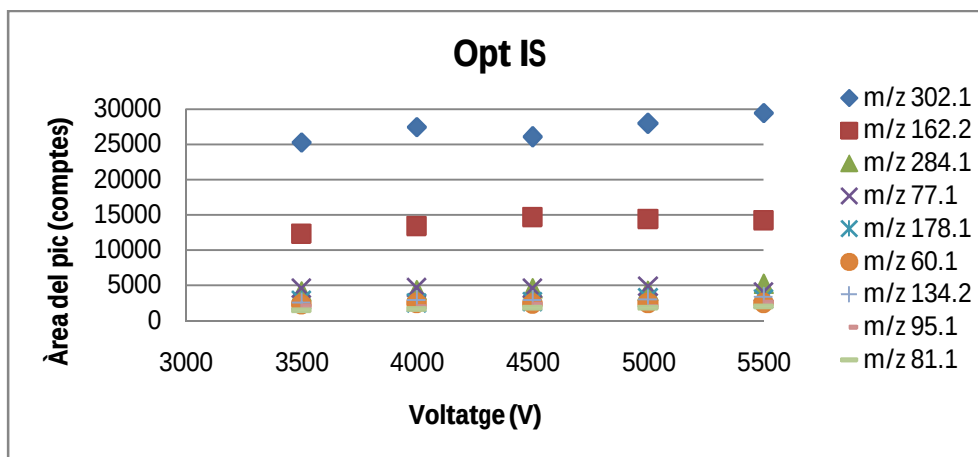


Figura 11: Gràfic resultat de la optimització de l'esprai d'ions

5.1.7. Condicions del detector optimitzades

A la taula 6 es mostren els paràmetres optimitzats del detector.

Taula 6: Paràmetres del detector optimitzats

PARÀMETRE D'ESI	MODE POSITIU
Potencial de desagrupació (DP)	51 (V)
Temperatura (TEM)	600 (°C)
Gas cortina (CUR)	30 (psi)
Gas de col·lisió (CAD)	4 (unitats arbitràries)
Voltatge del spray d'ions (IS)	5500 (V)
Gas nebulitzador (GAS1)	50 (psi)
Gas calefactor (GAS2)	50 (psi)

5.1.8. Mètode per a mostres

El mètode per a mostres (taula 7) s'ha desenvolupat agafant les condicions optimitzades del detector per a l'estàndard de tetrodotoxina i a partir de les relacions m/z més abundants a les altres tetrodotoxines de la bibliografia amb detectors MS/MS (4) (22) (23). L'energia de col·lisió (CE) s'ha escollit per comparació amb les de la tetrodotoxina, és a dir, per a una pèrdua d'aigua (18 unitats de diferència) 29 V i per a l'obtenció de fragments més petits 53 V.

Taula 7: Mètode MRM per a mostres

Tetrodotoxina	Q1 (amu)	Q3 (amu)	temps (ms)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
TTX i 4-epiTTX	320,1	302,1	90	51	12	20	29	4
	320,1	162,2	90	51	12	20	53	4
4,9-anhydroTTX	302,1	162,2	90	51	12	19	53	4
	302,1	256,1	90	51	12	19	53	4

5-deoxyTTX i	304,1	162,2	90	51	12	19	53	4
11-deoxyTTX	304,1	286,1	90	51	12	19	53	4
6,11-dideoxyTTX	288,1	224,0	90	51	12	18	53	4
5,6,11-trideoxyTTX	272,1	162,2	90	51	12	18	53	4
	272,1	254,0	90	51	12	18	29	4
11-norTTX-6(S)-ol i	290,1	272,1	90	51	12	18	29	4
11-norTTX-6(R)-ol	290,1	162,2	90	51	12	18	53	4

5.2. Optimització de les condicions cromatogràfiques

5.2.1. Condicions cromatogràfiques inicials

Les condicions inicials s'han escollit a partir de les recomanacions de la columna Luna HILIC utilitzada per a realitzar l'estudi inicialment³ (16).

Al tractar-se de columnes HILIC el gradient comença en un tant per cent alt de fase mòbil orgànica (ACN) i progressivament va augmentant el percentatge de fase aquosa, finalment es retorna a les condicions inicials tal com es mostra a la figura 12.

Les fases mòbils proposades inicialment han estat:

- FM A: H₂O 5 mM de formiat d'amoni.
- FM B: ACN:H₂O (90:10) 5 mM de formiat d'amoni.

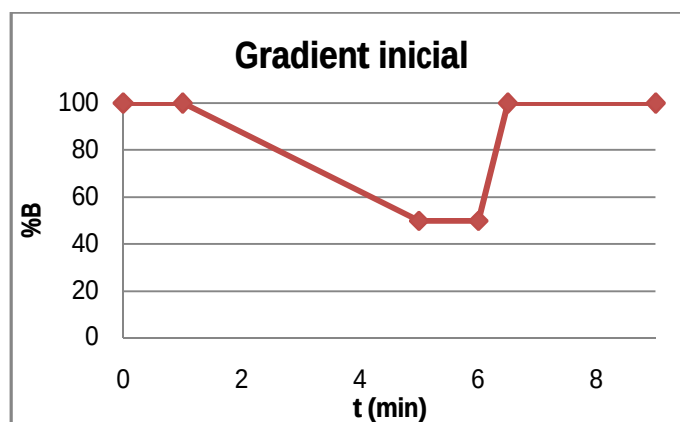


Figura 12: Gradient del mètode MRM inicial

S'ha començat en una capacitat de càrrega de 10 µL i en alguns experiments qualitatius s'han punxat 5 µL per a no gastar extracte. El solvent de la mostra inicial ha sigut àcid acètic 0,1% tal com es fa l'extracció per a evitar un canvi de solvent.

S'ha punxat estàndard diluït de TTX a les condicions inicials i l'extracte que s'ha utilitzat per a la optimització és el tracte intestinal de l'individu femella de Grècia (4 GI track). S'ha escollit aquesta mostra per a optimitzar les condicions cromatogràfiques perquè és una de les mostres més tòxiques de que es disposa.

³ A l'inici de l'estada només hi havia una columna HILIC al centre.

5.2.2. Optimització de la fase mòbil

La optimització de la fase mòbil consta de: tipus de sal, quantitat de sal i pH.

Els dos primers paràmetres s'han optimitzat amb la columna Luna HILIC i punxant l'estàndard de la TTX diluït. Per al tipus de sal s'ha utilitzat acetat i format d'amoni, i s'ha optimitzat conjuntament amb la quantitat de sal (mM). Les quantitats d'acetat d'amoni i format d'amoni provades han estat 5, 10, 15, 20, 25, i 30 mM de sal, ja no s'ha pogut augmentar més la concentració degut a que a la FM B es formaven dos fases diferenciades. A la figura 13 es mostra el resultat obtingut en les dos transicions de la tetrodotoxina més abundants, les àrees del pic (comptes) estan a l'eix de l'esquerra i en blau, i les intensitats del pic (cps) estan a l'eix de la dreta en verd, a l'eix de les x es mostra la concentració en milimolar.

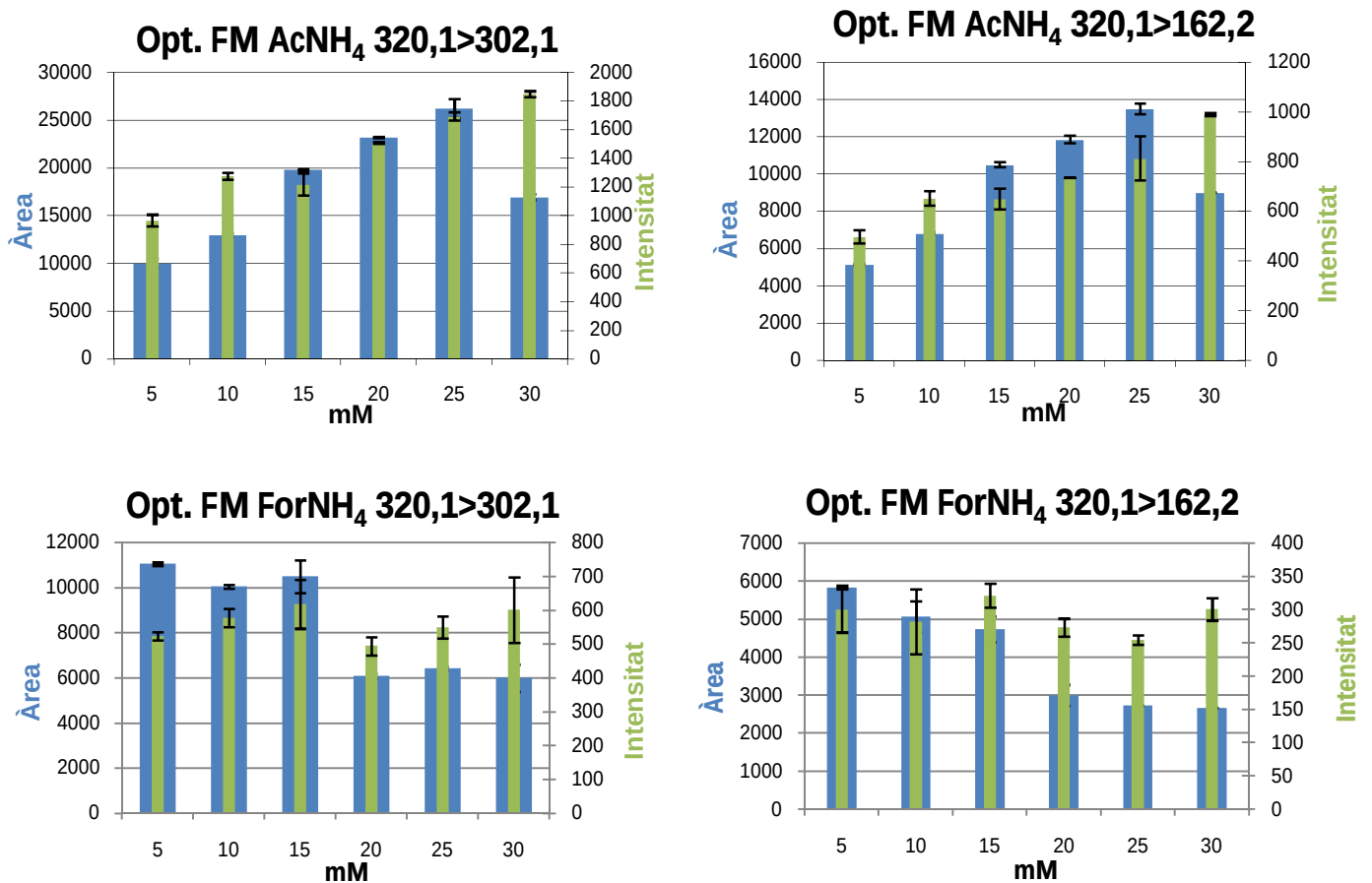


Figura 13: Gràfics de la optimització del tipus de sal i la quantitat a les FM

S'ha decidit escollir l'acetat d'amoni com a sal a concentració 30 mM, ja que com es mostra a la figura 13 s'aconsegueix una major intensitat de pic i també que sigui més estret per a ambdós transicions per això l'àrea del pic baixa una mica.

Pel que fa al pH s'ha optimitzat en un rang de 3,8 a 5,8 de 0,5 en 0,5 per a les tres columnes. Abans d'optimitzar el pH la FM A tenia un pH al voltant de 7 i en aquest tipus de cromatografia és important optimitzar-lo perquè varien considerablement els resultats. La columna que ha donat una millor separació cromatogràfica ha sigut la Amida de Waters a pH 5,8 es mostren els diferents cromatogrames de la columna òptima a la figura 14.

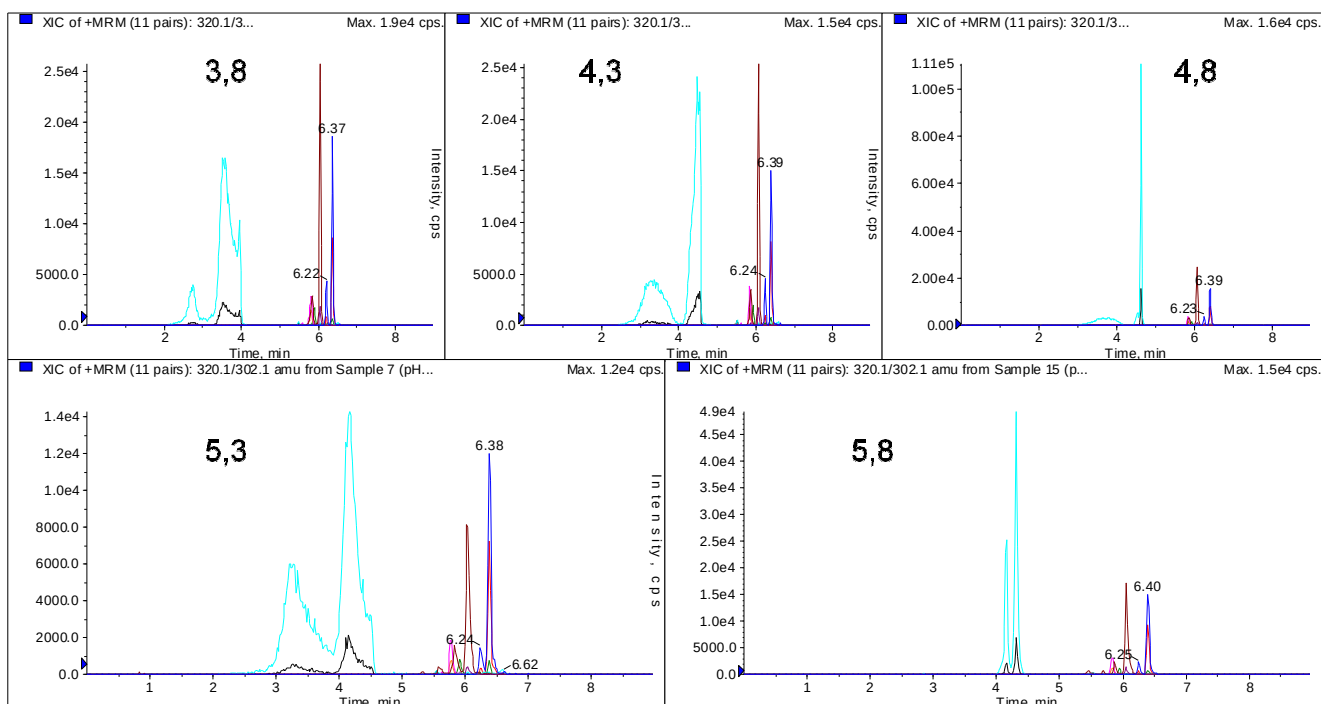


Figura 14: Cromatogrames de 4 GI track en la columna òptima (Amida) a diferents pH.

Per a calcular la quantitat d'àcid acètic que s'ha de posar a la FM A i a la part aquosa de la FM B s'ha utilitzat l'equació de la figura 15, i després de preparades s'ha mesurat amb el pH metre el pH exacte.

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Figura 15: Equació de Henderson-Hasselbalch

Exemple del càlcul de la quantitat d'àcid acètic òptima a afegir a la FM A:

pH = 5,8

[A⁻] = 0,03 (30mM)

pKa HAc = 4,76

V FM = 500 mL

PM HAc = 60,05

δ HAc = 1,049 g/mL

Puresa 9,99-100%

$$5,8 = 4,76 + \log \frac{[0,03]}{[HA]}$$

$$[HA] = 0,0027 \text{ mols/L d'HAc}$$

$$500 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{0,0027 \text{ mols}}{1 \text{ L}} \times \frac{60,05 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1,049 \text{ g}} = 0,078 \text{ mL}$$

Les fases mòbils òptimes són les següents:

- FM A: H₂O 30 mM d'acetat d'amoni a pH 5,8.

Per a 500mL: 15mL de solució estoc d'acetat d'amoni 1M i 78 µL d'àcid acètic.

- FM B: ACN:H₂O (90:10) 30 mM d'acetat d'amoni. La part aquosa ha d'estar a pH 5,8.

Per a 500mL: 15mL de solució estoc d'acetat d'amoni 1M i 78 µL d'àcid acètic enrasat a 50mL en aigua Milli-Q, transvasar a un matràs de 500mL i enrasar en ACN.

- Solució estoc: 1 M d'acetat d'amoni

Per a 250 mL: 19,6633 g d'acetat d'amoni enrasat en aigua Milli-Q

5.2.3. Optimització del gradient

El gradient del mètode s'ha optimitzat per a les dos columnes, la HILIC de Phenomenex i la amida de Waters, degut a que la columna HILIC de Waters ha donat pitjors cromatogrames que la de l'altra marca comercial.

En la columna Luna HILIC s'han provat diversos gradients amb la fase mòbil inicial (5.2.1.) i el millor ha resultat ser el gradient proposat al començament (figura 12). Per a avançar una mica els pics però s'ha provat de disminuir el percentatge d'aigua de la FM B d'un 10% fins a un 5%, que és el mínim d'aigua que se li pot aplicar a la columna (16).

El gradient òptim per a la columna Luna HILIC de Phenomenex és el gradient inicial amb la fase mòbil 30mM d'acetat d'amoni però amb un 5% d'aigua a la fase mòbil B.

En la columna Amida de Waters s'han provat alguns gradients diferents als d'abans perquè la senyal segons la fase estacionària de la columna varia. El gradient òptim es mostra a la figura 16, en aquest cas s'ha mantingut la fase mòbil ja optimitzada.

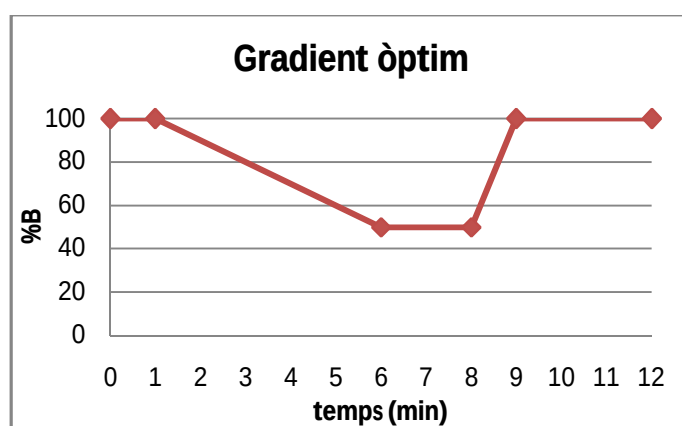


Figura 16: Gradient òptim per al mètode

Aquesta columna amb fase estacionària amida (figura 4) amb tot optimitzat dona una millor separació cromatogràfica que les altres dos amb una major resolució (R_s) per als pics que estan molt junts de la mateixa m/z , la TTX i la 5,6,11-trideoxyTTX amb els seus epímers. Els resultats de la resolució s'han calculat mitjançant la fórmula de la figura 17, per a la TTX ha estat 0,96 i per a la 5,6,11-trideoxyTTX ha estat 0,99. Per tant s'ha escollit aquesta columna amb grups amida per al mètode de les tetrodotoxines ja que és el que té major eficàcia.

$$R_s = 2 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2}$$

Figura 17: Fórmula de la resolució

5.2.4. Volum de punxada i dissolvent de la mostra

El volum de punxada s'ha provat amb l'estàndard diluït de la tetrodotoxina. S'ha provat diluït en àcid acètic 0,1%, que és el dissolvent utilitzat per a l'extracció, i amb MeOH que el recomanen les instruccions tècniques de la columna (17). Interessa punxar com més volum de mostra millor ja que les toxines estan en baixes concentracions i com més volum de punxada més sensibilitat. Els volums que s'han provat són: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75 i 100 μ L amb els dos dissolvents. Es poden observar a la figura 18 els gràfics de l'àrea del pic de la TTX la primera transició (320,1>302.1) i de la intensitat en front al volum de punxada al de dalt en àcid acètic i al de baix en metanol, per a la segona transició tenen la mateixa forma. Es pot observar que la intensitat baixa i puja l'àrea a les últimes punxades això indica que la columna està sobrecarregada i per tant no interessa perquè hi ha una pèrdua d'eficàcia.

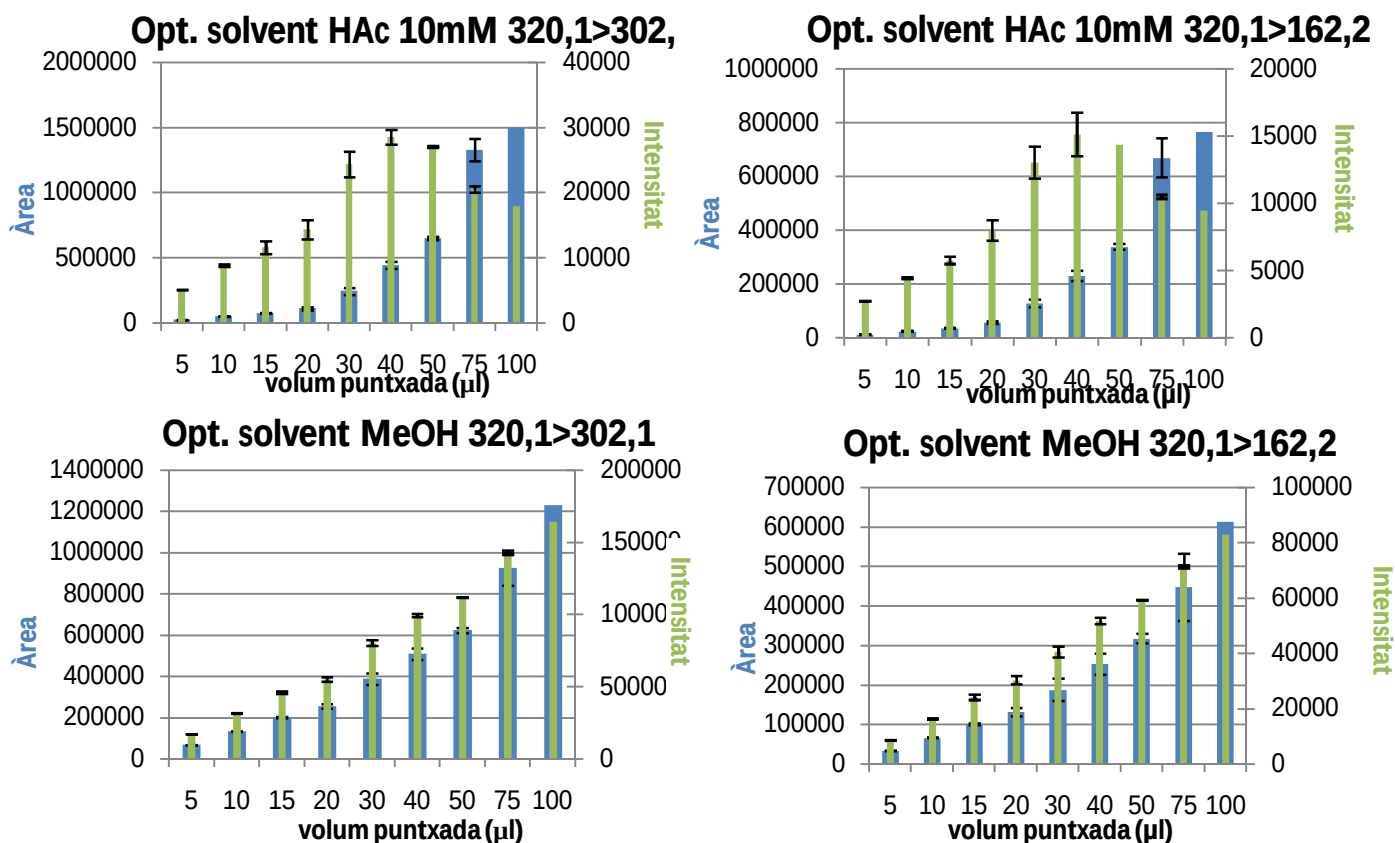


Figura 18: Gràfics de la optimització del solvent de la mostra, dalt HAc i baix MeOH

S'escull treballar en MeOH ja que mostra una millor sensibilitat i intensitat. El volum de punxada escollit és 50 μL, ja que 75 i 100 comencen a presentar més mala forma de pic, eixamplant-se, i és sobrecarregar molt la columna tot i que augmenti també la intensitat. Ja que estem treballant en MRM això s'ha de tindre en compte ja que només veiem al cromatograma els ions que volem veure i no la resta de la matriu.

5.3. Validació del mètode

La validació d'un mètode és el procés de demostració experimental i documentada de que un mètode analític funciona correctament. Les exigències de validació es que es compleixin els següents requisits: **estudis d'exactitud, precisió, linealitat, selectivitat, sensibilitat, rang, límit de detecció, límit de quantificació i robustesa.**

En aquest mètode no s'ha pogut validar rigorosament tot el necessari per falta de temps.

L'exactitud i la precisió no s'han determinat per al mètode complet, però en contraposició a cada tanda es posaven rectes de calibrat cada sis mostres i es quantificava cada mostra en les dos rectes més properes a ella. També s'ha fet un dopatge a tres nivells de mostres blanques de cargol de mar i s'ha trobat que hi ha efecte matriu per a aquest tipus de mostres.

La selectivitat és la capacitat del mètode per a identificar els analits d'interès en presència d'altres substàncies, i tractant-se d'un detector de masses no s'ha avaluat.

La sensibilitat s'ha considerat bona degut a que s'ha arribat a uns límits de quantificació a nivells de ppb com veurem més endavant.

La robustesa és la capacitat del mètode analític per a romandre inalterat per lleugeres variacions, s'ha vist per exemple un canvi significatiu en l'estudi del pH, el mètode però és fiable en les condicions descrites.

5.3.1. Linealitat i rang

La linealitat és la capacitat del mètode per a proporcionar resultats que són directament proporcionals a la concentració de l'analit a la mostra dins d'un rang. S'ha escollit un rang de 1 ppb fins a 500 ppb ja que s'ha considerat suficient per a la majoria de les mostres.

A l'hora de fer la recta s'ha considerat 1 ppb com a LOD per tant s'ha eliminat el punt de la recta, i s'ha eliminat el punt de 500 ppb perquè fa que hi hagi molta dispersió entre punxades, i en la majoria dels casos per a quantificar les mostres no ha sigut necessari i disminuïa la R^2 .

S'ha establert un criteri de linealitat d'una $R^2 \geq 0,992$. A la figura 19 es mostra una de les rectes amb l'equació i la R^2 com a exemple.

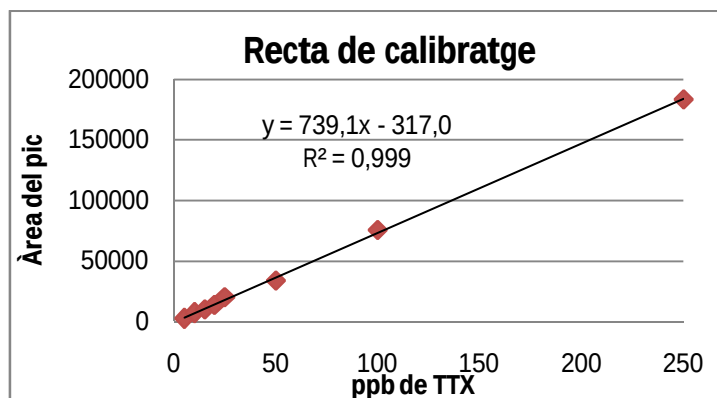


Figura 19: Recta de calibratge del mètode

5.3.2. Límits

El límit de detecció (LOD) és la mínima quantitat d'analit que es pot detectar amb el mètode, i el límit de quantificació (LOQ) és la mínima quantitat d'analit que es pot quantificar en l'adequada precisió i exactitud. Per a determinar aquests límits s'ha utilitzat el criteri de que la relació senyal/soroll. Per al LOD ha de ser de igual a la concentració d'analit que proporcionï una senyal 3 vegades superior al soroll, i per al LOQ el senyal ha de ser 10 vegades igual al soroll. Per a determinar aquests límits s'han aprofitat els resultats obtinguts per a la linealitat del mètode. S'ha determinat que els límits són (figura 20):

- LOD: 1 ppb de tetrodotoxina.
- LOQ: 5 ppb de TTX (25 µg/Kg), és la concentració més baixa de la recta de calibratge.

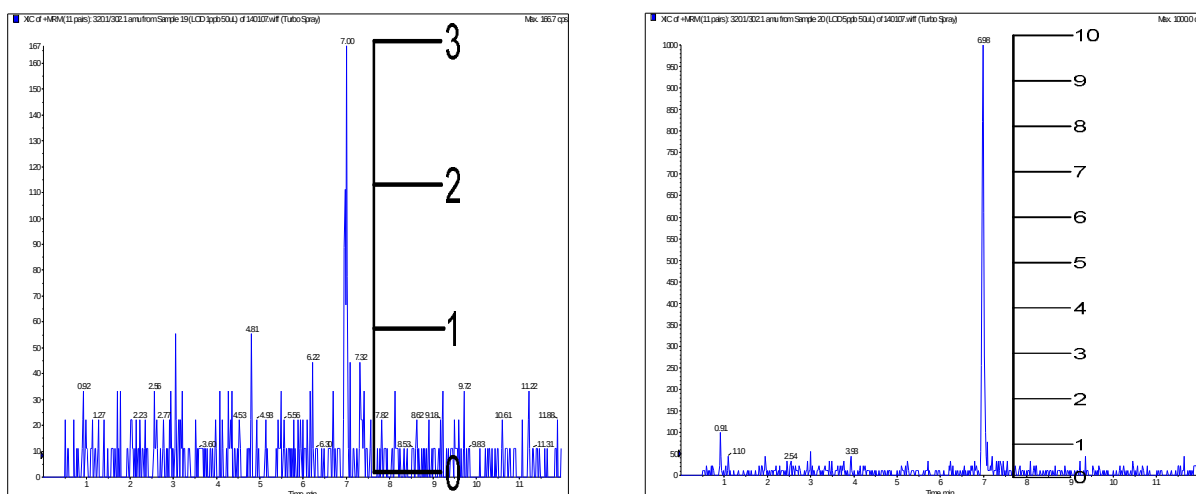


Figura 20: LOD a l'esquerra i LOQ a la dreta.

6. Aplicació de la metodologia desenvolupada a mostres reals

6.1. Mostres analitzades

S'han analitzat 12 mostres de cargol, i tres exemplars de peix globus dos *Lagocephalus sceleratus* i l'*Sphoeroides pachygaster* amb les diferents parts per separat. Del *Lagocephalus sceleratus* s'han analitzat les mostres també diluïdes 1:20 ja que s'havia punxat prèviament i hi havia tetrodotoxines que haguessin sortit de rang.

6.2. Anàlisi cromatogràfic

Amb el mètode "TTXs_MRM_Def.dam" amb el mode MRM desenvolupat s'ha de programar un set de mostres. Al set cada mostra s'injectarà per duplicat però de manera no consecutiva. Al principi es fa un condicionament de 4 blancs i a continuació, a cada set de mostres s'inclou un blanc de solvent (MeOH LC-MS) i una corba de calibrat d'estàndard TTX de 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 i 250 ppb preparats en MeOH LC-MS; al davant i al darrere de cada 6 injeccions consecutives màxim de mostres crues. Es programa un "Rentat" mètode "limpieza.dam" al final de cada tanda.

6.3. Identificació

La identificació s'ha dut a terme per comparació amb el temps de retenció (t_R) obtingut amb l'anàlisi de les solucions de treball (4 GI track), detallats a la taula 8, i l'estàndard; a banda de que han de coincidir les dos transicions de la toxina.

Taula 8: Temps de retenció de les TTXs

Tetrodotoxina	t_R
TTX	6,92
4-epiTTX	6,74
4,9-anhydroTTX	6,38
5-deoxyTTX i	6,27
11-deoxyTTX	6,02
6,11-dideoxyTTX	- ⁴
5,6,11-trideoxyTTX-1	4,49
5,6,11-trideoxyTTX-2	4,73
11-norTTX-6(S)-ol	6,52
11-norTTX-6(R)-ol	6,31

A més a més s'han fet dos EPIs (*Enhanced Product Ion Scan*), ja que l'empremta molecular de l'EPI redueix el nombre de resultats fals-positius. S'han realitzat un de la m/z 320 en mostra i un de l'estàndard, i un de la m/z 272 en mostra, per a poder utilitzar en un futur.

Els EPI de m/z 320 es mostren a la figura 21. Aquests EPIs indiquen que a la mostra hi ha TTX com a l'estàndard ja que coincideix el pic de t_R . A més a més a l'espectre de masses que els acompanya resultat de l'EPI indica que no tant sols coincideixen els dos ions més abundants monitoritzats al mètode MRM, sinó que també coincideixen els ions minoritaris.

⁴ No s'ha trobat 6,11-dideoxyTTX a cap de les mostres, ni traces no quantificables per a poder determinar el temps de retenció.

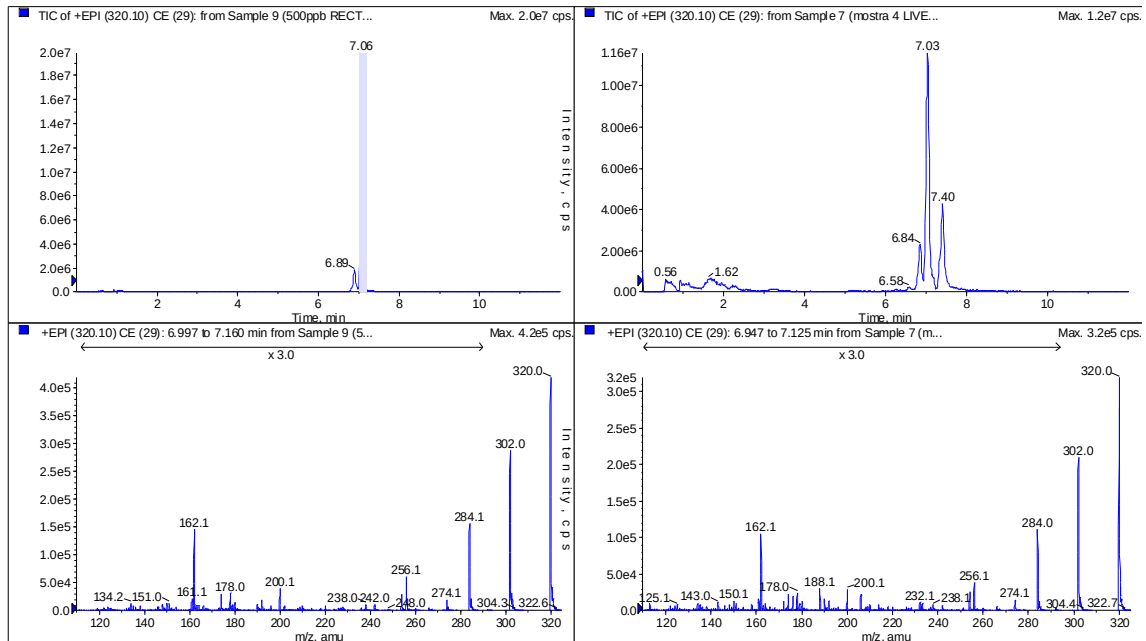


Figura 21: EPI m/z 320 a la dreta de la mostra 4 GI track, a l'esquerra de l'estàndard.

A la figura 22 es pot observar el cromatograma òptim però amb 5 μ L d'injecció del 4 GI track, amb les diferents tetrodotoxines trobades per separat a la seva dreta. Hi ha una ampliació de dos ordres de magnitud del minut 6 al 8 del cromatograma.

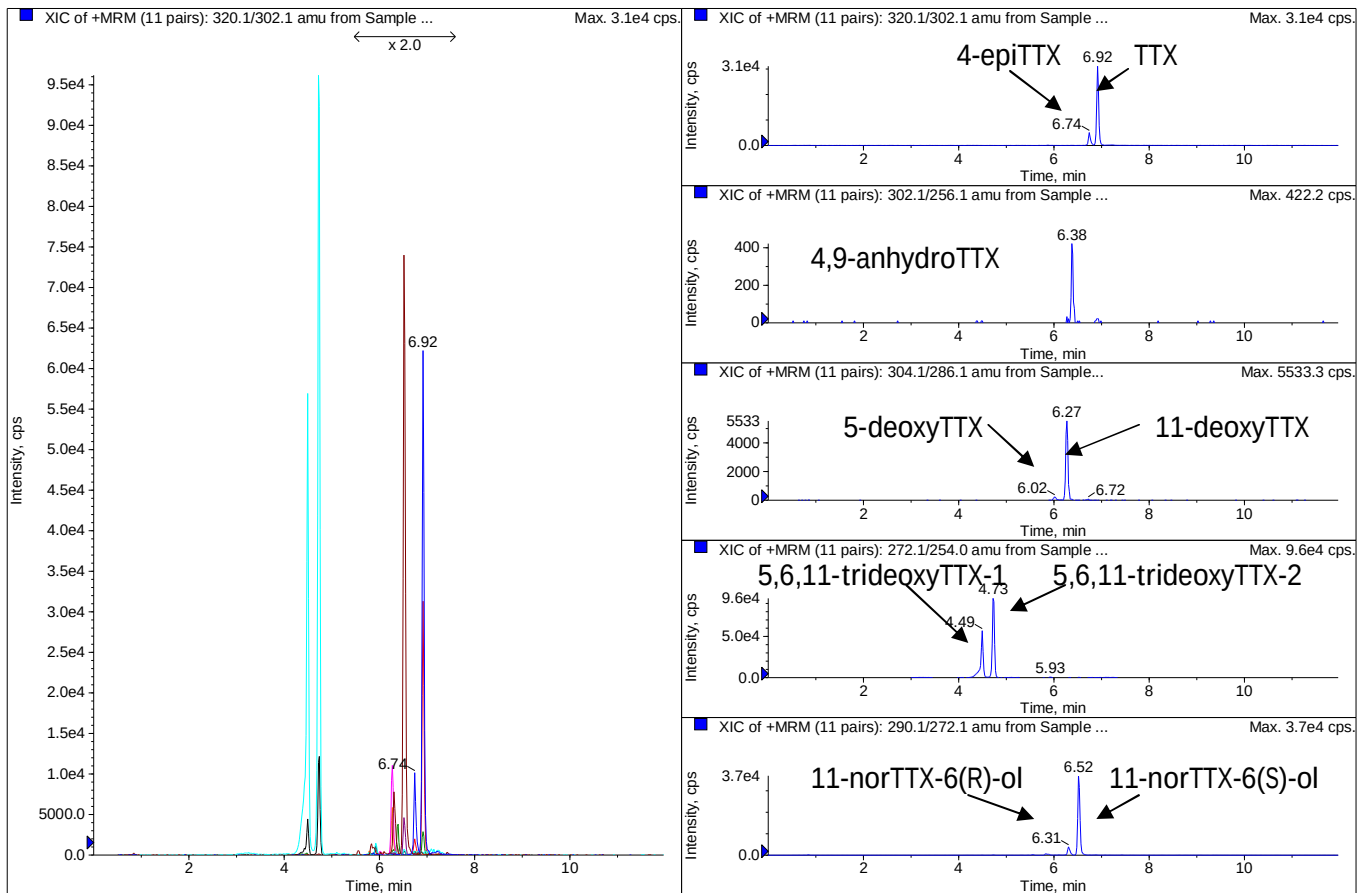


Figura 22: Cromatograma òptim del 4 GI track amb les diferents TTXs a la dreta

S'han integrat les àrees dels pics cromatogràfics obtinguts a una regressió lineal del tipus:

$$y = ax + b$$

Aquesta regressió es pot aplicar per al càlcul de la concentració de totes les tetrodotoxines del mètode. La quantificació es fa mitjançant el valor d'àrea obtingut d'integrar el pic de TTXs i aplicant els següents càlculs (si es fan dilucions s'han d'incloure al factor):

$$x = \frac{y - b}{a} = ng/mL$$

$$\text{Concentració en carn} = \frac{(ng)}{(mL)} \times \frac{V(mL)}{m(g)} \times \frac{1000(g)}{1(Kg)} \times \frac{1(\mu g)}{1000(ng)} = \mu g/Kg$$

Essent "a" la pendent de la recta, "b" la coordenada a l'origen, "V" el volum de l'extracte després d'enrasar i "m" la massa exacta de teixit pesada inicialment. Cal recordar el punt 6.2. i que a cada set de mostres se li ha determinat la concentració segons les dos rectes més properes a ella.

6.4. Resultats

Els resultats experimentals obtinguts es resumeixen a la taula 9 per al *Sphoeroides pachygaster*, a la taula 10 per al *Lagocephalus sceleratus* i a la taula 11 per a *Charonia lampas lampas*. Les mostres estan etiquetades tal que:

- *Lagocephalus sceleratus*: amb un número que correspon al número d'espècimen, la part del peix en anglès i la dilució feta, si és el cas, al final.
- *Charonia lampas lampas*: amb una S (sample) i amb un número consecutiu tal com van arribar.
- *Sphoeroides pachygaster*: amb la inicial de l'òrgan i si s'escau un número per a indicar l'extracció i una lletra per a indicar la rèplica de filtració.

- *Lagocephalus scleratus*

Taula 9: Resultats experimentals del peix globus de Grècia en µg/Kg

MOSTRA	TTX	4-epiTTX	4,9-anhidroTTX	11-deoxyTTX	5-deoxyTTX	6,11dideoxyTTX	5,6,11-trideoxyTTX-1	5,6,11-trideoxyTTX-2
4 GI TRACK	2867	762	<LOQ ⁵	689	<LOQ	<LOQ	1429	3347
4 GI TRACK 1:20	15456	2272	<LOQ	2142	<LOQ	<LOQ	30628	35154
4 LIVER	2331	488	<LOQ	1203	<LOQ	<LOQ	1292	2829
4 LIVER 1:20	7129	870	<LOQ	2287	<LOQ	<LOQ	36547	44162
4 SKIN	736	115	<LOQ	156	<LOQ	<LOQ	331	703
4 SKIN 1:20	1278	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11356	10899
4 MUSCLE	331	51	<LOQ	66	<LOQ	<LOQ	<LOQ	30
4 MUSCLE 1:20	267	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	740	519
4 GONADS	1106	293	<LOQ	665	<LOQ	<LOQ	177	405
4 GONADS1:20	3965	279	<LOQ	1656	<LOQ	<LOQ	6728	6016
2 GI TRACK	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2 GI TRACK 1:20	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2 LIVER	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2 LIVER 1:20	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2 SKIN	33	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2 SKIN 1:20	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	74	<LOQ
2 MUSCLE	45	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2 MUSCLE 1:20	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

⁵ On posa <LOQ es refereix a que hi ha menys de 25µg/Kg de toxina a la mostra

Taula 10: Resultats experimentals del cargol d'Irlanda en µg/Kg

[illegible]

Taula 11: Resultats experimentals del peix globus pescat a Palamós en µg/Kg

[illegible]

7. Aspectes econòmics

S'han detallat els preus del material fungible utilitzat sense IVA. I a més a més el cost d'amortització de l'equip LC-MS/MS i el cost d'un tècnic. No s'han tingut en compte les despeses energètiques i tampoc el cost d'amortització dels equips més senzills utilitzats.

- Acetonitril hipergrau.....	45,79€/2L
- Acetonitril grau gradient.....	21€/2,5L
- Metanol grau gradient.....	9,55€/2,5L
- Metanol hipergrau.....	20,20€/2L
- Àcid acètic glacial.....	57,76€/2,5L
- Formiat d'amoni per a MS.....	64,90€/50g
- Acetat d'amoni.....	43,90€/250g
- Filtres de nylon 0,2 µm.....	70,70€/50u
- Filtres de nylon 0,45 µm.....	51,70€/100u
- Filtres de membrana 3K.....	112€/24u
- Xeringues de plàstic 6 mL.....	3,44€/100u
- Xeringues de plàstic 15 mL.....	8€/100u
- Tubs de centrífuga 50 mL.....	44€/500u
- Tubs de centrífuga 15 mL.....	35€/500u
- Guants.....	12,5€/100u
- Pipetes pasteur.....	41€/1000u
- Puntetes 200 µL µpipetes.....	5€/100u
- Puntetes 1 mL µpipetes.....	7€/100u
- Vials de vidre per a LC.....	92,82€/1000u
- Taps de vials de vidre.....	51,70€/100u
- Microinsertos vials de vidre.....	400€/1000u
- Estàndard de TTX.....	440€/mg
- Columna Phenomenex Luna HILIC 200Å 100 x 2,00 mm, 3 µm.....	450€/u
- Columna Waters XBridge HILIC 2,1 x 100 mm, 3,5 µm.....	631€/u
- Columna Waters XBridge Amida 2,1 x 100 mm, 3,5 µm.....	631€/u
- Cromatògraf Agilent 1200 LC system.....	5000€/280h
- Tècnic 3.1.....	-17€/h

8. Conclusions

A MRM method based on liquid chromatography with hydrophilic interaction coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) has been developed and optimized in MRM for detection of tetrodotoxins (TTXs) in real samples "TTXs_MRM_Def.dam."

The methodology developed, although not validated, has been applied in a sample of puffer fish found in Catalonia (Sphoeroides pachygaster). Also it has been applied in sea snail (Charonia Lampas Lampas) and puffer fish (Lagocephalus sceleratus).

This current work has contributed to the analysis of results of the samples in question. Although with only one sample it couldn't define the potential risk to consumers of catalonia, it can say that the sample of the catalan coast has proved not to be very toxic. Comparing the results obtained for the greek puffer fish with Sphoeroides Pachygaster, it can be concluded that the Lagocephalus Sceleratus is apparently more toxic than the catalan fish, and the most toxic thing of Palamós fish is the skin.

An IRTA's standard working procedure has been written. It includes the whole procedure of simple treatment and the method. This is attached in appendix 1.

9. Projectió del treball

Encara s'ha de seguir treballant, a IRTA es vol seguir investigant amb les mostres. El que volen fer de moment és mirar si amb els extractes es poden analitzar PSP toxines paralitzants. També es vol posar a punt un mètode ELISA i fer assajos de citotoxicitat amb cultius cel·lulars.

S'estudiarà si convé fer fraccionaments en les mostres positives. L'avantatge d'analitzar les fraccions en lloc dels extractes crus serà una quantificació més fiable al reduir la càrrega de la matriu i una possible estimació de la potència tòxica dels derivats de la TTX per comparació de les respostes funcionals (cel·lules) i estructurals (MS/MS i ELISA).

10. Referències

1. IRTA. [En línia] [Data: 22 / 11 / 2013.] <http://www.irta.cat>.
2. La Vanguardia. [En línia] 16 / 11 / 2012. [Data: 5 / 12 / 2013.] <http://www.lavanguardia.mobi/slowdevice/vida/20121116/54354550120/detectado-peiz-globo-venenoso-litoral-catalan.html>.
3. Diari de Girona. [En línia] 15 / 11 / 2012. [Data: 11 / 11 / 2013.] <http://www.diaridegirona.cat/comarques/2012/11/16/detecten-presencia-dun-peix-globus-verinos-al-litoral/591192.html>.
4. **Katikou, P. et al.** *First report on toxicity assessment of the Lessepsian migrant pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters (Aegean Sea, Greece).* [Toxicon] Grècia : ELSEVIER, 2009. Vol. 54 pp50-55. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.03.012.
5. **Y., Bentur et al.** *Lessepsian migration and tetrodotoxin poisoning due to *Lagocephalus sceleratus* in the eastern Mediterranean.* [Toxicon] Israel : ELSEVIER, 2008. Vol. 52, pp:964-968. DOI:10.1016/j.toxicon.2008.10.001.
6. **J. F., Fernández-Ortega et al.** *Seafood intoxication by tetrodotoxin: first case in Europe.* [The journal of emergency medicine] Màlaga : ELSEVIER, 2008. DOI:10.1016/j.jemermed.2008.09.024.
7. **D., Hwang et al.** *Tetrodotoxin poisoning.* [Advances in food and nutrition research] Taiwan : ELSEVIER, 2007. Vol. 52.
8. Chemspider. [En línia] [Data: 29 / 11 / 2013.] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.16736198..>
9. Sigma Aldrich. [En línia] 20 / 12 / 2013. <http://www.sigmaaldrich.com>.
10. Fisher Scientific. [En línia] [Data: 30 / 12 / 2013.] http://www.fishersci.com/ecomm/servlet/fsproductdetail_10652_3793664__-1_0.
11. [En línia] [Data: 30 / 12 / 2013.] http://www.merckmillipore.com/spain/chemicals/acetonitrilo/MDA_CHEM-115500/p_CpWb.s1Lba0AAAEWZeEfVhTl.

12. MG Scientific. [En línia] [Data: 30 / 12 / 2013.] <http://www.mgscientific.com/products/methanol-hplc-methyl-alcohol-jt-baker/>.
13. Merck Milipore. [En línia] [Data: 30 / 12 / 2013.] - http://www.merckmillipore.com/chemicals/methanol/MDA_CHEM-106035/spanish/p_HJCb.s1Ld8gAAAEWp.AfVhTl.
14. MG Scientific. [En línia] [Data: 30 / 12 / 2013.] <http://www.mgscientific.com/products/acetic-acid-glacial-usp-fcc-jt-baker/>.
15. VWR. [En línia] [Data: 31 / 12 / 2013.] http://us.vwr.com/store/catalog/product.jsp?product_id=4546853.
16. Phenomenex. [En línia] [Data: 13 / 11 / 2013.] <http://www.phenomenex.com/hplc-column?culture=es>.
17. Waters. [En línia] [Data: 12 / 02 / 2013.] <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720001366EN.pdf>.
18. FAO. [En línia] [Data: 22 / 11 / 2013.] (<http://www.fao.org/docrep/017/i1276b/i1276b.pdf>). ISSN: 1020-6868.
19. Fish base. [En línia] [Data: 22 / 11 / 2013.] <http://www.fishbase.org/summary/Sphoeroides-pachygaster.html>.
20. **M., Milazzo et al.** *On the occurrence of the silverstripe blaasop *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) along the Libyan coast.* [Bioinvasions Records] s.l. : REABIC, 2012. Vol. vol 1; pp: 125-127. DOI: <http://dx.doi.org/10.3391/bir.2012.1.2.08>.
21. **Nzougheh, J. K. et al.** *Comparison of sample preparation methods, validation of an UPLC–MS/MS procedure for the quantification of tetrodotoxin present in marine gastropods and analysis of pufferfish.* [Food Chemistry] Belfast : ELSEVIER, 2013. Vols. 136 pp1584-1589. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.01.109.
22. **J., Jang et al.** *LC/MS Analysis of Tetrodotoxin and Its Deoxy Analogs in the Marine Puffer Fish *Fugu niphobles* from the Southern Coast of Korea, and in the Brackishwater Puffer Fishes *Tetraodon nigroviridis* and *Tetraodon biocellatus* from Southeast Asia.* [Marine Drugs] 2010. DOI:10.3390/md8041049.
23. **Y., Kudo et al.** *Isolation and Structural Determination of the First 8-epi-type Tetrodotoxin Analogs from the Newt, *Cynops ensicauda popei*, and Comparison of Tetrodotoxin Analogs Profiles of This Newt and the Puffer Fish, *Fugu poecilonotus*.* [Marine Drugs] 2012. DOI:10.3390/md10030655.

11. Glossari

CAD: Collision Activated Dissociation, gas de col·lisió

CE: Collision Energy, energia de col·lisió

CEP: Collision cell Entance Potential, potencial d'entrada a la cel·la de col·lisió

CRM: Certified Reference Material, material de referència certificat

CUR: curtain gas, gas cortina CXP: Collision cell Exit Potential, potencial de sortida de la cel·la de col·lisió

ELISA: Entzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, assaig per immunoabsorció lligat a enzims

EP: Entance Potential, potencial d'entrada

EPI: Enhanced Product Ion Scan, escaneig del producte d'ions

Da: Dalton, dalton

DP: Declustering Potential, potencial de desagrupació

ESI: ElectroSpray Ionization, font d'ionització per electroesprai

FM: Fase Mòbil

HILIC: Hydrophilic Interaction Chromatography, cromatografia d'interacció hidrofílica

IS: Ion Spray, electroesprai d'ions

LC-MS/MS: Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry in tandem, cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem.

LOD: Limit Of Detection, límit de detecció

LOQ: Limit Of Quantification, límit de quantificació

MLD: Minimal Letal Dose, dosi mínima letal

MRM: Multiple Reaction Monitoring, seguiment de reacció múltiple

ms: Miliseconds, milisegons

PNT: Procediment Normalitzat de Treball (a IRTA es diu IT, Instrucció Tècnica)

rpm: revolucions per minut

tr: Temps de Retenció

Q1: Quadrupole 1, quadrupol 1

Q3: Quadrupole 3, quadrupol 3

TTX: Tetrodotoxin, tetrodotoxina

uma: Unitat de Massa Atòmica

V: Volt, Volt

δ : Density, densitat

12. Annex 1



Desenvolupament d'un mètode de cromatografia de líquids acoblada a un espectròmetre de masses en tàndem per a la determinació de tetrodotoxines by [Gil Pagà, Lourdes De la Iglesia, Pablo](#) is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](#).

Puede hallar permisos más allá de los concedidos con esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.ca>