



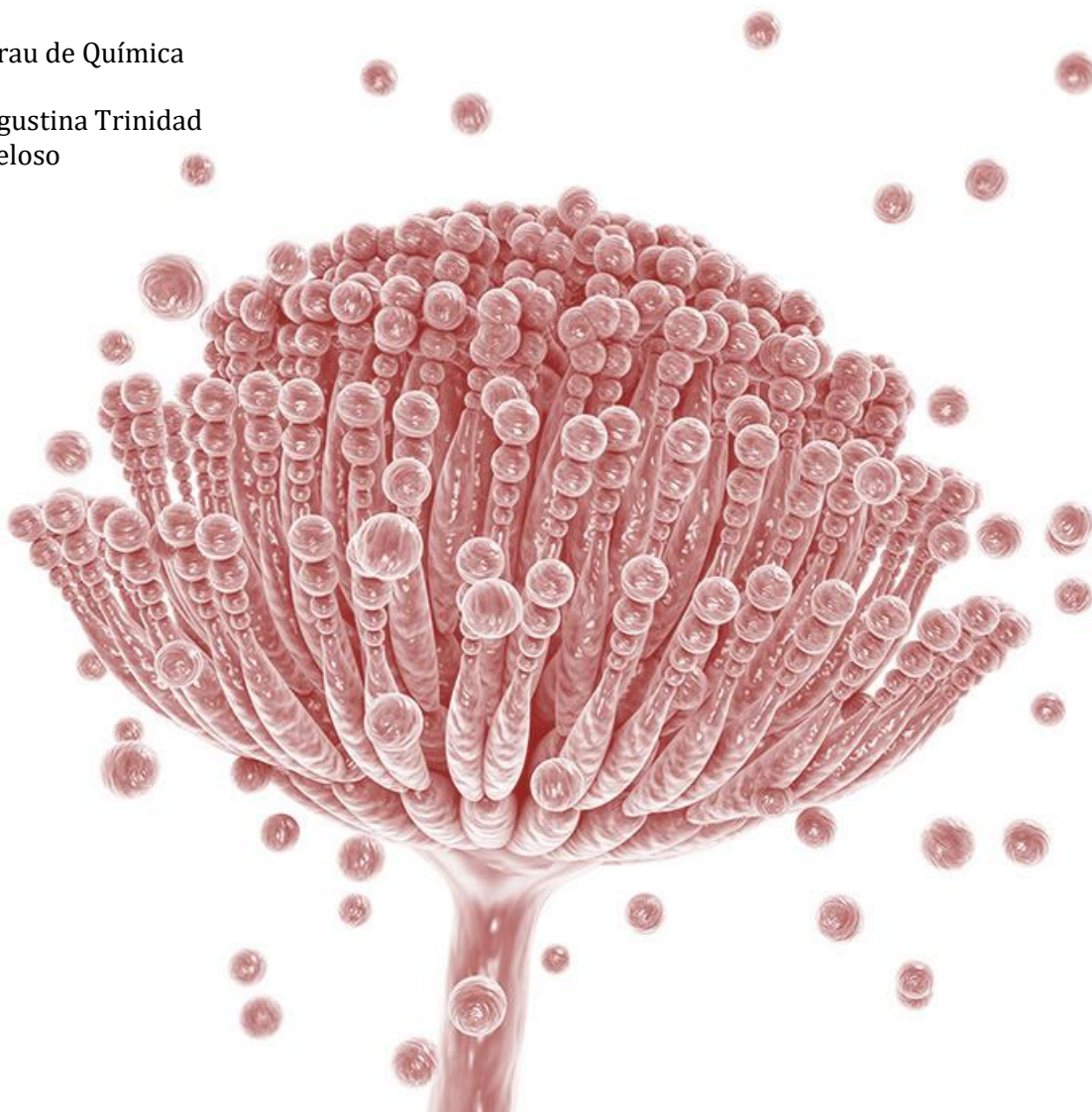
2019

07/06/2019

Universitat Rovira
i Virgili

Grau de Química

Agustina Trinidad
Peloso



[VALIDACIÓ D'UN MÈTODE: DETERMINACIÓ DE MICOTOXINES PER HPLC- MS/MS]

Treball de fi de grau 2018-2019

Tutor: Omar Boutureira





“ La vida no és fàcil, per cap de nosaltres. Però hi ha que perseverar y, sobretot, tenir confiança amb un mateix. S’ha de sentir dotat per realitzar alguna cosa i que aquella cosa hi ha que aconseguir-la, costi el que costi.”

Marie Curie





ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Les micotoxines.....	8
1.1.1. Cromatografia líquida acoblada a un detector de masses en tàndem (HPLC-MS/MS)	11
1.1.2. Instrumentació	11
1.1.3. Fonament del detector de masses	12

2. PLA DE TREBALL

2.1. Reactius i productes químics	14
2.2. Equip i materials de laboratori	15
2.3. Preparació de solucions mare	15
2.4. Preparació de patrons interns	16
2.5. Solució d'extracte matriu	17
2.6. Rectes patró	18
2.7. Condicions cromatogràfiques per l'anàlisi HPLC-MS/MS	19

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. Matrius blanques	23
3.2. Optimització dels paràmetres dels anàlits per HPLC-MS/MS	23
3.3. Mostres reals	27

4. VALIDACIÓ

4.1. Efecte matriu	29
4.2. Linealitat	31
4.3. Reproductibilitat	32
4.4. Límit de quantificació, valors paramètrics i rang alt	32



5. CONCLUSIONS	35
6. BIBLIOGRAFIA	37
ANNEX 1	38



Resum: Cada dia ingerim aliments que provenen de fonts animals i vegetals i és essencial que aquests aliments siguin de qualitat, tant els que mengem nosaltres com els que mengen els animals, ja que ens podrien afectar a nosaltres a causa de la cadena alimentaria. És important, per tant, tenir un control sobre aquests perquè poden haver-hi substàncies que poden afectar l'organisme, com és el cas de les micotoxines produïdes per fongs que infecten els aliments durant qualsevol etapa del cicle d'elaboració i en cas d'ingerir una concentració alta d'aquestes, provocarien efectes aguts i crònics al cos.

Tenint en compte això, posarem a punt dos mètodes que quantificaran algunes de les micotoxines més importants amb un equip de cromatografia líquida acoblat a un detector de masses en tàndem. En conseqüència, intentarem validar-los.

Every day, we eat food from animal and vegetable sources and it's essential that these foods are of high quality, both those that we eat and those that eat the animals, because it could affect us. For this reason, it's important to control what we eat and what animals eat, because some substances can affect our organism or that of animals, such as mycotoxins who are produced by some fungi. Mycotoxins infect food in the processing phase, if they are produced a high concentration, they will cause us acute and chronic effects to our body.

On the other hand, we will develop a method that will quantify some of the most important mycotoxins. Consequently, we will try to validate this method with liquid chromatography tandem mass spectrometry instrument.

Objectiu: L'objectiu principal d'aquest treball és desenvolupar i validar un mètode per determinar 16 micotoxines mitjançant HPLC-MS/MS en tres famílies de matrius : cereals, farina i derivats, fruits secs i pinsos i matèries primes.



1. INTRODUCCIÓ

El present treball s'ha realitzat a l'empresa AGROLAB Ibérica situada en el municipi de Tarragona. L'anàlisi de les micotoxines es durà a terme mitjançant cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada a un detector de masses en tàndem de triple quadrupol (HPLC-MS/MS QTRAP). Actualment en el laboratori només s'analitza ocratoxina, zearalenona, deoxinivalenol i aflatoxines per cromatografia líquida d'alta eficàcia amb detectors de fluorescència i ultravioleta visible. Cada micotoxina té una preparativa diferent, amb un mètode que requereix temps i diners.

Mitjançant aquest nou mètode es vol desenvolupar un mètode capaç d'analitzar totes aquestes micotoxines a la vegada, estalviant d'aquesta manera temps i diners. Així doncs, aquest comptarà amb un tractament comú per a totes les micotoxines i sense necessitat de fer una extracció en fase sòlida (SPE). La selectivitat també es veu millorada, ja que un detector MS/MS és més selectiu que els detectors amb els que es treballa i assegura una identificació segura dels nostres anàlits.

1.1. Les micotoxines

Les micotoxines són substàncies tòxiques produïdes per certs fongs que sorgeixen en el procés de la collita o en qualsevol etapa del procés d'un aliment i l'infecten. En cas d'ingerir-les, inhalar-les o absorbir-les per la pell provoquen efectes sobre la salut de les persones i els animals. Aquestes malalties es denominen micotoxicosis.¹ A l'annex 1 es poden veure les concentracions màximes de les micotoxines d'interès segons el reglament (CE) N° 1831/2003² i les recomanacions d'alimentació 576/CE i 1319/CE.³

Actualment, es coneixen més de 300 micotoxines amb diferents característiques físico-químiques. Les més importants provenen dels fongs dels gèneres *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* i són les aflatoxines, l'ocratoxina A, les fumosinines, la zearalenona i el grup dels tricotecens.^{4,5}

En aquest treball ens centrem en 16 micotoxines diferents (Taula 1).

Taula 1: Micotoxines d'interès i el gènere del fong productor^{5,6}

MICOTOXINES	GÈNERE DEL FONG	ALIMENTS QUE AFECTEN
Aflatoxina (B1,B2,G1 i G2)	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Cereals, blat, nous, cacauets, blat de moro i fruits secs.
Ocratoxina A	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Cereals, vi, fruita i cafè
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	Cereals i aliments a base de cereals
Fumonisin (B1,B2,B3)	<i>Fusarium moniliforme</i>	Cereals i derivats, cervesa i llet
Tricotecens (deoxinivalenol, nivalenol, Toxines T2 i HT2, Diacetoxiscirpenol, Fusarenona X, Neosolaniol)	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium cerealis</i> <i>Fusarium graminearum</i>	Cereals i derivats

- **Aflatoxines (AFLA):** L'estructura química de les aflatoxines és una cumarina substituïda que conté anells de bifurà amb conformació de lactona (Figura 1).

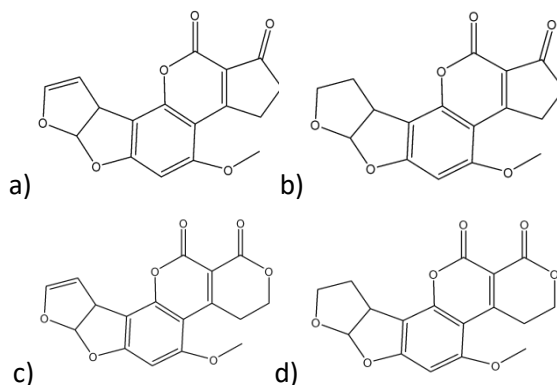


Figura 1: Estructura molecular de les aflatoxines a) B1 b) B2 c) G1 d) G2

- **Ocratoxina A (OTA):** L'ocratoxina A està formada químicament per una 3,4-dihidrometil isocumarina unida pel grup 7-carboxílic a una molècula de fenilalanina mitjançant un enllaç amida (Figura 2).

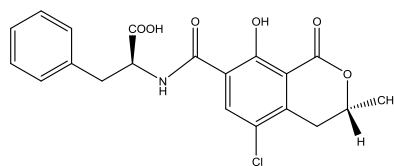


Figura 2: Estructura molecular de l'ocratoxina A

- **Zearalenona (ZEARA) :** La zeara és una lactona derivada de l'àcid β -resorcílic (Figura 3).

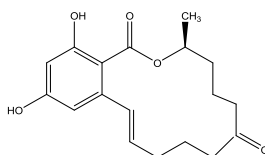


Figura 3: Estructura molecular de la zearalenona

- **Tricotecens:** El tricotecens es divideixen en 4 grups segons les estructures químiques de cada micotoxina. Ens centrarem en els grups A i B que serien on es troben els tricotecens d'interès en aquest treball:

- **Grup A**

Està format per micotoxines que presenten un grup funcional en el carboni 8 diferent a l'acetat. Dins d'aquest grup es troba el diacetoxiscirpenol (DAS) , el neosolaniol (Figura 4) i les toxines T-2 i HT-2 (Figura 5).

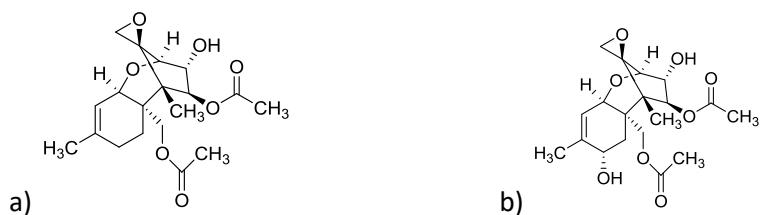


Figura 4: Estructura molecular de a) DAS i b) Neosolaniol



Figura 5: Estructura molecular de les toxines a) T-2 b) HT-2

- **Grup B**

Aquest grup inclou els tricotecens que tenen un grup carbonil al carboni 8. Dins d'aquest es troben el deoxinivalenol (DON), el nivalenol i la fusarenona X (Figura 6).

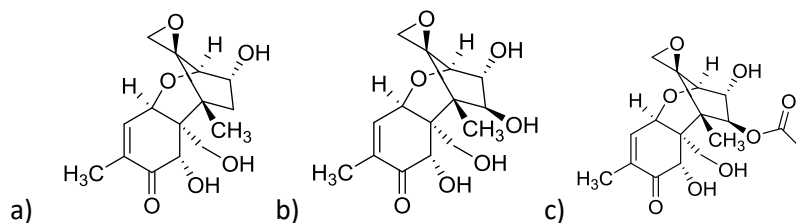


Figura 6: Estructura molecular del a) DON b) Nivalenol i c) Fusarenona X

- **Fumonisin (B1,B2,B3):** Existeixen uns 15 tipus de fumonisines però les més importants són la fumonisina B1, B2 i B3 (Figura 7) .

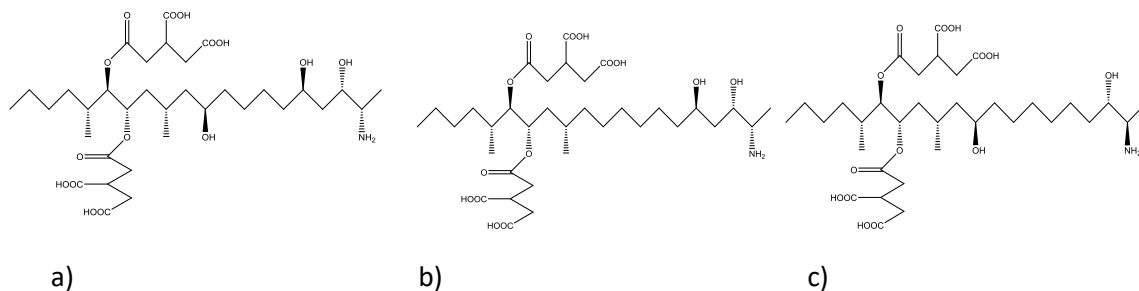


Figura 7: Estructura molecular de les fumonisines a) B1 b) B2 c) B3

1.2. Cromatografia líquida acoblada a un detector de masses en tàndem (HPLC-MS/MS)

La cromatografia líquida d'alta resolució és una tècnica analítica cromatogràfica en columna que serveix per separar anàlits en una mostra. Aquests són bombejats en un solvent a alta pressió que es denomina fase mòbil a través d'una columna que és la fase estacionària. Té la capacitat de separar i identificar compostos presents en qualsevol mostra que pugui ser dissolta en un líquid. La quantificació i la detecció es basa en la interacció dels anàlits amb la fase mòbil i la fase estacionària deguda a la polaritat.

HPLC-MS/MS és una cromatografia líquida que utilitza un detector de masses en tàndem de triple quadrupol, tenint així una bona selectivitat, ja que es basa en la fragmentació de les masses dels anàlits que són específiques per cada compost.

1.2.1. Instrumentació

L'instrument que s'utilitza per a la tècnica HPLC (Figura 8) és un cromatògraf de líquids que es compon de sis mòduls: recipients de la fase mòbil, desgasificador, sistema de bombeig, sistema d'injecció, columna i detector.⁷



Figura 8: Equip d'HPLC- MS/MS amb el que treballem

1. **Reservori de dissolvents:** Com veiem a la figura damunt de tot es troben les ampolles on es troba la fase mòbil que s'utilitzarà per a l'anàlisi. Aquesta fase mòbil es mou gràcies a l'acció de la bomba.
2. **Desgasificador:** El sistema de desgasificació manté l'instrument amb una atmosfera inert. També serveix per purgar l'equip de bombolles d'aire que puguin quedar en la fase mòbil que poden interferir posteriorment en l'anàlisi provocant problemes de reproductibilitat i alteracions en la línia base.
3. **Bomba:** La bomba és l'encarregada d'impulsar la fase mòbil per tot el sistema. La principal característica que ha de tenir és que ha de suportar les altes pressions. El sistema de bombeig pot ser isocràtic (no es modifica el percentatge de la fase mòbil durant l'anàlisi) o gradient (varia el percentatge durant el procés).

4. **Sistema d'injecció:** El sistema d'injecció pot ser automàtic o manual. En aquest cas es disposa d'un automàtic, que té millor precisió a un de manual. Té la característica d'injectar sempre un volum precís i que és fixat per l'analista segons l'anàlisi. S'encarrega de succionar la mostra i portar-la al port d'injecció. Entre cada injecció l'equip neteja l'agulla amb un dissolvent que és metanol per eliminar possibles restes de la mostra anterior.
5. **Columna:** La columna és on es dur a terme la separació i conté la fase estacionària per a retenir i interaccionar amb els anàlits d'interès. Compta també d'una precolumna (en alguns casos) que serveix per donar una vida més llarga a la columna evitant que entrin partícules dins la columna. Les columnes han de tenir una longitud, diàmetre intern, una mida de partícula i una fase estacionària determinada per a cada mètode.
6. **Detector:** Serveix per generar un cromatograma, que és un gràfic dels resultats. Hi ha diferents detectors per HPLC i en aquest cas nosaltres utilitzem un masses en tàndem amb trampa iònica.

1.2.2. Fonament del detector de masses

El detector que utilitzem és un detector de masses de triple quadrupol amb trampa iònica. Els components d'un sistema de masses són els següents:

- **Sistema d'entrada de mostra i font d'ionització:** En aquest cas el sistema d'entrada és cromatogràfic, ja que la mostra prové d'un HPLC. L'anàlit és ionitzat per una font d'ionització d'electrospray (ESI) que converteix els anàlits que estan en fase líquida a fase gas. La mostra passa a través d'un capil·lar on hi ha un camp elèctric i a la sortida d'aquest es forma el que s'anomena "spray" que són gotes de la mostra carregades en forma gas. El GS 1 que veiem a Figura 9 és l'encarregat d'aquest procés i el GS 2 s'encarrega d'evaporar el solvent que queda en aquestes gotes juntament amb la temperatura. A continuació, després de l'evaporació del dissolvent, les gotes són més petites i com hi ha càrregues, es repel·leixen i se separen i passen a través d'un canal, que té una amplada determinada (orifice(DP)) segons el mètode, a l'analitzador on hi ha una corrent de gas en contra (curtain gas (CUR)) que impedeix l'entrada de molècules neutres i adductes iònics.⁸

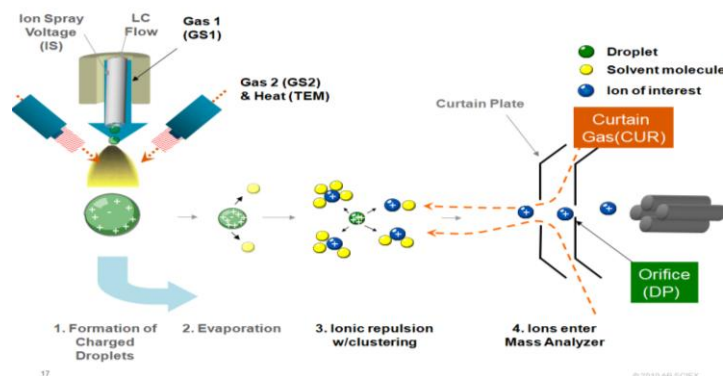


Figura 9: Sistema ESI

- **Analitzador de masses:** S'encarrega de separar els ions que arriben de la ionització en la relació a la seva m/z . En tenir un MS/MS s'utilitza un analitzador de triple quadrupol que dóna una informació addicional sobre la fragmentació dels ions. Compta amb tres quadrupols situats en sèrie, on el primer i el tercer actuen com a quadrupols però el segon actua com una cel·la de col·lisió on es tornen a fragmentar els ions a causa d'una col·lisió amb un gas inert de la presència d'un gas (Figura 10)⁸. El primer quadrupol es selecciona l'ió precursor (ió pare) que passa a la cel·la de col·lisió on es fragmenta i dóna lloc als ions producte (ions fills).

El triple quadrupol té diferents modes de treball segons el tipus d'anàlisi que es vulgui fer. Es pot fer un full scan que és un escaneig de tots els ions o en mode SIM que és seleccionar un ió concret.

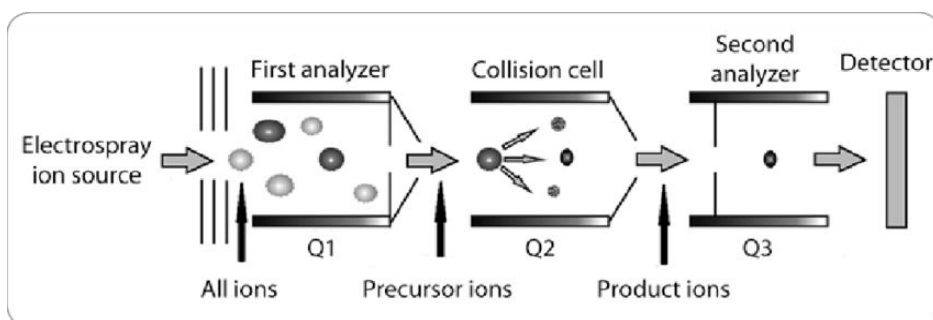


Figura 10: Esquema del procés d'un analitzador de MS/MS

El tercer quadrupol d'aquest equip té una funció dual, ja que s'utilitza com a quadrupol o com trampa iònica al ser un analitzador QTRAP. Els ions resultant de la fragmentació de l'ió precursor són seleccionats i es tornen a fragmentar en el Q3 donant lloc als subproductes (ions nets) de l'ió precursor, que serviran com a una segona confirmació de la presència del nostre anàlit. (Figura 11)⁸.

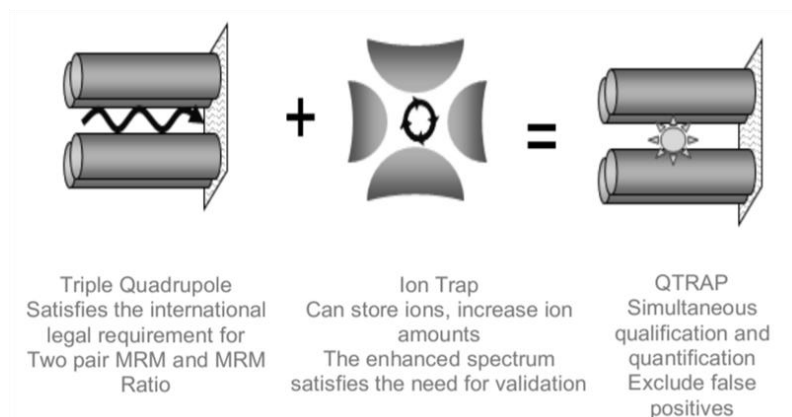


Figura 11: Analitzador QTRAP



2. PLA DE TREBALL

En primer lloc, abans de realitzar cap experimentació, es realitza una recerca bibliogràfica dels límits màxims establerts en la legislació permesos en aliments i pinsos per tal de determinar el límit de quantificació. Aquests es poden trobar en l'annex 1.

Per a la realització de la preparativa de mostres i les condicions cromatogràfiques, el mètode està basat en un procediment realitzat en un laboratori d'Alemanya, també del grup AGROLAB, que està acreditat^{9,10}.

Hi ha 16 micotoxines d'interès per analitzar, separades en dos mètodes, ja que les fumonisines presenten una preparativa diferent de la resta de micotoxines. Parlarem, per tant, de dos mètodes diferents que anomenarem mètode de multimicotoxines i mètode de fumonisines.

2.1. Reactius i productes químics

A continuació es nomenen els reactius i patrons que s'han utilitzat per a aquest treball. El metanol i l'acetonitril són dissolvents inflamables i tòxics, s'ha d'evitar flames i el contacte amb oxidants, utilitzant com material de seguretat guants i ulleres. Referent als patrons s'ha de tenir cura en la seva manipulació, ja que les micotoxines tenen una elevada toxicitat.

1) Dissolvents

- Aigua Mil·liQ
- Acetonitril grau HPLC
- Àcid Acètic glacial de puresa 100%
- Metanol grau HPLC- MS
- Acetat d'amoni de puresa 99 %
- Àcid fòrmic de puresa 98%

2) Patrons comercials de multimicotoxines

- Vial d' 1,2 ml de mix d'aflatoxines: 2 µg/ml de B1 i G1 i 0,5 µg/ml de B2 i G2 en acetonitril
- Vials d' 1 ml d'ocratoxina A : 10,23 µg/ml i 100 µg/ml en acetonitril
- Vials d' 5 ml de mix de tricotecens i zearalenona: 10 µg/ml i 100 µg/ml de nivalenol, deoxinivalenol, HT2 i T2; 10,1 µg/ml i 100 µg/ml de fusarenona X i zearalenona, 10,20 µg/ml i 100 µg/ml de diacetoxiscirpenol i 10,03 µg/ml i 100 µg/ml de acetildeoxinivalenol en acetonitril
- Vial d' 1 ml de neosolaniol : 101,30 µg/ml en acetonitril

3) Patrons comercials de fumonisines

- Vials de 5 ml de mix de fumonisines B1 i B2 en 50/50 ACN/H₂O: 50,10 µg/ml i 100 µg/ml de B1 i 50 µg/ml i 100 µg/ml de B2
- Vials d'1 ml de fumonisina B3 en 50/50 ACN/H₂O: 50,30 µg/ml i 100 µg/ml

4) Patrons interns de multimicotoxines

- Vial d' 1,2 ml de ¹³C-aflatoxines en acetonitril: 0,50 µg/ml
- Vial d' 1,2 ml de U-¹³C₂₀-ocratoxina A en acetonitril: 10,07 µg/ml
- Vial d' 1,2 ml de U-[¹³C₁₅]-deoxinivalenol en acetonitril: 25 µg/ml
- Vial d' 1,2 ml de U-[¹³C₁₈]-zearalenona en acetonitril: 25,10 µg/ml
- Vial d' 1,2 de U-[¹³C₂₂]-HT-2-toxina en acetonitril : 25,10 µg/ml
- Vial d' 1,2 ml de U-[¹³C₂₄]-T-2-toxina en acetonitril : 25,10 µg/ml
- Vial d' 1,2 ml de U-[¹³C₁₉]-diacetoxiscirpenol en acetonitril : 25 µg/ml

**5) Patrons interns de fumonisines**

- Vial d' 1,2 ml de U-[¹³C₃₄]-fumonisina B1 en 50/50 ACN/H₂O: 25,10 µg/ml
- Vial d' 1,2 ml de U-[¹³C₃₄]-fumonisina B2 50/50 ACN/H₂O: 10,10 µg/ml
- Vial d' 1,2 ml de U-[¹³C₃₄]-fumonisina B3 50/50 ACN/H₂O: 10,02 µg/ml

2.2. Equips i material de laboratori

- Balança analítica
- Micropipetes de 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl i 10 ml
- Centrífuga
- Sistema d'agitació mecànica i vòrtex
- Bomba de buit i sistema de filtració (paper de filtre 0,22 µm)
- Tubs falcon de 15, 50 i 60 ml
- Filtres de xeringa de nylon 0,22 µm
- Vials ambar de 2 ml

El mètode es du a terme amb un HPLC-MS/MS QTRAP:

- Equip HPLC 1260 INFINITY II (Agilent) amb detector MS/MS QTRAP 6500⁺ (ABSciex)
- Columna Zorbax XDB – C18, 75x3.0 mm 0.35 µm o equivalent
- Software Analyst i Sciex OS Q

2.3. Preparació de les solucions mare (WS)

En primer lloc, a partir dels patrons comercials (STDC) preparem solucions intermèdies d'alguns anàlits (SS) i a partir d'aquestes les solucions mare (WS_R) com veiem a la taula 2 i 3 amb les quals realitzarem la recta. Per multimicotoxines, cal diluir aquest WS_R amb un factor de dilució de 20, aquesta dilució l'anomenarem F20, la qual s'utilitza pels patrons més petits de la recta.

Taula 2: Preparació de WS de fumonisines

	Patró estàndard (WS_R)	Solució intermèdia (SS)	
	ng/ml	ng/ml	µl
FUM B1	25,05	5010	50
FUM B2	25,00	5000	
FUM B3	25,15	5030	50
		Vol Final (µl)	10000
		Solvent	AcN/H ₂ O (20/80 v/v)



Taula 3: Preparació de WS de multimicotoxines

		Patró estàndard (WS_R)	STDC / SS	
		ng/ml	ng/ml	µl
Solució mare d'aflatoxines	B1	8,36	20900	4
	G1	8,42	21060	
	B2	8,39	20980	
	G2	8,42	21050	
Solució mare d'ocratoxina A	OTA	8,18	1023	80
Solució mare del mix de tricotecens i zearalenona	DON	350,00	10000	350
	NIVALENOL	350,00	10000	
	FUSARENONA X	353,50	10100	
	ZEA	353,50	10100	
	HT-2	350,00	10000	
	T-2	350,00	10000	
	DAS	357,00	10200	
Solució mare del neosolaniol	NEOSOLANIOL	160,00	100000	16
		V final (µl)	10000	
		Solvent	1mM NH ₄ Ac-0,1%Àc.For en H ₂ O	

2.4. Preparació dels patrons interns (WSI)

Es segueix el mateix procediment que per la preparació de les solucions mare per fer la recta. En primer lloc, es prepara una solució intermèdia d'OTA (SSI_1) i una altra per la resta de multimicotoxines (SSI_2) menys les afles que s'agafarà directament del patró comercial. Cal esmentar que no tots els tricotecens tenen patró intern, pel compostos que no en tenen s'aplicarà el IS del DON, ja que són de la mateixa família de micotoxines. En el cas de fumonisines, no cal aquesta solució intermèdia del patró intern.

A continuació, es preparen els patrons estàndards interns (WSI) com es veu en les taules 4 i 5 :

Taula 4: Preparació de patrons interns de multimicotoxines

	Patrons estàndards interns (WSI)	STDC / SSI			
	ng/ml	ng/ml	µl STDC	µl SSI_1	µl SSI_2
AFLAS	2	500	80		
OTA	10	1000		200	
DON	200	2500		1600	
ZEA	100	1250			
HT2	100	1250			
T2	100	1250			
DAS	100	1250			
		V final (µl)	20000		
		Solvent	1mM NH ₄ Ac-0,1%Àc.For en H ₂ O		



Taula 5: Preparació de patrons interns de fumonisines

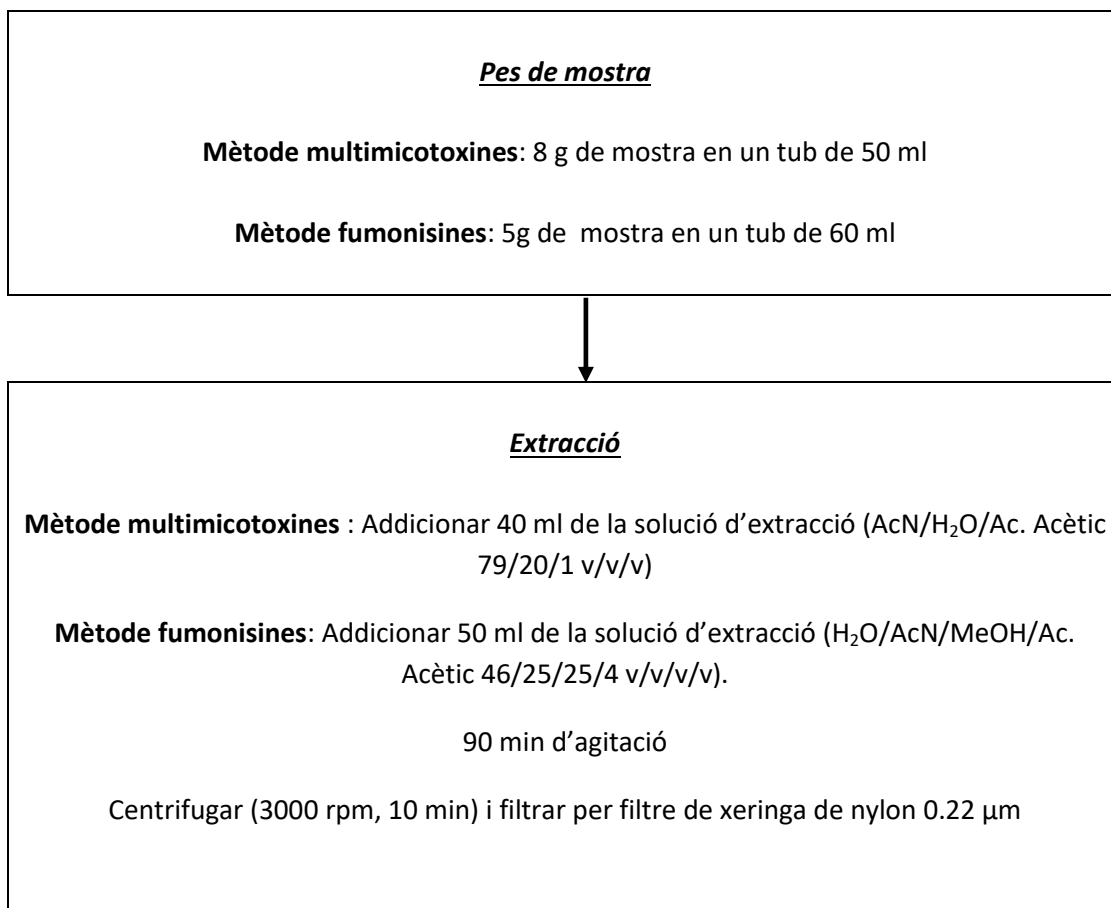
	WSI	STD comercial	
	ng/ml	ng/ml	µl
FUM B1	150,60	25100	120
FUM B2	151,50	10100	300
FUM B3	150,30	10020	300
		Vol Final (µl)	20000
		Solvent	AcN/H ₂ O(20/50 v/v)

2.5. Solució d'extracte matriu

Les rectes de patrons es realitzen amb extracte matriu i amb solvent per comprovar l'efecte matriu de les mostres. Per això, hem de preparar l'extracte matriu que afegim als patrons.

Per preparar aquestes solucions s'agafa una de les matrius, que en aquest cas és l'arròs, i se segueix el procediment com si fos una mostra real com s'indica a l'esquema 1.

Esquema 1: Procediment de tractament de mostres





2.6. Rectes patró

- **Recta multimicotoxines**

Les concentracions de la recta patró estan basades segons el límit de quantificació (LOQ) que ens indica la legislació ² i que està determinat per la sensibilitat de l'equip. Per aflatoxinas i ocratoxina és 0.5 µg/kg, pel don i el nivalenol és 50 µg/kg i per la resta és 10 µg/kg, per tant el primer patró està per sota d'aquest límit i guiant-nos de la legislació de l'annex 1 i les concentracions de les mostres rutina definim un màxim i comprovem la linealitat.

La recta, primerament, es duu a terme amb extracte matriu i amb patró intern que és com es realitza al mètode de referència (Taula 6). El volum de WSI que s'afegeix està calculat perquè la concentració d'aquest estigui aproximadament a la meitat de la recta. La recta s'enrasa amb el solvent d' 1mM d'acetat d'amoni amb 0,1% d'àcid fòrmic en aigua.

Taula 6: Recta patró de multimicotoxines

		S1 (ng/ml)	S2 (ng/ml)	S3 (ng/ml)	S4 (ng/ml)	S5 (ng/ml)	S6 (ng/ml)
Patró d'aflatoxines	B1	0.0031	0.0101	0.1005	0.4020	0.8040	1.6080
	G1	0.0031	0.0101	0.1005	0.4020	0.8040	1.6080
	B2	0.0008	0.0025	0.0251	0.1002	0.2004	0.4008
	G2	0.0008	0.0025	0.0251	0.1004	0.2008	0.4016
Patró d'ocratoxina A	OTA	0.0032	0.0102	0.1023	0.4092	0.8184	1.6368
Patró de Tricotecens i zearalenona	DON	0.1556	0.5000	5.0000	20.000 0	40.000 0	80.000 0
	NIVALENOL	0.1556	0.5000	5.0000	20.000 0	40.000 0	80.000 0
	FUSARENONA X	0.1571	0.5050	5.0500	20.200 0	40.400 0	80.800 0
	ZEA	0.1571	0.5050	5.0500	20.200 0	40.400 0	80.800 0
	HT-2	0.1556	0.5000	5.0000	20.000 0	40.000 0	80.000 0
	T-2	0.1556	0.5000	5.0000	20.000 0	40.000 0	80.000 0
	DAS	0.1587	0.5100	5.1000	20.400 0	40.800 0	81.600 0
Patró de neosolaniol	NEOSOLANIOL	0.0681	0.2188	2.1875	8.7500	17.500 0	35.000 0
	V F20 (µl)	7	22	225			
	V WS_R (µl)				45	90	180
	V extracte matriu (µl)	80					
	V IST (µl)	20					
	V (µl) final	900					



- **Recta de fumonisines**

La recta de fumonisines com en el cas de les multimitoxines també es basa en el LOQ que serà de 20 µg/kg per les tres fumonisines. El WSI també té una concentració que està en mig de la recta.

Així doncs, la recta patró conté el volum del WS_R i de WSI, l'extracte matriu i s'enrasa a 1 ml amb aigua (Taula 7).

Taula 7: Recta patró fumonisines

	S1 (ng/ml)	S2 (ng/ml)	S3 (ng/ml)	S4 (ng/ml)	S5 (ng/ml)
FUM B1	0.1750	0.3507	1.7500	3.5100	7.0100
FUM B2	0.1750	0.3500	1.7500	3.5000	7.0000
FUM B3	0.1760	0.3521	1.7600	3.5200	7.0400
V WS_R (µl)	7	14	70	140	280
V extracte matriu (µl)	100				
V WSI	20				
V final (µl)	1000				

2.7. Condicions cromatogràfiques per l'anàlisi per HPLC_MS/MS

L'anàlisi cromatogràfic es duu a terme utilitzant com a referència el mètode acreditat per un laboratori del grup^{9,10} amb dues fases mòbils comuns per als dos mètodes que són:

- **Fase mòbil A** : 2 mM d'acetat d'amoni i 0,1% d'àcid fòrmic en aigua
- **Fase mòbil B**: 2 mM d'acetat d'amoni i 0,1% d'àcid fòrmic en metanol

La majoria de compostos tenen d'ió precursor la molècula protonada ([M+H]⁺), això vol dir que es necessiten fases mòbils que puguin donar lloc a protons, que són de pH àcid.

El gradient de la fase mòbil de tots dos mètodes s'indiquen en les taules 8 i 9:

Taula 8: Gradient de la fase mòbil pel mètode de multimitoxines

T (min)	A [%]	B [%]	Flux [µl/min]
0,00	98	2	500
2,00	98	2	
8,00	20	80	
11,00	14,4	85,6	
11,20	2	98	
13,00	2	98	
13,10	98	2	
18,00	98	2	



Taula 9: Gradient de la fase mòbil pel mètode de fumonisines

T (min)	A [%]	B[%]	Flux [μ l/min]
0,00	80	20	500
2,00	80	20	
12,00	10	90	
13,00	10	90	
13,10	80	20	
17,00	80	20	

La temperatura de la columna és 22 °C per multimicotoxines amb un volum d'injecció de 50 μ l i per fumonisines és una temperatura de 25 °C amb una injecció de 20 μ l.

- Condicions del mètode de multimicotoxines

Es realitzen tres mètodes experimentals per a la detecció de MS, ja que es necessita una polaritat negativa per detectar la ZEARA i una fragmentació addicional utilitzant trampa iònica pel cas de l' OTA per la seva dificultat de detecció. Per cada compost tenim un ió de quantificació que és amb el que es quantifiquen els resultats que són els que tenen un 1 en les taules següents i un ió de confirmació que ens assegura la presència del nostre anàlit en la mostra, aquests tenen un número 2 i 3. Així doncs, l'anàlisi cromatogràfic es va divideix en tres experiments:

- **L'experiment 1:** Es duu a terme amb polaritat positiva per MRM que inclou totes les micotoxines menys la zearalenona. MRM (monitorització de reaccions múltiples) s'utilitza per quantificar, on en la font d'ionització es produeix l'ió precursor que es fragmenta per produir els ions productes. Es parteix de les condicions del mètode de referència ¹³ (Taula 10):

Taula 10: Condicions cromatogràfiques per l'experiment 1

Analit	Q1 (amu)	Q3 (amu)	Temps (min)	DP	CE	CXP
DON IS	312	263	7	81	17	8
Afla B1 IS	330	301	9.6	120	33	16
Afla B1 IS 2	330	255	9.6	100	51	22
Afla B2 IS	332	303.2	9.4	100	37	24
Afla G1 IS	346	257	9.2	90	39	18
Afla G2 IS	348	200	9.0	90	57	16
DAS IS	403.2	324.3	9.6	66	17	17
OTA IS	424	250	11	40	31	16
HT-2 IS	464.2	278.2	10.2	41	19	8
T-2 IS	508.4	260.1	10.55	51	19	18



Analit	Q1 (amu)	Q3 (amu)	Temps (min)	DP	CE	CXP
DON 1	297.1	249.1	7	66	15	10
DON 2	297.1	203.4	7	66	21	8
Afla B1 1	313	213	9.6	100	61	12
Afla B1 2	313	241	9.6	100	50	12
Afla B1 3	313	285	9.6	100	33	14
Nivalenol 1	313.3	175	6.0	25	25	10
Nivalenol 2	313.3	125	6.0	66	19	8
Nivalenol 3	313.3	137.2	6.0	25	22	10
Afla B2 1	315	259	9.4	100	41	14
Afla B2 2	315	287	9.4	100	37	18
Afla G1 1	329	243	9.2	100	39	14
Afla G1 2	329	200	9.2	100	54	12
Afla G2 1	331	245	9.0	100	43	14
Afla G2 2	331	189	9.0	100	57	12
Fusarenona X 1	355.3	247.2	7.8	66	13	16
Fusarenona X 2	355.3	174.8	7.8	31	27	14
DAS 1	384.3	307.1	9.6	66	17	22
DAS 2	384.3	247.3	9.6	66	21	18
Neosolaniol 1	400	214.8	8.0	41	21	16
Neosolaniol 2	400	141.2	8.0	41	77	16
OTA 1	404	239	11.0	66	33	14
OTA 2	404	221	11	66	51	16
HT-2 1	442.2	263.1	10.2	30	15	19
HT-2 2	442.1	105	10.2	30	60	8
HT-2 3	442.3	215.3	10.2	46	19	14
T-2 1	484.3	215.2	10.55	30	25	18
T-2 2	484.3	185.1	10.55	30	26	11

- **L'experiment 2** : Es duu a terme amb polaritat negativa amb mode MRM. Inclou només la zearalenona, ja que aquesta té més facilitat per perdre un protó que no en agafar-lo. Es parteix de les condicions del mètode de referència⁹ i dels paràmetres de fragmentació (Taula 11):

Taula 11: Paràmetres de la zearalenona per l'experiment 2

Analit	Q1 (amu)	Q3 (amu)	Temps (min)	DP	CE	CXP
ZEA 1	317.2	131	11	-70	-38	-11
ZEA 2	317.2	175.1	11	-70	-34	-11
ZEA 3	317.2	273.4	11	-70	-26	-7
ZEA IS	335	140	11	-80	-42	-8
ZEA IS 2	335	185	11	-80	-34	-13



- **L'experiment 3:** Es duu a terme l'actuació de la trampa iònica només per l'OTA, ja que s'ha vist que aquesta pot donar a errors en la seva detecció donant lloc a falsos positius. Fent aquest experiment ens assegurem que la detecció d'OTA sigui realment OTA i no una interferència de la matriu. Per tant, s'escolliria un interval de masses per l'ió de quantificació de 221 i es farà un scan. Aquest mode només s'utilitza com confirmació no per quantificar. Es parteix de les condicions del mètode de referència⁹ i dels paràmetres de l' ocratoxina (Taula 12).

Taula 12: Paràmetres de l' OTA per l'experiment 3

Analit	Q1	Q3	Temps(msec)
OTA	215	225	0.0010

- **Condicions del mètode de fumonisines**

Les condicions cromatogràfiques es mostren a la taula 13, els temps de retenció es determinen com s'indica a l'apartat 3.1 degut que el nostre mètode de referència¹⁰ no els tenia estipulats. El mode utilitzat és el MRM en positiu:

Taula 13: Paràmetres de les fumonisines

Analit	Q1	Q3	Temps de retenció	DP	EP	CE	CXP
Fumonisina B2 1	706.44	336	12.62	76	10	51	10
Fumonisina B2 2	706.44	318.5	12.62	76	10	53	28
Fumonisina B3 1	706.4	336.2	12.12	71	10	49	10
Fumonisina B3 2	706.4	318	12.12	71	10	53	28
Fumonisina B1 1	722.4	352.5	11.42	61	10	49	12
Fumonisina B1 2	722.4	334.4	11.42	61	10	53	12
Fumonisina B2 IS	740.4	358.5	12.61	106	10	51	12
Fumonisina B2 IS 2	740.4	340.4	12.61	106	10	53	12
Fumonisina B3 IS	740.41	358.49	12.11	106	10	51	12
Fumonisina B3 IS 2	740.41	340.39	12.11	106	10	53	12
Fumonisina B1 IS	756.5	374.5	11.41	116	10	51	12
Fumonisina B1 IS 2	756.5	356.5	11.41	116	10	53	12



3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. Avaluació de les matrius

En primer lloc ens hem d'assegurar que els extractes matrius que estem afegint a les rectes siguin blancs, és a dir, que no continguin cap de les micotoxines que s'analitzaran, ja que interferirà en els resultats.

Volem validar aquest mètode per tres grups de matrius diferents, de les quals agafarem 3 de cada grup:

- Cereals, farina i derivats: galeta, arròs i pa
- Fruits secs: nous, ametlles i pistatxo
- Pinsos i matèries primeres: blat, alfalfa i pinso

Per la seva preparació es segueix el procediment de mostres reals i es prepara en un vial afegint l'extracte filtrat amb 20 µl de WSI i s'enrasa amb buffer o aigua segons el mètode.

A continuació es pot veure el resultat en la taula 15 de la matriu d'arròs per fumonisines on veiem clarament que és blanca, ja que no hi ha la presència de cap dels nostres anàlits. Per les altres matrius obtenim els mateixos resultats igual que pel mètode de multimicotoxines.

Taula 15: Resultats de la matriu blanca d'arròs per fumonisines

Matriu	Analit	Àrea	Senyal/soroll	Concentració
Arròs	Fumonisina B2 1	N/A	N/A	N/A
Arròs	Fumonisina B2 2	N/A	N/A	N/A
Arròs	Fumonisina B3 1	N/A	N/A	N/A
Arròs	Fumonisina B3 2	N/A	N/A	N/A
Arròs	Fumonisina B1 1	N/A	N/A	N/A
Arròs	Fumonisina B1 2	N/A	N/A	N/A

3.2. Optimització del paràmetres dels analits per HPLC-MS/MS

• Mètode micotoxines

En primer lloc, abans de començar a analitzar rectes s'hauria de fer les infusions de totes les nostres micotoxines per veure els paràmetres òptims per la seva determinació. En aquest cas, com partim d'un mètode ja validat, hem partit de les condicions que tenen en el mètode de referència⁹.

Injectem una recta tal com figura al mètode afegint un patró de concentració més baixa perquè estigui per sota del LOQ i observem els resultats. L'equip quantifica amb l'ió més abundant que dona una intensitat major i confirma la seva identificació amb l'ió que sigui més abundant després d'aquest.

El cromatograma del patró S3 (per l'experiment 1), que té una concentració que cau en mig de la recta, es mostra en la figura 12. Els temps de retenció es veuen una mica desplaçats als esperats sent els següents: OTA (10.710 min), DON (6.927 min), Afla B1 (9.275 min), Nivalenol

(6.012 min), Afla B2 (9.034 min), Afla G1 (8.878 min), Afla G2 (8.669 min), Fusarenona (7.700 min), DAS (9.410), Neosolaniol (7,820 min), HT-2 (9.927 min) i T-2 (10.391 min).

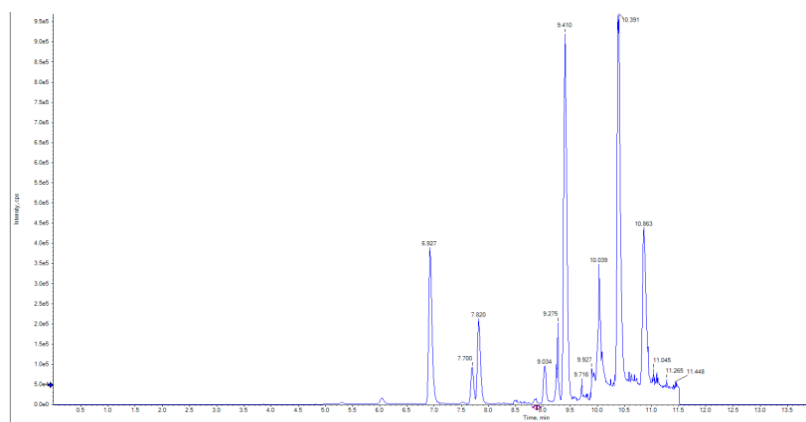


Figura 12: Cromatograma del patró 3 de multimitoxines

Veiem que obtenim una línia base d'alta intensitat a partir del minut 10 aproximadament. Això ens afecta en l'OTA, ja que amb les transicions que ens indica el nostre mètode de referència no la podem observar ni quantificar fins als patrons més concentrats (a partir del S4). Afecta més a aquest anàlit perquè té una concentració molt més petita que altres anàlits que cauen en aquest rang de temps. Per una altra banda, tenim problemes per detectar l' aflatoxina G2, ja que no es pot observar el pic de l'anàlit fins al patró S4 a pesar de tenir una bona línia base. Per tant, degut a aquests problemes s'opta per fer una infusió per veure si els paràmetres cromatogràfics d'aquests anàlits corresponen exactament amb els esperats. Per la resta de micotoxines al tenir una concentració més alta com són els tricotecens i el neosolaniol no es té problemes amb els patrons més baixos. També en el cas de l' aflatoxina B1 i B2, i la zearalenona es veu que el pic del qualificador és de major intensitat que el de l'ió quantificador, per tant també realitzem una infusió d'aquestes micotoxines.

Una infusió és bàsicament injectar un patró del nostre anàlit directament al detector MS per escollir l'ió precursor i els seus fills.

Per dur a terme això es preparen solucions en metanol de 10 ppb a partir de la solució comercial dels patrons i amb una xeringa s'injecta directament al masses. Com d'aflatoxines no es té un patró on estiguin separades, es va preparar el mix. A partir d'aquí es fa un mètode full-scan en positiu per l'experimentació 1 i en negatiu per l'experimentació 2 per obtenir l'ió precursor. A partir d'aquest es troben els ions fills de cada anàlit que són els 2 més abundants.

En la següent taula 14 es poden veure els resultats obtinguts per cada anàlit amb les DP i CE optimitzades:

Taula 14: Resultats de l'infusió de micotoxines

Analit	DP	Transició de quantificació	EC(eV)	CXP	Transició de confirmació	EC(eV)	CXP	Segona transició de confirmació	EC(eV)	CXP
Afla B1	111	312>285	31	14	312>241	51	28	312>213	59	20
Afla B2	16	314>287	35	26	314>259	41	28			
Afla G1	106	328>243	37	22	328>200	55	24			
Afla G2	86	330>948	41	12	330>183	29	10			
Zearalenona	-105	316>273	-23	-13	316>175	-36	-13	316>131	-40	-17
Ocratoxina	41	404>239	33	22	404>358	21	20	404>221	47	32

S'observa en comparació amb les taules 10 i 11 que en el cas de l' afla B1 i zearalenona la suposició era la correcta, ja que s'obté que l'ió de quantificació que es té no és el més abundant però analitzant la recta i observant les diferències , es treu la conclusió que encara que no és el més abundant amb el que es qualifica dona una millor resolució i senyal/soroll, per tant deixem els paràmetres com el mètode. Per l'ocratoxina canviem l'ió de quantificació que tenim pel de 404>358, ja que s'observa una molt bona senyal soroll i es pot veure el nostre pic en el S2 i com confirmació deixem la transició 404>221.

En l'ota, veiem en la figura 13 la comparació d'aquest patró S3 amb la transició segons el mètode de referència (color blau) i amb la nova transició trobada després de realitzar l' infusió (color vermell):

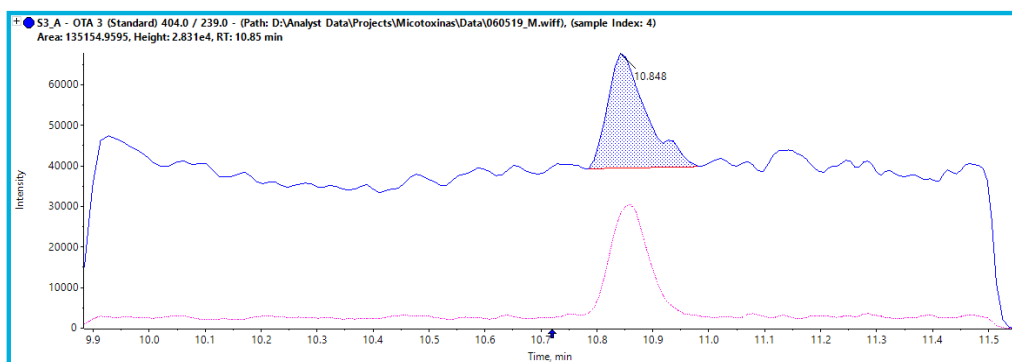


Figura 13: Cromatograma de l'ocratoxina A

Es pot observar clarament una baixada de la intensitat de la línia base bastant evident, encara que després de realitzar diverses proves no s'ha trobat el factor causant d'aquesta intensitat.

En la figura 14, es mostra el cromatograma del patró s1 de l'aflatoxina G2 que està un patró per sota del límit de quantificació i que es necessita veure per complir amb les normes de validació (el primer punt de la recta ha d'estar per sota del LOQ). Es pot observar que no es té una bona resolució del pic i no es compleix la relació S/N ni en l'ió de quantificació ni en el de confirmació.

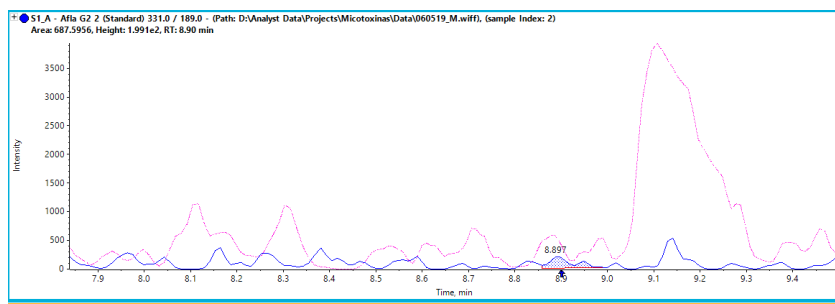


Figura 14: Cromatograma de l'alfatoxina G2

- **Mètode fumonisines:**

Prèviament a la realització de la recta, es fa una injecció d'un patró preparat només amb fumonisina B3 per veure a quin temps de retenció surt, ja que té la mateixa fragmentació que B2 i l'únic que les diferencia és el temps de retenció al que surten. El que s'esperava és que la fumonisina B3 al tenir una columna no polar sortís abans per les seves característiques estructurals, que la fan més polar que la B2. En realitzar l' injecció es va comprovar que aquesta suposició era la correcta.

Una vegada es sap l'ordre d'elució es prepara la recta de fumonisines seguint el mètode de referència¹⁰ i fent-la amb matriu i IS observem que tenim una molt bona senyal dels pics en tots els patrons (Figura 15) i obtenim rectes bones com veiem en la figura 16, per tant no es modificarà res ni caldrà realitzar l' infusió.

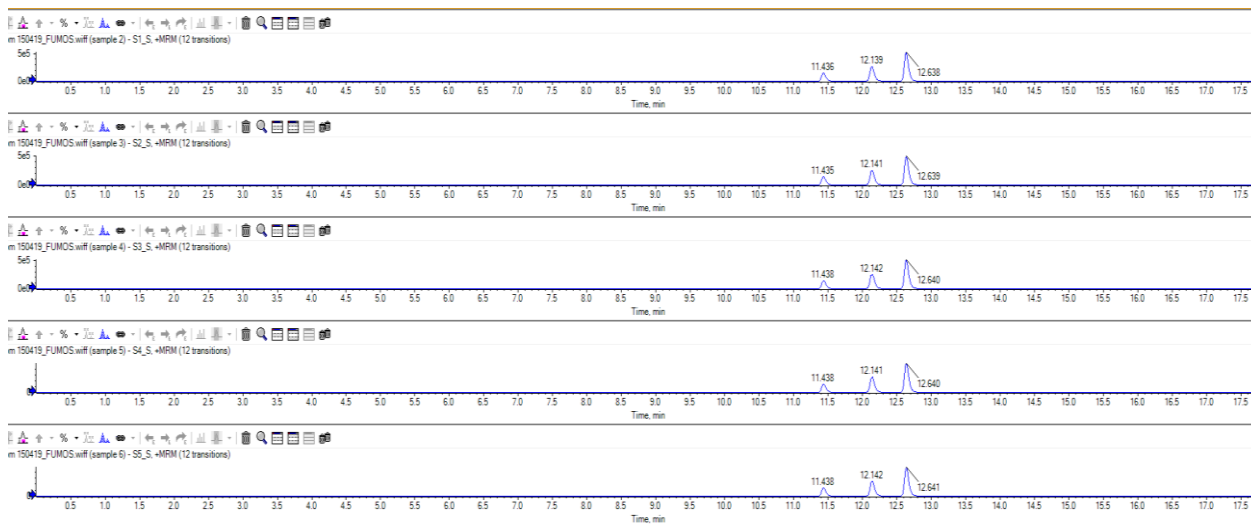


Figura 15: Cromatograma dels patrons de fumonisines

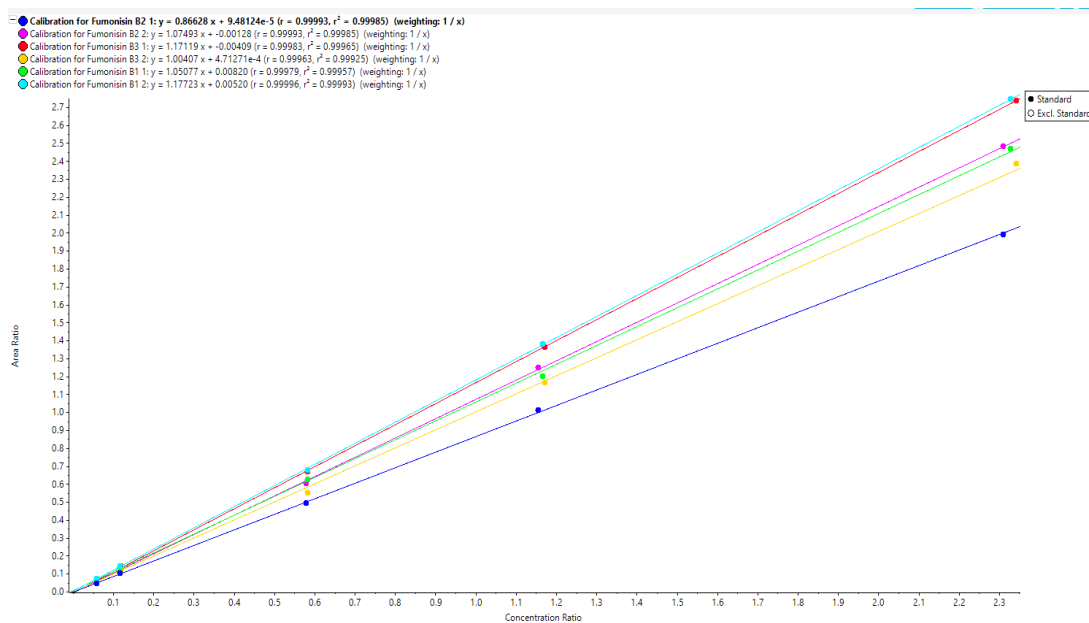


Figura 16: Rectes de calibratge de fumonisines

3.3. Avaluació de mostres reals

Es realitzen anàlisis de mostres rutina que s'analitzen al laboratori de referència per comparar els resultats i calcular el coeficient de variació (CV). Només es realitza pel cas de les fumonisines, degut que les rectes de micotoxines no donaven com era d'esperar i no es pot quantificar. S'analitzen 8 mostres de matrius diferents, tant els resultats obtinguts en el nostre laboratori com en el de referència es poden veure en la taula 16:

Taula 16: Comparació de resultats d'anàlisis de mostres reals

MATRIU	FUMONISINA	NOSTRE LABORATORI (µg/Kg)	LABORATORI EXTERN (µg/Kg)	CV (%)
Blat de moro	B2	114,156	170,285	28
	B1	455,084	658,871	28
Pinso	B2	<20	22,650	7
	B1	75,486	83,490	7
Pinso	B2	29,187	<20	26
	B1	68,619	63,890	0
Blat	B2	<20	<20	0
	B1	<20	<20	0
Blat de moro fregit	B2	<20	<20	0
	B1	<20	<20	0
Pinso	B2	<20	<20	0
	B1	40,158	44,887	7
Blat	B2	<20	<20	0
	B1	<20	<20	0
Farina de blat	B2	<20	<20	0
	B1	<20	<20	0



Podem observar que obtenim una mica menys de concentració en comparació a l'altre laboratori, obtenint en la majoria de casos un valor acceptat de CV. El coeficient de variació ens indica la dispersió entre els resultats, on aquests valor ha de ser inferior a 30 per acceptar els resultats com a bons. S'ha de tenir en compte que les mostres per l'anàlisi de micotoxines no són del tot homogènies llavors afecta els resultats cada vegada que s'analitzen, tenint un cert grau de dispersió entre ells.

Podem estar segurs que no s'està realitzant una extracció inadequada ni s'està perdent analits en el procediments, ja que juntament amb les mostres es realitzen mostres de control dopades que donen una recuperació major al 90% i es realitzen patrons de control en la recta per verificar que la quantificació sigui la correcta.



4. VALIDACIÓ

La validació del mètode es realitza segons els paràmetres que avalua ENAC i que estan en el Reglament 2002/657/CE 12 d'agost ¹¹. En el període de l'estada a l'empresa només vaig poder arribar a realitzar una prevalidació amb el mètode de fumonisines i l'avaluació aproximada d'alguns paràmetres per multimicotoxines, encara que a continuació explico el procediment que es tenia previst realitzar.

4.1. Efecte matriu

La primera cosa d'avaluar és l'efecte matriu que es pot obtenir en l'anàlisi de les mostres reals que poden ocasionar pèrdues o interferències en la recuperació dels anàlits, ja que provoquen una afectació a l'ionització dels nostres compostos donant lloc a una supressió o augment del senyal.

- **Efecte matriu en multimicotoxines**

En un primer lloc, es va realitzar la recta amb matriu i amb IS i una altra amb solvent que seria el buffer i amb IS també. Per observar les recuperacions es va realitzar una preparació de mostres amb un material de referència que seria una mostra de blat de moro que contenia algunes de les nostres micotoxines d'interès. S'escull la matriu d'arròs, ja que és la menys complexa i la que utilitzen al laboratori de referència.

L'efecte matriu s'avalua mitjançant la recuperació dels nostres anàlits en les mostres. El IS soluciona els problemes d'extracció per tant, una recuperació inferior al 100% serà degut al fet que hi ha un efecte matriu. Per tant, compararem les recuperacions calculades amb una recta amb matriu aplicant l' IS (taula 17) i amb una recta en solvent sense extracte matriu aplicant l' IS (taula 18), així el resultat ens donarà el possible efecte matriu. S'ha de tenir en compte que les rectes de multimicotoxines no donaven com esperàvem, per tant es van eliminar algun patrons de la recta per aconseguir una linealitat i un coeficient de correlació acceptable, així doncs no es pot treure una conclusió clara i concisa d'aquest mètode, només una idea aproximada.

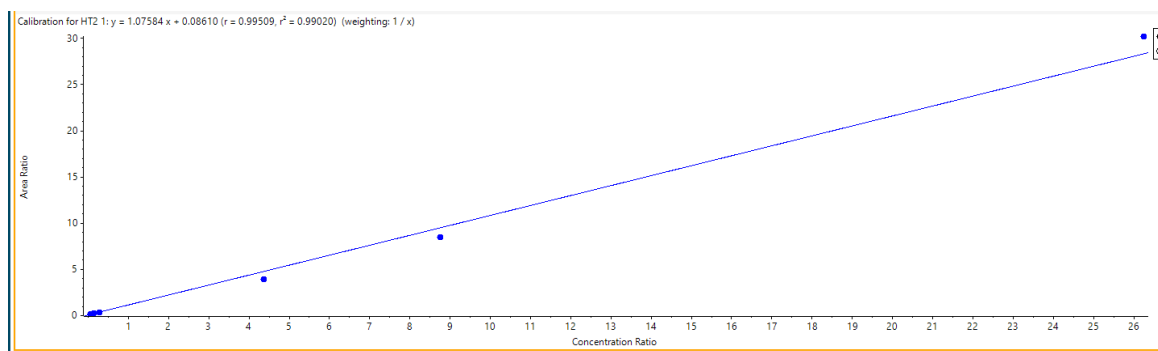
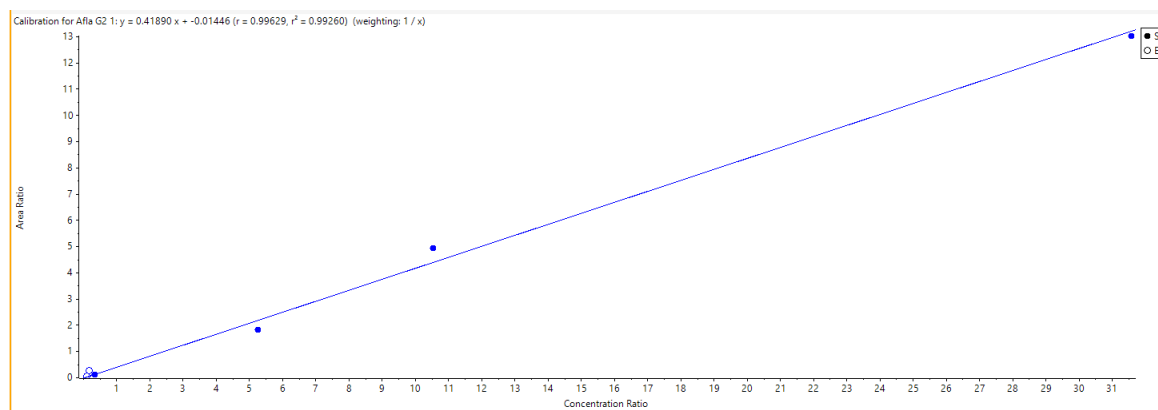
Taula 17: Recuperació del material de referència amb una recta amb matriu

Anàlit	Concentració Calculada (µg/Kg)	Teòrica (µg/Kg)	Recuperació (%)
OTA 1	2.5140	2.8	89.8
DON 1	395.9361	410	96.6
Afla B1 1	3.4664	3.5	99.0
Afla B2 1	2.4917	2.3	108.3
Afla G1 1	1.7909	1.8	99.5
Afla G2 1	0.1692	1.3	13.0
HT-2 1	21.4957	38	56.6
T-2 1	44.4627	43	103.4
ZEA 1	103.0003	85	121.2

Taula 18: Recuperació del material de referència amb una recta amb solvent

Anàlit	Concentració Calculada (µg/Kg)	Teòrica (µg/Kg)	Recuperació (%)
OTA 1	2.4015	2.8	87.1
DON 1	402.92	410	98.3
Afla B1 1	3.6020	3.5	101.9
Afla B2 1	2.7203	2.3	115.8
Afla G1 1	1.9065	1.8	107.1
Afla G2 1	0.5002	1.3	39.3
HT-2 1	21.8157	38	57.3
T-2 1	44.8321	43	104.3
ZEA 1	105.9740	85	124.6

Es pot observar que les recuperacions no tenen grans canvis significants, per tant es pot considerar que no es té efecte matriu. Pel que fa a l'afla G2 (figura 17) i la HT-2 (figura 18) són les que donen pitjors rectes i per això no es poden quantificar bé.


Figura 17: Recta de l'aflatoxina G2

Figura 18: Recta de toxina HT-2

- **Efecte matriu en fumonisines**

Es realitza el mateix procediment per la comprovació de l'efecte matriu que en multimicotoxines. En aquest cas el material de referència només té fumonisina B1 i B2, però a altes concentracions que superen el límit màxim de quantificació de la nostra recta per tant es realitza una dilució en l' injecció de 20, injectant així 1 µl. Les recuperacions dels materials de referència amb les dues rectes es veuen en les taules 19 i 20.

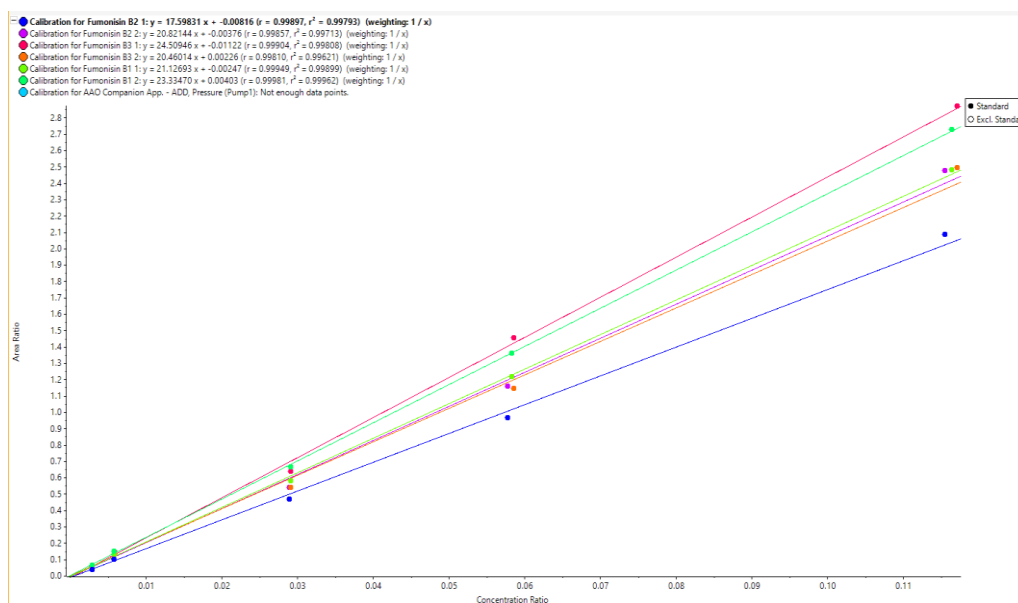
Taula 19: Recuperació del material de referència amb una recta amb matriu

Anàlit	Concentració Calculada (µg/Kg)	Teòrica (µg/Kg)	Recuperació (%)
Fumonisina B2 1	1658.3402	1375.00	120.61
Fumonisina B1 1	5145.1452	4412.00	116.62

Taula 19: Recuperació del material de referència amb una recta amb solvent

Anàlit	Concentració Calculada (µg/Kg)	Teòrica (µg/Kg)	Recuperació (%)
Fumonisina B2 1	1681.5512	1375.00	122.29
Fumonisina B1 1	5169.4030	4412.00	117.17

Es pot observar que en ambos casos obtenim una recuperació bastant alta de les dues fumonisines presents en el material de referència, tant en la recta amb extracte matriu com en solvent. La diferencia de recuperació estaria entre un 1%-3% de millora amb una recta amb matriu, per tant s'opta per realitzar la recta amb solvent i aplicant l' IS. (figura 19).


Figura 19: Recta de calibratge feta en solvent

4.2. Linealitat

La linealitat dels mètodes es verifica mitjançant les rectes de calibratge, només per fumonisines, ja que són les que ens donava una bona linealitat i senyal. Per la comprovació de la linealitat s' injecta una recta de fumonisines cada dia durant un període de 10 dies.

Per veure si a aquestes concentracions s'obté una bona linealitat, s'observa el coeficient de determinació (r^2) de la recta que ha de presentar un valor superior a 0.996 per ser acceptat. Les rectes es poden veure en la figura 19 on s'observa una molt bona linealitat.



4.3. Reproductibilitat

Aquest paràmetre es basa en la variabilitat del mètode sobre una mateixa mostra la qual s'ha efectuat en les mateixes condicions i dies diferents. En el nostre cas, hem verificat la reproductibilitat de les rectes.

A partir de l'experimentació realitzada per avaluar la linealitat es calculen els factors de desviació estàndard relativa (RSD), on aquesta per ser acceptada com ha bona ha de tenir un valor inferior al 15%.

El valor mitjà de RSD que s'obté durant aquests dies per fumonisines és de 5.6% per fumonisina B2 i B3 i de 6.6% per fumonisina B1, això significa que obtenim valors baixos que estan per sota del 15% que signifiquen que s'obté té una bona reproductibilitat del mètode quant a les rectes.

4.4. Límit de quantificació, valors paramètrics i rang alt

Per trobar aquests valors ens basem en la legislació, en recomanacions establertes per les micotoxines i en les ordres del departament de qualitat de l'empresa. En base això es crea un patró extern que tindrà una concentració major als patrons de la recta, és a dir, crearem una solució mare a partir de patrons comercials que tenen concentracions molt més altes en comparació a l'utilitzat per la formació de la solució mare de la recta que anomenarem WS_E. Encara que no la vaig duu a terme, el procediment és el següent:

- **Mètode multimicotoxines**

La solució del WS_E es mostra a continuació en la taula 20:

Taula 20: Concentració del WS_E de multimicotoxines

		Patró estàndard extern (WS_E)	STDC / SS	
		ng/ml	ng/ml	µl
Solució mare d'aflatoxines	B1	135,68	2010	675
	G1	135,68	2010	
	B2	33,82	501	
	G2	33,89	502	
Solució mare d'ocratoxina	OTA	135	100000	270
solució mare del mix de tricotecens i zearalenona	DON	2700	100000	270
	NIVALENOL	2700	100000	
	FUSARENON-X	2700	100000	
	ZEA	2727	100000	
	HT2	2700	100000	
	T2	2700	100000	
	DAS	2700	100000	
Solució mare del neosolaniol	NEOSOLANIOL	2700	100000	
		V final (µl)	10000	
		Solvent	1mM NH4Ac-0,1%HF en H2O	

Per l'elecció dels valors paramètrics i el rang alt (taula 21) s'ha de tenir en compte que no totes les micotoxines presenten els mateixos valors, per tant es fa una mica més difícil fer una homogeneïtat d'aquests, per tant s'ha de fer diferents per cada micotoxina. Per alguns compostos com el DAS, nivalenol, neosolaniol i fusarenona no es té cap legislació establerta per tant com corresponen a la família dels tricotecens s'aplicaran els valors legiscats pel DON.

**Taula 21: Límit de quantificació, valors parametris i rang alt de multimicotoxines**

	LOQ1	LOQ2(B2,G2)/VP1	LO3	VP1/VP2	MRA1	MRA2
B1	0,53	2		10,09	60,3	
G1	0,53	2		10,09	60,3	
B2		0,5		2,52	15,03	
G2		0,5		2,52	15,06	
OTA	0,52	1,99		10,04	60	
DON			49,95	200,81		3000
NIVALENOL			49,95	200,81		3000
FUSARENONA-X	10,46		49,95	200,81		3000
ZEA	10,57		50,45	202,82		3030
HT2	10,46		49,95	200,81		3000
T2	10,46		49,95	200,81		3000
DAS	10,46		49,95	200,81		3000
NEOSOLANIOL	10,46		49,95	200,81		3000

Els valors paramètrics s'escullen en funció al valor més petit legislat en l'alimentació humana i animal pel més petit degut a l'alt cost de patrons., els altres s'escullen en funció de la resta d'addiccions si coincideixen amb algun paràmetre d'altra micotoxina.

Per fer aquesta part de la validació es dopen les 9 matrius amb els valors necessaris per complir amb totes les concentracions de la taula 21. Es durà a terme en un període de 10 dies.

- **Mètode fumonisines**

A continuació es mostra la concentració de la solució mare externa en la taula 22, on per fumonisines com que no esta legislat cap valor no es realitzarà:

Taula 22: Concentració del WS_E de fumonisines

	WS_E	Solució intermèdia	
Fumonisines	ng/ml	ng/ml	µl
FUM B1	2000	10000	200
FUM B2	2000	10000	
		Vol Final (µl)	10000
		Solvent	acetonitril/aigua (20/80 v/v)

En aquest mètode les dues fumonisines tenen el mateix límit de quantificació que és de 20 µg/kg, s'estableix un rang alt de 3500 µg/kg d'acord a les recomanacions 576/CE i 1319/CE³ i basat en les concentracions màximes que s'han quantificat en mostres rutines del laboratori. Els valors paramètrics estaran compresos entre el límit de quantificació i el rang alt com es mostra a la següent taula 21, aquests han sigut seleccionats segons la despesa que s'ha de fer de patró extern i segons els criteris de l'empresa. Finalment es van escollir com a valors paramètrics el valor més petit que feia referència a aliments elaborats a base de blat de moro i aliments infantils per lactant i nens, basat en el reglament (CE) N° 1881/2006²:

**Taula 23: Límit de quantificació, valor paramètric i rang alt de fumonisnes**

	LOQ	SUMA DE B1 + B2	
		VP1	RA
B1	20	200	7000
B2	20	200	7000

El límit de quantificació es realitza dopant totes les matrius a validar amb el volum necessari per obtenir una concentració pròxima al límit de quantificació, d'igual manera es va realitzar la comprovació dels altres paràmetres. En tot cas, es dopa amb la solució mare a partir d'un patró extern. Per fumonisines no es realitza el dopatge ni la validació per les matrius de fruits secs, ja que no consten en la legislació ni en cap recomanació. També es realitza durant 10 dies.



5. CONCLUSIONS

En aquest treball es va intentar posar dos mètodes a punt i validar-los a partir del procediment i condicions que es tenien en un altre laboratori del mateix grup.

Al principi pot resultar molt fàcil copiar un mètode validat en un altre laboratori, ja que es tenen totes les condicions i el procediment necessari per dur-lo a terme. Però l'experimentació ens va comprovar que no era tan fàcil com semblava. També, cal tenir en compte que treball amb un detector QTRAP requereix molta atenció a tot el que sigui preparativa de fases mòbils i reactius, ja que qualsevol interferència pot afectar a l'equip i com a conseqüència els nostres anàlisis. Encara aquesta consideració, implementar aquests mètodes en el laboratori estalviaria molt de temps en els anàlisis, ja que en 17 min s'obtenen amb el mètode de micotoxines els resultats de 14 micotoxines i en la preparativa no es cal la utilització de SPE.

Desgraciadament, no es va poder acabar de completar en el temps en el qual vaig ser a l'empresa. Va ser molt difícil trobar una explicació per la qual no obteníem els mateixos resultats que el nostre mètode de referència pel cas del mètode de multimicotoxines, ja que el reproduíem tal qual ens indicaven i amb el mateix equip i condicions.

Pel mètode de fumonisines va ser molt més fàcil la seva realització, ja que a la primera ens va donar molt bons resultats, inclòs es van realitzar anàlisis de mostres rutina i es van comparar amb els d'altres laboratoris, resultant ser satisfactoris en la majoria de casos.

Pel que fa a la validació, es va avançar molt més amb el mètode de fumonisines, ja que el mètode ens donava bé i vam poder veure com les nostres rectes mantenien la linealitat i es tenia una bona reproductibilitat.



CONCLUSIONS

In this essay, we tried to get ready and validate two methods which were based on the procedure and conditions that were held in another laboratory of the same group.

At the beginning, it's normal to think that it will be easy to copy a validated method in another laboratory, because we know all the parameters needed. But experimentation proved that it wasn't as easy as it seemed. Also, it must take into consideration that working with a QTRAP detector requires a lot of attention to the preparation of the mobile phase and the reagents, because any interference can affect the equipment and, in consequence, our analysis. Despite this, implementing these methods in the laboratory would save a lot of time in the analysis because you can obtain the results of 14 mycotoxins in 17 minutes and the use of SPE isn't required in the preparation.

Unfortunately, I wasn't able to complete the experiment in the time I was to the company. It was very difficult to find the reason we didn't get the same results as our method of reference for the multimycotoxin method, because we reproduced it as we indicated and with the same equipment and conditions.

The fumonisin method was much easier, since the first one yielded very good results even in routine analysis of samples, which were compared with satisfactory results in most cases.

Thanks to the good results obtained with the fumonisins method we were able to start with the validation by observing the good linearity of the graph and the good reproducibility.



6. BIBLIOGRAFIA

1. Soriano del Castillo, J.M. *Micotoxinas en alimentos*, Edició Díaz de Santos: España, 2007, pàg. 15-16.
2. Reglament (CE) Nº 1831/2003 de la Comissió del 19 de desembre de 2003, pel que es fixa el contingut màxim de determinats contaminants en els productes alimentaris.
3. Recomanació (UE) 2016/1319 de la Comissió de 29 de juliol de 2016 que modifica la Recomanació de 2006/576/CE sobre la presència de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxines T-2 y HT-2 y Fumonisin en productes destinats a l'alimentació animal pel que refereix al deoxinivalenol, la zearalenona i l'ocratoxina A en els aliments per animals de companyia.
4. Arroyo, N.; Huertas, J.F; Gámiz, L.; García, A.M. ; *Control de micotoxinas en alimentos*; Universidad de Granada: Granada, SP, gener 2014.
5. European Food Safety Authority. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins> (visitat 5 maig ,2019).
6. Kumar, P; Majato, D.K.; Kamle, M.; Mohanta, T.K.; Kang, S.G. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *NCBI*. [Online] 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5240007/> (visitat 10 maig ,2019)
7. Waters: How Does High Performance Liquid Chromatography Work?. www.waters.com/waters/es_ES/How-Does-High-Performance-LiquidChromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=es_ES (visitat 10 maig ,2019)
8. Sacharlab, Lab Sourcing Group. *Curso de determinación de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS)*; Sailab: España ,març 2019.
9. Baierbach, A. *Determination of selected mycotoxins using HPLC-MSMS*; Quality Management inspection instruction: Alemanian ,decembre 2017.
10. Baierbach, A. *Determination of fumonisins (mycotoxins) using HPLC-MSMS*; Quality Management inspection instruction: Alemanian ,decembre 2017.
11. Decisió de la Comissió, del 12 de agost de 2002, per la que s'aplica la Directiva 96/23/CE del Consell en quant al funcionament dels mètodes analítics i l' interpretació dels resultats.

**ANNEX 1**

A continuació en les taules de la 24 a la 34 es poden veure els valors límits permessos de les micotoxines pel reglament 1881/2006 (CE) per alimentació humana i els valors límits recomanats segons les recomanacions 576(CE) i 1319(CE) per alimentació animal. Per algunes de les micotoxines analitzades en aquest treball no s'ha trobat cap norma que estableixi els límits.

Taula 24 : Límits màxims legislat per alimentació humana per aflatoxines

Alimentació humana		
Aflatoxines	Contingut màxim (µg/Kg) B₁	Contingut màxim (µg/Kg) Suma de B₁, B₂, G₁ i G₂
Cacauets destinats a ser sotmesos a un procés de selecció o altre tractament físic, abans del consum humà directe o d'un us com a ingredients alimentaris	8,0	15,0
Fruits de closca destinats a ser sotmesos a un procés de selecció o un altre tractament físic abans del consum humà	5,0	10,0
Cacauets i fruits secs i productes derivats de la seva transformació, destinats al consum humà directe o a ser utilitzat com ingredients en els productes alimentaris	2,0	4,0
Fruits secs destinats a ser sotmesos a un procés de selecció o un altre tractament físic, abans del consum humà directe, o a ser utilitzat com ingredients en els productes alimentaris	5,0	10,0
Fruits secs i productes derivats de la seva transformació, destinats al consum humà directe o a ser utilitzat com ingredients dels productes alimentaris	2,0	4,0
Tots els cereals i tots els productes a base de cereals, inclòs els productes derivats de la transformació de cereals	2,0	4,0
Blat destinat a ser sotmès a un procés de selecció, o un altre tractament físic, abans del consum humà directe o del seu us com ingredient de productes alimentaris	5,0	10,0
Aliments elaborats a base de cereals i aliments infantils per lactants i nen de curta edat	0,10	-



Taula 25 : Límits màxims legislats per alimentació animal per aflatoxines

Alimentació animal	
Aflatoxines	Contingut màxim (µg/Kg)
Matèries primes per pinsos	20
Pinsos complementaris	10
Pinsos compostos per vaques lactant i vedells, ovelles lactants i xais, cabres lactants i cabrits, porcs i aus de corrals	5
Pinsos compostos per bovins, porcins i aus de corral	20

Taula 26 : Límits màxims legislats per alimentació humana per l'ocratoxina A

Alimentació humana	
Ocratoxina A	Continguts màxims (µg/Kg)
Cereals no elaborats	5,0
Tots els productes derivats de cereals no elaborats, inclòs els productes transformats a base de cereals i els cereals destinats al consum humà	3,0
Cafè torrat en gra i cafè molt	5,0
Cafè soluble	10,0
Aliments elaborats en base a cereals i aliments infantils per lactants i nen de curta edat	0,50

Taula 27 : Límits màxims legislats per alimentació animal per l'ocratoxina A

Alimentació animal	
Ocratoxina A	Contingut màxim (µg/Kg)
Matèries primes per pinsos: cereals i productes a base de cereals	250
Pinsos complementaris i complets per porcs	50
Pinsos complementaris i complets per aus de corral	100



Taula 28 : Límits màxims legislat per alimentació humana pel deoxinivalenol

Alimentació humana	
Deoxinivalenol	Continguts màxims ($\mu\text{g/Kg}$)
Cereals no elaborats que no siguin trigo dur, avena i blat	1250
Trigo dur i avena no elaborada	1750
Blat no elaborat	1750
Pasta	750
Cereals destinats al consum humà directe, farina de cereals	1750
Pa, pastissos, galetes, aperitius de cereals i cereals per l'esmorzar	500
Aliments elaborats a base de cereals i aliments infantil per lactants i nen de curta edat	200

Taula 29 : Límits màxims legislat per alimentació animal pel deoxinivalenol

Alimentació animal	
Deoxinivalenol	Contingut màxim ($\mu\text{g/Kg}$)
Matèries primes per pinsos: cereals i productes a base de cereals	8000
Matèries primes per pinsos: subproductes de blat	12000
Pinsos complementaris i complets	5000
Pinsos complementaris i complets per porcs	900
Pinsos complementaris i complets per aus de corral	2000

Taula 30 : Límits màxims legislat per alimentació humana per la zearalenona

Productes alimentaris	
Zearalenona	Continguts màxims ($\mu\text{g/Kg}$)
Cereals no elaborats que no siguin blat	100
Blat no elaborat	200
Cereals destinats al consum humà directe i farina de cereals	75
Blat destinats al consum humà directe, farina de blat i blat molt. Blat triturat i oli de blat	200
Pa, pastissos, galetes, aperitius de cereals i cereals	50
Aperitius de blat i cereals per l'esmorzar a base de blat	50



Aliments elaborats a base de cereals i aliments infantils per lactants i nens de curta edat	20
Aliments elaborats a base de blat per lactants i nens de curta edat	20

Taula 31 : Límits màxims legislats per alimentació animal per la zearalenona

Alimentació animal	
Zearalenona	Contingut màxim (µg/Kg)
Matèries primes per pinsos: cereals i productes a base de cereals	2000
Matèries primes per pinsos: subproductes de blat	3000
Pinsos complementaris i complets per garrins i porcs	100
Pinsos complementaris i complets per porcs	2500
Pinsos complementaris i complets per terners, ganat, ovelles i cabres	500

Taula 32 : Límits màxims legislats per alimentació humana per fumonisines

Productes alimentaris	
Fumonisines	Continguts màxims (suma de B1+ B2) (µg/Kg)
Blat no elaborat	2000
Farina de blat, blat molt. Blat triturat i oli de blat	1000
Aliments a base de blat destinats al consum humà directe	400
Aliments elaborats a base de blat i aliments infantils per lactant i nens de curta edat	200

Taula 33 : Límits màxims legislats per alimentació animal per fumonisines

Alimentació animal	
Fumonisines	Contingut màxim (µg/Kg)
Matèries primes per pinsos: blat i productes a base de blat	60000
Pinsos complementaris i complet: porcs, cavall, conill i animals de companyia	5000
Pinsos complementaris i complets per peixos	10000
Pinsos complementaris i complets per aus de corral, vedells, cordero i cabrits	20000
Pinsos complementaris i complets per remugants major de 4 mesos	50000



Taula 34 : Límits màxims legislats per alimentació animal per HT-2 i T-2

Alimentació animal	
T-2 i HT-2	Contingut màxim ($\mu\text{g/Kg}$)
Pinsos compostos per gats	0,05