



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI



# TREBALL DE FI DE GRAU

---

## DESENVOLUPAMENT I VALIDACIÓ D'UN MÈTODE ANALÍTIC: QUANTIFICACIÓ DE L'AFLATOXINA TOTAL EN PURÉS DE PRÉSSEC MITJANÇANT EL MÈTODE ELISA

**Empresa:** Indulleida

**Autor:** Joel Felip Giraut Abad

**Directora del treball:** Esther Aubets Fusté

**Tutora acadèmica:** Josefa Gavalda Martínez

**Data:** 15/06/2025

# AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull agrair als meus pares i a la meva germana tot el suport que m'han donat, no solament durant la realització d'aquest treball, sinó que al llarg de tota la carrera.

A la directora del treball, l'Esther, per la seva guia constant i l'ajuda que m'ha proporcionat quan ho he necessitat.

A la tutora acadèmica, la Fina, que m'ha orientat sobre com anar desenvolupant el treball.

Al Siscu i al Francesc, que gràcies als seus consells he pogut aclarir tots els dubtes que m'han anat sorgint, i pràcticament m'han acompanyat des del plantejament del treball fins les conclusions finals.

I finalment, a Indulleida, per donar-me aquesta oportunitat d'aprendre i per tota l'experiència viscuda.

# ÍNDEX DE CONTINGUTS

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUM.....                                                    | 6  |
| 2. OBJECTIUS.....                                                | 7  |
| 3. MARC TEÒRIC .....                                             | 8  |
| 3.1. INTRODUCCIÓ .....                                           | 8  |
| 3.2. FONAMENTS .....                                             | 9  |
| 3.3. ANTECEDENTS BIBLIOGRÀFICS .....                             | 11 |
| 4. PART EXPERIMENTAL .....                                       | 13 |
| 4.1. REACTIUS .....                                              | 13 |
| 4.2. SOLUCIONS .....                                             | 14 |
| 4.3. MATERIAL I EQUIP NECESSARI .....                            | 14 |
| 4.4. MOSTREIG.....                                               | 14 |
| 4.5. PLA EXPERIMENTAL .....                                      | 15 |
| 4.6. QUANTIFICACIÓ DE LES AFLATOXINES AMB LA TÈCNICA ELISA ..... | 19 |
| 5. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....                                   | 22 |
| 5.1. RESULTATS OBTINGUTS AMB CADA EXTRACCIÓ .....                | 22 |
| 5.2. VALIDACIÓ DEL MÈTODE DESENVOLUPAT .....                     | 25 |
| 6. CONCLUSIONS .....                                             | 35 |
| 7. BIBLIOGRAFIA .....                                            | 37 |
| 8. ANNEXOS.....                                                  | 40 |
| 8.1. ANNEX 1: MUNTATGE DE LA COLUMNA IAC .....                   | 40 |

## 1. RESUM

En aquest treball de fi de grau s'ha desenvolupat i validat d'un mètode analític per a la quantificació de l'aflatoxina total en purés de préssec sense additius, utilitzant columnes d'immunoafinitat (IAC) i la tècnica ELISA (anàlisi per immunoadsorció lligat a enzims).

Davant la manca de protocols específics per analitzar l'aflatoxina total en aquesta matriu, s'han adaptat metodologies existents aplicades a altres tipus d'aliments. L'estudi inclou l'avaluació de diferents solvents d'extracció, volums d'eluent i l'ús del tensioactiu Tween 20 per millorar la recuperació de l'analit. Com a resultat, s'ha aconseguit optimitzar les condicions d'extracció per assolir una recuperació del 70%, d'acord amb el Codex Alimentarius.

Finalment, el mètode desenvolupat ha estat validat estadísticament en termes de recuperació, precisió, incertesa i límit de quantificació, mostrant-se adequat per a la determinació de l'aflatoxina total en aquesta matriu alimentària. També s'han intentat comparar els resultats obtinguts amb els resultats proporcionats per un laboratori extern acreditat segons la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 mitjançant la tècnica LC-MS/MS (cromatografia líquida unida a espectròmetre de masses en tàndem).

## 1. SUMMARY

In this final degree project, an analytical method has been developed and validated for the quantification of total aflatoxin in additive-free peach purées, using immunoaffinity columns (IAC) and the ELISA technique (enzyme-linked immunosorbent assay).

Due to the lack of specific protocols for analyzing total aflatoxin in this food matrix, existing methodologies applied to other types of food have been adapted. The study includes the evaluation of different extraction solvents, eluent volumes, and the use of the surfactant Tween 20 to improve analyte recovery. As a result, the extraction conditions were optimized to achieve a recovery of 70%, in accordance with the Codex Alimentarius.

Finally, the developed method was statistically validated in terms of recovery, precision, uncertainty, and limit of quantification, proving to be suitable for the determination of total aflatoxin in this food matrix. An attempt was also made to compare the results obtained with those provided by an external laboratory accredited according to UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 using the LC-MS/MS technique (liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry).

## 2. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest treball és desenvolupar i validar un mètode per quantificar la concentració d'aflatoxina total en purés de préssec sense additius mitjançant l'ús de columnes d'immunoafinitat (IAC) i la tècnica ELISA (anàlisi per immunoabsorció lligat a enzims).

En aquest treball, es volen comparar diferents variables dins del procediment d'extracció per extreure les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> de les mostres, amb l'objectiu d'optimitzar la recuperació d'aquests analits previ a la seva quantificació amb la tècnica ELISA.

Un cop s'hagi escollit el procediment d'extracció més adequat (el que doni una major recuperació), es pretén validar el mètode analític emprant el menor nombre de recursos necessaris. Per fer-ho, es volen avaluar els principals paràmetres de qualitat com la recuperació, l'exactitud, la incertesa del resultat i el LOQ (límit de quantificació). A més, també es volen comparar els resultats obtinguts analitzant mostres reals a través del mètode desenvolupat amb els d'un laboratori extern acreditat segons la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 mitjançant la tècnica LC-MS/MS, per veure si els resultats obtinguts són acceptables.

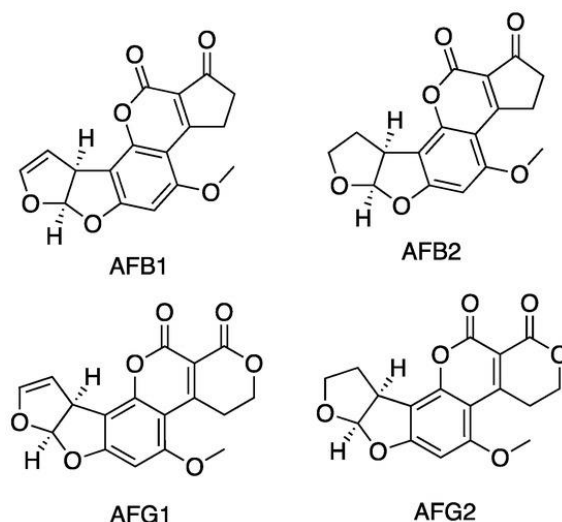
## 3. MARC TEÒRIC

### 3.1. INTRODUCCIÓ

Aquest treball s'ha desenvolupat en l'empresa Indulleida S.A., dins de l'àrea de control de qualitat. Indulleida és una empresa dedicada a la transformació de fruita per a l'elaboració de sucres, concentrats, purés i altres derivats destinats principalment a la indústria alimentària. El projecte s'ha dut a terme en el laboratori de control de qualitat, on es realitzen anàlisis fisicoquímiques i microbiològiques per garantir la seguretat i qualitat dels productes. En aquest cas, s'han aplicat tècniques d'anàlisi instrumental per quantificar l'aflatoxina total en purés de préssec sense additius, contribuint a la millora del sistema de control intern i al compliment de la normativa vigent.

Les aflatoxines són un tipus de micotoxines produïdes pels fongs de la família *Aspergillus* (sobretot per les espècies *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*), les quals són carcinògenes pels humans. Els fongs *Aspergillus* són aeròbics, pel que tenen la capacitat de produir aflatoxines en els aliments mentre s'estan cultivant o durant la post-collita. Aquests fongs creixen sobretot a temperatures d'entre 25 i 37 °C i en ambients amb un 80-85% d'humitat.<sup>1</sup> Un cop els fongs han produït les aflatoxines, es pot reduir la seva concentració emprant diferents tècniques, però no es poden eliminar completament.<sup>2</sup> Entre aquestes tècniques per degradar les aflatoxines, es troben tècniques físiques (irradiació gamma, UV o amb feix d'electrons), químiques (amb ozó o àcids orgànics) o biològiques (amb microbis o enzims), entre d'altres.<sup>3</sup> No s'acostuma a eliminar-les usant temperatures elevades, ja que el rang de descomposició de les aflatoxines es troba entre els 237 i els 306 °C (la temperatura de descomposició de l'aflatoxina B<sub>1</sub>, la més nociva, és de 267 °C).<sup>4</sup>

Les aflatoxines poden ser absorbides en l'organisme tant per la seva ingesta directa a través dels aliments com a través de la pell. En els aliments, es poden trobar en els fruits secs, les fruites, la carn, les espècies, el blat de moro, l'arròs, la llet i els productes làctics.<sup>5</sup> Existeixen més de 18 tipus d'aflatoxines diferents, de les quals les més rellevants són la B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) i G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>). D'aquestes quatre, la que més destaca és l'AFB<sub>1</sub>, que a més és la més abundant. Un cop s'ha ingerit un aliment infectat amb la toxina, aquesta queda retinguda al fetge, on causa adductes amb l'ADN. Per aquest motiu, s'estima que l'aflatoxina B<sub>1</sub> provoca anualment uns 155.000 casos d'hepatocarcinoma,<sup>2</sup> tot i que també pot provocar càncer de ronyó, pulmó o còlon, immunosupressió, malnutrició i efectes mutagènics en humans i animals.<sup>5</sup>



**Figura 1.** Estructura química de les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>

A la Unió Europea, el límit màxim permès de les aflatoxines està especificat en el Reglament (UE) 2023/915 de la comissió del 25 d'abril de 2023, que varia lleugerament segons l'aliment o la família d'aliments. En el cas dels purés de préssec, no s'estipula una concentració màxima d'aflatoxina total per aquest producte ni productes similars. Tot i això, en el cas de que s'utilitzi com a ingredient per produir aliments per a nens petits i lactants, per a usos mèdics especials i pels substitutius de la dieta completa pel control del pes, el màxim es troba en 0.10 µg/kg per l'AFB<sub>1</sub> (concentració en matèria seca). A Espanya, el límit màxim permès de les aflatoxines està especificat en Reial Decret 475/1988 del 13 de maig, que estableix que pels aliments de consum humà el màxim es troba en 5 µg/kg per l'AFB<sub>1</sub> i en 10 µg/kg per la total (suma de l'AFB<sub>1</sub>, l'AFB<sub>2</sub>, l'AFG<sub>1</sub> i l'AFG<sub>2</sub>).

## FONAMENTS

Existeixen diferents mètodes per extreure i quantificar aflatoxines en mostres de diferents aliments.

### 3.2.1. EXTRACCIÓ I PURIFICACIÓ DE L'ANALIT

Per fer l'extracció i purificació de les aflatoxines, les tècniques més comuns són IAC, DLLME o QuEChERS.

#### 1) IAC (columnes d'immunoafinitat)<sup>6</sup>

Aquestes són simples i altament específiques per l'antigen d'interès. Quan s'injecta una mostra en aquesta columna, les aflatoxines queden retingudes gràcies a la unió selectiva que fan amb els anticossos que hi ha en les parets d'aquesta, mentre que

la resta de components de la matriu no. Després, cal fer una neteja per remoure les possibles impureses que poden haver quedat en la columna, i finalment, cal eluir les aflatoxines fent passar un solvent capaç de trencar aquesta unió antigen-anticòs, que acostuma a ser metanol. És un mètode molt eficaç, ràpid, sensible i selectiu, i l'extracte final que s'obté és compatible amb moltes tècniques quantitatives com fluorimetria, LC-FLD (cromatografia líquida unida a detector de fluorescència) o LC-MS (cromatografia líquida unida a espectròmetre de masses) sense haver de fer més tractaments a la mostra.

## 2) DLLME (microextracció líquid-líquid dispersiva)<sup>7</sup>

És una tècnica d'extracció i preconcentració de l'analit per una solució aquosa. En la fase d'extracció, s'utilitza un solvent orgànic immiscible en aigua (d'extracció) i un solvent orgànic miscible en aigua (de dispersió). El solvent de dispersió permet que es dispersi el solvent d'extracció en la solució de la mostra, de manera que a l'agitar la dissolució es forma una solució tèrbola en la que el solvent d'extracció retén els analits. Després, es centrifuga per separar la fase aquosa de la fase orgànica (que conté l'analit) i es recollecta amb una microxeringa.

## 3) QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe)<sup>8</sup>

QuEChERS és una tècnica molt senzilla per mostres sòlides que consta de dues etapes: una d'extracció i una de *clean-up* (neteja).

En la primera, s'usa un solvent orgànic (normalment acetonitril) acompanyat de sals, per ajudar a que els analits es separin de la fase sòlida de la mostra, i posteriorment es centrifuga per separar les diferents fases (de les quals interessa el sobrenedant perquè conté els analits). En la segona, es fa una extracció dispersiva en fase sòlida d'aquest sobrenedant i es torna a centrifugar, per obtenir un extracte que es pot analitzar directament. Com diu el seu propi nom, aquesta tècnica és molt efectiva al ser molt més ràpida, barata, segura i respectuosa amb el medi ambient que la majoria de mètodes més convencionals com SPE (extracció en fase sòlida).

De totes aquestes tècniques d'extracció, l'escollida en aquest treball és la IAC, gràcies a la seva selectivitat per l'analit d'interès.

### **3.2.2. ANÀLISI DE L'ANALIT**

Les tècniques més usades per determinar i quantificar les aflatoxines són:

### 1) HPLC (cromatografia líquida d'alta eficàcia)

És una tècnica en la qual es separen els components d'una mescla. En aquesta, la fase mòbil (que conté la mostra amb l'analit) passa a través de la fase estacionària (columna), que va interaccionant químicament amb els analits fins que aquests acaben sortint de la columna i sent detectats. Quan més afinitat tingui l'analit amb la fase estacionària, més trigarà en sortir. Els detectors que es poden usar amb HPLC són el detector UV o el de fluorescència. En el cas del detector de fluorescència, abans de fer l'anàlisi, cal fer una extracció prèvia de l'analit i una posterior derivatització d'aquest per obtenir menors límits de detecció.

És una tècnica amb baixos límits de detecció i quantificació, en la qual cal optimitzar l'anàlisi per separar els pics dels diferents compostos presents en la mostra.

### 2) ELISA (anàlisi per immunoabsorció lligat a enzims)<sup>9</sup>

En aquesta tècnica, té lloc una reacció antígen-anticòs, on es detecta un antígen immobilitzat gràcies a un anticòs (específic per aquest antígen) unit a un enzim que forma un producte detectable. Com que la interacció antígen-anticòs és molt específica, permet detectar i quantificar un antígen en una mostra complexa. La detecció mitjançant aquesta tècnica pot ser directa o indirecta, depenent de l'analit a analitzar. Per aquests motius, és un mètode simple, adaptable, sensible i molt selectiu.

D'aquestes dues tècniques d'anàlisi, l'escollida en aquest treball és l'ELISA, al tenir una gran selectivitat per l'analit d'interès.

## **3.3. ANTECEDENTS BIBLIOGRÀFICS**

Encara que en els últims anys hi ha hagut una creixent preocupació per la presència d'aflatoxines en els aliments, la majoria dels estudis científics que s'han fet fins al moment han utilitzat com a mostres llet, ous i, sobretot, nous (o altres fruits secs). Aquests mètodes analitzaven les mostres amb les tècniques ELISA i/o HPLC (utilitzant detectors d'UV, fluorescència o MS), i principalment usaven com a tècniques d'extracció IAC o DLLME. A més, els pocs estudis que s'han fet amb mostres de préssecs o productes derivats s'han fet mitjançant UPLC-MS/MS, usant QuEChERS com a tècnica d'extracció de les aflatoxines.<sup>10</sup>

La falta de protocols ben establerts per analitzar aflatoxines en productes diferents dels mencionats prèviament ressalta la necessitat d'adaptar i optimitzar els mètodes d'extracció i quantificació de les aflatoxines a diferents matrius d'aliments. És per aquest motiu que en aquest estudi es té com a objectiu avaluar i comparar diferents variables en una tècnica d'extracció d'aflatoxines per purés de préssec sense additius per trobar un mètode eficient i adequat per extreure i analitzar aquesta matriu. També es compararan els resultats obtinguts a través del mètode desenvolupat amb els de l'anàlisi de les mateixes mostres fet per un laboratori extern acreditat amb la norma UNE-EN ISO/IEC 17025: 2005 usant un mètode intern i mitjançant LC-MS/MS, per veure si el mètode desenvolupat és fiable.

## 4. PART EXPERIMENTAL

### 4.1. REACTIUS

| Reactiu                                                                | Puresa | Toxicitat                       | Manipulació                          |
|------------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------------|--------------------------------------|
| NaCl                                                                   | 99.9%  |                                 | Ulleres de protecció i guants.       |
| H <sub>2</sub> O destil·lada                                           | 99.9%  |                                 |                                      |
| Metanol, HPLC grade                                                    | ≥99.9% | Inflamable, tòxic i cancerigen. | Sota campana, guants i bata.         |
| PBS - Tween 20                                                         | 99.9%  |                                 | Ulleres de protecció, guants i bata. |
| PBS (RBRRP202)                                                         | 99.9%  |                                 | Bata.                                |
| Solució patró Trilogy Liquid Standard Aflatoxin (TSL-108-10)           | 99.9%  | Inflamable i tòxic.             | Ulleres de protecció, guants i bata. |
| Patrons d'aflatoxina total del kit RIDASCREEN Aflatoxin Total (R4701)  | 99.9%  | Inflamable, tòxic i cancerigen. | Ulleres de protecció, guants i bata. |
| Conjugat d'aflatoxina total del kit RIDASCREEN Aflatoxin Total (R4701) | 99.9%  |                                 | Ulleres de protecció, guants i bata. |
| Anticòs d'aflatoxina total del kit RIDASCREEN Aflatoxin Total (R4701)  | 99.9%  |                                 | Ulleres de protecció, guants i bata. |
| Cromògen vermell Pro del kit RIDASCREEN Aflatoxin Total (R4701)        | 99.9%  |                                 | Ulleres de protecció, guants i bata. |
| Solució de parada del kit RIDASCREEN Aflatoxin Total (R4701)           | 99.9%  | Corrosiu.                       | Ulleres de protecció, guants i bata. |

## 4.2. SOLUCIONS

- Patró d'aflatoxina total (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub>) de 50 µg/L.
- Patrons d'aflatoxina total (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub>) de 0.05, 0.15, 0.45, 1.35 i 4.05 µg/L en metanol al 10%.
- Solució tampó de rentat (PBS:H<sub>2</sub>O destil·lada) (1:100)
- Solució tampó de rentat (PBS-Tween 20:H<sub>2</sub>O destil·lada) (1:100)
- Solució de metanol:H<sub>2</sub>O destil·lada (60:40)
- Solució de metanol:H<sub>2</sub>O destil·lada (70:30)
- Solució de metanol:H<sub>2</sub>O destil·lada (80:20)
- Solució de metanol:H<sub>2</sub>O destil·lada (90:10)

## 4.3. MATERIAL I EQUIP NECESSARI

- Kit ELISA RIDASCREEN Aflatoxin Total (R4701)
- Columnes AflaRhone WIDE (RBRP116/25)
- Accessoris per IAC (RBRAPO1)
- Agitador
- Centrifugadora
- Paper de filtre
- Fotòmetre per microplaques Multiskan FC
- Programa RIDASOFT® Win.NET Food & Feed
- Pipetes automàtiques de 10mL, 1mL, 100 µL.
- Microsoft Excel

## 4.4. MOSTREIG

Les mostres amb les que s'ha treballat han estat purés de préssec sense additius produïts a Indulleida l'any 2024. Mentre no s'han analitzat, les mostres s'han guardat en un lloc fresc i protegit de la llum a -4°C.<sup>11</sup> Abans de dur a terme el procediment experimental, les mostres s'han descongelat i s'han deixat una estona a temperatura ambient (20-25 °C) fins que s'han temperat.

## 4.5. PLA EXPERIMENTAL

Amb l'objectiu d'avaluar la recuperació al variar diferents paràmetres d'un mètode d'extracció per l'aflatoxina total en purés de préssec, s'ha dissenyat un pla experimental amb diferents variables en quant al tipus de dissolvent emprat per a l'extracció de les aflatoxines i el volum d'eluent usat posteriorment en la columna IAC. També es vol comprovar, en el cas de que la recuperació no sigui satisfactòria (menor al 70% segons directrius del Codex Alimentarius<sup>12</sup>), si l'addició de Tween 20 (tensioactiu no iònic) ajuda a millorar o no aquesta extracció. L'objectiu és comparar la recuperació de les aflatoxines per trobar quin mètode d'extracció dona una major recuperació d'aflatoxina total. El número de variables a optimitzar en l'estudi s'ha limitat amb els objectius d'optimitzar aquelles variables més importants en quant a l'extracció i d'utilitzar el menor nombre possible de columnes IAC. Per aquests motius, el pla experimental s'ha dividit en dues fases.

Cal tenir en compte que les aflatoxines són carcinògenes, pel que tot el procediment a seguir s'ha de dur a terme amb el material de protecció adequat. Per fer-ho, cal usar bata, ulleres de seguretat i guants de protecció.

### 4.5.1. PRIMERA FASE

En la primera fase, es compararan diferents tipus de solvent d'extracció (emprant el mateix volum de solvent en cada cas) per veure quin aconseguix una major recuperació d'aflatoxina total ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  i  $G_2$ ). Posteriorment, després de fer la preconcentració amb les columnes IAC, s'emprarà el mateix volum d'eluent (metanol) en cada cas (un suficientment gran per assegurar la completa elució de les aflatoxines extretes).

Per calcular la recuperació, les mostres que s'usaran en aquest pla experimental seran mostres fortificades. Per fer-ho, s'usaran mostres les quals es sap que la seva concentració d'aflatoxina total és 0 (mostres analitzades prèviament pel laboratori extern acreditat) i a les que s'afegirà una concentració coneguda d'aflatoxina total per veure quina quantitat es recupera. Les mostres es fortificaran per a tenir una concentració de 2 µg/kg d'aflatoxina total, que és una concentració que es troba dins de l'interval de linealitat dels patrons que s'utilitzaran i que es troba per sota de la meitat del límit legal. La fórmula que s'emprarà per calcular aquesta recuperació serà la fórmula 1.

$$\text{Recuperació (\%)} = \frac{[\text{mostra fortificada}] - [\text{mostra sense fortificar}]}{[\text{afegida}]} \cdot 100 \quad (1)$$

I com que les mostres sense fortificar tenen una concentració nul·la d'aflatoxina total, la fórmula resultant es pot veure en l'equació 2.

$$\text{Recuperació (\%)} = \frac{[\text{mostra fortificada}]}{[\text{afegida}]} \cdot 100 \quad (2)$$

En primer lloc, per obtenir resultats més precisos i reproduïbles, és imprescindible homogeneïtzar bé la mostra abans d'analitzar-la, i tenir-la a temperatura ambient (20-25 °C). Un cop es tingui la mostra ben homogeneïtzada, s'hauran de pesar 5g d'aquesta i posar-ho en un tub de centrífuga. Per fortificar la mostra, primer s'haurà de preparar una solució patró de 50 µg/L a partir de la solució mare de 5 µg/mL d'aflatoxina total. Un cop s'hagi fet aquesta solució patró de 50 µg/L, s'ha de calcular el volum que cal pipetejar als 5g de mostra per a que aquesta tingui la concentració desitjada de 2 µg/kg d'aflatoxina total:

$$2 \frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \cdot 5\text{g mostra} \cdot \frac{1\text{kg}}{1000\text{g}} \cdot \frac{1\text{L}}{50\mu\text{g}} \cdot \frac{10^6 \mu\text{L}}{1\text{L}} = 200 \mu\text{L} \quad (3)$$

Després de pipetejar els 200 µL de la solució patró dins de la mostra i homogeneïtzar-la, també caldrà addicionar-hi 1 g de NaCl<sup>13</sup>, i 20 mL d'un solvent d'extracció, que serà diferent en cada cas:

- Solvent 1: 20 mL de metanol:H<sub>2</sub>O destil·lada (60:40)
- Solvent 2: 20 mL de metanol:H<sub>2</sub>O destil·lada (70:30)<sup>14-17</sup>
- Solvent 3: 20 mL de metanol:H<sub>2</sub>O destil·lada (80:20)<sup>18-23</sup>
- Solvent 4: 20 mL de metanol:H<sub>2</sub>O destil·lada (90:10)

S'ha optat per solucions de metanol:H<sub>2</sub>O destil·lada de diferents proporcions ja que és el solvent d'extracció més comú per extreure aflatoxines dels aliments.

Cal barrejar bé durant uns 10 minuts cada tub de centrífuga (manualment o amb l'ajuda d'un agitador) i posteriorment s'han de centrifugar 10 minuts a 4000 rpm i filtrar. Seguidament, cal agafar 4 mL del filtrat, abocar-los en un vas de precipitats de 100 mL i diluir-los afegint 25 mL de la solució de PBS 1:100 (per disminuir la concentració de solvent orgànic i assegurar que la mostra estigui en un pH òptim per fer-la passar per la columna IAC). Seguidament, cal preparar el muntatge de la columna IAC (per veure com fer-lo, consultar l'annex 1). Tot el procediment de l'extracció amb la columna IAC s'ha de fer a un flux de 1 gota per segon, de manera que les aflatoxines puguin quedar ben retingudes als anticossos del gel de la columna i posteriorment es puguin eluir correctament.

Primer, s'han de fer passar els 29 mL de l'extracte diluït a través de la columna, i després, s'han de fer passar 20 mL d'H<sub>2</sub>O destil·lada a un flux de 5 mL/min per rentar bé la columna. A l'acabar, s'ha de fer passar aire a través de la columna per assecar-la i eliminar el líquid residual. Un cop la columna estigui seca, cal eluir les toxines

en un tub de vidre. En aquesta primera fase del pla experimental, s'usaran 4 mL de metanol per assegurar la completa elució de les aflatoxines de la columna IAC. La velocitat de l'elució de les aflatoxines també ha de ser d'1 gota per segon. Una elució lenta permet, per una banda, desnaturalitzar els anticossos immobilitzats de la columna IAC, i per l'altra, eluir de forma més eficient les aflatoxines (per polaritat). Un cop s'hagi fet passar tot el metanol, és recomanable fer *back flushing* (revertir el flux de l'eluat) 3 vegades, per intentar que s'elueixi la major quantitat possible d'aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>. Per fer-ho, un cop s'hagi eluït tot el metanol, cal xuclar-lo novament i tornar a eluir-lo a un flux d'1 gota per segon. Seguidament, cal portar a sequedat l'eluat evaporant-lo sota una corrent de nitrogen a 60 °C. Després, s'ha de reconstituir en 1 mL de metanol al 10%, que és la concentració de metanol que contenen els patrons inclosos en el kit.

El factor de dilució de les mostres que s'analitzin seguint aquest procediment es calcula seguint l'equació 4.

$$x \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \cdot \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \cdot 1 \text{ mL} \cdot \frac{20 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{5 \text{ g mostra}} \cdot \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ Kg}} = x \frac{\mu\text{g}}{\text{Kg}} \quad (4)$$

Per tant, el resultat obtingut amb la tècnica ELISA seguint aquest procediment serà la concentració real de la mostra directament (no caldrà multiplicar-lo pel factor de dilució ja que és 1).

#### 4.5.2. SEGONA FASE

En la segona fase, un cop s'hagi seleccionat el millor solvent, s'optimitzarà el volum d'eluent emprat per fer les extraccions de les columnes IAC. El procediment que cal seguir és molt similar al de la primera fase. En aquest cas, s'utilitzarà el solvent d'extracció de la primera fase que doni una major recuperació. Per dur a terme aquesta segona fase del pla experimental, caldrà seguir els mateixos passos que s'han seguit en la primera fase fins just abans d'eluir les aflatoxines de la columna IAC. En aquest cas, un cop hagin quedat les aflatoxines ben retingudes al gel de la columna, s'hauran d'eluir en un tub de vidre, però utilitzant diferents volums de metanol en cada cas:

-Volum 1: 1 mL

-Volum 2: 2 mL

-Volum 3: 3 mL

-Volum 4: 4 mL

La velocitat d'elució de les aflatoxines també ha de ser d'1 gota per segon, i novament caldrà fer *back flushing* (revertir el flux de l'eluat) per assegurar la màxima

elució d'aflatoxines possible. Per finalitzar, igual que en la primera fase, caldrà portar a sequedat l'eluat evaporant-lo sota una corrent de nitrogen a 60 °C, i s'haurà de reconstituir en 1 mL de metanol al 10%.

Seguint aquest procediment s'intentarà trobar el millor mètode d'extracció per les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> utilitzant el mínim nombre possible i necessari de columnes IAC. Les variables que es pretenen optimitzar en aquest disseny experimental es poden veure en les taules 1 i 2 a continuació.

**Taula 1.** Pla experimental per avaluar el millor solvent d'extracció

| <b>PRIMERA FASE: SOLVENT</b> |          |          |          |          |
|------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| <b>EXTRACCIÓ</b>             | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> |
| <b>Metanol : aigua</b>       | 60:40    | 70:30    | 80:20    | 90:10    |

**Taula 2.** Pla experimental per avaluar el volum de metanol necessari

| <b>SEGONA FASE: ELUENT</b> |          |          |          |          |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|
| <b>EXTRACCIÓ</b>           | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> |
| <b>Volum de metanol</b>    | 1 mL     | 2 mL     | 3 mL     | 4 mL     |

És imprescindible dur a terme cada extracció de cadascuna de les fases per triplicat amb l'objectiu d'obtenir resultats tan representatius com sigui possible.

#### **4.5.3. AVALUACIÓ DE L'EFECTE DEL TWEEN 20 EN LA RECUPERACIÓ**

El Tween 20 és un tensioactiu no iònic. Alguns estudis suggereixen que l'ús de Tween 20 pot ser útil per dur a terme l'extracció d'aflatoxines en mostres amb pigments<sup>24</sup>, tot i que en altres estudis s'ha demostrat que l'addició d'un 2% de Tween 20 disminueix la recuperació d'aflatoxina total<sup>21</sup>. El puré de préssec és ric en carotenoides<sup>25</sup> i antocianines<sup>26</sup> (uns pigments que predominen en la polpa d'aquest fruit), així que, en el cas de que la recuperació que s'assoleixi amb les dues primeres fases experimentals no sigui prou satisfactori (idealment hauria de ser d'un 70% com a mínim<sup>12</sup>), es provarà si l'ús de Tween 20 ajuda a millorar la recuperació de l'aflatoxina total durant l'extracció amb les columnes IAC.

D'aquesta manera, es seguirà el procediment d'extracció descrit prèviament utilitzant aquelles variables que hagin donat una major recuperació en les fases 1 i 2, fins al pas en el que es filtra la mostra després d'haver-la centrifugat. El Tween 20 cal addicionar-lo en la dissolució formada per l'alíquota de 4 mL de mostra en

solvent orgànic i 25 mL de la solució PBS 1:100 que es fa passar per la columna IAC. Les mostres addicionades amb Tween 20 cal agitar-les al menys 2 minuts abans de dur a terme l'extracció amb IAC. Posteriorment, cal seguir tot el procediment i fer l'anàlisi de l'analit reconstituït mitjançant ELISA. D'aquesta forma, es compararan les recuperacions a l'afegir aquest reactiu.

-Cas 1: No s'addiciona Tween 20.

-Cas 2: S'addicionen 2 mL de Tween 20.

## **4.6. QUANTIFICACIÓ DE LES AFLATOXINES AMB LA TÈCNICA ELISA**

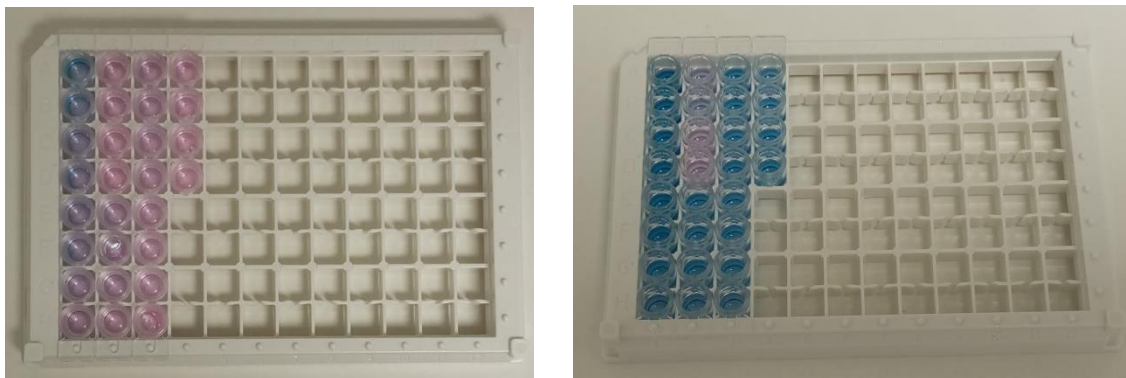
Després de comparar les diferents variables del mètode d'extracció, totes les mostres han estat analitzades amb la tècnica ELISA mitjançant el kit comercial RIDASCREEN Aflatoxin Total (R4701), que inclou tots els reactius i patrons necessaris per fer l'anàlisi. L'interval de treball en el que es treballarà serà 0.05 – 4.05 µg/L d'aflatoxina total, que és el rang de concentracions dels patrons inclosos en el kit. El procediment que s'ha seguit per analitzar totes les mostres i els patrons és l'indicat pel fabricant, per poder garantir la comparabilitat dels resultats.

Es treballa amb una placa en la qual es col·loquen pous d'un sol. Durant aquest procediment, cal evitar que els pous amb els que es treballen s'assequin o que passi molt temps entre els passos a seguir. També és important evitar que aquests pous rebin llum directa durant les etapes d'incubació, pel que caldrà incubar les mostres a la foscor. Dins de la placa, cal posar tants pous com mostres i patrons s'hagin d'analitzar (per duplicat), recordant quin va en cada un. En cada pou, caldrà pipetejar 50 µL de la mostra o del patró d'interès, 50 µL de la solució de l'enzim conjugat (aflatoxina amb enzim) i 50 µL de la solució d'anticossos. Aquests pous estan recoberts amb anticossos de captura que s'uneixen amb els anticossos anti-aflatoxina, així que a l'afegir la mostra, aflatoxines unides a enzims i anticossos anti-aflatoxines, té lloc una reacció competitiva per veure quina aflatoxina s'uneix a l'anticòs anti-aflatoxina i, per tant, queda retinguda en les parets del pou. Cal mesclar suaument agitant la placa manualment i incubar-la durant 30 minuts a temperatura ambient i en un lloc fosc.

Un cop hagi passat aquest temps, cal buidar el contingut d'aquests pous sobre paper absorbent donant la volta a la placa, i assegurar-se de que tot el líquid hagi sortit (aquest líquid conté les aflatoxines que no han quedat unides als anticossos, i per tant, que no han quedat retingudes a les parets dels pous). Després, cal

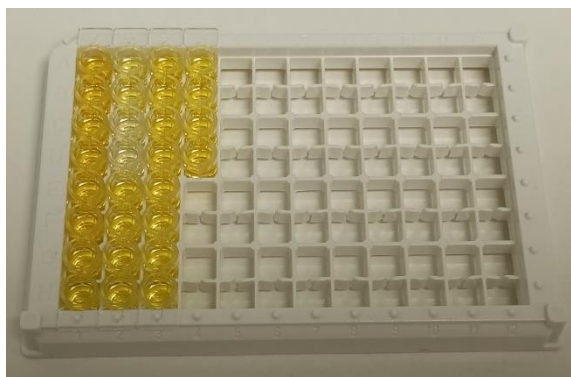
emplenar els pous amb 250  $\mu$ L de la solució PBS-Tween 20 1:100 (inclosa en el kit), buidar novament els pous i repetir aquest últim pas dues vegades més.

Al finalitzar, cal pipetejar 100  $\mu$ L de la solució substrat/cromogen a cada pou per a que el cromogen canviï a color blau en contacte amb els enzims que contenen algunes de les aflatoxines (veure figura 2). Cal mesclar suaument agitant la placa manualment i incubar-la durant 15 minuts a temperatura ambient i en un lloc fosc.



**Figura 2.** Placa a l'afegir la solució de substrat/cromogen, que comença adoptant un color rosa i després canvia a color blavós

Quan el temps hagi acabat, caldrà pipetejar 100  $\mu$ L de la solució de parada per a que el color canviï de blau a groc (veure figura 3).



**Figura 3.** Placa a l'afegir la solució parada

Novament, cal mesclar suaument agitant la placa manualment, i fer la lectura de les absorbàncies de la placa. Les lectures de l'absorbància s'han realitzat en el fotòmetre per a microplaques Multiskan FC a una longitud d'ona de 450 nm. L'absorbància mesurada és inversament proporcional a la concentració d'aflatoxina de la mostra. És important fer aquesta lectura de la placa en menys de 30 minuts des de que s'afegeix l'última solució (la que finalitza la reacció).

La concentració de les aflatoxines s'ha calculat amb el programa *RIDASOFT Win.NET Food & Feed*, on s'ha utilitzat una funció de spline cúbica. Aquest programa permet introduir directament el factor de dilució del procediment per donar el resultat real de la mostra directament. Els resultats de les concentracions proporcionats pel programa no s'han calculat a partir de les absorbàncies

absolutes, sinó a partir de les absorbàncies relatives. Per aquest motiu, també s'ha de fer la lectura d'un "patró" inclòs en el kit de 0 µg/kg d'aflatoxina total, i calcular l'absorbància relativa a partir de la fórmula 5:

$$\frac{B}{B_0} (\%) = \frac{Abs (mostra o patró)}{Abs (0 \frac{\mu g}{kg} \text{ d'aflatoxina total})} \cdot 100 \quad (5)$$

Com ja s'ha mencionat prèviament, seguint el procediment descrit en el treball el factor de dilució és 1. S'ha adaptat el procediment per aconseguir aquest factor de dilució de 1, de manera que es pugui quantificar la concentració d'aflatoxina total en mostres que es trobin en el rang de 0.05 – 4.05 µg/kg d'aflatoxina total, perquè gairebé totes les mostres d'Indulleida contenen una concentració d'aflatoxina total molt menor a 4.05 µg/kg. Tot i això, en el cas de que alguna mostra donés un valor d'aflatoxina total per sobre de 4.05 µg/kg (fora de l'interval de treball), s'hauria de reconstituir la mostra en 2 mL de metanol al 10% (en lloc de 1 mL), de manera que, si conté menys de 8.10 µg/kg d'aflatoxina total, es pugui quantificar aquesta concentració per saber si es troba dins del límit legal.

## 5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 5.1. RESULTATS OBTINGUTS AMB CADA EXTRACCIÓ

De cada una de les extraccions, s'ha calculat la recuperació (emprant la fórmula 2) i la desviació estàndard relativa (RSD) d'aquesta. Per calcular aquesta dispersió dels resultats, s'han utilitzat les fórmules 6 i 7.

$$s_i = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (6)$$

$$RSD_i(\%) = \frac{s_i}{\bar{x}_i} \cdot 100 \quad (7)$$

Per tal de validar el mètode d'extracció, s'ha pres com a referència les directrius establertes pel Codex Alimentarius<sup>12</sup>, elaborades per la FAO (Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació) i l'OMS (Organització Mundial de la Salut), que estableixen criteris de qualitat per a l'anàlisi de micotoxines en aliments (entre les quals es troba l'aflatoxina total). Com que no existeixen directrius clares respecte a l'anàlisi d'aflatoxina total en productes de préssec ni derivats (al no ser productes gaire comuns), es prendrà com a referència la guia per a l'extracció i l'anàlisi d'aflatoxina total en cacauets. Segons aquesta, pel rang de concentracions d'entre 1 i 15 µg/kg d'aflatoxina total, es recomana una recuperació d'entre el 70% i el 110%.

En quant a la RSDr màxima permesa (desviació estàndard relativa de repetibilitat, que és la que ve donada en les taules a continuació com a RSD), aquesta es recomana que sigui menor a 2/3 del  $RSD_{Horwitz}$ , que es pot calcular segons la fórmula 8.

$$\%RSD_{Horwitz} = 2^{1-0.5 \cdot \log c} \quad (8)$$

Aquesta equació de Horwitz és una equació empírica que serveix per predir la variabilitat d'un mètode analític en funció de la concentració que s'analitza. Com que durant el procés d'optimització de la recuperació les mostres han estat fortificades a una concentració de 2 µg/kg, en aquesta fórmula  $c = 2 \cdot 10^{-9}$  (2 µg/kg expressat com una relació de masses sense unitats). El resultat obtingut és el següent:

$$RSD_{Horwitz} = 40.77$$

Si calculem aquesta RSDr màxima permesa, que és  $2/3$  del  $RSD_{\text{Horwitz}}$ , obtenim que el valor de RSDr podrà ser com a màxim del 27.18% per la concentració de 2 µg/kg d'aflatoxina total.

Els resultats obtinguts amb cada extracció es poden trobar a continuació:

### 5.1.1. EFECTE DEL TIPUS DE SOLVENT D'EXTRACCIÓ

En la primera fase, s'ha buscat quin solvent orgànic dona una major recuperació d'aflatoxina total. A la taula 3 es poden veure els resultats obtinguts.

**Taula 3.** Resultats del tipus de solvent orgànic emprat en la recuperació d'aflatoxina total

| EXTRACCIÓ | SOLVENT<br>(metanol:aigua) | AFEGIT<br>(µg/kg) | DETERMINAT<br>(µg/kg) | RECUPERACIÓ<br>% | RSD<br>% | RESULTAT<br>(recuperació ± RSD) |
|-----------|----------------------------|-------------------|-----------------------|------------------|----------|---------------------------------|
| 1         | 60:40                      | 2                 | 0.811                 | 40.56            | 16.34    | 41 ± 16                         |
| 2         | 70:30                      |                   | 1.341                 | 67.04            | 17.25    | 67 ± 17                         |
| 3         | 80:20                      |                   | 1.036                 | 51.80            | 17.04    | 52 ± 17                         |
| 4         | 90:10                      |                   | 0.930                 | 46.52            | 10.83    | 47 ± 11                         |

Com es pot observar en la taula 3, l'extracció que dona una major recuperació mitjana de les aflatoxines és la segona, amb un 67%. En la resta d'experiments, les recuperacions es troben solament entre el 41% i el 52%.

Si es comparen les RSDr (desviacions estàndard relatives), es pot veure que, exceptuant la quarta extracció, que dona una RSDr de 11%, la resta d'experiments dona una RSDr d'aproximadament el 17% (tots són acceptables ja es troben per sota del RSDr límit calculat prèviament). Tot i que la dispersió dels resultats obtinguts amb la quarta extracció és la millor (és la més petita), no queda compensada per la baixa recuperació d'aflatoxina total en aquest experiment ( $R=47\%$ , molt per sota del valor recomanat). En general, la segona extracció és la que millor compromís té entre la màxima recuperació possible i la mínima dispersió dels resultats obtinguts (el guany en recuperació compensa la variabilitat dels resultats).

En quant a l'estàndard afegit en les mostres, aquest conté 2 µg/mL de l'AFB<sub>1</sub> i l'AFG<sub>1</sub>, i 0.5 µg/mL de l'AFB<sub>2</sub> i l'AFG<sub>2</sub> (5 µg/mL d'aflatoxina total). Per aquest motiu, el solvent d'extracció que dona una major recuperació és aquell que més eficientment pot extreure les aflatoxines B<sub>1</sub> i G<sub>1</sub>, al ser les majoritàries. Per tant, la resta de solvents d'extracció (solvents 1, 3 i 4) no necessàriament són pitjors per extreure aflatoxines; simplement són pitjors per extreure les aflatoxines AFB<sub>1</sub> i AFG<sub>1</sub> (que acostumen a ser les majoritàries en mostres reals, sobretot l'AFB<sub>1</sub>).

Com que el solvent d'extracció que dona una major recuperació de l'aflatoxina total és el de metanol:aigua 70:30 (extracció número 2), és el que s'ha escollit com a

òptim. Tot i això, com que la recuperació de l'extracció número 2 dona un valor inferior al recomanat pel Codex Alimentarius ( $70\% \leq R\% \leq 110\%$ ), s'haurà de comprovar si l'addició de Tween 20 és capaç de millorar aquesta recuperació i fer-la entrar dins de l'interval recomanat.

### 5.1.2. EFECTE DEL VOLUM D'ELUENT

En la segona fase, s'ha buscat quin volum d'eluent era necessari per eluir totalment les aflatoxines, pel que s'ha comprovat a partir de quin volum d'eluent la recuperació d'aflatoxina total no augmentava més (emprant el solvent d'extracció òptim). A la taula 4 es poden veure els resultats d'aquesta segona fase.

**Taula 4.** Resultats del volum d'eluent emprat en la recuperació d'aflatoxina total

| EXTRACCIÓ | VOLUM D'ELUENT<br>(metanol, en mL) | AFEGIT<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | DETERMINAT<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | RECUPERACIÓ<br>(%) | RSD<br>(%) | RESULTAT<br>(recuperació $\pm$ RSD) |
|-----------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------|------------|-------------------------------------|
| 1         | 1                                  | 2                              | 0.638                              | 31.89              | 8.92       | 32 $\pm$ 9                          |
| 2         | 2                                  |                                | 1.071                              | 53.57              | 18.83      | 54 $\pm$ 19                         |
| 3         | 3                                  |                                | 1.224                              | 61.18              | 9.83       | 61 $\pm$ 10                         |
| 4         | 4                                  |                                | 1.279                              | 63.95              | 14.50      | 64 $\pm$ 15                         |

Com es pot observar en la taula 4, a mesura que s'ha anat usant un major volum de metanol, més ha augmentat la recuperació d'aflatoxina total. Tot i això, aquest augment de la recuperació ha anat augmentant cada cop més lentament, fins que pràcticament ha assolit un màxim entre els 3 i els 4 mL. Com es pot veure, amb 1 mL s'ha recuperat més del 30% d'aflatoxina total, i amb 3 mL i 4 mL, s'ha arribat a unes recuperacions del 61% i del 64%, respectivament (gairebé s'ha arribat al 67% de recuperació que s'havia assolit durant la fase 1). En quant als RSDr obtinguts, els valors són acceptables ja que es troben per sota del màxim permès calculat prèviament.

Tot i que la diferència entre les recuperacions d'aflatoxina total és menor al 3% quan s'usen 3 o 4 mL de metanol, s'ha escollit com a volum de metanol òptim 4 mL, ja que és possible que en mostres amb una concentració major a 2  $\mu\text{g/kg}$  d'aflatoxina total no s'acabin d'eluir correctament les aflatoxines i s'obtingui un resultat menor al real.

### 5.1.3. INFLUÈNCIA DEL TWEEN 20 EN LA RECUPERACIÓ

Com que la recuperació d'aflatoxina total no ha estat prou satisfactòria en la primera fase ( $R < 70\%$ ), s'ha considerat necessari avaluar si l'ús de Tween 20 és capaç de millorar la recuperació durant el procediment d'extracció amb IAC.

Així, un cop s'ha escollit quin era el solvent d'extracció ideal i el volum d'eluent necessari, s'ha dut a terme un altre experiment on s'ha comprovat si l'addició de Tween 20 abans de la preconcentració amb la columna IAC millorava la recuperació d'aflatoxina total. Els resultats obtinguts s'han recollit en la taula 5.

**Taula 5.** Resultats de l'ús de Tween 20 en la recuperació d'aflatoxina total

| EXTRACCIÓ | TWEEN 20<br>(% en PBS) | AFEGIT<br>(µg/kg) | DETERMINAT<br>(µg/kg) | RECUPERACIÓ<br>(%) | RSD<br>(%) | RESULTAT<br>(recuperació ± RSD) |
|-----------|------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|------------|---------------------------------|
| 1         | 0                      | 2                 | 1.279                 | 63.95              | 14.50      | 64 ± 15                         |
| 2         | 0.05                   |                   | 1.405                 | 70.26              | 12.26      | 70 ± 12                         |

En aquest cas, es pot veure clarament com l'addició de Tween 20 ha millorat notablement la recuperació d'aflatoxina total, ja que aquesta ha passat d'aproximadament el 64% al 70%. A més, a l'afegir Tween 20 la RSDr ha disminuït lleugerament, però en tots dos casos aquests valors de RSDr són acceptables (es troben per sota del límit de 27.18%). Per tant, s'ha considerat adient incloure aquest darrer pas en el protocol optimitzat.

## 5.2. VALIDACIÓ DEL MÈTODE DESENVOLUPAT

Un cop s'han comparat els resultats obtinguts amb cada extracció i s'han escollit les variables del procediment que donen una major recuperació de l'analit, s'ha intentat validar el mètode proposat. Per validar-lo, s'han analitzat la recuperació, l'exactitud (veracitat i precisió), la incertesa i el LOQ (límit de quantificació). D'aquesta forma, es podrà comprovar que el mètode desenvolupat és vàlid per analitzar l'aflatoxina total ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  i  $G_2$ ) en purés de préssec sense additius.

### 5.2.1. RECUPERACIÓ

Basant-nos en les directrius establertes pel Codex Alimentarius, el mètode d'extracció desenvolupat ha pogut aconseguir una recuperació de l'aflatoxina total dins de l'interval recomanat ( $70\% \leq R\% \leq 110\%$ ) i amb una desviació estàndard relativa baixa (molt per sota del valor recomanat de 27.18%).

Per tant, per avaluar els següents requisits analítics, els resultats obtinguts s'hauran de multiplicar per la recuperació del mètode ( $R=70\%$ ) per obtenir les concentracions reals de les mostres que s'analitzin.

### 5.2.2. EXACTITUD<sup>27</sup>

L'exactitud és la proximitat entre un resultat d'assaig i el valor de referència acceptat. Inclou tant la precisió com la veracitat.

#### 5.2.2.1. PRECISIÓ

La precisió és la diferència entre els resultats obtinguts al fer mesures sota condicions estipulades. Per validar-la, s'hauria d'avaluar la repetibilitat (repetir les anàlisi sense variar cap factor) i la precisió intermèdia (variant 1 sol factor, que és el dia) a dos nivells de concentració d'aflatoxina total diferents. En aquest cas, s'ha decidit avaluar-les fortificant les mostres a 1 i 3 µg/kg d'aflatoxina total, ja que són valors que es troben dins de l'interval de treball a prop dels valors més extrems. L'objectiu d'avaluar la precisió a 2 nivells de concentració diferents és veure si el mètode escollit es igual de vàlid per a mostres amb altes o baixes concentracions d'aflatoxina total.

#### REPETIBILITAT

Per avaluar la repetibilitat, s'han fet 5 extraccions de cada una de les dues mostres. Cada extracció feta s'ha analitzat per duplicat. En primer lloc, s'ha fet un test G de Grubbs per veure si algun dels resultats obtinguts era un valor discrepant. Per fer-ho, s'ha calculat  $G_{cal}$  i s'ha comparat amb  $G_{tab}$  per un nivell de significació  $\alpha=0.05$  i  $n-1$  graus de llibertat (g.ll. = 4).  $G_{cal}$  s'ha calculat segons la fórmula 9.

$$G_{cal} = \frac{|x_n - \bar{x}|}{s} \quad (9)$$

Posteriorment, s'ha calculat la mitjana dels resultats, la desviació estàndard i la RSDr (%). La desviació estàndard relativa dels resultats s'ha calculat segons la fórmula 7. Com ja s'ha comentat prèviament, els resultats que apareixen en la taula a continuació ja s'han multiplicat per la recuperació del mètode d'extracció optimitzat ( $R=70\%$ ). Els resultats obtinguts es poden veure en la taula 6.

**Taula 6.** Valors del test G de Grubbs i RSD obtinguts sota condicions de repetibilitat per 2 nivells de concentració d'aflatoxina total diferents

|                 | EXTRACCIÓ | AFEGIT<br>(µg/kg) | DETERMINAT<br>(µg/kg) | G cal | G tab | RSD<br>% |
|-----------------|-----------|-------------------|-----------------------|-------|-------|----------|
| <b>NIVELL 1</b> | 1         | 1                 | 0.88                  | 0.42  | 1.71  | 17       |
|                 | 2         |                   | 0.77                  | 1.13  |       |          |
|                 | 3         |                   | 0.89                  | 0.39  |       |          |
|                 | 4         |                   | 1.18                  | 1.48  |       |          |
|                 | 5         |                   | 1.02                  | 0.46  |       |          |
| <b>NIVELL 2</b> | 1         | 3                 | 2.80                  | 1.02  | 1.71  | 8        |
|                 | 2         |                   | 3.23                  | 0.71  |       |          |
|                 | 3         |                   | 2.77                  | 1.15  |       |          |
|                 | 4         |                   | 3.27                  | 0.87  |       |          |
|                 | 5         |                   | 3.20                  | 0.59  |       |          |

Com es pot veure, cada una de les  $G_{cal} < G_{tab}$ , cosa que indica que no existeix cap valor discrepant.

En aquest cas, com que els RSDr que apareixen en la taula pertanyen a concentracions de 1 i 3 µg/kg, s'ha hagut de calcular novament  $RSD_{Horwitz}$  (fórmula 5) per trobar quin és el RSDr límit que es pot permetre. Per a la concentració de 1 µg/kg, on  $c = 1 \cdot 10^{-9}$ ,  $RSD_{Horwitz} = 45.25$ . Per tant, si calculem RSDr, que és 2/3 del  $RSD_{Horwitz}$ , obtenim que el valor de RSDr màxim que es podrà permetre serà del 30.16% per la concentració de 1 µg/kg d'aflatoxina total. Per a la concentració de 3 µg/kg, on  $c = 3 \cdot 10^{-9}$ ,  $RSD_{Horwitz} = 38.36$ . Per tant, RSDr màxim que es podrà permetre serà de 25.57% per la concentració de 3 µg/kg d'aflatoxina total.

Com es pot veure, en cap cas aquest RSDr límit és superat, i per tant, els resultats obtinguts sota condicions de repetibilitat són correctes.

### PRECISIÓ INTERMÈDIA

Per avaluar la precisió intermèdia, s'ha variat un sol factor, que és el dia. En aquest cas, tot i que s'hauria d'haver avaluat també als nivells d'1 i 3 µg/kg d'aflatoxina total, solament s'ha analitzat a un sol nivell de concentració amb una mostra real, amb l'objectiu de, posteriorment, poder validar la veracitat dels resultats i calcular la incertesa associada als resultats obtinguts.

Aquesta mostra real escollida pertany a un lot que va ser analitzat prèviament per un laboratori extern acreditat amb la norma UNE-EN ISO/IEC 17025: 2005, el qual va analitzar la mostra mitjançant LC-MS/MS (cromatografia líquida unida a espectròmetre de masses en tàndem) seguint un mètode intern (MET-CR-

Micotoxinas-LCMSMS). El resultat proporcionat per aquest laboratori extern és de  $2.9 \pm 0.7 \mu\text{g/kg}$  d'aflatoxina total. La data en que es va fer aquesta anàlisi va ser el 25/09/2024.

Per avaluar la precisió intermèdia, s'han de fer durant 4 dies successius 3 extraccions per dia, i analitzar cada una d'aquestes per duplicat. En aquest cas, avaluar la precisió intermèdia (variant el dia), també permet conèixer la repetibilitat. Per tant, es pretèn avaluar aquests dos factors d'aquesta mostra real. Els resultats obtinguts, aplicant la recuperació del 70%, s'han recollit a la taula 7 a continuació.

**Taula 7.** Concentracions determinades de la mostra real de  $2.9 \mu\text{g/kg}$  d'aflatoxina total sota condicions de precisió intermèdia

|              | EXTRACCIÓ | TEÒRIC<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | DETERMINAT<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | RSD<br>% |
|--------------|-----------|--------------------------------|------------------------------------|----------|
| <b>DIA 1</b> | 1         | 2.9                            | 0.544                              | 16       |
|              | 2         |                                | 0.611                              |          |
|              | 3         |                                | 0.446                              |          |
| <b>DIA 2</b> | 1         | 2.9                            | 0.466                              | 15       |
|              | 2         |                                | 0.526                              |          |
|              | 3         |                                | 0.629                              |          |

Solament s'han fet les extraccions durant 2 dies successius ja que, a priori, es pot veure que aquests resultats difereixen molt dels resultats proporcionats pel laboratori extern. Per confirmar que els dos resultats no són comparables, s'ha fet un test  $t$  amb la mitjana dels resultats obtinguts seguint el mètode desenvolupat. Per fer-ho, s'ha calculat  $t_{cal}$  (fórmula 10) i s'ha comparat amb  $t_{tab}$  per un nivell de significació  $\alpha=0.05$  i  $n-1$  graus de llibertat ( $g.ll. = 5$ ).

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x} - x_{ref}|}{s/\sqrt{n}} \quad (10)$$

$$t_{cal} = 78.12$$

$$t_{tab} (\alpha=0.05, g.ll.=5) = 2.57$$

Com que  $t_{cal} > t_{tab}$ , els dos resultats no són comparables, i per tant, els resultats obtinguts amb el mètode desenvolupat no són correctes.

Si ens fixem, els RSDr tenen un valor petit, com els obtinguts prèviament (es troben per sota de 2/3 del RSD de Horwitz, que per a una concentració de  $2.9 \mu\text{g/kg}$  d'aflatoxina total seria del 25.70%). Això suggereix que els resultats obtinguts amb el mètode desenvolupat realment mostren la concentració real de la mostra analitzada, ja que la dispersió entre aquests resultats obtinguts és molt petita. A més, com que els resultats que va proporcionar el laboratori extern són del dia 25/09/2024, pot ser que durant aquest temps l'estabilitat de les aflatoxines de la

mostra hagi jugat un paper crucial en la concentració real d'aflatoxina total; encara més tractant-se de concentracions molt baixes (a nivells de  $\mu\text{g/kg}$ ).

D'aquesta manera, per avaluar la precisió intermèdia, veracitat i incertesa, s'utilitzarà una mostra fortificada a una concentració de  $2 \mu\text{g/kg}$  d'aflatoxina total. Per fer-ho, es seguirà el mateix esquema de treball que abans, fent durant 4 dies successius 3 extraccions per dia, i analitzant cada una per duplicat. Els resultats obtinguts, aplicant la recuperació del 70%, s'han recollit a la taula 8 a continuació.

**Taula 8.** Concentracions determinades de la mostra fortificada de  $2.0 \mu\text{g/kg}$  d'aflatoxina total sota condicions de precisió intermèdia

|              | EXTRACCIÓ | TEÒRIC<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | DETERMINAT<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | RSD<br>% |
|--------------|-----------|--------------------------------|------------------------------------|----------|
| <b>DIA 1</b> | 1         |                                | 1.870                              |          |
|              | 2         | 2.0                            | 2.342                              | 14       |
|              | 3         |                                | 1.848                              |          |
| <b>DIA 2</b> | 1         |                                | 2.057                              |          |
|              | 2         | 2.0                            | 2.225                              | 12       |
|              | 3         |                                | 1.743                              |          |
| <b>DIA 3</b> | 1         |                                | 1.716                              |          |
|              | 2         | 2.0                            | 2.083                              | 10       |
|              | 3         |                                | 1.851                              |          |
| <b>DIA 4</b> | 1         |                                | 1.756                              |          |
|              | 2         | 2.0                            | 2.319                              | 16       |
|              | 3         |                                | 1.830                              |          |

El primer que s'ha fet ha estat un test G de Grubbs dins de cada dia (amb el resultat obtingut més distant respecte la mitjana de cada dia) per veure si algun dels resultats obtinguts era un valor discrepant, usant la fórmula 9 (per un nivell de significació  $\alpha=0.05$  i 2 graus de llibertat). Els resultats obtinguts s'han recollit a la taula 9.

**Taula 9.** Valors del test G de Grubbs obtinguts sota condicions de precisió intermèdia

| DIA | VALOR DISCREPANT<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | MITJANA<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | G cal | G tab |
|-----|------------------------------------------|---------------------------------|-------|-------|
| 1   | 2.342                                    | 2.020                           | 1.15  |       |
| 2   | 1.743                                    | 2.008                           | 1.08  | 1.15  |
| 3   | 2.083                                    | 1.883                           | 1.08  |       |
| 4   | 2.319                                    | 1.968                           | 1.15  |       |

Com es pot veure, en els dies 1 i 4,  $G_{\text{cal}} = G_{\text{tab}}$ . Tot i que estan al límit i es podrien considerar valors discrepants, s'ha optat per no descartar-los ja que solament s'han fet 3 repeticions dins de cada dia i així els RSD obtinguts seran més realistes (al disposar d'un major nombre d'anàlisis). En els dies 2 i 3, sí que es compleix que  $G_{\text{cal}} < G_{\text{tab}}$ , cosa que ens indica que no existeixen valors discrepants.

Posteriorment, s'han calculat les RSDr i RSDR (desviació estàndard relativa de reproductibilitat). En aquest cas, RSDr correspondrà a un sol valor, que serà representatiu de la variància dels resultats obtinguts dins de cada dia. Per obtenir-les, primer s'han de calcular les variàncies de la repetibilitat (equació 11) i entre sèries (equació 13), respectivament. Després, per obtenir la desviació estàndard, s'ha de calcular l'arrel quadrada de cadascuna d'elles i, finalment, s'ha de calcular la RSD segons l'equació 7, dividint per la mitjana de totes les concentracions obtingudes.

$$s_r^2 = MS_E = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p \cdot (n-1)} \quad (11)$$

$$MS_{serie} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{p-1} \quad (12)$$

$$s_{serie}^2 = \frac{MS_{serie} - MS_E}{n} \quad (13)$$

Els resultats obtinguts s'han proporcionat a continuació:

$$s_r^2 = 0.066$$

$$s_r = \sqrt{s_r^2} = \sqrt{0.066} = 0.258$$

$$RSD_r = 13\%$$

$$s_{serie}^2 = -0.020$$

Prenent com a referència les directrius del Codex Alimentarius, els RSDr i RSDR màxims permesos corresponen a 2/3 del RSD de Horwitz i al RSD de Horwitz (fòrmula 5), respectivament. Per a la concentració de 2 µg/kg, aquests valors són:

$$RSDr \text{ límit} = 2/3 RSD_{Horwitz} = 27.18\%$$

$$RSDR \text{ límit} = RSD_{Horwitz} = 40.77\%$$

Com es pot veure, en quant al RSDr, el límit no és superat. En quant al RSDR, no es pot calcular ja que la variància entre sèries és negativa. Això és degut a que la variància entre sèries prové de la resta de la suma de quadrats entre series menys la variància de repetibilitat, i com que aquesta darrera és major en aquest cas, el resultat és negatiu. Per tant, la variància entre sèries és tan petita que és pràcticament nul·la, així que es pot considerar que RSDR=0.

En cap cas els RSDr i RSDR límit són superats, i per tant, els resultats obtinguts de precisió intermèdia són correctes.

#### 5.2.2.2. VERACITAT<sup>27</sup>

La veracitat és la diferència entre la mitjana aritmètica d'un gran conjunt de mesures i el valor vertader o acceptat com a referència. En aquest cas, el valor de referència és la concentració a la que s'ha fortificat les mostres.

Per validar-la, primer s'ha de fer un test  $G$  de Grubbs per detectar els resultats obtinguts que siguin discrepants. Com s'ha vist prèviament durant l'avaluació de la precisió intermèdia, no s'ha trobat cap punt discrepant. Posteriorment, s'ha de fer un test  $F$  per veure si les variàncies són comparables o no. La fórmula per calcular  $F_{cal}$  és la número 14, on la variància major sempre va al numerador, i la menor, al denominador.

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2} (14)$$

Tot i que l'estàndard utilitzat per fortificar les mostres té un certificat d'anàlisi en el qual apareixen les incerteses de les quatre aflatoxines per separat, no es pot fer el test  $F$  ja que les concentracions de l'estàndard (amb el que s'han fortificat les mostres) i de les mostres analitzades tenen diferents unitats de concentració ( $\mu\text{g/mL}$  i  $\mu\text{g/kg}$ , respectivament), així que les variàncies no són comparables.

Finalment, s'ha fet un test  $t$  per veure si el resultat obtingut amb el nostre mètode és diferent estadísticament de la concentració teòrica de la mostra fortificada per un nivell de significació  $\alpha=0.05$ . En aquest cas, com que les variàncies no són comparables, per calcular  $t_{cal}$  s'ha d'emprar la fórmula 15. Per calcular  $t_{tab}$ , cal calcular els graus de llibertat ( $\nu$ ) segons la fórmula 16, al no ser les variàncies comparables.

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}} (15)$$

$$\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}{\frac{s_1^4}{n_1^2 \cdot (n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2 \cdot (n_2 - 1)}} (16)$$

$$t_{cal} = 0.33$$

$$\nu = 574.65 \approx \text{inf}$$

$$t_{tab} (\alpha=0.05, \text{g.l.l.}=\text{inf}) = 1.96$$

Com que  $t_{cal} < t_{tab}$ , els resultats obtinguts amb el mètode desenvolupat són comparables, i per tant, el resultat obtingut amb el nou mètode és veraç.

### 5.2.3. INCERTESA<sup>28</sup>

La incertesa és una estimació que dona un interval de valors dins del qual es pot afirmar que es troba el valor real.<sup>27</sup> Aquest valor inclou totes les fonts d'error del mètode analític, com errors aleatoris o sistemàtics.

Quan s'analitza una mostra i s'obtenen uns resultats, aquests s'han d'expressar com a *Valor 1 ± Valor 2*. Aquest *Valor 2* normalment s'expressa com a incertesa expandida (U), que s'obté de multiplicar la incertesa estàndard (u) per un factor de cobertura (k), que acostuma a ser 2 (assumint una distribució normal i per un nivell de significació  $\alpha=0.05$ ).

$$U = k \cdot u \quad (17)$$

Tot i això, aquesta incertesa expandida (U) també es pot calcular depenent de la concentració de la mostra analitzada, i s'obté multiplicant aquest factor de cobertura (k) pel *Valor 1* (que és la mitjana dels resultats obtinguts a l'analitzar la mostra) i per la incertesa estàndard relativa ( $u_{rel}$ ).

$$U = k \cdot \text{Valor 1} \cdot u_{rel} \quad (18)$$

Un cop s'hagi calculat aquest valor de la incertesa expandida (U) a través de les dues equacions, s'haurà d'escollir aquell valor que sigui major, ja que serà el que més error acapari.

Per calcular la incertesa expandida a través de la primera equació, primer s'ha de trobar el valor de la incertesa estàndard. Aquesta incertesa estàndard és l'arrel de la suma dels quadrats de totes les fonts d'incertesa que trobem durant el procés de validació. En aquest cas, es troba incertesa deguda a la precisió del mètode ( $u_{precisió}$ ) i deguda a la comprovació del biaix ( $u_{biaix}$ ). La incertesa deguda a la precisió del mètode ( $u_{precisió}$ ) té en compte la variabilitat del procediment analític, ja que estima els errors aleatoris associats al mètode analític i té en compte les fonts de variabilitat considerades durant l'avaluació de l'exactitud. Aquesta incertesa s'estima com la precisió intermèdia del mètode ( $s_I$ , equació 19), que és l'arrel de la suma de les variàncies de la repetibilitat (equació 11) i entre sèries (equació 13) calculades prèviament. En aquest cas, com que la variància entre sèries és negativa, solament es tindrà en compte la variància de la repetibilitat.

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_{serie}^2} \quad (19)$$

$$s_I = u_{precisió} = \sqrt{s_r^2} = \sqrt{0.066} = 0.26$$

La incertesa deguda a la comprovació del biaix ( $u_{biaix}$ ) correspon a la incertesa associada a l'estimació del biaix quan s'avalua l'exactitud, i estima els errors sistemàtics associats al mètode analític. La fórmula que cal usar per calcular-la

varia depenent de si les variàncies emprades en el test  $F$  al calcular el biaix eren estadísticament diferents ( $F_{cal} > F_{tab}$ ) o no ( $F_{cal} < F_{tab}$ ). Com que sí que ho eren, per calcular  $u_{biaix}$  s'ha d'emprar la fórmula 20. Per calcular la incertesa estàndard de referència (del patró), primer s'ha de calcular la incertesa de l'aflatoxina total a partir de les incerteses de cada aflatoxina per separat (fórmula 21). Després, seguint la fórmula 17, es pot calcular  $u_{\bar{x}_{ref}}$ .

$$u_{biaix} = \sqrt{u_{\bar{x}}^2 + u_{\bar{x}_{ref}}^2} = \sqrt{\frac{S_I^2}{n} + \frac{S_{ref}^2}{n_{ref}}} \quad (20)$$

$$U_{ref} = \sqrt{U_{AFB1}^2 + U_{AFB2}^2 + U_{AFG1}^2 + U_{AFG2}^2} \quad (21)$$

$$U_{ref} = \sqrt{0.17^2 + 0.04^2 + 0.17^2 + 0.04^2} = 0.25$$

$$u_{\bar{x}_{ref}} = \frac{U_{ref}}{k} = 0.125$$

$$u_{biaix} = 0.15$$

Finalment, es pot calcular quina és la incertesa estàndard ( $u$ ) a partir de la fórmula 22.

$$u = \sqrt{u_{precisió}^2 + u_{biaix}^2} \quad (22)$$

$$u = 0.30$$

El resultat de la incertesa estàndard obtinguda és de 0.30, i si s'aplica la fórmula 17 (per un factor de cobertura  $k=2$ ), s'obté que la incertesa expandida és 0.60.

Per calcular la incertesa expandida a partir de la concentració de la mostra, s'ha de calcular el RSD de cada una de les incerteses estàndard que s'han calculat prèviament. La fórmula que cal aplicar per calcular cada RSD és la fórmula 23, i per calcular la incertesa estàndard relativa, la fórmula 24.

$$RSD_i = \frac{u_i}{x_{ref}} \quad (23)$$

$$RSD_{precisió} = 0.13$$

$$RSD_{biaix} = 0.07$$

$$u_{rel} = \sqrt{RSD_{precisió}^2 + RSD_{biaix}^2} \quad (24)$$

$$u_{rel} = 0.15$$

El resultat de la incertesa estàndard relativa és de 0.15, i aplicant la fórmula 18 (per un factor de cobertura  $k=2$ ), s'obté que la incertesa expandida és 0.58.

Com que la incertesa obtinguda amb l'equació número 17 és major, aquesta serà la incertesa que s'escollirà. Per tant, el resultat de l'anàlisi és  $2.0 \pm 0.6 \mu\text{g/kg}$  d'aflatoxina total.

#### 5.2.4.LOQ

El límit de quantificació (LOQ) és la quantitat més baixa d'un analit que es pot determinar de forma quantitativa amb certa precisió.<sup>27</sup> En aquest cas, es trobarà el LOQ a partir de 5 repeticions del patró d'aflatoxina total de concentració més baixa, que és el de  $0.05 \mu\text{g/kg}$  d'aflatoxina total. A partir d'aquestes repeticions, s'ha calculat la mitjana de les absorbàncies relatives (%) obtingudes i la corresponent RSD. Els resultats es poden trobar en la taula 10 a continuació:

**Taula 10.** Valors de les absorbàncies relatives, mitjana i RSD per validar el LOQ per una concentració de  $0.05 \mu\text{g/kg}$  d'aflatoxina total

| MESURA         | ABSORBÀNCIA RELATIVA<br>(B/B0) (%) |
|----------------|------------------------------------|
| 1              | 89.8                               |
| 2              | 90.1                               |
| 3              | 86.0                               |
| 4              | 93.8                               |
| 5              | 91.2                               |
| <b>MITJANA</b> | 90.18                              |
| <b>RSD (%)</b> | 3.13                               |

Com es pot veure, la desviació estàndard relativa és molt baixa (3.13%); molt menor al límit de 10% segons la guia d'Eurachem.<sup>29</sup> Per tant, tot i que el LOQ s'ha validat per a una concentració de  $0.05 \mu\text{g/kg}$  d'aflatoxina total, segurament aquest LOQ és encara menor, ja que es troba molt per sota del RSD límit de 10%.

## 6. CONCLUSIONS

S'ha aconseguit desenvolupar i validar un mètode analític per la determinació de l'aflatoxina total en mostres de puré de préssec sense additius. Les variables instrumentals que s'han optimitzat per dur a terme l'extracció de les aflatoxines han estat:

1. El tipus de solvent orgànic que s'ha escollit per diluir la mostra, que finalment ha estat una dilució de metanol:H<sub>2</sub>O destil·lada (70:30).
2. El volum de metanol necessari per eluir completament les toxines de la columna IAC, que finalment ha estat de 4 mL.
3. L'addició de Tween 20 en l'alíquota abans de fer-la passar per la columna IAC, ja que s'ha demostrat que millora de forma significativa la recuperació de les aflatoxines.

El mètode s'ha validat tenint en compte els següents paràmetres:

1. La recuperació del mètode d'extracció s'ha demostrat que és acceptable (R=70%), pel que el mètode proposat permet detectar i quantificar l'aflatoxina total inclús en mostres amb baixa concentració d'aquesta.
2. L'exactitud del mètode proposat és acceptable, ja que tant la precisió (RSD% de la repetibilitat i la precisió intermèdia de 13% i 0%, respectivament), com la veracitat indiquen que el mètode proposat dona resultats que no difereixen estadísticament dels de referència (teòrics).
3. La incertesa dels resultats a partir de les variàncies dels resultats obtinguts i de la validació del mètode desenvolupat, que per a la mostra fortificada de 2.0 µg/kg d'aflatoxina total ha estat de 0.6 µg/kg d'aflatoxina total. És un valor acceptable ja que no engloba el *Valor 1* (2.0).
4. El LOQ del mètode és de al menys 0.05 µg/kg d'aflatoxina total. És un bon límit de detecció, que permet quantificar la concentració d'aflatoxina total en mostres amb una concentració molt baixa i amb un error molt petit (RSD = 3.13% per aquesta concentració).

## 6. CONCLUSIONS

An analytical method has been developed and validated for the determination of total aflatoxin in additive-free peach purée samples. The instrumental variables that have been optimized to carry out the extraction of aflatoxins have been:

1. The type of organic solvent that has been chosen to dilute the sample, which has finally been a dilution of methanol: distilled H<sub>2</sub>O (70:30).
2. The volume of methanol required to completely elute the toxins of the IAC column, which has finally been 4 mL .
3. The addition of Tween 20 in the aliquot before passing it through the IAC column, as it has been shown to significantly improve the recovery of aflatoxins.

The method has been validated taking into account the following parameters:

1. The recovery of the extraction method has been shown to be acceptable (R=70%), so the proposed method allows the detection and quantification total aflatoxin even in samples with low concentration of it.
2. The accuracy of the proposed method is acceptable, as both accuracy (RSD% of repeatability and intermediate precision of 13% and 0%, respectively), and trueness indicate that the proposed method gives results that do not differ statistically from those of reference (theoretical).
3. The uncertainty of the results, based on the variances of the results obtained and the validation of the developed method, which for the fortified sample of 2.0 µg/kg of total aflatoxin has been 0.6 µg/kg of total aflatoxin. It is an acceptable value since it does not include *Value 1* (2.0).
4. The LOQ of the method is at least 0.05 µg/kg of total aflatoxin. It is a good detection limit, which allows quantifying the concentration of total aflatoxin in samples with very low concentrations and with a very small error (RSD=3.13% for this concentration).

## 7. BIBLIOGRAFIA

- (1) Nazhand, A.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Souto, E. B.; Santini, A. Characteristics, Occurrence, Detection and Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds. *Foods* **2020**, 9 (5), 644. <https://doi.org/10.3390/foods9050644>.
- (2) Akbar, M.; Ali, N.; Imran, M.; Hussain, A.; Hassan, S. W.; Haroon, U.; Kamal, A.; Farhana; Chaudhary, H. J.; Munis, M. F. H. Spherical Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles Inhibit the Production of Aflatoxins (B1 and B2) and Regulate Total Soluble Solids and Titratable Acidity of Peach Fruit. *Int J Food Microbiol* **2024**, 410. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110508>.
- (3) Guo, Y.; Zhao, L.; Ma, Q.; Ji, C. Novel Strategies for Degradation of Aflatoxins in Food and Feed: A Review. *Food Research International* **2021**, 140, 109878. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109878>.
- (4) Rustom, I. Y. S. Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence, Legislation and Inactivation by Physical Methods. *Food Chem* **1997**, 59 (1), 57–67. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00096-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00096-9).
- (5) Shabeer, S.; Asad, S.; Jamal, A.; Ali, A. Aflatoxin Contamination, Its Impact and Management Strategies: An Updated Review. *Toxins (Basel)* **2022**, 14 (5), 307. <https://doi.org/10.3390/toxins14050307>.
- (6) Xie, J.; Sun, Y.; Zheng, Y.; Wang, C.; Sun, S.; Li, J.; Ding, S.; Xia, X.; Jiang, H. Preparation and Application of Immunoaffinity Column Coupled with DcELISA Detection for Aflatoxins in Eight Grain Foods. *Food Control* **2017**, 73, 445–451. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.08.035>.
- (7) He, Y. Liquid-Based Microextraction Techniques for Environmental Analysis. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists* **2012**, 835–862. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00116-2>.
- (8) González-Curbelo, M.; Socas-Rodríguez, B.; Herrera-Herrera, A. V.; González-Sálamo, J.; Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. Evolution and Applications of the QuEChERS Method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, 71, 169–185. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.04.012>.
- (9) Lee, N. A.; Wang, S.; Allan, R. D.; Kennedy, I. R. A Rapid Aflatoxin B1 ELISA: Development and Validation with Reduced Matrix Effects for Peanuts, Corn, Pistachio, and Soybeans. *J Agric Food Chem* **2004**, 52 (10), 2746–2755. <https://doi.org/10.1021/jf0354038>.

- (10) Xie, H.; Li, Y.; Li, J.; Chen, Y.; Li, J.; Kuang, L.; Shah Bacha, S. A.; Zhang, T.; Chao, Y. Mycotoxin Determination in Peaches and Peach Products with a Modified QuEChERS Extraction Procedure Coupled with UPLC-MS/MS Analysis. *Foods* **2023**, *12* (17). <https://doi.org/10.3390/foods12173216>.
- (11) Chun, H. S.; Kim, H. J.; Ok, H. E.; Hwang, J. B.; Chung, D. H. Determination of Aflatoxin Levels in Nuts and Their Products Consumed in South Korea. *Food Chem* **2007**, *102* (1), 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.031>.
- (12) WHO. *GENERAL STANDARD FOR CONTAMINANTS AND TOXINS IN FOOD AND FEED*; 1995.
- (13) Herzallah, S. M. Determination of Aflatoxins in Eggs, Milk, Meat and Meat Products Using HPLC Fluorescent and UV Detectors. *Food Chem* **2009**, *114* (3), 1141–1146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.077>.
- (14) Leong, Y.-H.; Ismail, N.; Latif, A. A.; Ahmad, R. Aflatoxin Occurrence in Nuts and Commercial Nutty Products in Malaysia. *Food Control* **2010**, *21* (3), 334–338. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.06.002>.
- (15) Hellany, H.; Assaf, J. C.; Matta, J.; Khalil, M. I. Fungal Isolation, Detection, and Quantification of Aflatoxins in Nuts Sold in the Lebanese Market. *Processes* **2024**, *12* (5), 1018. <https://doi.org/10.3390/pr12051018>.
- (16) YILDIZ, H.; SERT, S.; GÜRSES, M. EFFECTS OF DIFFERENT STORAGE CONDITIONS ON AFLATOXIN FORMATION IN KÖME INOCULATED WITH *ASPERGILLUS PARASITICUS* NRRL 2999. *J Food Saf* **2008**, *28* (1), 103–110. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2007.00098.x>.
- (17) Maroto, A.; Boqué, R.; Riu, J.; Ruisánchez, I.; Òdena, M. Uncertainty in Aflatoxin B1 Analysis Using Information from Proficiency Tests. *Anal Bioanal Chem* **2005**, *382* (7), 1562–1566. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3321-2>.
- (18) Leong, Y. H.; Ismail, N.; Latif, A. A.; Ahmad, R. Aflatoxin Occurrence in Nuts and Commercial Nutty Products in Malaysia. *Food Control* **2010**, *21* (3), 334–338. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.06.002>.
- (19) DONNELLY, C.; GALLAGHER, M.; JORDAN, V.; MORITA, H. Analysis of Asian Herbs for the Presence of Aflatoxins Using AFLACARD TOTAL for Screening and Immunoaffinity Columns for Quantification. *Mycotoxins* **2010**, *60* (2), 71–78. <https://doi.org/10.2520/myco.60.71>.

- (20) Reza, S. S. M.; Masoud, A.; Ali, T.; Faranak, G.; Mahboob, N. Determination of Aflatoxins in Nuts of Tabriz Confectionaries by ELISA and HPLC Methods. *Adv Pharm Bull* **2012**, 2 (1), 123–126. <https://doi.org/10.5681/apb.2012.018>.
- (21) Lee, N. A.; Wang, S.; Allan, R. D.; Kennedy, I. R. A Rapid Aflatoxin B<sub>1</sub> ELISA: Development and Validation with Reduced Matrix Effects for Peanuts, Corn, Pistachio, and Soybeans. *J Agric Food Chem* **2004**, 52 (10), 2746–2755. <https://doi.org/10.1021/jf0354038>.
- (22) Karami-Osboo, R.; Maham, M. Pre-Concentration and Extraction of Aflatoxins from Rice Using Air-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. *Food Anal Methods* **2018**, 11 (10), 2816–2821. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1265-3>.
- (23) Suárez-Bonnet, E.; Carvajal, M.; Méndez-Ramírez, I.; Castillo-Urueta, P.; Cortés-Eslava, J.; Gómez-Arroyo, S.; Melero-Vara, J. M. Aflatoxin (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub>) Contamination in Rice of Mexico and Spain, from Local Sources or Imported. *J Food Sci* **2013**, 78 (11). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12291>.
- (24) Zhu, Z.; Liu, G.; Chen, Y.; Cheng, J. Assessment of Aflatoxins in Pigmented Rice Using a Validated Immunoaffinity Column Method with Fluorescence HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis* **2013**, 31 (2), 252–258. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2013.05.011>.
- (25) Zhao, B.; Sun, M.; Li, J.; Su, Z.; Cai, Z.; Shen, Z.; Ma, R.; Yan, J.; Yu, M. Carotenoid Profiling of Yellow-Flesh Peach Fruit. *Foods* **2022**, 11 (12), 1669. <https://doi.org/10.3390/foods11121669>.
- (26) Rahim, Md. A.; Busatto, N.; Trainotti, L. Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in Peach Fruits. *Planta* **2014**, 240 (5), 913–929. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2078-2>.
- (27) International Organization for Standardization. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions*; ISO 5725-1:2023, Geneva, Switzerland, **2023**.
- (28) ISO. *ISO/IEC Guide 98-3:2008—Uncertainty of Measurement—Part 3: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM:1995)*; International Organization for Standardization: Geneva, **2008**.
- (29) *The Fitness for Purpose of Analytical Methods : A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*; Eurachem, **2014**.

## 8. ANNEXOS

### 8.1. ANNEX 1: MUNTATGE DE LA COLUMNA IAC

Per fer el muntatge de la columna IAC es necessari tenir un suport amb una nou i una pinça. S'ha d'agafar la columna IAC, treure-li el tap blau que porta a la part superior i encaixar-li l'adaptador. A sobre de l'adaptador, s'hi haurà d'encaixar una xeringa de vidre, i un cop es tingui tot preparat, s'haurà d'aguantar la columna de vidre amb la pinça (veure figura 5). A sota, s'hi haurà de posar un vas de precipitats gran, per a que reculli tot el líquid que es vagi filtrant.



**Figura 4.** Columnes IAC



**Figura 5.** Muntatge de les columnes IAC

Per començar a filtrar l'alíquota de la mostra, en primer lloc s'haurà d'emplenar la xeringa de vidre de la part superior amb aquesta i després s'haurà de treure el tap blanc que porta la columna IAC a la part inferior. La columna començarà a gotejar a un flux d'una gota per segon aproximadament, i en el cas de que sigui necessari augmentar aquest flux, a la part superior de la xeringa de vidre s'hi pot encaixar una xeringa de plàstic amb un adaptador de goma a la punta, de manera que l'aire que es comprimeixi ajudi a fer passar el líquid a través de la columna IAC.