



**INVESTIGACIÓN DE TOXINAS NATURALES
EN AGUAS Y ALIMENTOS
MEDIANTE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA
DE MASAS EN TÁNDEM**

EDUARDO BELTRÁN ITURAT

**TESIS DOCTORAL
ABRIL 2014**

**DIRECTORES:
JUAN VICENTE SANCHO LLOPIS
MARÍA IBÁÑEZ MARTÍNEZ**



**UNIVERSITAT
JAUME·I**



Universitat Jaume I

Departament de Química Física i Analítica

Institut Universitari de Plaguicides i Aigües

**INVESTIGACIÓN DE TOXINAS NATURALES EN AGUAS Y
ALIMENTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM**

Tesis Doctoral

EDUARDO BELTRÁN ITURAT

2014

Dr. Juan Vicente Sancho Llopis, Catedrático de Química Analítica, y **Dra. María Ibáñez Martínez**, Investigador Contratado Doctor en Química Analítica, de la Universitat Jaume I de Castelló,

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral “Investigación de toxinas naturales en aguas y alimentos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem” ha sido desarrollada bajo su dirección, en el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas, Departamento de Química Física y Analítica de la Universitat Jaume I de Castelló, por **Eduardo Beltrán Iturat**.

Lo que certificamos para los efectos oportunos en Castelló de la Plana, a 25 de febrero de 2014.

Fdo. Dr. Juan Vicente Sancho Llopis

Fdo. Dra. María Ibáñez Martínez

Este trabajo se ha realizado mediante la concesión de una beca predoctoral para la formación de personal investigador dentro del Plan de Promoción de la Investigación de la Universitat Jaume I (2007), desde el 1 de noviembre de 2008 (PREDOC/2007/37).

Eduardo Beltrán Iturat ha sido beneficiario de una beca de movilidad enmarcada en el Plan de Promoción de la Investigación de la Universitat Jaume I (2011) para la realización de una estancia en el *Center for Analytical Chemistry, Department of Agrobiotechnology, IFA-Tulln* de la *University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU)*, de Viena (Austria), desde el 8 de enero al 4 de mayo de 2012. El trabajo de investigación llevó por título: “*Development of modern analytical methodologies for mycotoxins determination*” bajo la supervisión del Dr. Michael Sulyok.

Los trabajos realizados en la presente memoria han sido en parte financiados por proyectos del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto PETRI) y por la Generalitat Valenciana.

Esta Tesis ha sido realizada, y consecuentemente será defendida, con el propósito de obtener el título de Doctorado Internacional.

Previamente a la defensa de la Tesis Doctoral, este trabajo ha sido evaluado por dos censores extranjeros independientes directamente relacionados con el área de investigación, Dr. Marc H.G. Berntssen (Senior Researcher at the National Institute of Nutrition and Seafood Research-NIFES, Bergen, Noruega), y Dr. Franz Berthiller (Assistant Professor at the University of Natural Resources and Life Sciences-BOKU, Vienna, Austria).

AGRADECIMIENTOS

Voldria aprofitar aquestes línies per a agrair sincerament a tota la gent que d'una manera o d'una altra m'ha ajudat a que aquesta Tesi s'haja convertit finalment en una realitat.

En primer lloc voldria dedicar aquestes paraules als meus directors de Tesi, la Dra. María Ibáñez y el Dr. Juan Vicente Sancho, per la seva ajuda, dedicació i supervisió. Especialment, voldria felicitar a María per la seva primera direcció de Tesi. Així mateix, m'agradaria també donar les gràcies al Dr. Félix Hernández pel seu suport com a Director del Institut Universitari de Plaguicides i Aigües, y al Dr. Roque Serrano per la seva contribució en part dels treballs realitzats en aquesta Tesi.

També voldria mostrar el meu agraïment a tots els altres membres que conformen el IUPA. Em resulta impossible fer una dedicatòria individualitzada però be sabeu que han sigut molts anys de treball conjunt i moltes anècdotes que contar. Molta gent nova que ha arribat, altres que ens han visitat durant una temporada, i altra gent que ja no està treballant amb nosaltres, però tots d'alguna manera (be com a companys de despatx, de treball al laboratori, en docència, projectes, ...) em compartir el nostre treball, així com els bons i els no tant bons moments que la tasca d'investigació ens oferix. Ha estat un plaer haver estat amb vosaltres.

I would like to thank Dr. Michael Sulyok and Prof. Rudolf Krska for allowing me to do my research stay at the Analytical Center of IFA-Tulln (BOKU). I would also like to express my gratitude for the help and nice treatment during my stay to Sasha, Elisabeth, Armin and Benedikt. *Vielen Dank und bis bald.*

I com no, voldria fer una menció especial a la meua família en general i sobretot als meus pares i la meua germana, ja que sempre m'han recolzat en tot el que he fet. També a Paqui he d'agrair-li la seua ajuda en el disseny d'aquesta Tesi.

No vull oblidar citar en aquests agraïments a tots els meus amics i com no, als companys de Químiques. Tots sabeu que hem compartit i continuarem compartint confidències i molt bons moments tots junts.

Ja per finalitzar, i no menys important, voldria donar les gràcies als meus companys de pis. Encara que al llarg d'aquests anys n'han sigut uns quants, vos agraïsc a tots la bona convivència i l'amistat que ha quedat entre nosaltres.

Gràcies a tots i per tot.

Edu

RESUMEN

La presencia de contaminantes de origen natural en productos destinados al consumo humano ha suscitado una gran preocupación en los últimos años debido al mayor conocimiento de sus efectos nocivos para la salud humana. Por este motivo, los organismos responsables de velar por la salud de los ciudadanos, han decretado los niveles máximos permitidos de dichos contaminantes en alimentos y aguas. Se requiere pues metodología analítica que permita la determinación fiable de dichos contaminantes en las matrices correspondientes a los bajos niveles requeridos por la legislación.

En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado el potencial analítico y la aplicabilidad del acoplamiento cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo (QqQ), en el campo del análisis de tóxicos de origen natural en muestras alimenticias y mediambientales. El elevado potencial de esta técnica ha permitido el desarrollo de metodología analítica rápida, sensible, selectiva y fiable para la determinación de dichas toxinas. Además, todos los métodos de análisis desarrollados se han validado siguiendo los criterios de calidad recogidos en las guías europeas, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, con el fin de que los datos obtenidos presenten elevada fiabilidad.

La investigación realizada en esta Tesis Doctoral se estructura en dos bloques, estudiándose en el primero de ellos las toxinas correspondientes al grupo conocido como micotoxinas, mientras que el segundo está dedicado a las ficotoxinas. Esta estructura se ha elegido para agrupar los trabajos según los tóxicos y el tipo de matrices estudiadas.

En el primer bloque se han desarrollado metodologías para el análisis de micotoxinas en alimentos en su mayoría de origen agrícola. En el primer trabajo se ha

estudiado el potencial de la cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) para el desarrollo de un método multianalito que permita la determinación simultánea de las micotoxinas legisladas, con propiedades físico-químicas muy diferentes, de manera rápida, sensible y selectiva. Se evaluó las diferentes opciones que permitieran realizar una correcta cuantificación de las muestras, seleccionando el calibrado en matriz como la opción más favorable. Esta metodología se validó y aplicó al análisis de diferentes muestras pertenecientes a cereales y alimentos infantiles.

En el segundo trabajo se amplió el número de analitos, introduciendo micotoxinas estructuralmente relacionadas. Se estudió el potencial de esta técnica para el análisis de un elevado número de matrices utilizando la aproximación “*dilute and shoot*” con el objetivo de poder determinar simultáneamente todos los compuestos seleccionados en una única inyección. Se consiguió validar la metodología analítica para todos los compuestos legislados a concentraciones inferiores a las establecidas por el reglamento de la Comisión Europea. Esta metodología se aplicó al análisis de muestras pertenecientes a un estudio de dieta total (EDT) de la Comunidad Valenciana mediante el cual se pretendió determinar la ingesta de este tipo de contaminantes en los productos de consumo más habituales en la población de esta región.

El tercer y cuarto trabajo abordan distintos problemas analíticos surgidos en el desarrollo de la metodología multianalito. En el tercer trabajo se puso especial énfasis en aumentar la sensibilidad de la metodología analítica con el fin de determinar concentraciones sub- $\mu\text{g}/\text{kg}$ de determinadas aflatoxinas y ochratoxina A en muestras de alimentos destinadas a bebés y niños de corta edad, según se establece en la regulación establecida por la Comunidad Europea. Se evaluó el uso de la extracción en fase sólida (SPE) como la opción que permite la preconcentración de los analitos y purificación de los extractos, comparando el uso de diferentes materiales. Se observó que los mejores resultados se obtenían mediante el uso de cartuchos de inmunoafinidad, destacando su elevada selectividad para las micotoxinas objeto de interés.

En la última parte de este primer bloque se desarrolló metodología analítica para la determinación de la micotoxina patulina, la cual, debido a sus propiedades físico-químicas, no pudo ser incluida en los métodos multianalito. Debido a su elevada polaridad y bajo peso molecular se requirió una cuidadosa optimización del tratamiento de muestra, así como de las condiciones cromatográficas y espectrométricas. Se comparó el uso de dos fuentes de ionización a presión atmosférica, la ionización electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI). Mediante el uso de la APCI se consiguió minimizar los problemas de supresión iónica debidos a la matriz observados en la fuente ESI. De este modo se consiguió la determinación de este compuesto en productos derivados de manzana, tanto sólidos como líquidos. En el caso de los productos sólidos se realizó una extracción sólido-líquido, mientras que en el caso de las muestras líquidas se llevó a cabo la inyección directa en el sistema cromatográfico tras una etapa de dilución.

El segundo bloque aborda el análisis de ficotoxinas en muestras ambientales y alimenticias. En el primer trabajo de este bloque se desarrolló metodología analítica para la determinación de microcistinas y nodularina, toxinas procedentes de algas cianobacterianas, en aguas superficiales y de consumo. En este caso, al igual que en las micotoxinas, se pretendía desarrollar un método multianalito que permitiera la detección simultánea de la nodularina y las seis microcistinas seleccionadas. Se estableció el objetivo de poder determinar cada una de las toxinas seleccionadas a concentraciones inferiores a 1 µg/L (límite máximo establecido en la legislación Española para la microcistina LR). El procedimiento desarrollado incluyó una etapa de pre-concentración de los analitos en línea con el sistema UHPLC-MS/MS, el cual, con la inyección de 1 mL de muestra y de una manera totalmente automatizada, consiguió alcanzar las concentraciones deseadas.

Para finalizar, en el segundo trabajo de este bloque se desarrolló metodología analítica basada en cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de

másas en tándem (HPLC-MS/MS) para la determinación simultánea de toxinas marinas pertenecientes a diferentes grupos o familias. Este hecho aumentó la dificultad de la tarea ya que se pretendía la determinación de compuestos iónicos simultáneamente con compuestos de mayor apolaridad mediante cromatografía de fase reversa. Para ello se hizo uso de cromatografía de pares iónicos con el objetivo de aumentar la retención de los compuestos iónicos. Esta metodología se aplicó al análisis de muestras de vieiras contaminadas naturalmente en un “*bloom*” de algas tóxicas y sometidas posteriormente a un proceso de depuración, en las que se detectó la presencia de ácido domoico. El estudio de la concentración de ácido domoico en muestras tomadas a diferentes días posteriores a su contaminación permitió establecer la cinética de depuración de este contaminante en este tipo de organismos bivalvos.

SUMMARY

The presence of naturally occurring contaminants in products intended for human consumption has raised further concern in recent years, due to increased awareness of their harmful effects to human health. Food authorities, responsible of ensuring the health of citizens, have established the maximum permitted levels of such contaminants in food and water. Analytical methodologies are required for reliable determination of these pollutants, to ensure that contamination is below the maximum permitted levels required by legislation.

In this Thesis, the analytical potential and the applicability of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with triple quadrupole analyzer (QQQ) for the analysis of naturally occurring toxins in certain environmental and food samples has been studied . The great potential of this technique has allowed the development of rapid, sensitive, selective and reliable analytical methodologies for the determination of these toxins. In addition, all analytical methods have been validated following the quality criteria set out in the European guidelines.

The research conducted in this Thesis has been divided into two sections, the first one concerning a group of toxins known as mycotoxins, while the second has been dedicated to phycotoxins. This structure has been selected in order to organize the jobs according to the type of toxin and matrices studied.

In the first section, methodologies for the analysis of mycotoxins in foods, mainly from agriculture, have been developed. The first study investigated the potential of ultra high resolution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for developing a rapid, sensitive, and selective multi-analyte method for the

simultaneous determination of legislated mycotoxins with a wide range of physicochemical properties. After evaluating different options in order to obtain a correct quantification of the samples, the matrix-matched calibration was selected as the most favorable option. This methodology was validated and applied to the analysis of different cereals and baby foods.

In the second study, the number of analytes was increased, introducing structurally related mycotoxins. The potential of this technique was studied for the analysis of a large number of matrices using the approximation "dilute and shoot" in order to simultaneously determine all the selected compounds in a single injection. The analytical methodology was satisfactorily validated for all legislated compounds at concentrations below those established by the European Commission Regulation. The methodology was applied to the analysis of samples corresponding to a total diet study (TDS) of Valencia in which the highest consumed products by the population were selected.

The aim of the third work, as well as the fourth, was solve the different analytical problems appearing in the development of multi-analyte methods. In the third paper, the emphasis was focused on increasing the sensitivity of the analytical methodology in the determination of aflatoxins and ochratoxin A in food samples intended for infants and young children at concentrations sub- $\mu\text{g}/\text{Kg}$, as stated in the regulations established by the European Community. The use of solid phase extraction (SPE) was tested as the best technique for pre-concentration and purification of the extracts, comparing the use of different materials. It was observed that the best results were obtained using immunoaffinity columns, highlighting its high selectivity for the target mycotoxins.

In the last part of this first section, an analytical methodology for the determination of patulin was developed. Due to its physicochemical properties, patulin could not be included in the multi-analyte methods. Its high polarity and low molecular weight required a careful optimization of sample treatment, as well as chromatographic and spectrometric conditions. Two atmospheric pressure ionization sources were compared

the electrospray ionization (ESI) and the atmospheric pressure chemical ionization (APCI). The problems observed in the ESI source due to matrix effect were minimized by means of using an APCI source. Thus, the determination of this compound in apple products, both solid and liquid matrices, was satisfactorily achieved. In the case of solid products, extraction was carried out by solid-liquid extraction, whereas in the case of liquid samples their determination was done by direct injection into the chromatographic system after a dilution step.

The second section deals with the analysis of phycotoxins in environmental samples and food. In the first paper, an analytical methodology was developed for the determination of microcystins and nodularin, (cyanobacterial toxins from algae) in surface and drinking waters. A multi-analyte method that would allow the simultaneous detection of the six microcystins and nodularin selected was developed. The aim of this work was to determine each of the selected toxins at concentrations below 1 µg/L (the maximum permitted level for microcystin-LR by the Spanish legislation). The developed process included an on-line pre-concentration of the analytes with a fully automated SPE-UHPLC-MS/MS system which, with the injection of 1 mL of sample, was able to reach the desired concentrations.

Finally, in the second paper of this section, an analytical methodology based on high-resolution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was developed for the simultaneous determination of marine toxins of different groups or families. This task was highly difficult as it was intended to simultaneously determine ionic compounds with highly apolar compounds by reverse phase chromatography. Ion pairing reagents were selected in order to increase the retention of ionic compounds in the chromatographic process. This methodology was applied to the analysis of scallops (*Pecten Maximus*) naturally contaminated by a toxic algae bloom and subjected to a purification process, detecting the presence of domoic acid. The study of

domoic acid concentration in samples taken at different days after contamination allowed the depuration kinetics of this contaminant in those bivalves to be established.

ÍNDICE GENERAL

OBJETIVOS, METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO.....	1
OBJECTIVES, METHODOLOGY AND WORKING PLAN.....	11
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	21
1.1. Técnicas cromatográficas para el análisis de toxinas naturales en alimentos y muestras medioambientales	29
1.1.1. Métodos analíticos clásicos para la determinación de micotoxinas.....	29
1.1.2. Métodos analíticos clásicos para la determinación de ficotoxinas.....	30
1.2. Determinación de toxinas naturales mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Conceptos previos.	32
1.2.1. Tratamiento de muestra.....	32
1.2.2. Cromatografía líquida.....	33
1.2.3. Espectrometría de masas.....	37
1.2.4. Acoplamiento LC-MS.....	40
1.2.5. Problemáticas en la determinación mediante LC-MS. Efecto matriz.	42
1.2.6. Validación de metodologías y confirmación.	48
1.3. Referencias	52

CAPÍTULO 2. DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS EN ALIMENTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE ULTRA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASA EN TÁNDEM (UHPLC-MS/MS).....	57
2.1. Introducción	61
2.2. Metodologías de análisis multi-micotoxinas en alimentos mediante UHPLC-MS/MS.....	69
2.2.1. Determinación de metodología multianalito para la determinación de micotoxinas en alimentos mediante UHPLC-MS/MS	
2.2.1.1. Introducción.....	73
2.2.1.2. Artículo científico 1.....	77
Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry	
<i>Rapid Communications in Mass Spectrometry</i> (2009) 23, 1801-1809	
2.2.1.3. Discusión de los resultados obtenidos.....	105
2.2.2. Desarrollo de metodología para la determinación de micotoxinas en alimentos procedentes de un estudio de dieta total	
2.2.2.1. Introducción.....	113
2.2.2.2. Artículo científico 2.....	117
Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study	
<i>Analytica Chimica Acta</i> (2013) 783, 39-48	
2.2.2.3. Discusión de los resultados obtenidos.....	153

2.3. Desarrollo de metodología analítica de elevada sensibilidad para la determinación de aflatoxinas y ochratoxina A en alimentos infantiles y leche.	
2.3.1. Introducción.....	165
2.3.2. Artículo científico 3.....	169
UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk	
<i>Food Chemistry</i> (2011) 126, 737-744	
2.3.3. Discusión de los resultados obtenidos.....	197
2.4. Determinación de la micotoxina patulina en manzanas y productos derivados mediante UHPLC-MS/MS. Estudio del efecto matriz con diferentes interfases de ionización a presión atmosférica (API).	
2.4.1. Introducción.....	205
2.4.2. Artículo científico 4.....	209
Determination of the mycotoxin Patulin in apple and derived products by UHPLC-MS/MS. Study of matrix effect with atmospheric pressure ionization (API) sources	
<i>Food Chemistry</i> (2014) 142, 400-407	
2.4.3. Discusión de los resultados obtenidos.....	235
2.5. Referencias.....	241

CAPÍTULO 3. DETERMINACIÓN DE FICOTOXINAS EN AGUAS Y MOLUSCOS BIVALVOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS)	253
3.1. Introducción.....	257
3.2. Determinación de microcistinas y nodularina en aguas a niveles de concentración sub-ppb mediante SPE-UHPLC-MS/MS línea.	
3.2.1. Introducción.....	263
3.2.2. Artículo científico 5.....	273
Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction-ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry	
<i>Journal of Chromatography A</i> (2012) 1266, 61-68	
3.2.3. Discusión de los resultados obtenidos.....	297
3.3. Determinación de toxinas marinas en moluscos bivalvos mediante cromatografía líquida de fase iónica acoplada a espectrometría de masas en tándem. Estudio de depuración del ácido domoico	
3.3.1. Introducción.....	303
3.3.2. Artículo científico 6.....	309
N-Acetylcysteine boosts xenobiotic detoxification in shellfish	
<i>Aquatic Toxicology</i> (Enviado para su publicación)	
3.3.3. Discusión de los resultados obtenidos.....	347
3.4. Referencias	361
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES.....	373
RELACIÓN DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.....	383

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ALARA	As Low As Reasonably Achievable
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API	Atmospheric Pressure Ionization
APPI	Atmospheric Pressure PhotoIonization
ASP	Amnesic Shellfish Poisoning
AZA	Azaspiracids
CFP	Ciguatera Fish Poisoning
CID	Collision Induced Dissociation
DA	Domoic Acid
DAD	Diode Array Detector
DSP	Diarrheic Shellfish Poisoning
ECD	Electron Capture Detector
EDT	Total Diet Study
EFSA	European Food Safety Authority
EI	Electronic Ionization
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI	Electrospray Ionization
EU	European Union
FAO	Food and Agriculture Organization
FD	Fluorescence Detector
GC	Gas Chromatography
GTX	Gonyautoxin
HAB	Harmful Algae Bloom
HFBA	Heptafluorobutyric Acid
HILIC	Hidrophilyc Interaction Liquid Chromatography

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
IS	Internal Standard
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LC	Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MS	Mass Spectrometry
NAC	N-Acetylcysteine
NSP	Neurotoxic Shellfish Poisoning
OA	Okadaic Acid
PP	Protein Phosphatase
QC	Quality Control
QqQ	Triple Quadrupole
QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe
RSD	Relative Standard Deviation
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	Solid Phase Extraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
STX	Saxitoxin
TBA	Tetrabutylammonium Acetate
TFHA	Tridecafluoroheptanoic acid
TLC	Thin Layer Chromatography
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolet
WHO	World Health Organization
YTX	Yessotoxin



OBJETIVOS, METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

OBJETIVOS

El *objetivo principal* de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo y validación de metodología analítica basada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para el análisis cuantitativo de tóxicos de origen natural en diferentes matrices de interés alimentario y medioambiental.

El trabajo se divide en dos grandes bloques, que se diferencian principalmente por la naturaleza de las toxinas estudiadas. En el **Bloque 1** se aplicará la técnica LC-MS/MS para la determinación de micotoxinas en alimentos. Para ello se han desarrollado tanto técnicas multianalito como técnicas más específicas que han permitido resolver los problemas analíticos surgidos. En el **Bloque 2** se han desarrollado métodos cromatográficos para la determinación de ficotoxinas en muestras de aguas y organismos marinos. Esta metodología se ha aplicado a muestras contaminadas naturalmente con el fin de estudiar el proceso de depuración de estos tóxicos.

Toda la metodología desarrollada se ha validado atendiendo a los criterios establecidos en las guías europeas de control de análisis, con el fin de asegurar la calidad de los resultados obtenidos.

Los trabajos incluidos en cada uno de los bloques se han llevado a cabo atendiendo a unos *objetivos específicos*, que se detallan a continuación.

1. Desarrollo y validación de metodología analítica basada en cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo (QqQ) para la determinación multianalito de micotoxinas, prestando una mayor atención a las micotoxinas legisladas en el reglamento 1881/2006/EC.

2. Aplicación de la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) con el objetivo de mejorar la resolución cromatográfica, reducir el tiempo de análisis, así como aumentar la sensibilidad al obtener picos cromatográficos más estrechos y de mayor altura.
3. Evaluación del efecto matriz en métodos cuantitativos basados en UHPLC-MS/MS para diversas matrices y establecimiento de la corrección que resulte más adecuada y permita una cuantificación precisa y exacta
4. Aplicación de la UHPLC-MS/MS para llevar a cabo análisis rápidos que permitan la determinación simultánea de los compuestos ionizados en modo positivo y negativo en una sola inyección.
5. Estudio de las diferentes posibilidades que ofrece la técnica de extracción en fase sólida (SPE) con el objetivo de pre-concentrar los analitos y conseguir una mejora de la sensibilidad del método así como una mayor selectividad, especialmente en el caso de alimentos infantiles.
6. Comparación de la ionización a presión atmosférica (API) mediante las interfases de ionización electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI) en el caso de compuestos de mayor dificultad analítica, con el fin de obtener las condiciones óptimas para su determinación cuantitativa a los niveles requeridos.
7. Introducción directa de muestras acuosas en el sistema UHPLC-MS/MS mediante el uso de la SPE en modo *on-line*, con el fin de minimizar la manipulación de la muestra así como reducir los volúmenes tanto de muestra como de disolventes.
8. Utilización de cromatografía de pares iónicos en columnas de fase reversa con el objetivo de retener analitos de naturaleza iónica y conseguir la determinación

de compuestos iónicos o de gran polaridad, simultáneamente con compuestos de mayor apolaridad, mediante HPLC-MS/MS.

9. Determinación del contenido de ácido domoico en un estudio de depuración en muestras de moluscos bivalvos contaminados naturalmente y sometidos a un proceso de depuración.
10. Validación de todas las metodologías desarrolladas siguiendo las guías europeas relativas a análisis de residuos y criterios de calidad, con el objetivo de asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos,

METODOLOGÍA

La *metodología* seguida en la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado según el siguiente esquema:

1. Selección de las toxinas naturales objeto de estudio y revisión bibliográfica de las metodologías existentes para su determinación, prestando especial atención a las metodologías basadas en LC-MS/MS.
2. Optimización de las condiciones de MS mediante infusión de patrones de referencia con el fin de establecer el ion precursor de cada compuesto y sus correspondientes iones producto para así poder determinar las transiciones SRM más adecuadas (con fines cuantitativos y confirmativos).
3. Optimización de la separación cromatográfica (HPLC o UHPLC) mediante inyección de patrones. Elección de la fase móvil y del gradiente cromatográfico que proporcionen adecuada retención, resolución y forma de pico. Estudio del uso de aditivos en la fase móvil que puedan mejorar tanto el proceso cromatográfico como la ionización de los analitos en la interfase.
4. Estudio del efecto matriz mediante el análisis de patrones en solvente y en extractos de muestras fortificados al mismo nivel de concentración. Búsqueda de soluciones adecuadas para la corrección del efecto matriz en aquellos casos en los que la supresión o exaltación de la señal puedan comprometer una correcta cuantificación de los analitos.
5. Aplicación de la técnica de extracción en fase sólida (preferiblemente en modo *on-line*) como etapa de purificación y preconcentración en aquellas combinaciones matriz-analito en las que no se alcance la sensibilidad deseada.

6. Validación de la metodología desarrollada estudiando los parámetros indicados en las guías europeas (SANCO): linealidad, especificidad, exactitud y precisión.
7. Aplicación de la metodología LC-MS/MS desarrollada al análisis de muestras reales teniendo en cuenta criterios de control de calidad.

PLAN DE TRABAJO

A continuación se detalla el **plan de trabajo**:

1. Selección de las toxinas naturales a estudiar, basando dicha elección principalmente en la legislación actual en la que se establece las toxinas a determinar, niveles máximos permitidos y matrices en las que deben ser analizadas.
2. Revisión bibliográfica sobre los métodos de análisis existentes para la determinación de los compuestos a estudiar, con especial énfasis en aquellos basados en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
3. Desarrollo de metodología multianalito para la determinación simultánea de micotoxinas que presentan una gran diversidad en sus propiedades físico-químicas mediante UHPLC-MS/MS en diferentes alimentos. Estudio de las condiciones espectrométricas, cromatográficas y de extracción óptimas. Aproximación a las técnicas “dilute and shoot”.
4. Estudio del efecto matriz. Evaluación de las posibles aproximaciones existentes para la corrección de la supresión/exaltación en el proceso de ionización con el fin de obtener una correcta cuantificación.
5. Validación de la metodología UHPLC-MS/MS con el objetivo de asegurar el correcto funcionamiento de la metodología desarrollada a niveles inferiores a los máximos establecidos por la legislación.
6. Aplicación del método multianalito tanto a muestras alimenticias adquiridas en comercios locales como a muestras procedentes del Estudio de Dieta Total (EDT) de la Comunidad Valenciana.

7. Exploración del uso de la técnica SPE para la pre-concentración de los analitos y purificación de los extractos en aquellas combinaciones analito-matriz en las que se requiera una mayor sensibilidad para alcanzar los niveles deseados, especialmente en el caso de alimentos destinados a bebés y niños de corta edad. Comparación de diferentes técnicas de SPE.
8. Estudio comparado de las interfases ESI y APCI para la determinación sensible y selectiva de la micotoxina patulina en manzanas y productos derivados. Validación de la metodología desarrollada.
9. Desarrollo y validación de metodología analítica para la determinación de microcistinas en aguas superficiales y de consumo. Uso de la técnica SPE *on-line* acoplada a UHPLC-MS/MS con el objetivo de pre-concentrar los analitos y aumentar la sensibilidad del método de una manera rápida y automatizada.
10. Optimización de un método HPLC-MS/MS para la determinación simultánea de toxinas marinas con un amplio rango de propiedades físico-químicas en moluscos bivalvos.
11. Determinación del ácido domoico en muestras de vieiras contaminadas naturalmente y sometidas a un proceso de depuración. Establecimiento de las curvas de depuración.
12. Establecimiento de las principales conclusiones derivadas de las investigaciones realizadas en esta tesis.



OBJECTIVES, METHODOLOGY AND WORKING PLAN

OBJECTIVES

The main objective of this thesis is the development and validation of analytical methodology based on liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for quantitative analysis of naturally occurring toxicants in different food and environmental matrices.

The work is divided into two main sections, which differ primarily by the nature of the studied toxins. The first is focused on the development of LC-MS/MS methodologies for the determination of mycotoxins in foods. In this sense, multi-analyte methods as well as more specific methodologies have been applied to solve the appeared analytical problems. In the second, chromatographic methods have been developed for the determination of phycotoxins in water and shellfish samples. These methodologies have been applied to naturally contaminated samples in order to study the process of purification of these toxins.

All developed methodologies have been validated according to the criteria established in the European guidelines for control analysis to ensure the quality of the results.

The papers included in each of the blocks have been carried out according to specific objectives detailed below.

- 1 Development and validation of analytical methodology based on liquid chromatography coupled to ultra resolution tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) with triple quadrupole analyzer (QqQ) for multianalyte determination of mycotoxins, especially for mycotoxins legislated in the regulation 1881/2006/EC

- 2 Application of ultra high resolution liquid chromatography (UHPLC) with the aim of obtaining narrower and higher chromatographic peaks in order to improve chromatographic resolution, reducing analysis time and increasing sensitivity.
- 3 Evaluation of matrix effects in quantitative methods based on UHPLC-MS/MS for various matrices, establishing the most appropriate correction, which allows precise and accurate quantification.
- 4 Using UHPLC-MS/MS to perform rapid analyses that allow the simultaneous determination of ionized compounds in positive and negative mode in a single injection.
- 5 Study different technical possibilities of solid phase extraction (SPE) with the aim of pre- concentrating analytes to achieve an improvement in sensitivity of the method, especially for infant food.
- 6 Comparing atmospheric pressure ionization (API) using the electrospray ionization interface (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI), in the case of compounds with higher analytical difficulty, in order to obtain optimum conditions for a reliable quantitative determination at the lowest required levels.
- 7 Direct introduction of aqueous samples into the UHPLC-MS/MS system using SPE on-line mode, in order to minimize sample handling and reducing the sample volumes as well as solvents.
- 8 Using ion pair chromatography on reversed phase columns with the aim of retaining and determining ionic or high polarity compounds, simultaneously with apolar compounds by HPLC-MS/MS.

- 9 Determination of domoic acid and its depuration kinetics in naturally contaminated shellfish samples subjected to a purification process.
- 10 Validation of all developed methodologies following the European guidelines concerning to residue analysis and quality criteria, with the aim of ensuring reliable results.

METHODOLOGY

The methodology followed in this Thesis has been developed according to the following scheme:

1. Selection of the most relevant natural toxins and review of the existing methodologies in literature, paying special attention to those based on LC-MS/MS.
2. Optimization of MS conditions by infusion of analytical reference standards in order to establish the precursor ion of each compound and its corresponding product ions to select the most appropriate SRM transitions (quantitative and confirmatory purposes).
3. Optimization of the chromatographic separation (HPLC or UHPLC) by injection of reference standards. Selection of the chromatographic mobile phase and gradient which provide adequate retention, resolution and peak shape. Study of the use of additives in the mobile phase to improve the chromatographic and/or spectrometric processes.
4. Study of matrix effects by analyzing analytical standards and sample extracts spiked with analytical standards at the same concentration level. Research of the most suitable solution for the correction of matrix effects in those cases in which the signal suppression or enhancement can compromise the correct quantification of the analytes.
5. Application of the solid phase extraction technique (preferably by on-line mode) as a purification and pre-concentration step for those matrix-analyte combinations in which the desired sensitivity is not reached.

6. Validation of the developed methodology according to the parameters indicated in the European guidelines (SANCO): linearity, specificity, accuracy and precision.
7. Application of the developed LC-MS/MS methodology for the analysis of real samples taking into account the quality control criteria established.

WORKING PLAN

1. Selection of the natural toxins to be investigated, basing the choice primarily on current legislation, which establishes the toxins to determine and the maximum permitted levels and matrices in which they must be analyzed.

2. Bibliographic revision on the existing analytical methods for the determination of the selected compounds, with special emphasis on those based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

3. Development of multi-analyte method for the simultaneous determination of mycotoxins with a wide range of physicochemical properties by UHPLC-MS/MS in different foods. Optimization of the spectrometric, chromatographic and extraction conditions. Study of the “dilute and shoot” approach.

4. Study of matrix effects. Evaluation of different approaches for correcting the signal suppression/enhancement occurring during the ionization process in order to obtain a correct quantification.

5. Validation of the UHPLC-MS/MS methodology to ensure a reliable determination of the selected compounds at the limits set by the legislation.

6. Application of multi-analyte method in food samples purchased in local shops and samples from the Total Diet Study (TDS) of Valencian region.

7. Exploring the use of the SPE technique for pre- concentration and purification of analytes in those extracts analyte - matrix combinations where greater sensitivity is required to achieve the desired levels, especially in the case of foods for infants and young children. Comparison of different SPE techniques.

8. Comparative study of the ESI and APCI interfaces for sensitive and selective determination of patulin in apples and related products. Validation methodology.

9. Development and validation of analytical methodology for the determination of microcystins in surface and drinking water. Use of the on-line SPE technique coupled to UHPLC-MS/MS to pre-concentrate analytes and increase the sensitivity of the method in a rapid and automated way.

10. Optimization of a HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of marine toxins with a wide range of physicochemical properties in bivalve molluscs.

11. Determination of domoic acid in scallop samples naturally contaminated and maintained under purification. Establishment of the depuration kinetics

12. Establishment of the main conclusions derived from the research carried out in this Thesis.



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Técnicas cromatográficas para el análisis de toxinas naturales en alimentos y muestras medioambientales

1.1.1. Métodos analíticos clásicos para la determinación de micotoxinas

1.1.2. Métodos analíticos clásicos para la determinación de ficotoxinas

1.2. Determinación de toxinas naturales mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Conceptos previos.

1.2.1. Tratamiento de muestra

1.2.2. Cromatografía líquida

1.2.3. Espectrometría de masas

1.2.4. Acoplamiento LC-MS

1.2.5. Problemáticas en la determinación mediante LC-MS. Efecto matriz.

1.2.6. Validación de metodologías y confirmación.

1.3. Referencias

1. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos estamos expuestos a la acción de numerosos agentes potencialmente tóxicos, sean éstos físicos, químicos o biológicos, que provocan efectos fisiológicos, bioquímicos, patológicos y, en algunos casos, genéticos. La toxicología es la ciencia que estudia la interacción entre las toxinas ambientales y los sistemas biológicos.

Muchas de las sustancias tóxicas presentes en el medio ambiente tienen origen artificial; es decir, son sintetizadas por el hombre. Sin embargo, existen cientos de compuestos naturales generados por microorganismos, hongos, plantas y animales, que son muy tóxicos para otros seres vivos. Se conocen como tóxicos naturales y pueden definirse como sustancias que son sintetizadas por una planta, animal o microorganismo, que presentan propiedades tóxicas para otros organismos. Van Egmond (Van Egmond, 2004) clasificó las toxinas naturales en cinco grupos principales basándose en el origen de dichos tóxicos. Así, los grupos en los que se dividieron fueron:

- Micotoxinas: toxinas producidas por hongos. En general, son moléculas de bajo peso molecular, con elevada estabilidad frente al calor y que se encuentran presentes en alimentos. Las micotoxinas de mayor relevancia en función de su toxicidad e incidencia son las aflatoxinas, ochratoxinas, tricotecenos, patulina, fumonisinas y zearalenona.
- Toxinas bacterianas: son producidas por bacterias. La mayoría de las toxinas producidas son proteínas con baja estabilidad frente al calor.
- Ficotoxinas: toxinas producidas por algas (dinoflagelados, diatomeas, cianobacterias...). Las toxinas marinas se incluyen dentro de esta clasificación. Estos compuestos tóxicos pueden llegar al ser humano a través de la cadena alimentaria mediante el consumo de pescado y marisco contaminado, o bien mediante el agua.
- Fitotoxinas: son producidas por plantas (conocidas como *Plant Toxins*). El objetivo de estas toxinas es actuar como mecanismo de defensa frente a insectos y hongos. Algunos ejemplos son los glicoalcaloides presentes en patatas o los alcaloides pirrolizidínicos presentes en algunas plantas aromáticas o medicinales.
- Zootoxinas: tóxicos producidos por animales. Algunos ejemplos son los venenos producidos por serpientes o escorpiones.

Las micotoxinas, al igual que las toxinas bacterianas y las ficotoxinas, conforman el grupo de biocontaminantes ya que son tóxicos producidos por microorganismos capaces de contaminar productos alimenticios. Por el contrario, en el caso de las fitotoxinas y las zootoxinas, los tóxicos presentes son compuestos inherentes.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por hongos. El término micotoxinas incluye a todos aquellos metabolitos que a concentraciones bajas pueden producir algún tipo de enfermedad a humanos y seres

vertebrados, conformando un grupo extenso y de elevada heterogeneidad (Bennett & Klich, 2003).

Las ficotoxinas (Phyco=alga) son un grupo diverso de tóxicos producidos por diferentes plantas acuáticas de ambientes marinos o continentales. La producción de estos tóxicos se produce en ciertos géneros de algas ante condiciones ambientales específicas. En el caso de aguas dulces, la presencia de ficotoxinas se produce normalmente ante un brote de algas cianobacterianas (también conocidas como algas azul-verdosas). En ambientes marinos existe una amplia variedad de algas, normalmente dinoflagelados y diatomeas, capaces de producir diferentes tipos de tóxicos entre los que destacan las toxinas diarreicas (DSP), neurotóxicas (NSP) y las amnésicas (ASP), entre otras. La mayor problemática que presentan estas toxinas se produce por el consumo de marisco contaminado, ya que se trata de organismos filtrantes en los que se bioacumulan este tipo de toxinas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) califica al grupo de las micotoxinas y las ficotoxinas como contaminantes de elevada relevancia en alimentos capaces de producir efectos agudos y crónicos en la salud de animales y humanos (World Health Organization, 2002).

Se considera contaminante alimentario cualquier sustancia no añadida intencionadamente al alimento que esté presente como resultado de la producción, procesado, preparación, tratamiento, embalaje y transporte o como resultado de contaminación ambiental (World Health Organization, 1985).

En los últimos años, la preocupación por la seguridad alimentaria ha aumentado tanto desde el punto de vista de los consumidores, así como de los gobernantes y productores, dando como resultado un mayor control de los mercados con el objetivo de asegurar la calidad de los productos así como un consumo seguro en lo que a la salud respecta (Krska et al., 2012, Malik, Blasco & Picó, 2010).

El hombre moderno está expuesto a una gran variedad de microorganismos y productos químicos que pueden llegar a estar en contacto con el ser humano principalmente a través de la comida, el agua, el aire o contacto dérmico. Con el fin de evaluar el riesgo que presentan estos compuestos para la salud humana cuando son ingeridos con la comida se creó en 2002 la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA). A nivel mundial, es la Organización Mundial de la Salud (OMS), (también conocida en inglés como *World Health Organization* (WHO)), la responsable de llevar a cabo una estimación precisa de todos los casos de enfermedades producidas por la presencia de contaminantes en alimentos.

Los científicos y las agencias de salud pública son los responsables de realizar la evaluación de riesgo. Para ello deben identificar el peligro, caracterizarlo, evaluar la exposición a este riesgo y por último caracterizar el riesgo. En la práctica, una vez se ha identificado un tóxico o contaminante, el paso crucial es determinar su contenido en alimentos mediante metodologías analíticas validadas para poder determinar su toxicidad (Dorne, Dorne, Bordajandi, Amzal, Ferrari & Verger, 2009).

La OMS redactó en 2002 el documento “Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor”(World Health Organization, 2002) en el que se establecía la necesidad de nuevos métodos para evaluar y reducir el impacto de enfermedades transmitidas por alimentos. Para ello, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), administrado conjuntamente por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud se ha encargado de evaluar la presencia de contaminantes en alimentos y realizar la evaluación de riesgos. Es importante destacar que en esta evaluación de riesgos, la JECFA puso de manifiesto la necesidad de desarrollar metodologías analíticas validadas que permitieran la vigilancia de estos contaminantes de una manera fiable (Van Egmond, 2004).

1.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA EL ANÁLISIS DE TOXINAS NATURALES EN ALIMENTOS Y MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES.

Las técnicas de análisis que se han llevado a cabo tradicionalmente para la determinación cuantitativa de toxinas naturales tanto en muestras alimenticias como ambientales se han basado en su mayoría en determinaciones cromatográficas acopladas a diferentes detectores.

1.1.1. MÉTODOS ANALÍTICOS CLÁSICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS

Existe una amplia variedad de metodologías analíticas para la determinación de micotoxinas en muestras alimenticias. La utilización de técnicas basadas en inmunoensayos, como es el caso de los tests ELISA, se han empleado para la determinación rápida de micotoxinas. Sin embargo, estas metodologías están expuestas a problemas de reactividad cruzada y presentan problemas de precisión que no aseguran una correcta cuantificación. Es por ello que tradicionalmente la determinación de micotoxinas se ha realizado mediante el uso de técnicas cromatográficas. Así, una gran variedad de técnicas cromatográficas se han utilizado para el estudio de micotoxinas como es el caso de la cromatografía de capa fina (TLC), la cromatografía de gases (GC) con detector de captura de electrones (ECD), y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), provista de detectores ultravioleta (UV) o de fluorescencia (FD) (Krska, Schubert-Ullrich, Molinelli, Sulyok, MacDonald & Crews, 2008, Songsermsakul & Razzazi-Fazeli, 2008).

1.1.2. METODOS ANALÍTICOS CLÁSICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FICOTOXINAS

En el caso de toxinas procedentes de algas, como es el caso de las microcistinas, la HPLC también ha sido la técnica más utilizada principalmente acoplada a detectores UV. Sin embargo, se ha demostrado que la baja especificidad de esta técnica puede ser un obstáculo para la correcta determinación de este tipo de compuestos. En ocasiones, algunos autores han preferido utilizar detectores de barrido de diodos (DAD) con el objetivo de intentar mejorar la especificidad del método (Van Apeldoorn, Van Egmond, Speijers & Bakker, 2007; Pearson, Mihali, Moffitt, Kellmann & Neilan, 2010).

En el campo de las toxinas marinas, debido a la heterogeneidad que presentan los compuestos que conforman este grupo de tóxicos se observa, al igual que en el caso de las micotoxinas, un amplio abanico de metodologías. La GC se ha empleado para la determinación de las toxinas marinas de mayor volatilidad. La TLC también se ha aplicado para el análisis de diferentes biotoxinas. Sin embargo, al igual que en el campo de las micotoxinas, es la cromatografía líquida (HPLC) la que ha presentado mayor protagonismo en el análisis de este grupo de compuestos. La detección por fluorescencia ha sido la técnica más utilizada, aunque hay que resaltar que para la detección ha sido necesaria la derivatización de los analitos. En el caso del ácido domoico, debido a la presencia de un grupo cromóforo en su estructura, también se ha utilizado la detección por UV (Quilliam, 2003).

De este modo, se puede concluir que, aunque en la actualidad existe una gran variedad de metodologías analíticas para la detección y control de diferentes tóxicos naturales como es el caso de micotoxinas y ficotoxinas, el uso de la cromatografía líquida ha sido la preferida. Entre ellas destaca el uso de la cromatografía líquida con detección ultravioleta-visible (UV-Vis) y fluorescencia (FD), que presentan un menor coste que las

técnicas espectrométricas. La principal desventaja que presenta es que su aplicación se limita a la determinación de un tóxina o un grupo de toxinas estructuralmente semejantes.

Sin embargo, se está observando una tendencia a la aparición de nuevas metodologías para el análisis de toxinas naturales mediante el uso de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (MS). El estudio de publicaciones recientes basadas en la determinación de toxinas naturales muestra que existen dos campos de estudio en los que está irrumpiendo la aplicación de esta técnica de análisis. La primera de ellas es el desarrollo de métodos multianalito que permitan la detección de diferentes tóxicos mediante un único análisis. La segunda se basa en la elucidación y caracterización estructural de toxinas y sus productos de degradación mediante el estudio de cultivo de las especies productoras de dichos tóxicos (Malik, Blasco & Picó, 2010).

En la década pasada, la introducción de la cromatografía líquida de ultra resolución (UHPLC) acoplada a espectrómetros de masas de barrido rápido sensibles en el campo del análisis de contaminantes en alimentos ha favorecido un viraje de los métodos cromatográficos tradicionales hacia métodos multianalito rápidos y con mínimo tratamiento de muestra. Estas técnicas de análisis se describirán en mayor detalle en el capítulo correspondiente a cada grupo de tóxicos.

1.2. DETERMINACIÓN DE TOXINAS NATURALES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM. CONCEPTOS PREVIOS.

1.2.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA

El tratamiento de muestras para la determinación simultánea de compuestos que presenten grandes diferencias en su comportamiento físico-químico suele ser el talón de Aquiles del proceso analítico. La optimización del tratamiento de muestra para el análisis simultáneo de una gran variedad de compuestos en un amplio rango de matrices requiere una considerable cantidad de tiempo. Las etapas más comunes en el tratamiento de muestra son: muestreo, preparación de la muestra (molido, homogeneización,...), extracción, eliminación de interferentes (*clean-up*) y preconcentración de los analitos.

La tendencia actual en los métodos en los que se determinan un elevado número de compuestos con diferentes propiedades físico-químicas es la optimización de una extracción genérica que consiga un compromiso con resultados favorables para el máximo número de compuestos. Para ello se utilizan metodologías conocidas como “dilute and shoot”, es decir, tras realizar la extracción con un disolvente o mezcla de disolventes genérico, el extracto no es sometido a ningún tipo de tratamiento posterior (*clean-up*); únicamente se aplica una etapa de dilución previa a su inyección al sistema de análisis. En el caso de la determinación por LC-MS, para la extracción se utilizan disolventes compatibles con el sistema cromatográfico, como son el metanol o el acetonitrilo, o mezclas de estos con agua y/o modificadores con el objetivo de obtener una extracción lo más universal posible (Lacina, Zachariasova, Urbanova, Vaclavikova,

Cajka & Hajslova, 2012, Mol, Plaza-Bolaños, Zomer, De Rijk, Stolker & Mulder, 2008, Sulyok, Krska & Schuhmacher, 2010).

Sin embargo en ocasiones, la falta de sensibilidad y/o selectividad en el método analítico hace necesario la aplicación de alguna etapa de “*clean-up*” y preconcentración de muestra. La extracción en fase sólida (SPE) persigue ambos objetivos. Mediante la carga del extracto o muestra a través de un cartucho en el que se encuentra un relleno constituido por algún tipo de fase estacionaria (fase reversa C₁₈, polimérico,..) se consigue la eliminación de interferentes. Mediante su posterior elución se consigue preconcentrar los analitos, pues es común la necesidad de evaporar el disolvente de extracción y reconstituir el extracto en un mezcla de disolventes compatible con la cromatografía. La extracción en fase sólida se puede realizar de dos modos, en línea (*on-line*) o fuera de línea (*off-line*) (Hennion, 1999). A lo largo de esta tesis se mostrarán ambos modos de aplicación.

La modalidad “on-line” consiste en un proceso automatizado mediante el uso de válvulas de alta presión que permiten la purificación del extracto y preconcentración de los analitos sin necesidad de manipulación de la muestra. Esta modalidad presenta varias ventajas frente a la modalidad “off-line”, pues permite la inyección directa de grandes cantidades de muestra directamente en el sistema minimizando posibles errores y pérdidas derivados de la manipulación de la muestra (Hernández, Pozo, Sancho, López, Marín & Ibáñez, 2005). En el **Capítulo 3.2** se comentarán con más detalle su funcionamiento.

1.2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

La cromatografía líquida se define como una técnica de separación basada en la distinta afinidad que presentan los compuestos presentes en una muestra entre dos fases conocidas como fase móvil y fase estacionaria. En el caso de la cromatografía líquida, la

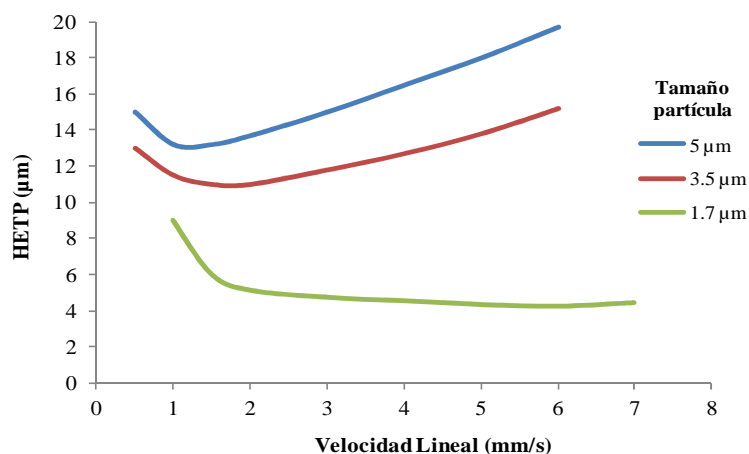
fase móvil está compuesta por un líquido que fluye a través de la fase estacionaria sólida empaquetada en el interior de una columna de acero.

La fase estacionaria o relleno de la columna cromatográfica será el determinante en la separación. En función del tipo de relleno se producirá un tipo u otro de separación. En cromatografía líquida el relleno que se utiliza más habitualmente es una fase estacionaria apolar formada por sílice modificada con grupos C18. Este tipo de separación es conocida como fase reversa. En este tipo de cromatografía la interacción de los analitos con la fase estacionaria es relativamente débil e inespecífica debida a interacciones de tipo Van der Waals. La retención en la columna C18 aumenta con el aumento de la apolaridad de los analitos. La fase móvil estará compuesta por mezclas de agua y modificadores orgánicos (habitualmente metanol o acetonitrilo) a los que se podrán añadir modificadores. La fase móvil podrá fluir a través de la fase estacionaria de modo isocrático o en modo gradiente, es decir variando el contenido de disolvente orgánico a lo largo de la separación cromatográfica con el objetivo de modificar la afinidad de los analitos entre ambas fases a través de la separación. Esta técnica es ideal para la separación de compuestos de un rango amplio de polaridades (Niessen, 2007).

El tipo de columnas (diámetro interno y longitud) así como el tamaño de partícula de la fase estacionaria son decisivos para obtener una separación cromatográfica eficiente. En HPLC con fines cuantitativos se utilizan habitualmente columnas cuya longitud oscila entre los 5 y 15 cm de longitud con diámetros internos de 2.1, 3 o 4.6 mm y tamaños de partícula de 3.5 o 5 μm . Sin embargo, la tendencia actual por desarrollar métodos más rápidos manteniendo una separación eficiente ha potenciado el desarrollo de columnas cromatográficas con tamaños de partícula inferior. El mejor empaquetamiento que muestran estas columnas mejora la separación cromatográfica. La técnica de separación mediante el uso de columnas de tamaño de partícula inferior a 2 μm se conoce como cromatografía de ultra resolución (*ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC).

1.2.2.1. UHPLC

En la última década, se han mejorado los sistemas convencionales de HPLC con el objetivo de conseguir análisis más rápidos manteniendo una adecuada separación cromatográfica o bien mejorar la resolución cromatográfica. Posiblemente, la estrategia más utilizada ha sido la utilización de columnas empaquetadas con materiales porosos de tamaño de partícula inferior a 2 μm . Según la ecuación de Van Deemter, utilizando tamaños de partícula sub-2 μm se consigue reducir la altura de plato teórico mejorando la resolución cromatográfica. De igual modo, la representación de la ecuación de Van Deemter (Fig. 1) evidencia la posibilidad de utilizar velocidades de flujo mayores que permiten una separación más rápida manteniendo la resolución. Como puede observarse en la curva de Van Deemter, el rango óptimo de velocidad de flujo es amplio, a diferencia de la HPLC en la que la velocidad de flujo óptimo está mucho más acotada.



Velocidad Flujo (mL/min)	
D.I.=1.0mm	0.04 0.07 0.10 0.13 0.17 0.20 0.24 0.27
D.I.=2.1mm	0.15 0.30 0.45 0.60 0.75 0.90 1.05 1.20
D.I.=4.6mm	0.70 1.4 2.1 2.8 3.5 4.2 4.9 5.6

Figura 1: Curva de Van Deemter

La selección de columnas cromatográficas con particulado de tamaño inferior a 2 μm presenta mayor eficiencia de separación cromatográfica y la posibilidad de separaciones más rápidas mediante el uso de flujos cromatográficos más elevados sin pérdida de eficiencia cromatográfica. Sin embargo, el uso de flujos elevados aumenta la fricción producida por la fase móvil al atravesar la fase estacionaria, produciendo un aumento de la presión del sistema. Debido a este aumento de presión fue necesario el desarrollo de nueva instrumentación que permitiera trabajar a presiones superiores de las que permitían los instrumentos HPLC convencionales. Esta nueva instrumentación se conoce como cromatografía de ultra resolución (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC). La combinación de columnas de tamaño de partícula inferior con el aumento de la velocidad de flujo ha permitido reducir considerablemente los tiempos de análisis cromatográficos sin la pérdida de eficiencia cromatográfica. Como ejemplo cabe comentar que la velocidad de flujo óptima utilizando columnas de 2.1 mm de diámetro interno y tamaños de partícula 3.5 μm es 0.2 mL/min, mientras que utilizando columnas similares con tamaños de partícula sub-2 μm es habitual el uso de flujos de 0.5 mL/min o superiores (Rodríguez-Aller, Gurny, Veuthey & Guillarme, 2013).

1.2.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es una técnica de análisis que permite la determinación de moléculas cargadas (iones) basándose en su relación masa/carga (m/z). Un espectrómetro de masas se caracteriza por presentar tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masa y el detector. La espectrometría de masas difiere de otro tipo de analizadores espectrales ya que en este tipo de detectores la muestra no emite o absorbe radiación como es el caso de otros detectores como el infrarrojo o ultravioleta.

- ANALIZADORES DE MASAS

El núcleo central del espectrómetro de masas es el analizador de masas, en el cual se separan los iones en función de su relación masa/carga (m/z). Se tratará de iones moleculares, aductos, o iones fragmento con carga positiva o negativa, formados en el proceso de ionización dependiendo de las propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados. La detección se producirá tras seleccionar los iones en función de su relación masa/carga y llevarlos al detector de iones donde serán contados.

ANALIZADOR CUADRUPOLAR (Q)

El analizador cuadrupolar es el analizador más utilizado en espectrometría de masas. Se compone de cuatro barras metálicas dispuestas en paralelo a las que se les aplica una corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF). Con la combinación de ambos potenciales se consigue estabilizar la trayectoria de una determinada relación masa/carga (m/z) en el interior del cuadrupolo. Los iones con relación m/z distinta a la estabilizada por los potenciales presentaran trayectorias inestables y no serán capaces de pasar a lo largo del filtro cuadrupolar.

ESPECTROMETRIA DE MASAS EN TÁNDEM (MS/MS)

El acoplamiento de dos analizadores de masas en línea se conoce como espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Este acoplamiento aporta un mayor potencial a la técnica de detección por espectrometría de masas, especialmente en términos de selectividad. Las técnicas de ionización suave, como es el caso de la ionización a presión atmosférica (API) utilizada en el acoplamiento LC-MS, se caracterizan por presentar escasa o nula fragmentación de las moléculas en el proceso de ionización. Este hecho se traduce en la ausencia de información estructural y por ello en una determinación menos selectiva.

La adquisición en MS/MS permite obtener información estructural de un compuesto mediante el uso de una celda de colisión en la que se produce la fragmentación de los iones mediante la disociación por colisión inducida (*collision-induced dissociation*, CID) con un gas molecular neutro.

El instrumento en configuración tándem MS más versátil y más ampliamente utilizada ha sido el triple cuadrupolo, el cual consiste en tres cuadrupolos en línea, en los que el primer y tercer cuadrupolo se utilizan como analizadores y el segundo “cuadrupolo” funciona como celda de colisión. Existen diferentes modos de trabajo en un triple cuadrupolo, aunque el más interesante en análisis cuantitativo por la elevada selectividad y la mejora en la relación S/N es el modo SRM (*Selected Reaction Monitoring*) (Wilfried M.A. Niessen, 2007). En la Tabla 1 se detallan los diferentes modos de trabajo más habituales del espectrómetro de masas triple cuadrupolo:

Tabla 1. Modos de análisis en instrumentos de triple cuadrupolo.

MODO	MS1	MS2	APLICACIÓN
Barrido de iones (<i>Full Scan</i>)	Barrido iones	-	Conocer la ionización que se produce en la molécula
Adquisición de un ión seleccionado (<i>Single Ion Monitoring, SIM</i>)	Selección ion	-	Adquirir un ion específico de la molécula
Barrido de iones producto (<i>Product Ion Scan</i>)	Selección ion	Barrido iones	Obtener información estructural de la molécula tras fragmentación en la celda de colisión del ion producido en la fuente
Adquisición de Reacción Seleccionada (<i>Selected Reaction Monitoring, SRM</i>)	Selección ion	Selección ion	Adquirir una reacción de disociación inducida por colisión específica
Barrido de iones precursores (<i>Product Ion Scan</i>)	Barrido iones	Selección ion	Obtener información de los compuestos que presentan fragmentos idénticos
Barrido de pérdidas neutras (<i>Neutral Loss Scan</i>)	Barrido iones	Barrido iones	Obtener información de compuestos que presentan pérdidas por fragmentación idénticas.

1.2.4. ACOPLAMIENTO LC-MS

Los analizadores de masas no suelen utilizarse como instrumentos de análisis de modo individual, ya que normalmente van ligados a un cromatógrafo. El cromatógrafo se encarga de separar los componentes que conforman las muestras antes de su introducción en el espectrómetro de masas. Para la separación de moléculas volátiles la cromatografía de gases ha sido la técnica más utilizada (GC-MS) mientras que en el caso de moléculas termolábiles o no volátiles se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS).

Con el objetivo de separar las moléculas en función de su relación m/z es necesario que estas sean ionizadas. Tradicionalmente, la fuente de ionización más utilizada ha sido la ionización electrónica (EI), la cual está asociada a la técnica GC-MS. Sin embargo, la necesidad de desarrollar la técnica HPLC-MS para poder determinar moléculas no volátiles requirió del desarrollo de nuevas fuentes de ionización que permitieran la introducción en el analizador de los compuestos presentes en el eluato cromatográfico. Por tanto, se requería una interfase que permitiera eliminar el disolvente e ionizar los compuestos de interés para posteriormente ser introducidos en el analizador. En la mayoría de las interfases de acoplamiento diseñadas para este fin, se consigue volatilizar y eliminar los disolventes del eluato mediante la combinación de calentadores y gases nebulizadores.

- INTERFASES DE IONIZACIÓN A PRESIÓN ATMOSFÉRICA (API)

En la actualidad las interfases más utilizadas en los sistemas LC-MS son las que trabajan a presión atmosférica (API) pues presentan una eficiencia de ionización mucho más elevada comparado con otras técnicas de ionización a alto vacío. Se caracterizan por presentar una ionización “blanda”, es decir, la energía utilizada en la ionización favorece la formación de la molécula protonada y muy poca o nula fragmentación. Son

compatibles con los flujos habituales de la HPLC, evitando etapas de división de flujo que repercutirían en la sensibilidad total del proceso. Entre ellas destacan las interfases de ionización química a presión atmosférica (APCI) y la ionización electrospray (ESI). Ambas interfases se caracterizan por presentar elevada robustez (Esteban, 1993).

INTERFASE ELECTROSPRAY (ESI)

La interfase de ionización electrospray consiste en un tubo capilar metálico en el cual se aplican diferencia de potencial de unos 3 KV entre la entrada de la muestra (eluato proveniente de la separación por HPLC) y el contraelectrodo. Por el efecto del intenso gradiente de potencial, la muestra emerge del capilar en forma de un aerosol de pequeñas gotas, que adquieren una carga eléctrica muy elevada. Estas gotas, a medida que avanzan en la cámara de desolvatación van reduciendo su tamaño hasta el momento en que su tamaño es tan pequeño que debido a las fuerzas coulombianas de repulsión entre los iones generados en su interior son capaces de vencer la tensión superficial y pasar a fase gaseosa.

Habitualmente, para los flujos utilizados en HPLC, es necesario asistir el proceso de nebulización mediante el uso de un nebulizador neumático y temperatura. Para ello, el capilar cargado se rodea en su parte exterior por otro tubo que contiene una corriente gas inerte caliente que favorece la evaporación del disolvente en la cámara de desolvatación. La interfase electrospray se caracteriza por presentar una respuesta dependiente de la concentración (Pramanik, Ganguly & Gross, 2002).

INTERFASE DE IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA (APCI)

La ionización química a presión atmosférica es una técnica que presenta una ionización eficiente para compuestos relativamente más apolares que los ionizados con la interfase electrospray. Al igual que la ionización por electrospray, se trata de una técnica

de ionización suave ya que raramente se produce la fragmentación de los compuestos estudiados.

Esta interfase consiste en una sonda de entrada de muestra provista de un nebulizador neumático colocado en una cámara de nebulización calentada, en la que se encuentra un electrodo en forma de aguja. El modo de operar de esta interfase consiste en introducir el eluato proveniente de la HPLC a la cámara de nebulización calentada gracias a la acción de un gas inerte para conseguir la desolvatación. La descarga de la aguja corona es la encargada de producir un plasma de iones reactivos del disolvente, que mediante un proceso de transferencia de carga produce la ionización de la muestra (ionización química), normalmente por adición o cesión de un protón. Debido a que la ionización se produce mediante el vapor del disolvente ionizado, se dice que la ionización es dependiente de la masa de flujo de disolvente (Esteban, 1993).

1.2.5. PROBLEMÁTICAS EN LA DETERMINACIÓN MEDIANTE LC-MS. EFECTO MATRIZ

A pesar de todas las ventajas que presentan las metodologías basadas en la detección por espectrometría de masas, esta técnica presenta también algunos inconvenientes o problemas en su aplicación que deben ser tenidos en cuenta para asegurar la robustez y fiabilidad de dicha metodología. Posiblemente, el principal problema que se encuentra en las metodologías LC-MS es el efecto matriz, el cual es un factor importante que puede afectar a la sensibilidad, precisión y exactitud del método analítico.

El efecto matriz es la alteración de la eficiencia de ionización en la fuente debido a la presencia de sustancia coeluidas. La elevada selectividad de los analizadores cuadrupolares en tándem, debido a los filtrados de masas realizados, lleva en muchas ocasiones a la idea errónea de que no existen interferentes. El mecanismo de supresión/exaltación iónica no se conoce con exactitud, pero se piensa que se debe

probablemente a un proceso de competición entre los analitos y los componentes de la matriz coeluidos (Tang & Kebarle, 1993). Algunos autores han demostrado que el efecto matriz se debe a la competencia entre los compuestos no volátiles y los analitos por acceder a la superficie de las pequeñas gotas donde se produce el paso a fase gas, por lo que cuanto mayores sean las fuerzas atractivas por mantener las gotas, menor será la eficiencia de ionización (King, Bonfiglio, Fernandez-Metzler, Miller-Stein & Olah, 2000). Otro mecanismo propuesto en el caso de la fuente electrospray es la competición entre los analitos y los compuestos interferentes para ser ionizados, fijando la concentración máxima de compuestos orgánicos para una ionización eficiente en 10^{-5}M (Kebarle & Tang, 1993, Kebarle & Verkcerk, 2009).

La importancia del efecto matriz radica en la reproducibilidad del método analítico tanto en términos de exactitud como precisión. Un elevado efecto de supresión iónica se traduce en una disminución de la sensibilidad del método. Del mismo modo, el efecto matriz puede dar lugar a errores en la cuantificación si los patrones analíticos utilizados para la cuantificación no están expuestos al mismo tipo de efecto matriz que las muestras. Por estos motivos, es necesario evaluar cómo afecta la presencia de la matriz en los compuestos que se pretenden determinar. Para ello existen dos maneras de estudiar el efecto matriz, bien por la adición de los compuestos en un extracto blanco, o mediante la infusión post-columna. La adición post-extracción consiste en añadir los compuestos de interés en un extracto de una muestra blanco y comparar la señal obtenida con la de un patrón en solvente. La relación entre estas dos señales nos marcará la intensidad del efecto matriz. La infusión post-columna consiste en añadir un flujo continuo del patrón analítico en el analizador mediante infusión. Simultáneamente, mediante el uso de una unión en T se mezcla con el eluato procedente de la columna cromatográfica en la que se ha inyectado un extracto blanco de la matriz a estudiar. Esta metodología permite conocer como se ve afectada la señal del compuesto de interés por la presencia de los diferentes interferentes de matriz a medida que van eluyendo de la columna cromatográfica (Taylor, 2005).

Una vez se conocen los efectos matriz y con el objetivo de obtener una metodología analítica robusta, es necesario corregir el efecto matriz, bien sea mediante su eliminación o compensación. Existen diferentes aproximaciones para conseguir este objetivo: (Antignac, de Wasch, Monteau, De Brabander, Andre & Le Bizec, 2005):

- Modificar las condiciones espectrométricas (modificar interfases de ionización)
- Actuar en el proceso de cuantificación
- Mejorar la separación cromatográfica
- Reducir la cantidad de matriz

➤ MODIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES ESPECTROMÉTRICAS

Esta aproximación consiste en aplicar algún cambio en el sistema de ionización que permita evitar el efecto matriz no deseado. Una primera aproximación puede ser la utilización de un fuente de ionización diferente. Aunque la fuente de ionización ESI es la más utilizada, existen otras fuentes de ionización a presión atmosférica como son la ya comentada APCI o la fotoionización a presión atmosférica (*atmospheric pressure photoionization*, APPI). Aunque desde sus inicios la fuente ESI ha sido la más estudiada por lo que respecta a su susceptibilidad a sufrir efecto matriz, se ha demostrado que las otras fuentes tampoco están exentas de sufrirlos. A pesar de ello, la selección de una fuente de ionización diferente puede resultar útil para evitar el efecto matriz, ya que el proceso de ionización es diferente de una fuente a otra. Así, la ionización en la fuente electrospray se produce en fase líquida, mientras que en la fuente APCI este proceso ocurre en fase gas. Por lo que respecta a la fuente APPI, el proceso de ionización es completamente diferente, produciéndose la ionización debido a un haz de fotones. En el **artículo científico 4** se muestra un ejemplo de esta aproximación. Adicionalmente, el efecto matriz puede variar entre fuentes de ionización similares debido a diferencias en su diseño, observándose diferencias en la ionización entre distintos instrumentos.

El cambio de polaridad es otra posible solución para evitar el efecto matriz. Se ha observado que la ionización en modo negativo se ve menos afectada por la presencia de interferentes de matriz. Los analitos, en función de sus propiedades ácidas o básicas presentan afinidad por ionizar, respectivamente, en modo negativo o positivo. Sin embargo, existen compuestos que presentan grupos en su estructura que permiten la ionización en ambos modos. Por tanto, el cambio de polaridad podría ser otra solución para intentar resolver el efecto matriz.

➤ ACTUAR EN EL PROCESO DE CUANTIFICACIÓN

El uso de la respuesta relativa es otra aproximación para corregir el efecto matriz. Consiste en la utilización de un patrón interno (*internal standard*, IS) el cual debe presentar un comportamiento similar al de los compuestos estudiados, es decir, se vea afectado semejantemente por el efecto matriz. Su aplicación se puede realizar directamente sobre la muestra previo al tratamiento de la misma con el objetivo de corregir posibles pérdidas en el proceso de extracción y el posible efecto matriz (*surrogate IS*), o únicamente adicionarse previo análisis en el extracto con el fin de corregir el efecto matriz (*internal standard*, IS). Como ya se ha comentado, su comportamiento debe ser lo más semejante posible al compuesto de interés, por lo que se tiende a seleccionar compuestos estructuralmente semejantes de los que se debe tener la certeza que su presencia en la muestra es altamente improbable o prácticamente imposible. La dificultad de encontrar un patrón interno que cumpla todos estos requisitos dificulta esta aproximación. Sin embargo, existe la posibilidad de utilizar patrones marcados isotópicamente, es decir, los compuestos estudiados a los que se les han sustituido algunos átomos por sus correspondientes isótopos. Un requisito que deben cumplir los compuestos marcados isotópicamente es que el compuesto contenga suficientes átomos sustituidos por sus correspondientes isótopos para evitar el solapamiento entre la distribución isotópica del compuesto marcado con el natural. Además, es preferible la sustitución de átomos de carbono o nitrógeno por ^{13}C o ^{15}N que

la sustitución de átomos de hidrogeno por deuterio, ya que éstos están más expuestos a sufrir efecto isotópico, traduciéndose en un diferente comportamiento cromatográfico (Rychlik & Asam, 2008). Estos compuestos, al ser estructuralmente iguales, deben comportarse idénticamente tanto cromatográficamente como espectrométricamente, presentando únicamente la diferencia en masa. La respuesta relativa obtenida entre la señal del compuesto natural y el compuesto marcado isotópicamente se utilizará para cuantificar la concentración del compuesto natural corrigiendo las variaciones debidas a la matriz. Aunque el uso de patrones marcados isotópicamente es la mejor solución, la limitada disponibilidad comercial o el elevado precio suele ser el principal hándicap para su aplicación (Hernández, Sancho & Pozo, 2005).

El uso de calibrado en matriz es otra posible herramienta para corregir los posibles errores en la cuantificación debido al efecto matriz. Esta alternativa consiste en preparar las curvas de calibrado para la posterior cuantificación en extracto blanco de la matriz, consiguiendo de este modo igualar el efecto matriz presente en las muestras y en los patrones de cuantificación. El principal requisito para la aplicación de esta alternativa es disponer de muestras blanco. Además es necesario asumir que la muestra que se utiliza para realizar el calibrado es representativa y que por tanto, los analitos en el patrón estarán expuestos a los mismos efectos matriz que en las muestras. En los **artículos científicos 1 y 2** se muestra la utilización del calibrado en matriz para realizar una correcta cuantificación de las muestras.

➤ MEJORA DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Otra alternativa para minimizar el efecto matriz consiste en mejorar el proceso cromatográfico con el objetivo de evitar la coelución de los interferentes que afectan a los compuestos de interés. Existen diferentes modos para intentar mejorar la separación cromatográfica. Uno de ellos consiste en la utilización de columnas con fases estacionarias diferentes que permitan una selectividad distinta. Por otro lado, la utilización de cromatografía líquida de mayor resolución podría permitir la separación de

algunos interferentes de matriz de los compuestos monitorizados. Este es el caso de los sistemas UHPLC que mediante el uso de columnas con rellenos cromatográficos de tamaño de partícula inferior al utilizado en HPLC permiten mejorar el proceso cromatográfico. Por último la utilización de columnas cromatográficas acopladas (LC-LC) podría ser útil para la eliminación del efecto matriz en muestras complejas (Dijkman et al., 2001, Sancho, Pozo, López & Hernández, 2002).

➤ REDUCCIÓN DE LA CANTIDAD DE MATRIZ

Todas las estrategias que se han comentado anteriormente tienen como objetivo compensar o minimizar el efecto que puede producir la presencia de interferentes de matriz en el proceso de análisis. Sin embargo, esta última estrategia se basa en evitar el efecto matriz mediante la reducción de interferentes de matriz inyectados en el sistema cromatográfico.

La opción más utilizada para la reducción de interferentes de matriz es la utilización de técnicas de purificación, siendo la extracción en fase sólida la técnica de “*clean-up*” por excelencia. Esto es debido a la gran variedad de fases estacionarias disponibles para obtener una purificación adecuada. Aunque la SPE presenta grandes ventajas, también hay que tener presente que esta técnica requiere un aumento del volumen de muestra a tratar, así como un aumento del tiempo de análisis. Además, la aplicación de técnicas de purificación en métodos multianálisis que contengan compuestos con propiedades físico-químicas muy amplias presenta ciertas limitaciones (ver **Artículo científico 3**).

Otro modo de reducir la cantidad de matriz en el proceso de ionización consiste en diluir los extractos antes de ser inyectados. Existen diferentes publicaciones en las que se demuestra que una dilución permite evitar el indeseable efecto matriz (Kruve, Leito & Herodes, 2009, Hernández, Sancho, Pozo, Villaplana, Ibáñez & Grimalt, 2003, Sancho, Ibáñez, Grimalt, Pozo & Hernández, 2005). Comúnmente esta técnica se conoce como

“*dilute and shoot*” y permite una reducción de la cantidad de matriz sin producirse pérdidas de compuestos y/o bajas recuperaciones. En el caso de utilizar las diluciones como herramienta para reducir el efecto matriz es necesario estudiar que factor de dilución es necesario (Stahnke, Kittlaus, Kempe & Alder, 2012). La principal desventaja que presenta esta estrategia es que la dilución reduce la sensibilidad del método. Otra propuesta consiste en reducir el volumen de extracto inyectado en el sistema cromatográfico, reduciendo de este modo la cantidad de matriz presente. Al igual que en la dilución, esta estrategia únicamente se podrá aplicar cuando el método presente suficiente sensibilidad para alcanzar los niveles de concentración deseados.

1.2.6. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS Y CONFIRMACIÓN

La validación de un método analítico supone demostrar que dicho método analítico posee las características de funcionamiento adecuadas que permiten su aplicación al objetivo para el cual ha sido desarrollado. Para ello es necesario llevar a examen dicha metodología analítica y aportar evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para la utilización prevista. Habitualmente, en el proceso de validación se determinan los siguientes parámetros: especificidad, exactitud, precisión, linealidad y límites de detección y cuantificación.

Aunque existen directivas específicas como la Directiva de la Unión Europea 401/2006 en la que se establecen los criterios de exactitud y precisión requeridos para la determinación de diferentes micotoxinas seleccionadas (Reglamento 401/2006/CE), es común la utilización de un procedimiento normalizado que describa las pautas a seguir en la validación de cualquier método analítico. En la actualidad, el documento europeo SANCO/12495/2011, en el que se establecen los procedimientos de validación y control de calidad para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos es posiblemente el procedimiento más utilizado para la validación de métodos analíticos para los análisis en los que no se dispone de normativa específica para su validación. El

cumplimiento de los criterios de aceptación establecidos para los parámetros fijados en el documento de validación permitirá que un método analítico se considere satisfactoriamente validado.

Otro punto importante que también es tratado en el documento SANCO es el referente a la confirmación de la identidad de los resultados positivos. La técnica LC-MS/MS es una herramienta analítica de elevado potencial en la confirmación de la identidad debido a la posibilidad de adquisición de distintas transiciones SRM para un determinado analito las cuales pueden utilizarse como confirmación adicional a la transición de cuantificación. El documento SANCO/12495/2011 establece al igual que el reglamento CE/657/2002 los criterios para la confirmación de la identidad de un resultado positivo (European Commission, 2011). Utilizando la técnica LC-MS/MS se ha establecido el requerimiento de adquirir al menos una transición SRM adicional a la utilizada con fines cuantitativos, la cual debe presentar un pico cromatográfico al mismo tiempo de retención ($\pm 2.5\%$) y cumplir con la relación de intensidades entre las transiciones SRM dentro del rango de tolerancia establecido en dichos documentos (ver **Tabla 2**).

Tabla 2. Tolerancias máximas permitidas para la relación de intensidades utilizadas con fines confirmativos mediante técnicas espectrométricas

Relación de intensidades (% del pico base)	LC-MSⁿ (desviación relativa)
< 50%	$\pm 20 \%$
>20 % a 50 %	$\pm 25 \%$
>10 % a 20 %	$\pm 30 \%$
$\leq 10 \%$	$\pm 50 \%$

Se recomienda evitar, siempre que sea posible, la selección como ion precursor de un fragmento de la molécula. Se seleccionaran como iones producto aquellos con mayor intensidad en los que no se observen interferencias y no presenten pérdidas poco selectivas como podrían ser H₂O, CO₂, etc... Las intensidades relativas teóricas entre las transiciones SRM se establecerán a partir de patrones de referencia preferiblemente en matriz inyectado en la misma secuencia de análisis.

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado la técnica de análisis LC-MS/MS para la determinación de toxinas naturales en alimentos y muestras medioambientales.

En el caso de las aplicaciones desarrolladas para análisis de micotoxinas en alimentos (**Capítulo 2**) se ha desarrollado metodología multianalito UHPLC-MS/MS con analizador QqQ (**Artículos científicos 1 y 2**). En el caso de las aflatoxinas y ocratoxina A, en los que se requirió una mayor sensibilidad, se utilizaron diferentes aproximaciones para conseguir este objetivo (**Artículo científico 3**). En el caso de la patulina se desarrolló un método alternativo para su determinación debido a que sus características físico-químicas dificultaron su introducción en el método multianalito (**Artículo científico 4**).

En el **Capítulo 3** se detallan los métodos desarrollados para la determinación de ficotoxinas mediante LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo. En el **Artículo científico 5** se muestra la metodología analítica para la determinación de microcistinas y nodularina en muestras de aguas mediante el uso de la técnica SPE-UHPLC-MS/MS en modo on-line. Por último, en el **Artículo científico 6**, se desarrolló una metodología HPLC-MS/MS para la determinación de toxinas marinas con la que poder evaluar la presencia de estos contaminantes y su depuración a lo largo del tiempo.

La variedad de trabajos presentados a lo largo de este trabajo corroboran el potencial de la técnica de análisis basada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Además, se muestran diferentes aproximaciones analíticas disponibles para dar solución a problemas analíticos concretos tanto desde un punto de vista cromatográfico, espectrométrico, o cuantitativo.

1.3. REFERENCIAS

- Antignac, J., de Wasch, K., Monteau, F., De Brabander, H., Andre, F., & Le Bizec, B. (2005). *The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 529(1–2), 129-136.
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516.
- Decisión 2002/657/CE de la Comisión de 12 de Agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario oficial de la Unión Europea* L221 (2002) pp 8-36.
- Dijkman, E., Mooibroek, D., Hoogerbrugge, R., Hogendoorn, E., Sancho, J.V., Pozo, O., & Hernández, F. (2001). *Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection*. *Journal of Chromatography A*, 926(1), 113-125.
- Dorne, J. L. C. M., Dorne, J. L. C. M., Bordajandi, L. R., Amzal, B., Ferrari, P., & Verger, P. (2009). *Combining analytical techniques, exposure assessment and biological effects for risk assessment of chemicals in food*. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 695-707.
- Esteban, L. (2013). *La espectrometría de masas en imágenes*. Ed. ACK comunicación. ISBN: 84-87687-18-0

- European Commission, 2011. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Document No. SANCO/12495/2011.
- Hennion, M. (1999). *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 856(1–2), 3-54.
- Hernández, F., Pozo, O. J., Sancho, J. V., López, F. J., Marín, J. M., & Ibáñez, M. (2005). *Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS2 using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers*. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24(7), 596-612.
- Hernández, F., Sancho, J. V., & Pozo, O. J. (2005). *Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(4), 934-946.
- Hernández, F., Sancho, J. V., Pozo, Ó. J., Villaplana, C., Ibáñez, M., & Grimalt, S. (2003). *Rapid Determination of Fosetyl-Aluminum Residues in Lettuce by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry*. *Journal of AOAC International*, 86(4), 832-838.
- Kebarle, P., & Verkerk, U. H. (2009). *Electrospray: From Ions in solution to Ions in the gas phase, what we know now*. *Mass spectrometry reviews*, 28(6), 898-917.
- Kebarle, P., & Tang, L. (1993). *From ions in solution to ions in the gas phase: The mechanism of electrospray mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 65(22), 972A-986A.
- King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., & Olah, T. (2000). *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(11), 942-950.

- Krska, R., Becalski, A., Braekevelt, E., Koerner, T., Cao, X., Dabeka, R., Godefroy, S., Lau, B., Moisey, J., Rawn, D. F. K., Scott, P. M., Wang, Z., & Forsyth, D. (2012). *Challenges and trends in the determination of selected chemical contaminants and allergens in food*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 139-162.
- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., & Crews, C. (2008). *Mycotoxin analysis: An update*. *Food Additives and Contaminants*, 25(2), 152-163.
- Kruve, A., Leito, I., & Herodes, K. (2009). *Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach*. *Analytica Chimica Acta*, 651(1), 75-80.
- Lacina, O., Zachariasova, M., Urbanova, J., Vaclavikova, M., Cajka, T., & Hajslova, J. (2012). *Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1262, 8-18.
- Malik, A. K., Blasco, C., & Picó, Y. (2010). *Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety*. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 4018-4040.
- Mol, H. G. J., Plaza-Bolaños, P., Zomer, P., De Rijk, T. C., Stolker, A. A. M., & Mulder, P. P. J. (2008). *Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrices*. *Analytical Chemistry*, 80(24), 9450-9459.
- Niessen, W.M.A. (2007). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. *Chromatographic Science Series*, 97.
- Pramanik, B.N., Ganguly A.K., Gross M.L. (2002). *Applied Electrospray Mass Spectrometry*. *Practical Spectroscopy Series*. Vol. 32. Ed. Marcel Dekker. ISBN:0-8247-0618-8

- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., & Neilan, B. (2010). *On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin*. *Marine Drugs*, 8(5), 1650-1680.
- Quilliam, M. A. (2003). *The role of chromatography in the hunt for red tide toxins*. *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2), 527-548.
- Reglamento 2006/401/CE de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea L70 (2006) pp 12-34*.
- Rodriguez-Aller, M., Gurny, R., Veuthey, J., & Guillarme, D. (2013). *Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications*. *Journal of Chromatography A*, 1292, 2-18.
- Rychlik, M., & Asam, S. (2008). *Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(2), 617-628.
- Sancho, J. V., Ibáñez, M., Grimalt, S., Pozo, Ó. J., & Hernández, F. (2005). *Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 530(2), 237-243.
- Sancho, J. V., Pozo, O. J., López, F. J., & Hernández, F. (2002). *Different quantitation approaches for xenobiotics in human urine samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(7), 639-645.
- Songsermsakul, P., & Razzazi-Fazeli, E. (2008). *A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins*.

Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 31(11-12), 1641-1686.

Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G., & Alder, L. (2012). *Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed?* Analytical Chemistry, 84(3), 1474-1482.

Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). *Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds.* Food Chemistry, 119(1), 408-416.

Tang, L., & Kebarle, P. (1993). *Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution.* Analytical Chemistry, 65(24), 3654-3667.

Taylor, P. J. (2005). *Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry.* Clinical biochemistry, 38(4), 328-334.

Van Apeldoorn, M. E., Van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A., & Bakker, G. J. I. (2007). *Toxins of cyanobacteria.* Molecular Nutrition and Food Research, 51(1), 7-60.

Van Egmond, H. P. (2004). *Natural toxins: Risks, regulations and the analytical situation in Europe.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378(5), 1152-1160.

World Health Organization (2002). *WHO global strategy for food safety: safer food for better health.* World Health Organization, Geneva, Food Safety Programme-2002.

World Health Organization (1985). *Guidelines for the Study of Dietary Intakes of Chemical Contaminants,* Geneva.



CAPÍTULO 2

DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS
EN ALIMENTOS MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE ULTRA ALTA
RESOLUCIÓN ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN
TÁNDEM (UHPLC-MS/MS)

CAPÍTULO 2. DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS EN ALIMENTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (UHPLC-MS/MS)

2.1. Introducción

2.2. Metodologías de análisis multi-micotoxinas en alimentos mediante UHPLC-MS/MS

2.2.1. Determinación de metodología multianalito para la determinación de micotoxinas en alimentos mediante UHPLC-MS/MS

2.2.1.1. Introducción

2.2.1.2. Artículo científico 1

Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry

Rapid Communications in Mass Spectrometry (2009) 23, 1801-1809

2.2.1.3. Discusión de los resultados obtenidos

2.2.2. Desarrollo de metodología para la determinación de micotoxinas en alimentos procedentes de un estudio de dieta total

2.2.2.1. Introducción

2.2.2.2. Artículo científico 2

Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study

Analytica Chimica Acta (2013) 783, 39-48

2.2.2.3. Discusión de los resultados obtenidos

2.3. Desarrollo de metodología analítica de elevada sensibilidad para la determinación de aflatoxinas y ochratoxina A en alimentos infantiles y leche.

2.3.1. Introducción

2.3.2. Artículo científico 3

UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk

Food Chemistry (2011) 126, 737-744

2.3.3. Discusión de los resultados obtenidos

2.4. Determinación de la micotoxina patulina en manzanas y productos derivados mediante UHPLC-MS/MS. Estudio del efecto matriz con diferentes interfases de ionización a presión atmosférica (API).

2.4.1. Introducción

2.4.2. Artículo científico 4

Determination of the mycotoxin Patulin in apple and derived products by UHPLC-MS/MS. Study of matrix effect with atmospheric pressure ionization (API) sources.

Food Chemistry (2014) 142, 400-407

2.4.3. Discusión de los resultados obtenidos

2.5. Referencias

2.1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos, los cuales no presentan significado bioquímico para el crecimiento y desarrollo fúngico, capaces de infectar cosechas tanto en su fase de crecimiento como en su etapa de almacenamiento. El término micotoxina deriva de las palabras griegas *mikes* y *toxicon*, que significan hongo y veneno, respectivamente. Se trata de moléculas relativamente pequeñas con pesos moleculares por debajo de 700 uma.

Las micotoxinas conforman un grupo de compuestos de elevada heterogeneidad, tanto desde un punto de vista toxicológico como químico. Todas las micotoxinas son de origen fúngico, sin embargo no todos los compuestos tóxicos producidos por hongos son micotoxinas. Aquellos compuestos producidos por hongos que son tóxicos para bacterias son conocidos como antibióticos, como es el caso de la penicilina. Los hongos productores de micotoxinas son capaces de producir desde un solo tipo de micotoxina hasta diversas micotoxinas simultáneamente (Bennett & Klich, 2003, Hussein & Brasel, 2001).

El crecimiento de hongos en diferentes alimentos, piensos o materias primas, y la producción de diferentes micotoxinas estará determinado tanto por factores medioambientales como biológicos, como puede ser temperatura, humedad, actividad del agua, o la presencia de daños producidos por insectos (Songsermsakul & Razzazi-Fazeli, 2008).

La clasificación de las micotoxinas en diferentes grupos resulta compleja. Existen diferentes clasificaciones en función de los conocimientos de la persona que ha realizado dicha clasificación. Los médicos clínicos han realizado una clasificación en función de los órganos afectados (neurotóxicos, hepatológicos, nefrotóxicos, inmunotóxicos, ...) o en función de la enfermedad observada. Por otro lado, los químicos las han clasificado en función de su estructura química, mientras que los bioquímicos, lo han hecho basándose en sus orígenes biosintéticos. Por último, los micólogos lo han hecho en función de los hongos productores. Sin embargo, ninguna de las clasificaciones ha resultado cien por cien satisfactoria (Bennett & Klich, 2003).

El descubrimiento en 1960 de las micotoxinas denominadas aflatoxinas y sus efectos dañinos para la salud, tanto en humanos como animales, provocó la aparición gradual de diferentes reglamentos con el objetivo de controlar el contenido máximo de micotoxinas tanto en alimentos como piensos. Según la FAO, en el año 1981 únicamente 33 países poseían legislación referente a micotoxinas, mientras que en 2003 eran ya 100 los países con límites máximos establecidos (Food and Agriculture Organization, 2004).

Con el objetivo de promulgar los límites máximos de micotoxinas es interesante el estudio de toxicidad de las micotoxinas y del consumo de alimentos, los cuales serán la base para establecer la estimación de riesgo. Sin embargo, otros factores también influirán a la hora de establecer los límites de micotoxinas como por ejemplo, la distribución de micotoxinas (tanto en concentraciones, como en alimentos), la disponibilidad de metodologías analíticas, legislación en otros países con los que exista contacto comercial y la disponibilidad de alimentos. Los dos primeros factores

(distribución y análisis) son necesarios para poder asegurar el cumplimiento de la legislación una vez ésta se establezca, mientras que los dos últimos son meramente socio-económicos (Van Egmond, Schothorst & Jonker, 2007).

En la actualidad, en la Unión Europea (EU) se ha establecido una legislación armonizada con límites legales máximos para ciertas micotoxinas en diferentes alimentos, incluyendo alimentos para bebés y niños de corta edad (Reglamento 2006/1881/CE). Los reglamentos de la UE en los que se establecen los contenidos máximos de micotoxinas la UE se basan en los informes publicados por la European Food Safety Authority (EFSA) (Van Egmond, Schothorst & Jonker, 2007).

Como se ha comentado previamente, uno de los factores determinantes en la promulgación de niveles máximos permitidos es la evaluación del riesgo. Es por ello, que aunque se conozcan cerca de 400 micotoxinas, únicamente existe legislación para un reducido número de ellas, es decir, para aquellas que se han reportado como responsables de daños importantes en la salud de humanos o animales. Entre estas micotoxinas encontramos el grupo de las aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, ocratoxina A, zearalenona y patulina, cuya estructura puede verse en la **Figura 1**. Algunos de estos compuestos, como es el caso de las aflatoxinas, han sido clasificados como cancerígenos por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC). Otras micotoxinas, como es el caso de la ocratoxina A y las fumonisinas han sido incluidas dentro del grupo de compuestos posiblemente cancerígenos (IARC, 2002).

La posible presencia de hongos en cualquier ambiente implica que se puedan encontrar micotoxinas en una gran variedad de muestras. Las muestras vegetales han sido las matrices más estudiadas debido a su contaminación directa por la infección de hongos, pero también el análisis de muestras de origen animal resulta interesante debido al consumo de piensos contaminados. Por otra parte, y más recientemente, se está prestando un mayor interés en el estudio de la presencia de micotoxinas en ambientes interiores desde que se relacionara el “síndrome del edificio enfermo” con la presencia de hongos y

esporas fúngicas en dichos ambientes. Por último, también citar el posible interés por la presencia de micotoxinas en muestras ambientales como suelos y aguas (Cigic & Prosen, 2009).

Por todo ello, y unido a la globalización e internacionalización de los mercados, es necesario un control de los alimentos con el fin de cumplir los criterios de seguridad alimentaria establecidos en los reglamentos. Para conseguir este objetivo, es necesario aunar esfuerzos en el desarrollo de metodología analítica que permita la identificación y determinación fiable de micotoxinas de una manera sensible, selectiva y precisa en muestras alimenticias (Songsermsakul & Razzazi-Fazeli, 2008).

Además, el desarrollo de metodología analítica altamente sensible y selectiva que permita la determinación de micotoxinas a bajas concentraciones en muestras complejas permite la obtención de información fidedigna para la evaluación de riesgos (Dorne, Dorne, Bordajandi, Amzal, Ferrari & Verger, 2009).

La necesidad de cumplir con los reglamentos que exigen contenidos máximos de micotoxinas en alimentos y piensos ha hecho que se desarrollen una gran variedad de metodologías para la determinación de este tipo de contaminantes, desde los métodos rápidos de detección basados en su mayoría en ensayos con anticuerpos específicos hasta métodos con elevada fiabilidad basados en técnicas cromatográficas.

Los métodos de barrido rápido para la determinación de micotoxinas están basados principalmente en el uso de inmunoensayos y biosensores. Estas técnicas se caracterizan por ser rápidas y sensibles, con un coste relativamente bajo y fáciles de realizar, incluso por personas no expertas en el campo de análisis. Sin embargo, el principal problema que se encuentra en estas metodologías es la falta de selectividad, asociada en muchas ocasiones a fenómenos de reactividad cruzada. Por tanto, cualquier resultado positivo detectado debe ser confirmado y debidamente cuantificado mediante el uso de técnicas de mayor fiabilidad como es el caso de las técnicas cromatográficas (Cigic & Prosen, 2009, Songsermsakul & Razzazi-Fazeli, 2008).

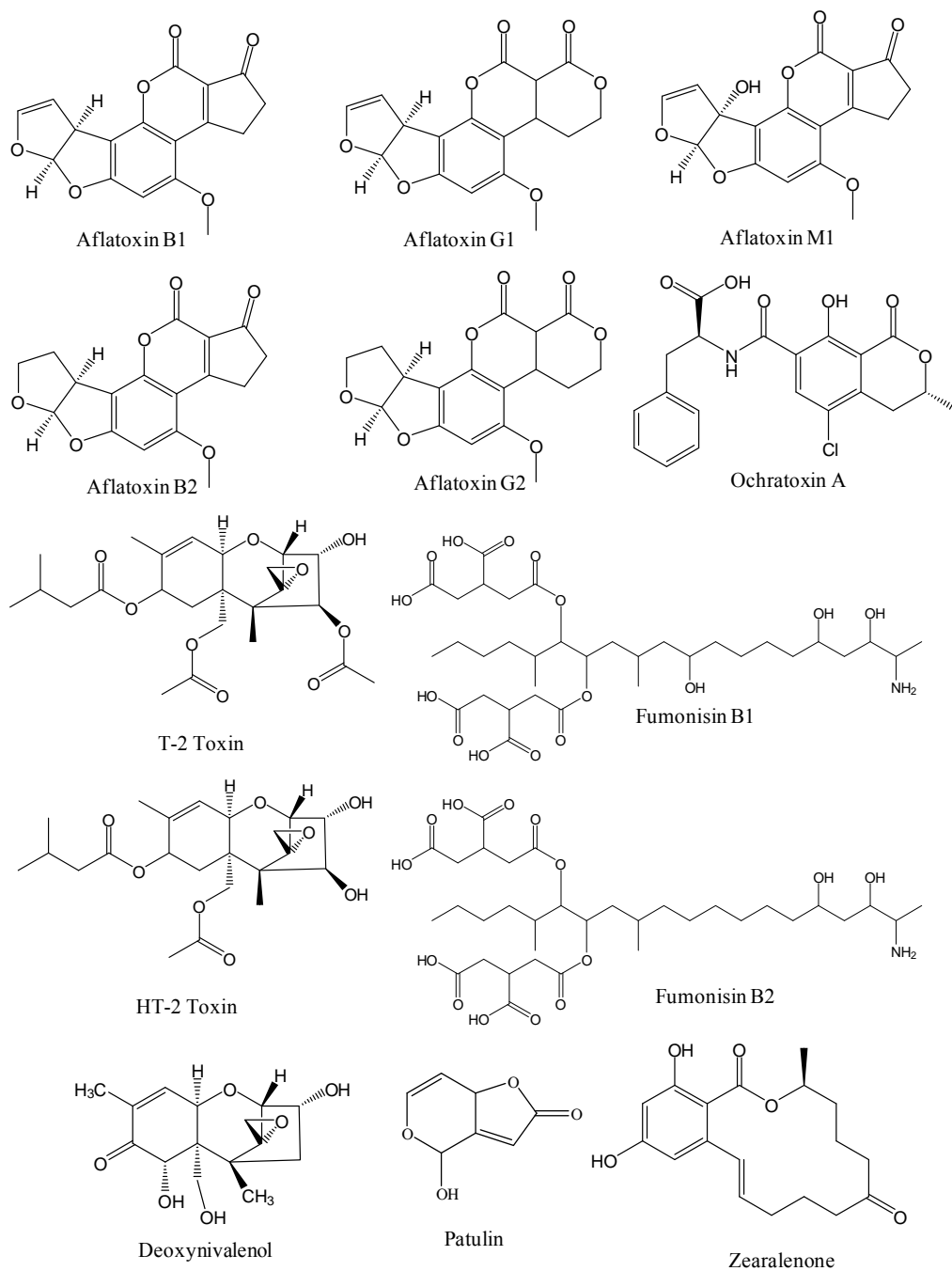


Figura 1. Estructura química de las micotoxinas reguladas en el Reglamento 1881/2006/EC.

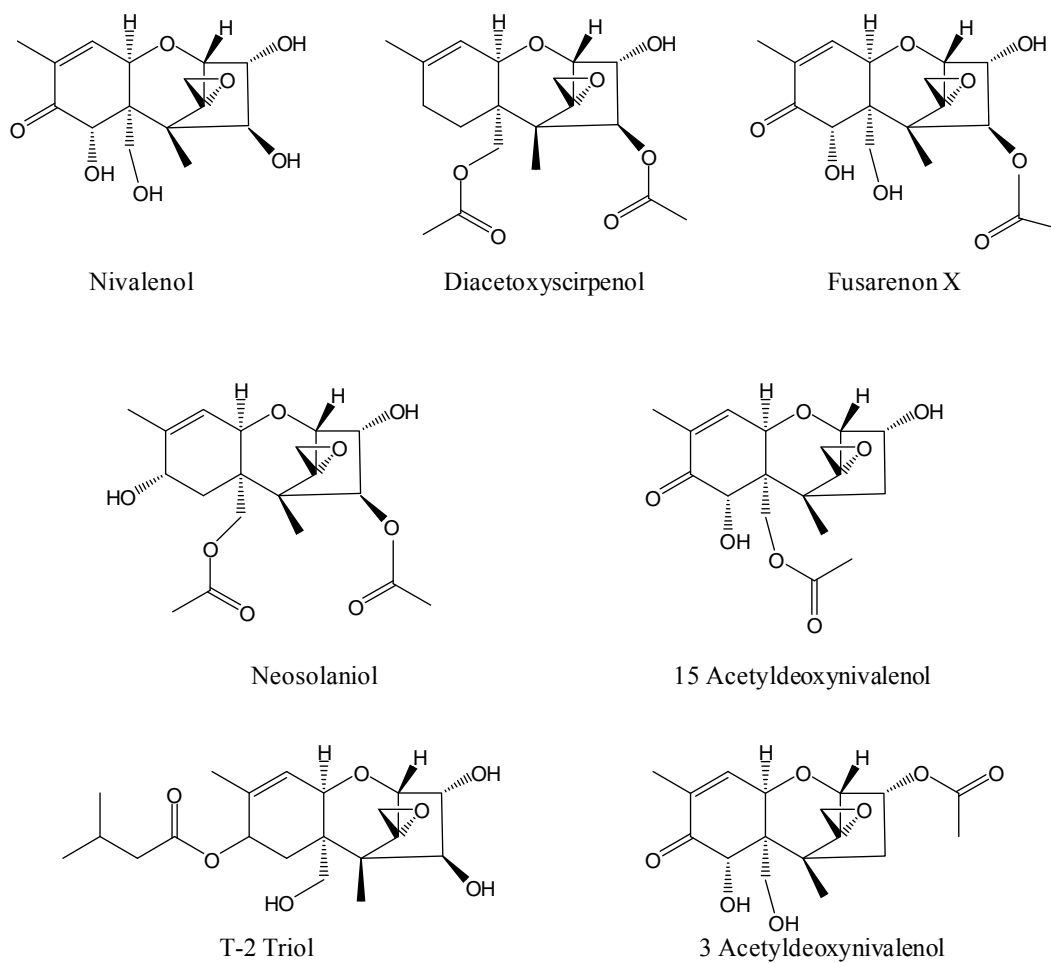


Figura 2. Estructura química de algunas micotoxinas pertenecientes al grupo de los tricotecenos

El desarrollo de métodos analíticos para la determinación de micotoxinas en alimentos y piensos basados en técnicas cromatográficas es extenso, utilizando diferentes técnicas analíticas como es el caso de cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de

gases (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplados a una gran variedad de sistemas de detección.

La TLC en combinación con detectores UV-Vis ha sido ampliamente utilizada para la determinación de micotoxinas, ya que permite el análisis de un número elevado de muestras a un coste relativamente bajo. Sin embargo la TLC presenta el inconveniente de requerir un elevado tratamiento de muestra, específico para cada grupo de tóxicos (Turner, Subrahmanyam & Piletsky, 2009).

En el caso de HPLC, la separación cromatográfica se ha realizado en su mayoría mediante el uso de fases estacionarias de fase reversa (C_{18}). Los detectores clásicos más comúnmente utilizados han sido la FD y el DAD. Estas técnicas de detección requieren un elevado tratamiento de muestra con el fin de eliminar los posibles interferentes de matriz. Las aflatoxinas han sido estudiadas mediante la técnica HPLC-FLD debido a su fluorescencia inherente. Sin embargo, en la mayoría de metodologías se observa la necesidad de derivatizarlas, pre- o post-columna, con el fin de aumentar la sensibilidad del método. Por lo que respecta al HPLC-DAD, se ha utilizado para la detección de varios grupos de micotoxinas, aunque en muchos trabajos se destaca que presentan baja sensibilidad, así como limitada selectividad (Köppen, Koch, Siegel, Merkel, Maul & Nehls, 2010, Songsermsakul & Razzazi-Fazeli, 2008).

La GC acoplada a diferentes técnicas de detección también ha sido utilizada para la determinación de micotoxinas en muestras de alimentos. Sin embargo, un gran número de micotoxinas no presentan las propiedades físico-químicas deseables para ser determinadas por cromatografía de gases, requiriendo en la mayoría de casos procesos de derivatización química. Así, los tricotecnos han sido el grupo más ampliamente estudiado utilizando detectores de captura electrónica (ECD), o de MS. Sin embargo, el uso de la cromatografía de gases en el campo de análisis de micotoxinas es cada día menor, prefiriéndose el uso de HPLC-MS(/MS) (Köppen, Koch, Siegel, Merkel, Maul & Nehls, 2010).

El desarrollo en los años 90 de las interfases API, ha permitido que la técnica HPLC-MS(/MS) se haya convertido en la técnica preferida para el análisis de micotoxinas debido a su elevada sensibilidad, selectividad y precisión así como su compatibilidad con un elevado número de compuestos de diferente polaridad. Es por este motivo que la LC-MS, preferiblemente en tándem, está reemplazando poco a poco los métodos de análisis clásicos. Entre las principales ventajas destacan la considerable reducción del tratamiento de muestra, la aplicación a un rango mayor de compuestos y la capacidad de identificación inequívoca.

Recientemente se han publicado diferentes revisiones bibliográficas en las que se pone de relieve el elevado potencial de esta técnica para la determinación de este tipo de contaminantes tanto en muestras alimenticias como medioambientales (Capriotti, Caruso, Cavaliere, Foglia, Samperi & Laganà, 2012, Krska & Molinelli, 2007, Köppen, Koch, Siegel, Merkel, Maul & Nehls, 2010, Zöllner & Mayer-Helm, 2006).

En el presente capítulo se muestra el desarrollo de metodología multianálito para la determinación simultánea de las micotoxinas reguladas por la UE en alimentos, mediante la técnica UHPLC-MS/MS (**Artículo científico 1**). Esta metodología fue posteriormente ampliada a un número mayor de micotoxinas y aplicada al análisis de muestras de diferentes alimentos pertenecientes a un estudio de dieta total (**Artículo científico 2**). Algunos de los problemas surgidos durante el desarrollo de esta metodología analítica fueron resueltos en trabajos posteriores. Por ello, en el **Artículo científico 3** se desarrolla metodología analítica de elevada sensibilidad con el fin de alcanzar los límites extremadamente bajos requeridos para algunas micotoxinas en alimentos infantiles. Por último, en el **Artículo científico 4** se abordan las dificultades observadas en el análisis de la micotoxina patulina.

2.2. METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS MULTI-MICOTOXINAS EN ALIMENTOS MEDIANTE UHPLC-MS/MS

2.2.1. DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS MEDIANTE EL USO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS EN TÁNDEM (UHPLC-MS/MS)

2.2.1.1 INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de las micotoxinas y las consecuencias del consumo de alimentos contaminados por este tipo de toxinas durante las décadas de los 60 y 70 despertó la conciencia de los gobiernos por decretar los niveles máximos de estos contaminantes en alimentos y así asegurar una alimentación segura.

El reglamento 1881/2006/EC establece el contenido máximo de las micotoxinas reguladas en la Unión Europea. En este documento, se regula el contenido máximo de 13 micotoxinas en un amplio abanico de matrices. Puede observarse que en algunas matrices únicamente ha sido regulada una cierta micotoxina, pero sin embargo existen matrices en las que el número de micotoxinas reguladas es mayor debido a la posible contaminación simultánea por diferentes tóxicas (Borutova, Aragon, Nährer & Berthiller, 2012, Sulyok, Krska & Schuhmacher, 2010).

En los últimos años, el interés por el desarrollo de metodología analítica para la determinación de micotoxinas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem ha crecido de manera exponencial. Las principales ventajas que se han observado frente a las técnicas clásicas son la posibilidad de determinar diferentes compuestos en un mismo análisis sin la necesidad de aplicar etapas de derivatización, así como la mayor capacidad de confirmación de resultados positivos.

Esta técnica ha sido aplicada tanto al análisis individual de micotoxinas como al análisis de grupos de micotoxinas con propiedades físico-químicas similares. Sin embargo, su principal ventaja es la capacidad para poder determinar simultáneamente un elevado número de micotoxinas que presenten propiedades físico químicas diferentes.

Para poder aplicar esta metodología a un amplio rango de analitos es necesario reducir el tratamiento de muestra, evitando procesos de purificación que pudieran reducir la multiresidualidad del método, es decir, aplicar una técnica de extracción lo más universal posible y una posterior dilución previa a la inyección al sistema cromatográfico (“*dilute and shoot*”). Es necesario, por tanto, elegir una mezcla de extracción que permita llegar a una situación de compromiso en la extracción de compuestos con diferentes rangos de polaridad.

El principal problema que se observa en estas metodologías en las que el tratamiento de muestra se ha reducido al máximo es la presencia de gran cantidad de interferentes de matriz que pueden coeluir con los analitos de interés, conocido como efecto matriz. Como ya se ha comentado en la introducción, el efecto matriz es la supresión o exaltación de la señal que se produce en el proceso de ionización debido a la presencia de interferentes de matriz coeluidos con los analitos de interés. El efecto matriz puede afectar a la repetibilidad y precisión del método, conduciendo a errores de cuantificación. Por ello, es necesario controlar los efectos matriz e intentar compensarlos mediante alguna técnica que permita su corrección. En el campo de las micotoxinas se han aplicado diferentes aproximaciones para compensar dicho efecto como puede ser la

aplicación de técnicas de purificación, el uso de patrones internos, preferiblemente marcados isotópicamente, o cuantificación mediante calibrado en matriz. El uso de técnicas de purificación basadas en SPE han sido ampliamente utilizadas con el objetivo de reducir la presencia de interferentes de matriz; sin embargo, se ha demostrado que no consiguen la purificación deseada, y reducen el rango de analitos (Royer, Humpf & Guy, 2004). El uso de patrones internos marcados isotópicamente parece ser la mejor aproximación para la corrección del efecto matriz, pues se trata de los compuestos con comportamiento más semejante posible a los compuestos estudiados. El principal inconveniente que frena su aplicación en el campo del análisis de micotoxinas es el limitado número de compuestos marcados isotópicamente comercialmente disponibles así como su elevado precio. De hecho únicamente se encuentran disponibles unos pocos trabajos en los que se aplica la corrección mediante micotoxinas marcadas isotópicamente (Varga et al., 2012, Zachariasova et al., 2010, Rychlik & Asam, 2008). El uso de curvas de calibrado preparadas en matriz es otra aproximación para corregir el efecto matriz, y posiblemente la aproximación más utilizada (Capriotti, Caruso, Cavaliere, Foglia, Samperi & Laganà, 2012).

En el presente estudio se ha desarrollado metodología analítica basada en la técnica “*dilute and shoot*” mediante UHPLC-MS/MS para la determinación de las micotoxinas reguladas en el Reglamento 1881/2006/EC.

En el trabajo que se presenta a continuación, **Artículo científico 1**, se muestra el desarrollo y validación de metodología analítica basada en UHPLC-MS/MS en 3 matrices de elevado interés en el campo de análisis de micotoxinas como son maíz, trigo en forma de pasta alimenticia y papilla multi-cereales destinada a bebés. Se han optimizado los procesos de extracción y análisis. Además se ha estudiado en profundidad el efecto matriz presente en cada una de las matrices estudiadas, eligiéndose la opción de calibrado en matriz para corregir los posibles errores de cuantificación derivados de los efectos de supresión/exaltación iónica en la fuente de ionización.

2.2.1.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 1

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009; 23: 1801–1809

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/rcm.4077

RCM

Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry

Eduardo Beltrán, María Ibáñez, Juan Vicente Sancho and Félix Hernández*

Research Institute for Pesticide and Water, University Jaume I, Avda. Sos Baynat, E-12071 Castellón, Spain

Received 12 February 2009; Revised 7 April 2009; Accepted 7 April 2009

A rapid multianalyte-multiclass method with little sample manipulation has been developed for the simultaneous determination of eleven mycotoxins in different food commodities by using ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC/MS/MS). Toxins were extracted from the samples with acetonitrile/water (80:20, v/v) 0.1% HCOOH and, after a two-fold dilution with water, directly injected into the system. Thanks to the fast high-resolution separation of UHPLC, the eleven mycotoxins were separated by gradient elution in only 4 min. The method has been validated in three food matrices (maize kernels, dry pasta (wheat), and eight-multicereal babyfood (wheat, maize, rice, oat, barley, rye, sorghum, millet)) at four different concentration levels. Satisfactory recoveries were obtained (70–110%) and precision (expressed as relative standard deviation) was typically below 15% with very few exceptions. Quantification of samples was carried out with matrix-matched standards calibration. The lowest concentration successfully validated in sample was as low as 0.5 µg/kg for aflatoxins and ochratoxin A in babyfood, and 20 µg/kg for the rest of the selected mycotoxins in all matrices tested. Deoxynivalenol could be only validated at 200 µg/kg, due the poor sensitivity for this mycotoxin analysis. With only two exceptions (HT-2 and deoxynivalenol), the limits of detection (LODs), estimated for a signal-to-noise ratio of 3 from the chromatograms of samples spiked at the lowest level validated, varied between 0.1 and 1 µg/kg in the three food matrices tested. The method was applied to the analysis of different kinds of samples. Positive findings were confirmed by acquiring two transitions (Q quantification, q confirmation) and evaluating the Q/q ratio. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by molds, without biochemical significance in fungal growth and development.¹ Mycotoxins have adverse effects on humans and animals and cause economic losses on crops due to their contamination.^{1,2} Although they have existed since ancient times, the term mycotoxins appeared in 1960 when 100 000 turkey poults died due to the ingestion of peanut contaminated with secondary metabolites from *Aspergillus flavus*.¹

Mycotoxins are compounds with various chemical structures and, therefore, various biological effects.³ There are over 300 known compounds that grow under a wide range of climatic conditions on agricultural commodities.² Not all secondary metabolites from molds are toxic, so it is necessary to regulate those mycotoxins that can be dangerous for human health.^{2,3} Aflatoxins have been classified as carcino-

genic to humans, while ochratoxin A and fumonisins are classified as possible carcinogens by the International Agency for Research on Cancer.⁴

Due to the serious effects on humans and animals, the European Commission (EC) has established the maximum permitted levels for several mycotoxins.^{5,6} The main mycotoxins regulated are: aflatoxins, ochratoxin A, patulin, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, and HT-2 and T-2 toxin (Table 1). It is therefore necessary to apply sensitive and reliable analytical methods able to reach the regulatory levels established by the EC.

Some screening methods have been developed for mycotoxin determination, based on enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) or immunoaffinity column-based analysis. Normally, they are focused on qualitative aspects, and require the use of liquid chromatography (HPLC) or gas chromatography (GC) for accurate quantification and/or correct confirmation of the compound detected.^{3,7,8}

In the last few years, HPLC has become the preferred technique for mycotoxins analysis, as it does not require the derivatization step typically applied in GC-based methods.³ HPLC when coupled to mass spectrometry (MS), or preferably to tandem mass spectrometry (MS/MS), is an

*Correspondence to: F. Hernández, Research Institute for Pesticide and Water, University Jaume I, Avda. Sos Baynat, E-12071 Castellón, Spain.

E-mail: felix.hernandez@qfa.uji.es

Contract/grant sponsor: Laboratory of Public Health, Valencia. Contract/grant sponsor: Generalitat Valenciana (Plataforma de Seguridad Alimentaria; contract/grant number: A-07/08.

Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry

Beltrán E., Ibáñez M., Sancho, J.V., Hernández, F.

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

Abstract

A rapid multianalyte-multiclass method with little sample manipulation has been developed for the simultaneous determination of eleven mycotoxins in different food commodities by using ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC/MS/MS). Toxins were extracted from the samples with acetonitrile/water (80:20, v/v) 0.1% HCOOH and, after a two-fold dilution with water, directly injected into the system. Thanks to the fast high-resolution separation of UHPLC, the eleven mycotoxins were separated by gradient elution in only 4 min. The method has been validated in three food matrices (maize kernels, dry pasta (wheat), and eight-multicereal babyfood (wheat, maize, rice, oat, barley, rye, sorghum, millet)) at four different concentration levels. Satisfactory recoveries were obtained (70-110%) and precision (expressed as relative standard deviation) was typically below 15% with very few exceptions. Quantification of samples was carried out with matrix-matched standards calibration. The lowest concentration successfully validated in sample was as low as 0.5 µg/kg for aflatoxins and ochratoxin A in babyfood, and 20 µg/kg for the rest of the selected mycotoxins in all matrices tested. Deoxynivalenol could be only validated at 200 µg/kg, due the poor sensitivity for this mycotoxin analysis. With only two exceptions (HT-2 and deoxynivalenol), the limits of detection (LODs), estimated for a signal-to-noise ratio of 3 from the chromatograms of samples spiked at the lowest level validated, varied between 0.1 and 1 µg/kg in the three food matrices tested. The method was applied to the analysis of different kinds of samples. Positive findings were confirmed by acquiring two transitions (Q quantification, q confirmation) and evaluating the Q/q ratio.

1. Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites produced by molds, without biochemical significance in fungal growth and development. Mycotoxins have adverse effects on humans and animals and cause economic losses on crops due to their contamination.^{1,2} Although they have existed since ancient times, the term mycotoxins appeared in 1960 when 100 000 turkey poultts died due to the ingestion of peanut contaminated with secondary metabolites from *Aspergillus flavus*.¹

Mycotoxins are compounds with various chemical structures and, therefore, various biological effects.³ There are over 300 known compounds that grow under a wide range of climatic conditions on agricultural commodities.² Not all secondary metabolites from molds are toxic, so it is necessary to regulate those mycotoxins that can be dangerous for human health.^{2,3} Aflatoxins have been classified as carcinogenic to humans, while ochratoxin A and fumonisins are classified as possible carcinogens by the International Agency for Research on Cancer.⁴

Table 1. Maximum levels for regulated mycotoxins in foodstuffs (intended for direct human consumption) according to EC/1881/2006 Commission Regulation.

Compound	Maximum levels ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	
	Foodstuffs (cereals, dried fruit,..)	Foods for infants and young children
Aflatoxin B1	2.0-8.0	0.1
Sum Aflatoxins (B1, B2, G1 and G2)	4.0-15.0	-
Aflatoxin M1	0.05	0.025
Patulin	25-50	10
Ochratoxin A	3.0-10.0	0.5
Deoxynivalenol	500-1750 ^a	200
Zearalenone	75-400 ^a	20
Sum Fumonisin (B1 and B2)	800-4000 ^a	200
Sum Toxin (HT-2 and T-2 toxin)	-	-

^a EC/1126/2007 Amending EC/1881/2006

Due to the serious effects on humans and animals, the European Commission (EC) has established the maximum permitted levels for several mycotoxins.^{5,6} The main mycotoxins regulated are: aflatoxins, ochratoxin A, patulin, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, and HT-2 and T-2 toxin (Table 1). It is therefore necessary to apply sensitive and reliable analytical methods able to reach the regulatory levels established by the EC.

Some screening methods have been developed for mycotoxin determination, based on enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) or immunoaffinity column-based analysis. Normally, they are focused on qualitative aspects, and require the use of liquid chromatography (HPLC) or gas chromatography (GC) for accurate quantification and/or correct confirmation of the compound detected.^{3,7,8}

In the last few years, HPLC has become the preferred technique for mycotoxins analysis, as it does not require the derivatization step typically applied in GC-based methods.³ HPLC when coupled to mass spectrometry (MS), or preferably to tandem mass spectrometry (MS/MS), is an excellent analytical tool within this field due to its already known advantages of high selectivity and sensitivity, substantial reduction of sample treatment, and reliable quantification and confirmation at the low concentrations required.^{3,8-12}

Nowadays, the trend in mycotoxin analysis is the development of multimycotoxin methods able to cover, in a single run, all mycotoxins considered by European Union (EU) food legislation.^{11,12} However, several difficulties are found to reach this objective. First, very different maximum levels are admitted for mycotoxins as a function of their toxicity and type of food (e.g. babyfood has more restricted regulation). Second, the matrix food composition under study is also highly variable, and, finally, mycotoxins present a great diversity in their physicochemical properties.

In this way, one of the main problems in multitoxin analysis is the extraction and purification for all analytes, which present great differences in their physicochemical properties.¹¹ To overcome this obstacle several authors prefer to avoid the purification step, injecting the crude extract.^{10,11,13,14} However, injection of crude extracts forces careful

consideration of the matrix effects caused by co-elution of matrix components. This effect leads to suppression or, more rarely, enhancement of the ionization efficiency of the analyte, affecting the accuracy and precision of the results.^{3, 10, 13} Therefore, to obtain a correct quantification it is necessary to compensate matrix effects. Some approaches are the use of internal standards (isotope-labelled analyte or other compounds with similar properties), matrix-matched standards calibration or the use of standard additions method.^{3, 15} The best way to compensate matrix effects seems to be the use of isotope-labelled mycotoxins as internal standards, as they normally present the same ionization behaviour as analytes. However, this approach presents an important drawback, the lack of isotope-labelled standards of all mycotoxins that may be included in a multimycotoxin method.¹⁶ Matrix-matched standards calibration, i.e. a blank sample extract spiked with reference standards, is one of the most used approaches to compensate for matrix effects,^{3, 10, 16, 17} saving the laborious work of spiking each sample at different levels, as required in the standard additions method.

Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) presents the benefits of shorter run times, and narrower chromatographic peaks, which result in increased sensitivity and improved peak resolution.^{14, 18} Many applications of this recent technique have been reported in different fields such as food safety¹⁴ or environmental analysis,^{19, 20} and it has also been applied to determination of mycotoxins very recently.^{18, 21} Ventura *et al.*²¹ developed a UHPLC/MS/MS method for the analysis of aflatoxins and ochratoxin A in beer whereas Ren *et al.*¹⁸ applied the same technique for the quantification of 17 mycotoxin contaminants in corn feeds and peanut butter. In both cases, a sample purification step was performed by solid-phase extraction (SPE).

The aim of this paper is the development of a UHPLC/MS/MS multianalyte method that allows the determination of eleven relevant EU-regulated mycotoxins in a single analysis in different sample matrices (maize kernels, dry pasta and multicereal babyfood). Until now, this analytical approach has not been applied to the determination of the analytes selected in this work in the three food matrices tested. Due to the wide range of physicochemical properties

of the analytes, sample treatment has been minimized, and crude extracts have been directly injected into the LC/MS system, avoiding pre-concentration and purification steps. Matrix effects have been compensated using matrix-matched standards calibration for the correct quantification. After validation of the method in three sample matrices selected, it has been applied to the analysis of 18 samples. Special emphasis has been placed on the confirmation of positive findings. For this purpose, ion intensity ratios between the quantification (Q) and the confirmation transition (q) were calculated and compared to those of reference standards.

2. Experimental

2.1. Reagents and chemical

All mycotoxins standards (>99% purity) were supplied by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Structures of the selected compounds can be found elsewhere.^{8, 13}

HPLC-grade water was obtained from water passed through a MilliQ water purification system (Millipore Ltd., Bedford, MA, USA). HPLC-grade methanol (MeOH), HPLC-grade acetonitrile (ACN), acetic acid (>99.8%) and ammonium acetate (NH₄Ac) (>99%) were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). Formic acid (HCOOH) (>98%) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland).

Individually stock solutions, at around 100 mg/L, were prepared dissolving about 5, 10 or 25 mg of solid reference standard in 15, 100 or 250 mL of ACN, respectively.

An intermediate mixed solution (MIX A) containing all aflatoxins at a concentration of 10 mg/L was obtained after mixing individual stock solutions and diluting with ACN. A similar procedure was carried out with OTA, ZEN, DON, HT-2 and T-2 (MIX B) (See Table 2 for abbreviations). The mixture standard solution (around 1 mg/L) was prepared by adding 1 mL of MIX A, 1 mL of MIX B, 1 mL of FB1 standard and 1 mL of FB2 standard (both at 10 mg/L), and diluting to 10 mL with water. Working standard solutions for LC/MS/MS analysis and for fortification of samples were prepared by dilution of the 1 mg/L

mixture solution with water. Stock and intermediate standard solutions were stored in a freezer at -20°C , whereas working solutions were stored in a fridge.

2.2. Instrumentation

An UPLC™ system (Acquity, Waters, Milford, MA, USA) was interfaced to a triple quadrupole mass spectrometer (TQD, Waters Micromass, Manchester, UK) using an orthogonal Z-spray-electrospray interface. The LC separation was performed using an Acquity UPLC BEH C18 analytical column ($1.7\ \mu\text{m}$ particle size, $2.1 \times 50\ \text{mm}$; Waters), at a flow rate of $300\ \mu\text{L}/\text{min}$. Mobile phase was a time-programmed gradient using A (H_2O $0.5\ \text{mM}$ NH_4Ac , 0.1% HCOOH), and B (MeOH $0.5\ \text{mM}$ NH_4Ac , 0.1% HCOOH). The percentage of organic modifier (B) was changed linearly as follows: 0 min, 10%; 4 min, 90%; 4.1 min, 10%; 7 min, 10%. The injection volume was $20\ \mu\text{L}$. Drying as well as nebulising gas was nitrogen, obtained from a nitrogen generator. The gas flow was set to $1200\ \text{L}/\text{h}$. For operation in MS/MS mode, collision gas was argon (99.995%; Praxair, Madrid, Spain) with a pressure of approximately $4.10^{-3}\ \text{mbar}$ in the collision cell. Experiments were performed by continuous positive/negative polarity switching (switching time of $0.02\ \text{s}$). Capillary voltages of $3.5\ \text{kV}$ (positive ionization mode) and $3.0\ \text{kV}$ (negative ionization mode) were applied. The desolvation gas temperature was set to 500°C and the source temperature to 120°C . Temperature column was set to 40°C . Dwell times of $0.030\ \text{s}/\text{scan}$ were chosen. MassLynx version 4.1 (Waters, Manchester, UK) software was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from samples.

2.3. Samples

Blank samples of maize kernels, dry pasta and eight-multicereal babyfood (wheat, maize, rice, oat, barley, rye, sorghum, millet) used in the validation experiments were purchased from different supermarkets in Castellon. Samples for analysis (at least $1\ \text{kg}$) were provided by the Laboratory of Public Health (Valencia, Spain).

2.4 Analytical procedure

The whole samples were thoroughly triturated using a homogenizer (model K55, Dito Sama, Aubusson, France). After that, 2.5 g triturated samples were accurately weighed (precision 0.1 mg) and transferred to centrifuge tubes (50 mL). Samples were extracted by shaking with 10 mL ACN/water (80:20) 0.1% HCOOH on a mechanical shaker (S.B.S. Instruments S.A, Barcelona, Spain) for 90 min, and then centrifuged at 4000 rpm for 10 min (Consul centrifuge, Orto-Alresa, Madrid, Spain). Afterwards, the supernatant extract was two-fold diluted with HPLC-grade water, taking an aliquot of 5 mL and diluting to 10 mL. After filtration through a 0.22 μm syringe nylon filter (Iso-disc, Supelco), 20 μL were directly injected into the UHPLC/ESI-MS/MS system.

Calibration was performed using matrix-matched standards prepared from a two-fold diluted blank extract.

Fortification of samples for recovery experiments was performed by delivering 1 mL of 1.25, 5, 50, 500 $\mu\text{g/L}$ mixture standard solution to 2.5 g homogenized blank sample in order to yield fortification levels of 0.5, 2, 20 and 200 $\mu\text{g/kg}$, respectively. These fortified samples were equilibrated for 1 h prior to extraction.

2.5. Validation study

The validation study was carried out for the eleven selected mycotoxins in three food matrices: maize kernels, dry pasta and eight-multicereal babyfood.

Linearity of the method was evaluated taking at least six matrix-matched standard solutions which were analyzed in duplicate in the following ranges: 0.05–100 ng/mL for aflatoxins and ochratoxin, and 1–100 ng/mL for the rest of compounds. It was considered satisfactory when correlation coefficients were higher than 0.99.

Precision (repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD), in %) and recoveries were determined within-day by analyzing fortified blank samples in quintuplicate.

This experiment was performed at three levels, 2, 20 and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for maize kernels and dry pasta, or at four levels (0.5, 2, 20, and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in the case of babyfood. Recoveries between 70–110% with RSD lower than 20% were considered satisfactory, except for the 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ level in babyfood, where acceptable recoveries were 50–120% according to the legislation.²²

The specificity of the method was evaluated by analyzing a blank procedure, a processed blank sample and a blank sample spiked at the lowest concentration validated.

The limit of quantification (LOQ) was estimated for a signal-to-noise (S/N) ratio equal to 10 from selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of samples spiked at the lowest concentration validated. The limit of detection (LOD) was estimated, from the same chromatograms, for an S/N ratio of 3.

3. Results and discussion

This work has been focused on mycotoxins in cereals and babyfood. Our previous experiments led to the conclusion that aflatoxin M1 required a different analytical approach to reach the sensitivity needed in agreement with the EC regulation (maximum level 0.025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in babyfood). In the case of patulin, electrospray ionization (ESI) was not satisfactory, hampering its inclusion in the multianalyte method developed in this article. These two analytes will be investigated in future works.

3.1. Optimization of MS/MS conditions

Full scan and MS/MS spectra of analytes were obtained from infusion of individual 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methanol/water (50:50) solutions of each compound at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Experiments were carried out in both positive and negative ionization modes.

All selected compounds showed higher signals in positive ionization mode with the exception of ZEN, which showed more satisfactory behaviour in negative ionization mode.

Therefore, to acquire the optimum SRM transitions for each analyte, it was necessary to work with positive/negative polarity switching along the chromatographic run.

Although most of the ESI positive compounds presented an abundant $[M+H]^+$ ion, it is important to note the formation of ammonium adducts in the group of trichothecenes, especially for trichothecenes A (HT-2 and T-2 toxin). DON presented formation of undesired sodium adducts, which could be minimized with the introduction of small quantities of ammonium acetate (0.5 mM) in the mobile phase. Two different precursor ions, $[M+H]^+$ and $[M+NH_4]^+$, were selected for this compound to obtain the maximum sensitivity. Although some authors studied DON in negative ionization mode,^{23, 24} in our study the best results were obtained using positive ionization.

Two product ions were acquired for each compound, avoiding the selection of product ions resulting from non-specific losses (i.e. H_2O or NH_3). Among them, the most abundant transition was used for quantification (Q) and the second one for confirmation purposes (q). **Table 2** shows optimized MS parameters (precursor and product ions, cone voltage and collision energy) and the transitions selected together with their Q/q ratios for mycotoxins investigated in this work. Dwell times around 100 ms did not produce enough data points to define good UHPLC peaks. Thus, a dwell time of 30 ms was selected to obtain adequate peak shape, monitoring 20 SRM transitions in positive ionization mode in a single function and 2 SRM transitions in negative ionization mode. Moreover, the positive-negative switching time selected (only 20 ms) allowed the measurement of all compounds in a single run.

Table 2. Optimized MS/MS parameters for the eleven mycotoxins selected

Compound	Retention time (min)	Ionization Mode	Precursor ion	Cone (V)	Product ion	Collision energy (eV)	Ion Ratio (Q/q)
Aflatoxin G ₂ (AFG2)	2.43	ESI +	331.2 [M+H] ⁺	55	189.2 (Q) 245.2 (q)	40 30	1.1
Aflatoxin G ₁ (AFG1)	2.56	ESI +	329.2 [M+H] ⁺	55	243.2 (Q) 128.1 (q)	25 60	2.9
Aflatoxin B ₂ (AFB2)	2.68	ESI +	315.2 [M+H] ⁺	60	287.2 (Q) 259.2 (q)	35 30	1.0
Aflatoxin B ₁ (AFB1)	2.81	ESI +	313.2 [M+H] ⁺	60	241.2 (Q) 285.2 (q)	25 35	1.1
Deoxynivalenol (DON)	1.46	ESI +	297.3 [M+H] ⁺ 314.3 [M+NH ₄] ⁺	30 10	249.2 (Q) 249.2 (q)	15 10	3.3
Ochratoxin A (OTA)	3.80	ESI +	404.2 [M+H] ⁺	30	239.1 (Q) 102.0 (q)	25 70	1.6
HT-2 Toxin (HT-2)	3.34	ESI +	442.4 [M+NH ₄] ⁺	20	263.2 (Q) 215.2 (q)	15 15	1.2
T-2 Toxin (T-2)	3.59	ESI +	484.4 [M+NH ₄] ⁺	20	305.3 (Q) 185.2 (q)	20 15	1.3
Fumonisin B ₂ (FB2)	3.81	ESI +	706.5 [M+H] ⁺	65	318.2 (Q) 74.0 (q)	35 35	1.0
Fumonisin B ₁ (FB1)	3.39	ESI +	722.6 [M+H] ⁺	60	334.5 (Q) 352.3 (q)	40 40	0.9
Zearalenone (ZEN)	3.77	ESI -	317.2 [M-H] ⁻	60	131.1 (Q) 175.1 (q)	25 30	1.0

Q: transition used for quantification; q: transition used for confirmation.

3.2. LC optimization

The wide range of physicochemical properties of mycotoxins, with quite different polarity and acidity characteristics, made it necessary to find a compromise between mobile phase composition (trying to achieve suitable chromatography retention) and MS response for the eleven mycotoxins under study. Better sensitivity was obtained for aflatoxins and DON when 0.5 mM ammonium acetate was added to the mobile phase. Moreover, the addition of small amounts of ammonium acetate avoided the formation of stable sodium adducts, especially in the case of DON, HT-2 and T-2 toxin, and favoured the formation of $[M+NH_4]^+$ precursor ions. However, higher concentrations of this salt (in the range 1–5 mM) produced ionization suppression, so the concentration of ammonium acetate was optimized at 0.5 mM.

We also studied the addition of different percentages of HCOOH to the mobile phase in order to increase the sensitivity for fumonisins.⁸ The addition of 0.1% HCOOH increased the fumonisins signals five-fold (see FB1 and FB2, **Fig. 1**) and improved the peak shape. Other compounds, such as aflatoxins, also increased their peak area. On the contrary, OTA and thricothecene toxins, like DON, HT-2 and T-2, showed a slight decrease in their signals. ZEN was the only compound that presented a notable suppression under these conditions (around 50%), as the presence of acid in the mobile phase made difficult its ionization in negative mode. Higher HCOOH concentrations were tested, but the results were less satisfactory. Finally, the addition of 0.1% HCOOH to the mobile phase was selected as a compromise for the determination of all mycotoxins.

Different mobile phase flow rates were also tested, selecting 0.3 mL/min as a compromise between sensitivity, resolution and analysis time. Higher flow rates did not allow an adequate sensitivity to be reached with the source design of our QqQ instrument. Retention times are shown in **Table 2**.

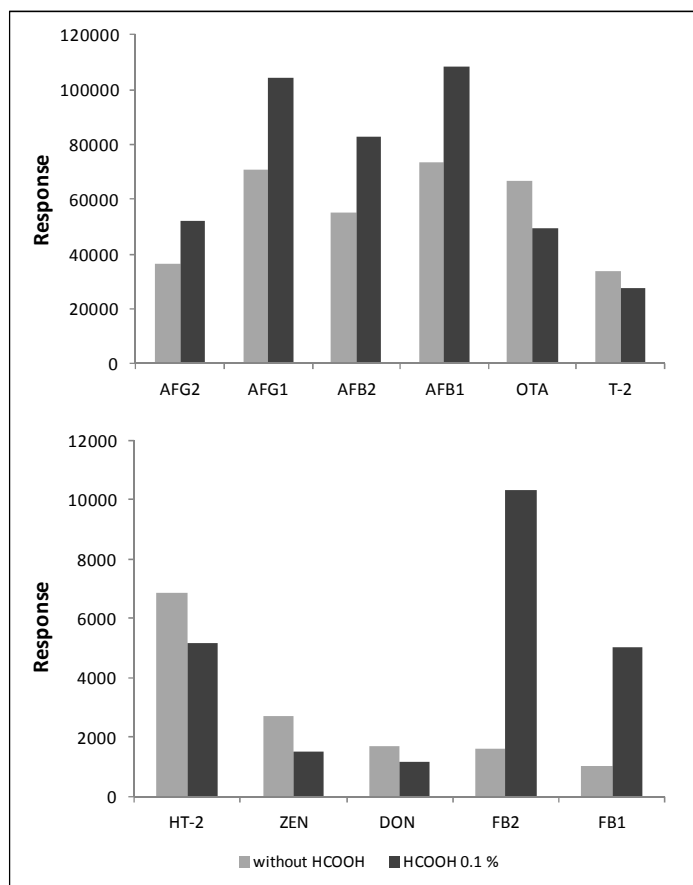


Figure 1. Effect of the addition of formic acid (HCOOH) to the mobile phase on the response of mycotoxins.

3.3. Selection of extraction solvent

The determination of compounds with a wide range of physicochemical properties requires an especial effort to optimize the extraction step. To select an adequate extraction solvent, different mixtures of water/organic solvents at different ratios were tested. The use of the modifier HCOOH at different percentages was also assayed.

The best results were obtained when using ACN as organic solvent. The mixture water/ACN (50:50) presented low recoveries for the selected analytes, but higher ratios of organic solvent improved the efficiency of extraction. After testing several ratios, the best results corresponded to water/ACN (20:80), obtaining satisfactory recoveries (>70%) for all compounds with the exception of FB1 and FB2. The use of mixtures of water/methanol led to worse extraction efficiency, especially in the case of aflatoxins.

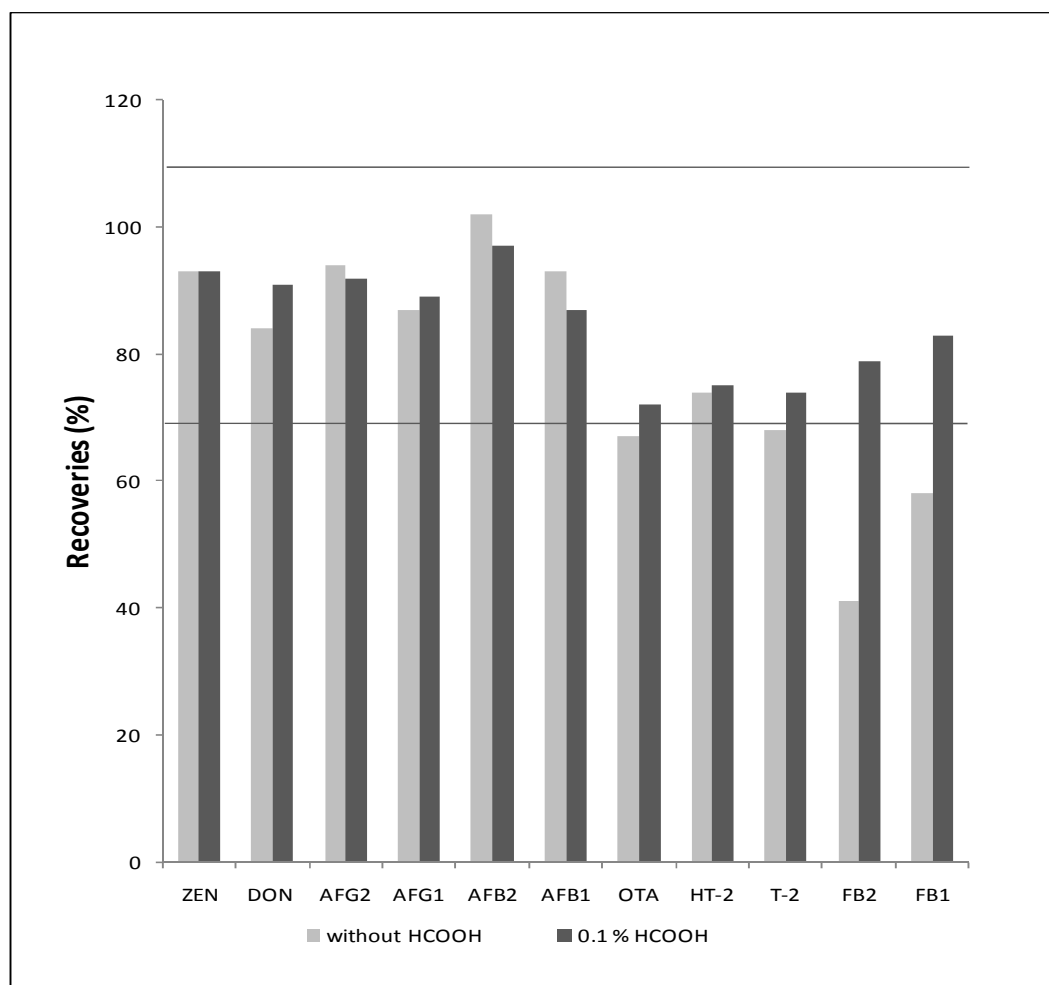


Figure 2. Effect of pH on the extraction efficiency of mycotoxins from maize kernels spiked at 200 µg/kg. Extraction solvent ACN/water (80:20)

To improve the extraction of fumonisins, we evaluated the addition of acetic acid and formic acid to the extraction solvent.^{17, 23} After testing different acid percentages in the extraction solvent, the addition of 0.1% HCOOH was selected as a compromise for all analytes. As an illustrative example, when using 0.1% HCOOH the recoveries of FB1 and FB2 in maize increased from 63% and 42% (without HCOOH) to 82% and 80%, respectively (**Fig. 2**).

3.4. Matrix effects

Reduction of sample treatment in a multitoxin method entails the possibility of analytical problems due to the co-elution of matrix components, i.e. matrix effects. Matrix effects can affect the ionization efficiency of the analytes, leading to suppression or enhancement of the signal depending on the analyte/matrix combination. Obviously, this affects the quantification, unless matrix effects are removed or compensated.

In order to evaluate matrix effects, the signal suppression-enhancement (SSE) for each analyte in each matrix was calculated, defined as the percentage of the matrix-matched calibration slope divided by the slope of the standard calibration in solvent.^{10, 16}

$$\text{SSE} = (\text{slope matrix-matched calibration} / \text{slope standard calibration in solvent}) \times 100$$

For this objective, blank sample extracts were fortified to obtain a matrix-matched standard calibration for every matrix. The matrix-matched curves slopes were compared with that of the calibration standards in solvent. Results are shown in **Table 3**, where it can be seen that notable signal suppression occurred for aflatoxins, mainly in maize. In general, matrix effects for all analytes were more important in maize in comparison to the other matrices. In dry pasta and babyfood samples, SSE values were within the range 60–120%. According to our results the use of matrix-matched standards calibration was required for the correct quantification of analytes, mainly for aflatoxins.

Table 3. Signal suppression/enhancement (SSE) for selected mycotoxins in different food matrices

Compounds	SSE (%)		
	Maize Kernels	Dry Pasta (Wheat)	Eight-Multicereal babyfood
Aflatoxin G2 (AFG2)	46%	84%	81%
Aflatoxin G1 (AFG1)	32%	78%	78%
Aflatoxin B2 (AFB2)	16%	71%	69%
Aflatoxin B1 (AFB1)	24%	68%	63%
Deoxynivalenol (DON)	79%	74%	68%
Ochratoxin A (OTA)	83%	97%	95%
HT-2 Toxin (HT-2)	84%	121%	112%
T-2 Toxin (T-2)	64%	87%	91%
Fumonisin B2 (FB2)	114%	111%	109%
Fumonisin B1 (FB1)	142%	115%	116%
Zearalenone (ZEN)	56%	90%	95%

SSE = (Slope matrix-matched calibration/slope standard calibration in solvent)/100.

3.5. Method validation

Matrix-matched standards calibration showed good linearity in the studied range (0.05–100 ng/mL for aflatoxins and OTA, and 1–100 ng/mL for the rest of compounds) with correlation coefficients ≥ 0.99 in all sample matrices.

The method was validated for the three food matrices selected in this work (maize, dry pasta and babyfood cereals), by spiking blank samples at different concentration levels in quintuplicate. The objective was to reach a validated level in compliance with the maximum value allowed by the European Commission (**Table 1**). DON was validated only at 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, whereas HT-2, T-2, FB1 and FB2 were validated at 20 and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Aflatoxins and OTA were validated at three levels (2, 20 and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$). An additional fourth level, 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, was included for aflatoxins and OTA in baby food, due to the lower levels tolerated in this matrix. As stated before, the 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ level could not be reached for aflatoxin B1, requiring higher

sensitivity in this particular case, possibly by pre-concentrating¹¹ and/or purifying sample extracts.

Accuracy and precision were estimated by means of recovery experiments at different spiking levels. The results obtained were satisfactory in the three matrices, with most of recoveries between 70–110% and RSDs below 20% (**Table 4**).

The specificity of the method was tested by the analysis of blank samples. No peaks were observed in any of the matrices at the same retention time as target mycotoxins, indicating that there were no matrix compounds that might give a false positive signal in the samples.

The lowest level validated for each compound with satisfactory precision and recovery was 20 µg/kg for HT-2, T-2, FB1, FB2 and ZEN in the three food matrices. For aflatoxins and OTA, this value could be lowered down to 2 µg/kg (maize and dry pasta) and to 0.5 µg/kg (babyfood). The poorest sensitivity was for DON that could only be validated at 200 µg/kg as the lowest level. To support these data, **Fig. 3** shows illustrative chromatograms for each compound at the lowest concentration validated in the three matrices evaluated. For the first eluting compound (DON), a slightly peak broadening was observed in maize and dry pasta matrices. Estimated LODs and LOQs were calculated for S/N ratios of 3 and 10, respectively, from the SRM chromatograms of samples spiked at the lowest level tested. LODs in the three matrices were found to be between 0.1 and 1 µg/kg, and LOQs ranged between 0.3 and 3.5 µg/kg. The exception was HT-2 (LOD 2–5 µg/kg, LOQ 6.5–15 µg/kg) and the less sensitive DON (LOD 25–45 µg/kg, LOQ 80–150 µg/kg) (**Table 4**).

Table 4. Validation of the UHPLC/MS/MS method for the determination of selected mycotoxins. Mean recoveries (%) and relative standard deviations (%; in brackets) of the overall analytical procedure (n = 5) at the validated levels. Estimated limits of quantification (LOQ) and detection (LOD)

Compound	Maize Kernels				Dry Pasta (Wheat)				Eight-multicereals baby/food						
	200 µg/kg	20 µg/kg	2 µg/kg	LOQ (µg/kg)	LOD (µg/kg)	200 µg/kg	20 µg/kg	2 µg/kg	LOQ (µg/kg)	LOD (µg/kg)	200 µg/kg	20 µg/kg	2 µg/kg	LOQ (µg/kg)	LOD (µg/kg)
Aflatoxin G ₂ (AFG2)	99 (7)	91 (5)	96 (19)	1.5	0.4	92 (3)	79 (5)	75 (12)	0.3	0.1	104 (4)	86 (4)	93 (8)	91 (23)	0.3
Aflatoxin G ₁ (AFG1)	88 (5)	98 (3)	101 (11)	0.3	0.1	88 (2)	77 (6)	73 (6)	0.3	0.1	106 (3)	82 (5)	93 (6)	88 (13)	0.5
Aflatoxin B ₂ (AFB2)	101 (5)	89 (12)	120 (21)	2.5	0.7	91 (3)	76 (6)	73 (10)	0.6	0.2	104 (5)	81 (4)	96 (9)	63 (24)	0.5
Aflatoxin B ₁ (AFB1)	94 (5)	96 (8)	108 (23)	0.7	0.2	87 (3)	69 (7)	76 (11)	0.3	0.1	95 (7)	67 (11)	76 (14)	61 (27)	0.3
Deoxynivalenol (DON)	86 (15)	n.a.	n.a.	150	45	92 (10)	n.a.	n.a.	80	25	73 (13)	n.a.	n.a.	n.a.	80
Ochratoxin A (OTA)	70 (9)	75 (13)	81 (12)	1	0.3	85 (3)	64 (5)	64 (18)	0.3	0.1	98 (7)	76 (13)	104 (13)	102 (14)	0.3
HT-2 Toxin (HT-2)	96 (11)	102 (11)	n.a.	6.5	2	93 (7)	84 (9)	n.a.	6.5	2	103 (8)	85 (9)	n.a.	n.a.	15
T-2 Toxin (T-2)	72 (9)	71 (18)	n.a.	3.5	1	85 (8)	62 (17)	n.a.	3.5	1	99 (7)	71 (15)	n.a.	n.a.	3.5
Fumonisin B ₂ (FB2)	82 (20)	72 (8)	n.a.	3.5	1	93 (5)	113 (16)	n.a.	3.5	1	100 (3)	114 (6)	n.a.	n.a.	3.5
Fumonisin B ₁ (FB1)	90 (12)	58 (4)	n.a.	3.5	1	102 (3)	101 (10)	n.a.	3.5	1	91 (6)	104 (5)	n.a.	n.a.	3.5
Zearalenone (ZEN)	66 (7)	61 (8)	n.a.	3.5	1	88 (10)	87 (15)	n.a.	1.5	0.5	103 (12)	79 (11)	n.a.	n.a.	1.5

n.a.: not applicable

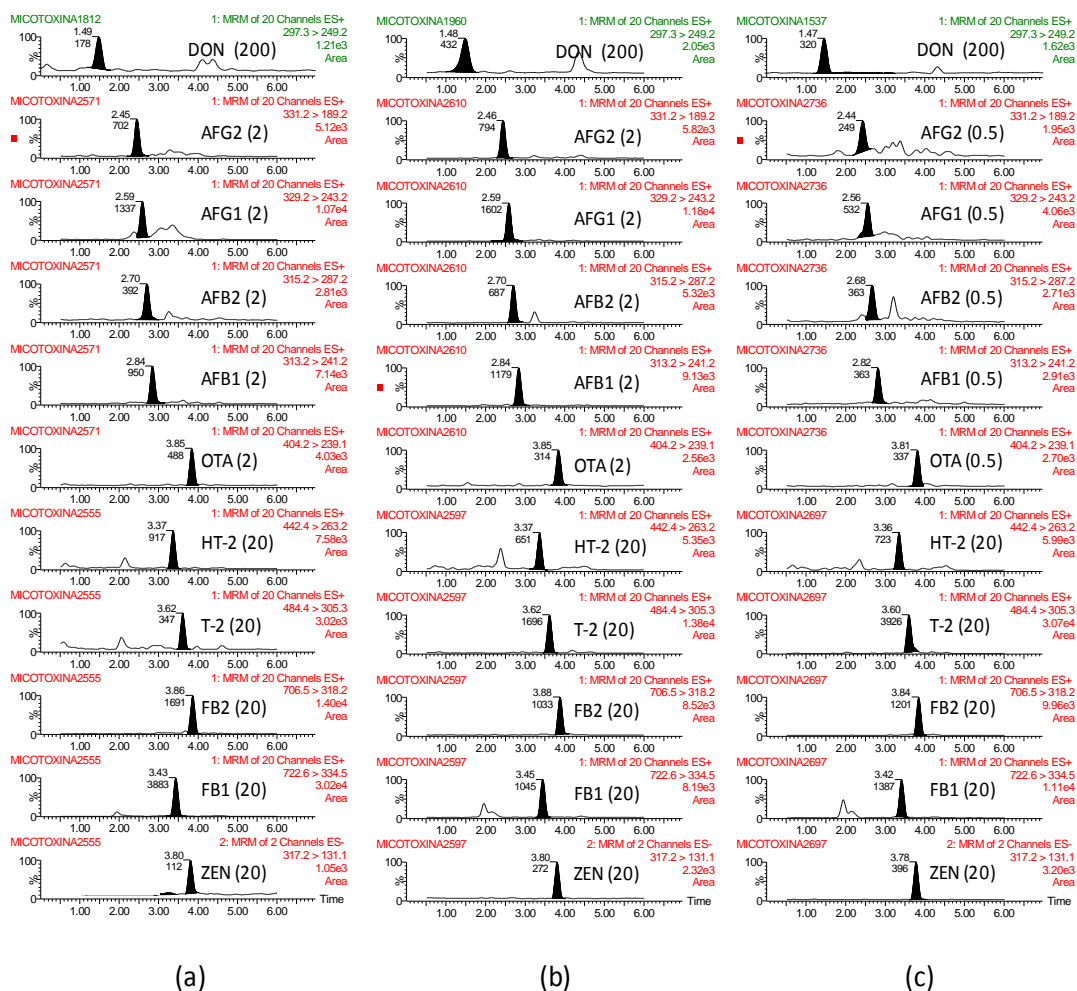


Figure 3. UHPLC/MS/MS chromatograms for the eleven mycotoxins in (a) maize kernels, (b) dry pasta, and (c) eight-multicereal babyfood, at the lowest level validated (in brackets, expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$).

3.6. Application to samples

The validated method was applied to the analysis of several samples provided by the Laboratory of Public Health (Valencia, Spain) and others acquired at local markets. In total, 18 samples were analyzed; five of them corresponded to maize; six samples corresponded to wheat in different kinds of dry pasta; the remaining seven were multicereal babyfood. All the samples analyzed were commercial products.

Only 3 out of 18 samples showed mycotoxin contamination, and the three corresponded to maize kernels. These positive samples showed contamination by fumonisins (FB1 and FB2), thricothecenes (DON, T-2 toxin and HT-2 toxin), OTA and ZEN.

As an example, **Fig. 4(b)** illustrates the positive findings of fumonisins in a maize sample, which contained 528 $\mu\text{g}/\text{kg}$ FB1 and 130 $\mu\text{g}/\text{kg}$ FB2. The presence of OTA and ZEN was also confirmed, although at lower concentrations. **Figure 4(c)** shows the presence of DON (814 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and HT-2 toxin (34 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in another maize sample, as well as the OTA and T-2 at lower concentrations. All positive findings were confirmed by accomplishment of the Q/q ratios (deviations were between the limits established by the European Union),^{25, 26} as well as by agreement of retention time, with deviations lower than 2.5% in respect to a reference standard. As an example, **Fig. 5** shows the confirmation of several mycotoxins in a positive sample. Their ion ratios were calculated (**Fig. 5(b)**) and compared to those obtained from reference standards (**Fig. 5(a)**). In all positives, deviations were lower than 15%, which was below the maximum tolerance accepted.²⁵ Regarding retention times, deviations were lower than 0.6%.

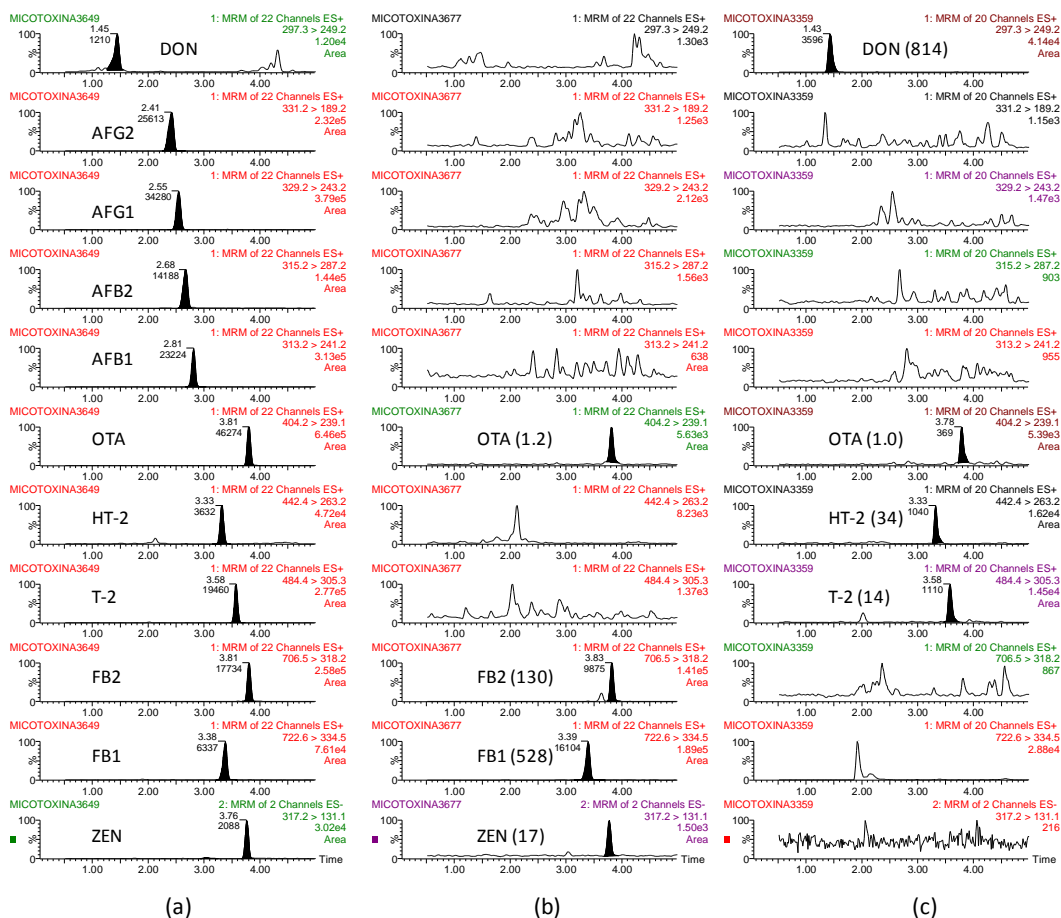


Figure 4. Application to samples. UHPLC/MS/MS chromatograms corresponding to: (a) blank maize kernels sample spiked at 200 µg/kg, (b) maize kernels sample 1, and (c) maize kernels sample 3. Concentration expressed in µg/kg (in brackets).

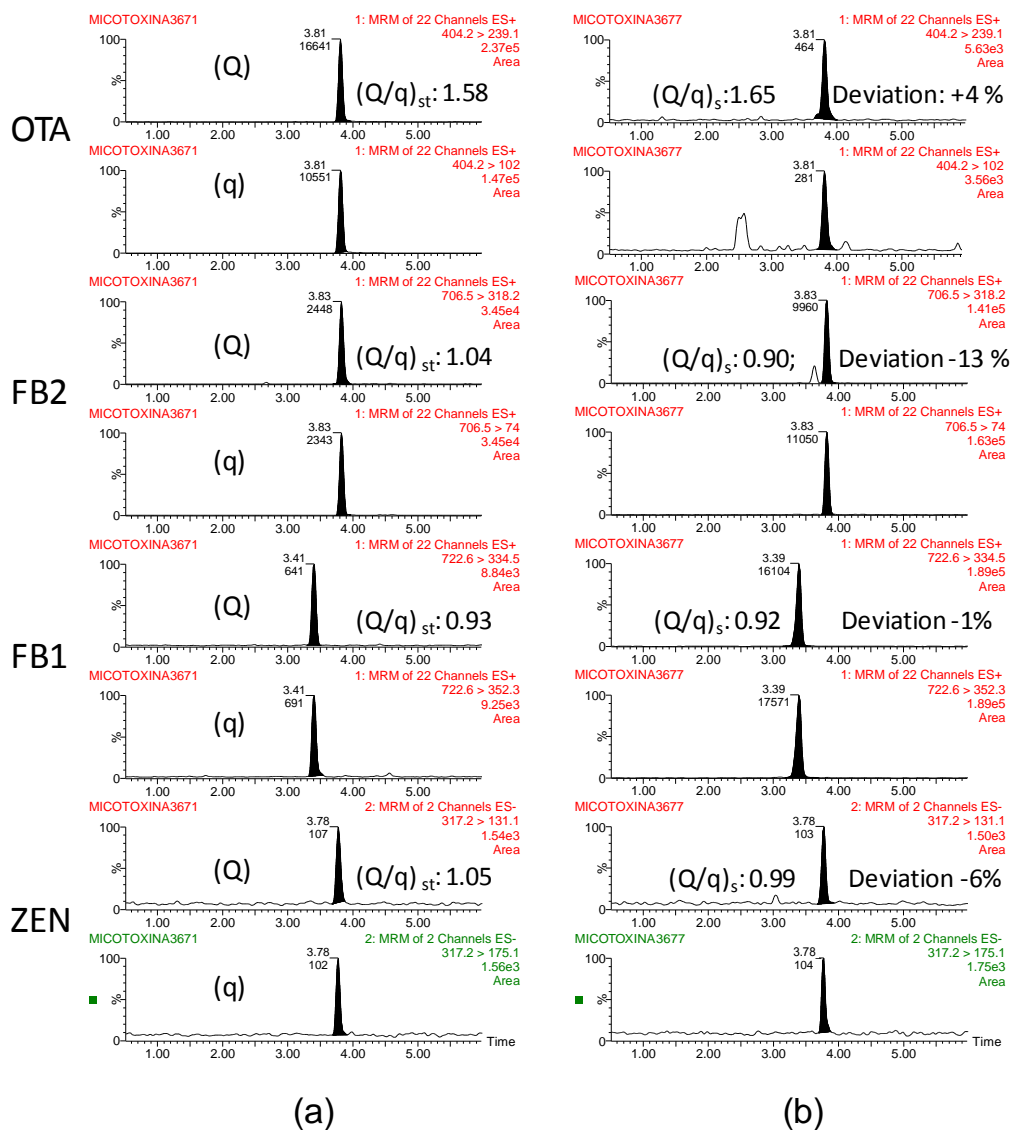


Figure 5. Confirmation of a positive maize kernels sample by the accomplishment of Q/q ratios. LC/MS/MS chromatograms corresponding to: (a) standard 20 µg/L and (b) sample positive for OTA, FB2, FB1 and ZEN.

4. Conclusions

A multianalyte UHPLC/MS/MS method has been developed for the fast and reliable screening, quantification and confirmation of eleven mycotoxins in cereals and babyfood. The proposed methodology allows the simultaneous determination of analytes with very different physicochemical properties in a single chromatographic run in less than 5 min. The high selectivity of the triple quadrupole analyzer allows the minimization of sample treatment, facilitating the determination of all analytes without the need to apply a SPE cleanup that might restrict the multiresiduality of the method. In addition, the fast switching of positive-negative ionization mode has allowed the simultaneous determination of positively and negatively ionized compounds, avoiding additional injections into the LC/MS/MS system.

The use of matrix-matched standards calibration has led to accurate quantification without the need to use isotope-labelled internal standards. Two SRM transitions have been acquired per compound, allowing in this way a safe identification of the compounds detected in samples.

The method has been validated, in three food matrices (maize, dry pasta and multicereal babyfood), obtaining satisfactory accuracy and precision for most of analyte/matrix combinations, supporting the applicability of the method taking into account the maximum levels of mycotoxins fixed by the EC in foodstuff.

Present research is focused on aflatoxin B1 and its metabolite aflatoxin M1 in order to reach the sensitivity required for babyfood analysis, accordingly to the very low concentration levels admitted by the EC.

Acknowledgements

The authors are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using the UPLC-TQD mass spectrometer and to Laboratory of Public Health, Valencia for its financial support and for providing the samples. The authors acknowledge the financial support from the Generalitat Valenciana (Plataforma de Seguridad Alimentaria, Project A-07/08). E.B. is grateful to Universitat Jaume I for his pre-doctoral grant.

References

1. Bennett JW, Klich M. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; 16: 497.
2. Hussein HS, Brasel JM. *Toxicology* 2001; 167: 101.
3. Songsermsakul P, Razzazi-Fazeli E. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 2008; 31: 1641.
4. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 56, Some natural occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic aromatic Amines and Mycotoxins, International Agency for research on Cancer, Lyon, 1993.
5. Commission Regulation 2006/1881/EC European Commission (2006) setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Brussels, 2006.
6. Commission Regulation 2007/1126/EC European Commission (2007) amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products , Brussels, 2007
7. Sforza S, Dall'Asta C, Marchelli R. *Mass Spectrom. Rev.* 2006; 25: 54.
8. Zöllner P, Mayer-Helm B. *J. Chromatogr. A* 2006; 1136: 123.

9. Kokkonen M, Jestoi M, Rizzo A. *Food Addit. Contam.* 2005; 22: 449.
10. Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006; 20: 2649.
11. Spanjer MC, Rensen PM, Scholten JM. *Food Addit. Contam.* 2008; 25: 472.
12. Krska R, Molinelli A. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 387: 145.
13. Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 389: 1505.
14. Pozo OJ, Barreda M, Sancho JV, Hernández F, Lliliberia J, Cortés MA, Bagó B. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 389: 1765.
15. Sancho JV, Pozo OJ, López FJ, Hernández F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002; 16: 639.
16. Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. *Food Addit. Contam.* 2007; 24: 1184.
17. Faberi A, Foglia P, Pastorini E, Samperi R, Laganà A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; 19: 275.
18. Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, Wang Z. *J. Chromatogr. A* 2007; 1143: 48.
19. Ibáñez M, Sancho JV, Hernández F, McMillan D, Rao R. *TrAC – Trends Anal. Chem.* 2008; 27: 481.
20. Richardson SD. *Anal. Chem.* 2008; 80: 4373.
21. Ventura M, Guillén D, Anaya I, Broto-Puig F, Lliliberia JL, Agut M, Comellas L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006; 20: 3199.

22. Commission Regulation 2006/401/EC European Commission (2006), laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Brussels, 2006.

23. Sørensen LK, Elbæk TH. *J. Chromatogr. B* 2005; 820: 183.

24. Berthiller F, Schuhmacher R, Buttinger G, Krska R. *J. Chromatogr. A* 2005; 1062: 209.

25. Commission Decision 2002/657/EC European Commission (2002) Implementing Council Directive 92/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Brussels, 2002.

26. Pozo OJ, Sancho JV, Ibáñez M, Hernández F, Niessen WMA. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2006; 25: 1030.

2.2.1.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

En el presente trabajo se ha desarrollado metodología basada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para la determinación de las micotoxinas reguladas por la Unión Europea. Desde un punto de vista químico, este grupo de tóxicos presentan una elevada heterogeneidad, por lo que su determinación requirió alcanzar un compromiso que permitiera la determinación de todos los compuestos simultáneamente.

Únicamente la micotoxina patulina, regulada en matrices tales como frutas y zumos de frutas, no fue incluida en esta metodología debido a la especificidad de las matrices en las cuales es necesaria su determinación así como por su elevada polaridad, la cual se

traducía en una insuficiente retención en la columna cromatográfica. Además algunos autores han comentado extracciones no satisfactorias con las mezclas de extracción habitualmente utilizadas en métodos multianalito (Sulyok, Berthiller, Krska & Schuhmacher, 2006, Spanjer, Rensen & Scholten, 2008). Por este motivo, el caso de la patulina se ha tratado de modo individual en el **artículo científico 4**.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó un analizador de triple cuadrupolo TQD[®] (Waters) que gracias a su celda de colisión basada en la tecnología T-Wave permite adquisiciones más rápidas, consiguiendo la determinación simultánea de un mayor número de transiciones sin pérdida considerable de sensibilidad. Además permite realizar cambio de ionización positivo-negativo en tan solo 20 ms, lo cual le confiere la capacidad de poder determinar simultáneamente compuestos ionizados en modo positivo y negativo sin la necesidad de realizar 2 inyecciones.

El primer paso llevado a cabo fue la optimización de las condiciones espectrométricas de cada uno de los compuestos. La mayoría de los compuestos presentaron ionización en modo positivo, a excepción de la zearalenona, la cual se ionizó en modo negativo. En el grupo de las aflatoxinas se observó la presencia de aductos de sodio que reducían la señal del aducto protonado. Con el objetivo de minimizar la abundancia de estos aductos de sodio, se añadió una pequeña cantidad de acetato amónico, la cual favoreció la abundancia de las moléculas protonadas frente a los aductos sodiados. En el grupo de los tricotecenos A (toxinas T-2 y HT-2), también se formaron aductos sodiados. En este caso, con la adición de acetato amónico no se observó la formación del ión protonado, sino que se formaron sus correspondientes aductos de amonio. Por lo que respecta al deoxinivalenol (tricoteceno grupo B), se estudió su ionización tanto en modo positivo como en negativo (Kokkonen & Jestoi, 2009, Sørensen & Elbæk, 2005, Vishwanath, Sulyok, Labuda, Bicker & Krska, 2009). Los mejores resultados se obtuvieron bajo ionización positiva, monitorizando el ión protonado y su correspondiente aducto de amonio.

Una vez conocidos los iones precursores, se estudió la fragmentación de los compuestos, seleccionando 2 iones producto por compuesto, intentando evitar la selección de iones debidos a pérdidas no específicas como por ejemplo H₂O o CO₂.

Después de estudiar las condiciones espectrométricas, se procedió a optimizar la cromatografía. Para realizar la separación cromatográfica se utilizó una columna de 5 cm con relleno C18 y tamaño de partícula de 1.7 µm (Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm, Waters). La utilización de una columna UHPLC permitió la separación cromatográfica de los compuestos en menos de 5 minutos. Para realizar la separación se utilizó como fase móvil agua:metanol en modo gradiente. La adición de acetato amónico fue necesaria para favorecer la formación de los aductos protonados y amoniados comentados anteriormente en la optimización espectrométrica. Se determinó que la concentración óptima que favorecía la formación de los aductos protonados y amoniados, especialmente en el caso de aflatoxinas y deoxynivalenol, sin observarse supresión de la señal era de tan sólo 0.5 mM en acetato amónico. Además, la adición de esta sal mejoró la cromatografía de gran número de compuestos, y en especial las aflatoxinas, mostrando picos cromatográficos más estrechos que los obtenidos sin modificador. Concentraciones superiores produjeron supresión de la ionización. Por otra parte, la acidificación de la fase móvil con ácido fórmico favoreció la protonación de las fumonisinas, mostrando un aumento de 5 veces en la señal. Aunque se probaron diferentes concentraciones de ácido, finalmente se alcanzó una situación de compromiso añadiendo un 0.1 % de ácido fórmico tanto en la fase orgánica como en la acuosa. Concentraciones superiores de ácido mostraron una ligera supresión de la señal para la ocratoxina A y los compuestos pertenecientes al grupo de tricotecenos. Asimismo, la zearalenona fue el compuesto que mostró mayor dependencia a la adición de ácido al presentar ionización en modo negativo. Se observó que la señal se redujo un 50 % debido a la acidificación de la fase móvil.

Con respecto al flujo de la fase móvil, se decidió trabajar a 0.3 mL/min, a pesar de no ser las condiciones idóneas de trabajo en UHPLC. La utilización de separaciones

cromatográficas más rápidas se descartó debido a la no idoneidad de la fuente de ionización disponible en el TQD de trabajar a flujos más elevados, produciéndose una pérdida de sensibilidad debido a una ineficaz desolvatación.

Para la extracción de las micotoxinas en las matrices seleccionadas se estudió el uso de diferentes mezclas de disolventes orgánicos (MeOH y ACN) con agua en diferentes proporciones, añadiendo modificadores de pH así como sin su adición. La técnica de extracción seleccionada fue la extracción mediante agitación mecánica. Se prefirió la utilización de mezclas ACN:H₂O frente al uso de MeOH:H₂O ya que se observó que la eficiencia de extracción en muestras fortificadas era mayor, especialmente en el caso de las aflatoxinas. En vista de los resultados obtenidos se decidió utilizar la mezcla ACN:H₂O (80:20) acidificada al 0.1 % con HCOOH. La acidificación de la mezcla de extracción resultó imprescindible para mejorar la extracción de las fumonisinas. Aunque algunos autores comentan que la extracción de las fumonisinas es variable dependiendo de la matriz estudiada, se puede ver que la extracción de estos compuestos se ve mejorada mediante la acidificación del disolvente de extracción (Desmarchelier, Oberson, Tella, Gremaud, Seefelder & Mottier, 2010, Sulyok, Berthiller, Krska & Schuhmacher, 2006). En aquellos trabajos en los que se han utilizado mezclas no acidificadas, los valores de extracción para fumonisinas han sido muy bajos (Lattanzio, Solfrizzo, Powers & Visconti, 2007, Spanjer, Rensen & Scholten, 2008, Sulyok, Berthiller, Krska & Schuhmacher, 2006, Martos, Thompson & Diaz, 2010), llegando en ocasiones a no ser incluidas estas micotoxinas en la metodología .

La utilización de técnicas de *clean-up* se descartó desde un primer momento debido a la gran diversidad química de los compuestos a determinar. Por tanto la extracción y posterior dilución de los extractos para ser inyectados en el sistema cromatográfico fue la opción elegida. En estas metodologías en las que el tratamiento de muestra se reduce al mínimo es común sufrir los indeseables problemas asociados al efecto matriz que deben ser estudiados en detalle para cada combinación de analito-matriz.

La evaluación del efecto matriz se realizó mediante comparación de las pendientes obtenidas en curvas de calibrado preparadas en solvente y en extracto blanco de matriz. Valores inferiores a uno en la relación entre pendiente en matriz y solvente indicaron supresión iónica, mientras que valores superiores fueron debidos a exaltación en la fuente. De modo general y como se aprecia en la **Tabla 3** del **Artículo científico 1**, se observaron los mayores efectos matriz en el maíz. Los compuestos que presentaron mayor efecto matriz fueron las aflatoxinas. Este hecho puso de manifiesto la necesidad de corregir el efecto matriz mediante el uso de calibrados en matriz ya que no se disponía de patrones internos marcados isotópicamente.

Para la validación de la metodología se utilizaron los criterios establecidos por la guía SANCO referente a la validación y aseguramiento de la calidad en el análisis de plaguicidas en muestras alimentarias y piensos (European Commission, 2009). Se evaluó la linealidad de las curvas de calibrado, la especificidad del método, así como la precisión y exactitud del método. En el caso de la exactitud, se estableció que las recuperaciones debían estar dentro del rango 70-110%, siendo este criterio ligeramente más restrictivo que el establecido en la guía. La metodología fue validada a 2 niveles de concentración (20 y 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) para todos los compuestos estudiados a excepción del deoxinivalenol, que únicamente fue validado al nivel superior. Asimismo, aflatoxinas y ocratoxina A se validaron a 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las tres matrices estudiadas y adicionalmente, en el caso de papilla multicereales, a 0.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ debido a que la legislación es más restrictiva para estos compuestos en alimentos destinados a bebés y niños de corta edad. Los resultados de validación pueden encontrarse en la **Tabla 4** del **Artículo científico 1**, observándose que los valores de recuperación obtenidos estuvieron para la mayoría de compuestos en el rango 70-110%, con RSDs inferiores al 20%. Únicamente, en el caso de los compuestos validados a concentraciones sub- $\mu\text{g}/\text{Kg}$ se observaron recuperaciones ligeramente inferiores con desviaciones estándar mayores, aunque en todos los casos cumpliendo con los criterios de validación establecidos en la legislación específica de análisis de micotoxinas en alimento (Reglamento 2006/401/CE).

Los límites de detección y cuantificación fueron estimados en muestras fortificadas al nivel más bajo validado según la relación señal/ruido (S/N) de 3 y 10, respectivamente. Como puede observarse en el caso de la aflatoxina B1, esta metodología no permitió la detección de este contaminante a la concentración exigida por la legislación en alimentos infantiles (Reglamento 2006/1881/CE). Por ello, en el **Artículo científico 3** se presenta la aproximación llevada a cabo para alcanzar este nivel mediante el uso de técnicas de preconcentración.

El método se aplicó a un total de 18 muestras, entre las cuales se detectaron positivos en 3 de ellas. En ningún caso se encontraron concentraciones por encima de los valores máximos permitidos por la legislación, aunque cabe destacar la detección de micotoxinas del género *Fusarium* en muestras de maíz. Así, se detectó en maíz 814 µg/Kg de deoxynivalenol simultáneamente con toxina HT-2 (34 µg/Kg) y trazas de toxina T2 y ocratoxina A. En otra muestra de maíz estudiada se detectó la presencia de fumonisinas B1 y B2, simultáneamente con ocratoxina A y zearalenona. La presencia de fumonisina en cereales, y más en concreto en muestras de maíz comercializadas en España, ha sido estudiada en diferentes trabajos, en los que se detectan niveles de contaminación semejantes a los detectados en este trabajo (Ariño, Estopañan, Juan & Herrera, 2007, Rubert, Soriano, Mañes & Soler, 2013, Silva et al., 2009).

Por último cabe destacar que todas las muestras positivas detectadas fueron confirmadas según los criterios de confirmación establecidos tanto por las guías de validación y control de calidad para la determinación de plaguicidas en muestras de origen vegetal como de residuos en muestras de origen animal (European Commission, 2009, Decisión 2002/657/CE). La ausencia de criterios definidos para la confirmación de micotoxinas hizo necesario la adopción de los criterios establecidos para el caso de plaguicidas en el mismo tipo de matrices.

**2.2.2. DESARROLLO DE METODOLOGÍA
ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE
MICOTOXINAS EN MUESTRAS DE
ALIMENTOS PROCEDENTES DE UN ESTUDIO
DE DIETA TOTAL**

2.2.2.1 INTRODUCCIÓN

Los Estudios de Dieta Total (EDT) constituyen una herramienta de gran valor para la estimación de la exposición a diferentes sustancias químicas a través de la dieta. Un EDT consiste en adquirir al por menor alimentos que se consumen comúnmente, procesarlos como si fueran a consumirse y analizarlos para conocer el posible contenido de sustancias químicas peligrosas y/o nutrientes. Por ello resultan de una gran utilidad en la evaluación de riesgos alimentarios causados por la presencia de contaminantes en alimentos. Este tipo de estudios tratan de reproducir las prácticas habituales de los consumidores, por lo que la selección de alimentos se realiza en función de los hábitos alimentarios característicos de la población estudiada.

La finalidad de los análisis en EDT es conocer la concentración a la que se encuentra cada una de las sustancias analizadas. Así, a diferencia de los sistemas de

control de alimentos en los que se pretenden determinar si ciertos contaminantes se encuentran por debajo o por encima del límite legal establecido, en los estudios de dieta total se pretende detectar y cuantificar la presencia de dichos contaminantes. Por ello, los métodos analíticos deben presentar una elevada sensibilidad y selectividad para poder realizar la detección de manera precisa a los niveles de concentración más bajos posibles. Uno de los aspectos más destacables sobre los estudios de EDT es que el resultado de los estudios son normalmente la fuente de datos más precisa y fiable de la exposición crónica a contaminantes (EFSA, 2011).

Aunque la utilización de los EDT para la estimación de la presencia de contaminantes en alimentos es una metodología llevada a cabo desde hace varias décadas, las micotoxinas no fueron estudiadas en los estudios iniciales debido a la ausencia de metodologías analíticas suficientemente sensibles que permitieran su detección a niveles cuantificables. No fue hasta mediados de los años 90 cuando gracias a la introducción de una etapa de “*clean up*” mediante el uso de columnas de inmunoafinidad fue posible la determinación de ocratoxina A, aflatoxina B1 y aflatoxina M1 en muestras de un estudio de dieta total (Sizoo & Van Egmond, 2005).

Por todo ello, la utilización de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas parece ser la herramienta ideal para realizar el análisis de micotoxinas en muestras de EDT, pues permite la determinación simultánea de un grupo amplio de micotoxinas en un simple análisis a niveles de concentración relativamente bajos. Sin embargo, la aplicación de métodos multi-micotoxinas en EDT o estudios específicos para la evaluación de riesgos es aún limitada (Serrano, Font, Ruiz & Ferrer, 2012). Como puede observarse en publicaciones recientes basadas en análisis de micotoxinas para la evaluación de riesgos, se continúan utilizando técnicas específicas para la determinación de cada grupo de micotoxinas (Cano-Sancho, Gauchi, Sanchis, Marín & Ramos, 2011, Sirot, Fremy & Leblanc, 2013).

En el trabajo que se presenta a continuación, **Artículo científico 2**, se muestra la ampliación del método analítico desarrollado en el **Artículo científico 1**, mediante la inclusión de nuevas micotoxinas. La metodología se lleva a cabo en un instrumento de nueva generación, el cual, gracias a las mejoras introducidas en el proceso de desolvatación y transmisión de iones, muestra una mejora de la sensibilidad frente a instrumentos previos. Asimismo, se demuestra la aplicabilidad de dicha metodología para la determinación de micotoxinas en un amplio abanico de matrices mediante su validación. En esta publicación se introduce la adquisición de 3 transiciones SRM por compuesto con el objetivo de aumentar la fiabilidad de los resultados y evitar reportar falsos positivos. Finalmente, el análisis de muestras correspondientes a 24 matrices distintas susceptibles de contaminación por micotoxinas procedentes de un estudio de dieta total permitió obtener información detallada de la presencia de dichos contaminantes de importante relevancia para establecer la evaluación de riesgos.

2.2.2.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 2

Analytica Chimica Acta 783 (2013) 39–48



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

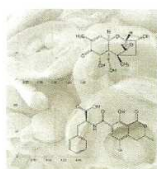
Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study

Eduardo Beltrán^a, María Ibáñez^a, Tania Portolés^a, Cristina Ripollés^a, Juan Vicente Sancho^a, Vicent Yusà^b, Sílvia Marín^b, Félix Hernández^{a,*}^a Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, 12071 Castellón, Spain^b Public Health Research Center of Valencia (CSISP), Avda Catalunya, 21, 46020 Valencia, Spain

HIGHLIGHTS

- Multiclass method for 18 mycotoxins in 24 different matrices.
- UHPLC-MS/MS method has been applied to a total diet study.
- Dilution of the extracts allowed minimizes matrix effects.
- Acquisition of 3 SRM transitions allowed unequivocal confirmation.
- The most detected compounds were DON, FB1 and OTA, mainly in cereals.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 January 2013

Received in revised form 16 April 2013

Accepted 20 April 2013

Available online 1 May 2013

Keywords:

Mycotoxins

Ultra-high performance liquid chromatography

Tandem mass spectrometry

Food analysis

Total diet study

ABSTRACT

A rapid and sensitive method for the determination of 18 mycotoxins in 24 different food matrices has been developed and validated. With the exception of beverages and oil samples, a simple extraction with acetonitrile:water 80:20 (0.1% formic acid) was applied. Fruit juice, wine and beer samples were simply diluted with water containing 0.1% formic acid. Oil samples were partitioned with acetonitrile/hexane in order to remove fats. Analyses were made by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to tandem mass spectrometry with triple quadrupole. Validation was carried out in all selected matrices using blank samples spiked at two analyte concentrations. Extraction recoveries between 70 and 120% and relative standard deviations lower than 20% were obtained for the wide majority of analyte–matrix combinations. Matrix-matched calibration was used for a correct quantification in order to compensate for matrix effects. Limits of quantification were lower than maximum permitted levels for every regulated mycotoxin–matrix combination. The acquisition of three SRM transitions per compound allowed the unequivocal confirmation of positive samples, supported by the accomplishment of ion intensity ratios and retention time when compared with reference standards. The developed methodology was applied to the analysis of 240 samples within a total diet study performed at Comunidad Valenciana (Spain). The most frequently found mycotoxins were deoxynivalenol, fumonisin B1, ochratoxin A and zearalenone at low $\mu\text{g kg}^{-1}$ levels, mainly in bread, breakfast cereals and beer.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mycotoxins are naturally occurring contaminants produced by filamentous fungi as secondary metabolites. All mycotoxins are

low-molecular-weight natural products [1]. Food contaminated by mycotoxins can produce acute and chronic effects, especially hepatic, gastrointestinal, and carcinogenic diseases [2]. Regarding toxicity, aflatoxins have been classified as carcinogenic for humans whilst other mycotoxins as fumonisins and ochratoxin A have been classified as possibly carcinogenic [3].

Current regulations are based on scientific opinions of authoritative organizations such as the FAO/WHO Joint Expert Committee

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368.
E-mail address: felix.hernandez@uji.es (F. Hernández).

Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study

Beltrán E.^a, Ibáñez M.^a, Portolés T.^a, Ripollés C.^a, Sancho, J.V.^a, Marín S.^b, Yusà V.^b, Hernández, F.^a

^a Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

^b Public Health Laboratory of Valencia-CSISP, Valencia, Spain

Abstract

A rapid and sensitive method for the determination of 18 mycotoxins in 24 different food matrices has been developed and validated. With the exception of beverages and oil samples, a simple extraction with acetonitrile:water 80:20 (0.1% formic acid) was applied. Fruit juice, wine and beer samples were simply diluted with water containing 0.1% formic acid. Oil samples were partitioned with acetonitrile/hexane in order to remove fats. Analyses were made by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to tandem mass spectrometry with triple quadrupole. Validation was carried out in all selected matrices using blank samples spiked at two analyte concentrations. Extraction recoveries between 70 and 120% and relative standard deviations lower than 20% were obtained for the wide majority of analyte–matrix combinations. Matrix-matched calibration was used for a correct quantification in order to compensate for matrix effects. Limits of quantification were lower than maximum permitted levels for every regulated mycotoxin–matrix combination. The acquisition of three SRM transitions per compound allowed the unequivocal confirmation of positive samples, supported by the accomplishment of ion intensity ratios and retention time when compared with reference standards. The developed methodology was applied to the analysis of 240 samples within a total diet study performed at Comunidad Valenciana (Spain). The most frequently found mycotoxins were deoxynivalenol, fumonisin B1, ochratoxin A and zearalenone at low $\mu\text{g kg}^{-1}$ levels, mainly in bread, breakfast cereals and beer.

Keywords: Mycotoxins; Ultra-high performance liquid chromatography; Tandem mass spectrometry; Food analysis; Total diet study

Highlights

Multiclass method for 18 mycotoxins in 24 different matrices.

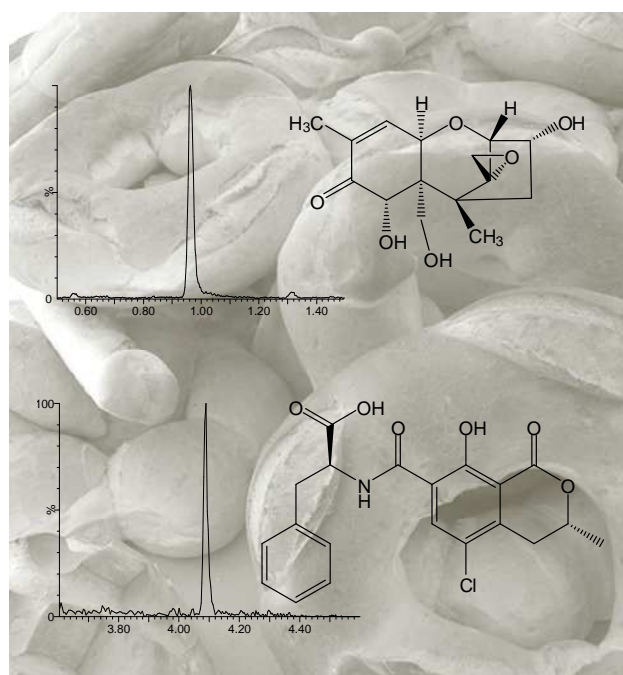
UHPLC-MS/MS method has been applied to a total diet study.

Dilution of the extracts allowed minimizes matrix effects.

Acquisition of 3 SRM transitions allowed unequivocal confirmation.

The most detected compounds were DON, FB1 and OTA, mainly in cereals.

Graphical abstract



1. Introduction

Mycotoxins are naturally occurring contaminants produced by filamentous fungi as secondary metabolites. All mycotoxins are low-molecular-weight natural products [1]. Food contaminated by mycotoxins can produce acute and chronic effects, especially hepatic, gastrointestinal, and carcinogenic diseases [2]. Regarding toxicity, aflatoxins have been classified as carcinogenic for humans whilst other mycotoxins as fumonisins and ochratoxin A have been classified as possibly carcinogenic [3].

Current regulations are based on scientific opinions of authoritative organizations such as the FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives of the United Nations (JECFA) or the European Food Safety Authority (EFSA) [4]. The European Union has established the maximum mycotoxin concentration levels allowed in several food commodities in the Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 [5-7]. Limits as low as few ng g^{-1} have been established for some mycotoxin–matrix combinations. Therefore, the development of sensitive, selective and reliable analytical methods is of major importance to have realistic data on the presence of mycotoxins in foodstuffs.

Liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC) have been the most widely applied techniques for determination of mycotoxins [8-11]. In the last years, the number of LC–MS/MS methods reported for multiclass analysis of mycotoxins in food has increased considerably due to the high selectivity and sensitivity reached, and also because of the compatibility of sample extract's and analyte's physicochemical characteristics with the mobile phases and ionization sources employed in LC–MS/MS [12]. More recently, the introduction of ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) has provided additional advantages in the determination of mycotoxins in foodstuffs [13-21]. The use of columns packed with sub-2 μm particles has allowed obtaining narrower peaks than those obtained with traditional HPLC columns. Faster separations and improved sensitivity have been achieved maintaining similar or even better separation efficiency [22].

One of the main objectives pursued in most laboratories is the application of multi-analyte methods with minimum sample treatment. The so called “dilute and shoot” methods are nowadays feasible thanks to the continuous improvements in analytical instrumentation [14-16, 23, 24]. However, although LC-MS/MS is a powerful technique and the workhorse for most organic pollutants/residues in the food safety and environmental fields, LC-MS/MS methods with little sample treatment are exposed to matrix effects which would lead to notable errors in quantification if they are not properly corrected. Several strategies can be applied to correct matrix effects [25,26]. One of them is to increase the sample treatment with the aim of minimizing the presence of coeluting matrix interferences; however, this approach hampers the application of rapid multianalyte methods due to the wide chemical diversity of toxins. Furthermore, extensive clean-up might be a handicap for application of the same methodology for different matrices. Other common options to compensate for matrix effects are the use of isotopically-labeled internal standards (ILIS) or matrix-matched standard calibration. The use of analyte ILIS seems the ideal approach to compensate for matrix effects [14, 17, 21, 27], however the elevated cost of the internal standards as well as their commercial availability for every analyte hinder its application in multi-residue methods. Matrix-matched calibration seems to be the most feasible and realistic approach in multi-mycotoxin methods to ensure a correct and reliable quantification [15, 16, 24, 28]. In addition, the excellent sensitivity of new-generation of triple quadrupole instruments may allow the dilution of sample extracts to an extent that matrix effects are notably minimized [29].

The aim of this work is to develop and validate a rapid method for the simultaneous determination of 18 mycotoxins (including all EU regulated mycotoxins) in a notable number of food matrices at concentration levels lower than the maximum permitted. For this purpose, UHPLC-MS/MS has been selected as the preferred technique. Selected compounds have been determined in SRM mode, using a state of the art triple quadrupole analyser with a rapid chromatographic separation of only 4.5 min. Sample treatment has been minimized in order to decrease analysis time as well as solvent consumption, reducing undesired losses that might occur along sample treatment. Finally, the developed method has been applied to the analysis

of around 240 samples corresponding to 24 different matrices, susceptible of mycotoxins contamination, collected for a total-diet study carried out at the Valencian region. The selection of food matrices was made to be representative of the diet at this Spanish area. Total Diet Studies (TDSs) are used as a tool for estimating the level of dietary exposure to chemical substances among the general population. It is recognized that the availability and detailed occurrence data for chemicals in food are essential in order to perform risk assessment [30].

2. Experimental

2.1. Reagents

All mycotoxin standards (>99% purity) were supplied by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Neosolaniol ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ in acetonitrile), T-2 triol ($50 \mu\text{g L}^{-1}$ in acetonitrile) and fumonisin B1 and B2 ($50 \mu\text{g L}^{-1}$ in acetonitrile:water (50:50)) were purchased in solution whilst the other mycotoxin reference standards were supplied as powder. HPLC-grade water was obtained from water passed through a MilliQ water purification system (Millipore Ltd., Bedford, MA, USA). HPLC-grade methanol (MeOH), HPLC-grade acetonitrile (ACN), acetic acid (>99.8%) and ammonium acetate (NH_4Ac) (>99%) were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). Formic acid (HCOOH) (>98%) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Individual stock solutions, at around 10 mg L^{-1} , were prepared by diluting the reference standards solutions of NEO, T-2 triol and fumonisins in acetonitrile (abbreviations used for mycotoxins are specified in **Table 1**). For the rest of compounds, individual stock solutions, at around 100 mg L^{-1} , were prepared by dissolving about 1, 5, 10 or 25 mg of solid reference standard in 10, 50, 100 or 250 mL of ACN, respectively. An intermediate mixed solution (MIX A) containing aflatoxins and OTA at a concentration of 0.1 mg L^{-1} was obtained after mixing individual stock solutions and diluting with ACN. A similar procedure was carried out with NEO, FB1, FB2, T-2 triol, DIA, T-2 toxin, and ZEN, at a concentration of 1 mg L^{-1} (MIX B). In the same way, DON, 3AcDON, 15AcDON, HT-2, FUSX and NIV, were mixed in order to obtain a concentration of 10 mg L^{-1} (MIX C). The total mixed standard solution was prepared by adding 1 mL of MIX A, 1 mL of MIX B, and 1 mL of MIX C, and diluting to 10 mL with water. Working standard solutions for LC-MS/MS analysis and

for fortification of samples were prepared by dilution of the total mixed standard solution with water. Stock and intermediate standard solutions were stored in a freezer at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, whereas working solutions were stored in a fridge.

2.2. Instrumentation

An UPLCTM system (Acquity, Waters, Milford, MA, USA) was interfaced to a triple quadrupole mass spectrometer (TQ-S, Waters Micromass, Manchester, UK) using an orthogonal Z-spray-electrospray interface (ESI). The LC separation was performed using an Acquity UPLC BEH C18 analytical column ($1.7\text{ }\mu\text{m}$ particle size, $2.1\text{ mm} \times 50\text{ mm}$; Waters), at a flow rate of $500\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. Mobile phase was a time programmed gradient using A (H_2O $0.1\text{ mM NH}_4\text{Ac}$, 0.01% HCOOH), and B (MeOH $0.1\text{ mM NH}_4\text{Ac}$, 0.01% HCOOH). The percentage of organic modifier (B) was changed linearly as follows: 0 min, 10%; 0.5 min, 20%; 2.5 min, 20%; 4 min, 90%; 4.5 min, 90%; 4.6 min, 10%; 6 min, 10% B. Injection volume was $10\text{ }\mu\text{L}$.

Drying as well as nebulizing gas was nitrogen (Praxair, Valencia, Spain). The gas flow was set to 1200 L h^{-1} and the cone gas to 250 L h^{-1} . For operating in MS/MS mode, collision gas was argon (99.995%; Praxair, Valencia, Spain) with a pressure of approximately $4 \times 10^{-3}\text{ mbar}$ in the collision cell (0.15 mL min^{-1}). Experiments were performed by continuous positive/negative polarity switching (switching time of 0.02 s). Capillary voltages of 3.0 kV (positive ionization mode) and 2.5 kV (negative ionization mode) were applied. The desolvation gas temperature was set to $650\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the source temperature to $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Column temperature was set to $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Automatic dwell times between 3 and 11 ms/transition were used. TargetLynx (MassLynx v. 4.1, Waters, Manchester, UK) software was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from samples.

A mechanical shaker (S.B.S. Instruments S.A, Barcelona, Spain) was used for shaking the sample during extraction. A centrifuge (Consul centrifuge, Orto-Alresa, Madrid, Spain) was used. Nylon filters (Iso-disc, Supelco, $0.22\text{ }\mu\text{m}$) were used for filtering the final extract before injection.

2.3. Samples

The 24 food matrices were classified in four different groups depending on their characteristics: nine were dry matrices (*group 1*), nine were a variety of food matrices, commonly with high water content, and milk products (*group 2*), four were liquid matrices of fruit juice, wine and beer (*group 3*) and, finally, two were matrices with high fat content, concretely oils (*group 4*). These groups were the following:

Group 1: wheat bread, sliced bread, cereals bread, pasta, rice, dried fruits, biscuits, processed baked goods, and breakfast cereals;

Group 2: olives and pickles, apple and pear, eggs, milk, yoghurt, milk shakes and custards, soya products, cheese, and grapes;

Group 3: wine, beer, orange juice, and juices (pineapple, grapes and peaches);

Group 4: olive oil, and sunflower oil.

In addition to the samples used for validation (that were analyzed to test the possible presence of mycotoxins), 240 samples (10 samples per matrix) were analyzed following the developed methodology. Samples were provided by AINIA within a total-diet study performed by the Valencian regional government (Consellería de Sanidad, Generalitat Valenciana).

2.4. Analytical procedure

Sample extraction was based on a previous work [15], with some changes applied when required, e.g. extraction of oils. The approach “dilute and shoot” was tried for all mycotoxin–matrix combinations, trying to avoid sample manipulation and compound losses during sample preparation.

2.4.1. Group 1

2.5 g triturated and homogenized samples were accurately weighed and transferred to centrifuge tubes (50 mL). Samples were extracted by shaking with 10 mL ACN/water (80:20) 0.1% HCOOH on a mechanical shaker for 90 min, and then centrifuged at 4000 rpm for 10 min. Afterwards, the supernatant extract was four-fold diluted with HPLC-grade water, taking an aliquot of 2.5 mL and diluting to 10 mL (final extract contains 0.0625 g sample mL⁻¹).

2.4.2. Group 2

2.5 g of homogenized samples were accurately weighed and transferred to centrifuge tubes (50 mL). Samples were extracted by shaking with 10 mL ACN/water (80:20) 0.1% HCOOH on a mechanical shaker for 90 min. The whole extracting mixture was filtered using a paper filter and the final volume was adjusted to 50 mL with HPLC-grade water (final content 0.05 g sample mL⁻¹).

2.4.3. Group 3

Fruit juice, wine and beer samples were treated as follows: 2.5 g of homogenized samples were accurately weighed. Final volume was adjusted to 25 mL with HPLC-grade water 0.1% HCOOH and then centrifuged at 4000 rpm for 15 min (final content 0.1 g sample mL⁻¹).

2.4.4. Group 4

Olive and sunflower oil samples content were treated as follows: 10 mL of hexane were added to 5 g homogenized samples. Then, the hexane-diluted sample was extracted twice with 10 mL of ACN saturated in hexane. Afterwards, the acetonitrile layer was separated and four-fold diluted with HPLC-grade water, taking an aliquot of 2.5 mL and diluting to 10 mL (final content 0.0625 g sample mL⁻¹).

In all cases, the final diluted extracts were filtered through a 0.22 μm nylon filter and 10 μL were directly injected into the UHPLC–(ESI)MS/MS system.

Samples of *groups 1, 2 and 3*, were spiked for recovery experiments by delivering 1 mL of the corresponding aqueous mixed standard solution to 2.5 g homogenized blank. Fortification levels of 0.4, 4, 40 or 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were obtained, depending on the sensitivity observed for each analyte. Oil samples (*group 4*) were spiked by adding 1 mL of the corresponding mixed standard solution prepared in acetone to 5 g of oil sample in order to yield the fortification levels above mentioned. Spiked samples were equilibrated 1 h prior to extraction.

Matrix-matched standard calibration was used for quantification purposes. Standards in matrix were prepared by adding 100 μL from the corresponding standard solution to 900 μL of the four-fold diluted blank extract.

2.5. Validation study

Method validation was carried out for the 18 selected mycotoxins in all the 24 food matrices under investigation. Compounds were divided into three different groups depending on their intensity response (i.e. sensitivity in the LC–MS/MS measurement): *group A* (high sensitivity; recovery experiments performed at 0.4 and 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$), including aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2, Ocratoxin A; *group B* (medium sensitivity; recovery experiments carried out at 4 and 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$), which includes Neosolaniol, fumonisin B1, fumonisin B2, T-2 triol, T-2 toxin, Diacetoxyscirpenol, Zearalenone, and *group C* (low sensitivity; recovery experiments made at 40 and 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$), containing Nivalenol, Deoxynivalenol, 3AcDON, 15AcDON, Fusarenon X, HT-2 Toxin.

Linearity of the method was evaluated taking at least six matrix-matched standard solutions which were analyzed in duplicate in the following ranges: 0.01–1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the compounds of the *group A*; 0.1–10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for *group B*; and 1–100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for *group C*. It was

considered satisfactory when correlation coefficients were higher than 0.99 with residuals lower than 20%.

Recoveries and precision (repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD) in %) were determined within-day by analyzing spiked blank samples in triplicate at the spiking levels indicated above. Acceptable recoveries and RSDs were established according to Commission Regulation 401/2006/EC [31]. For those compounds with no specific criteria in the regulation, recoveries between 70 and 120% with RSD lower than 20% were required [32].

Limits of quantification (LOQ) as well as limits of detection (LOD) were estimated for a signal-to-noise ratio (S/N) equal to 10 and 3, respectively, from the SRM chromatograms of samples spiked at the lowest concentration level validated.

The specificity of the method was evaluated by analyzing a blank procedure, a processed blank sample and a blank sample spiked at the lowest concentration validated, considering satisfactory results when the signal obtained from blank samples were lower than 30% of the signal at LOQ.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of MS/MS conditions

MS/MS parameters were optimized by chromatography using individual standard solutions of each mycotoxin at concentrations levels of 1, 10 or 100 ng mL⁻¹ depending on the sensitivity of the compound. Experiments were carried out in both positive and negative ionization modes. Firstly, full-scan acquisitions were performed to select the precursor ion and optimum cone voltage. All selected compounds presented higher sensitivity in positive ionization mode with the exception of ZEN, which showed more satisfactory results in negative mode.

Most of the compounds ionized under ESI positive mode presented an abundant $[M+H]^+$ ion. NEO, DIA, HT-2 and T-2 compounds, belonging to the group of thricothecenes A, showed the formation of ammonium adducts $[M+NH_4]^+$, in more abundance than the protonated molecules.

For some mycotoxins, such as aflatoxins, the formation of sodium and potassium adducts was also observed. These undesirable adducts were minimized by the addition of small amounts of ammonium acetate (0.1 mM) in the mobile phase.

In the case of T-2 triol, which only presented the formation of the $[M+Na]^+$ adduct, despite adding different concentrations of NH_4Ac , the formation of the protonated molecule or ammonium adduct was not observed. Therefore, $[M+Na]^+$ was selected as precursor ion for T-2 triol.

Mycotoxins of the group of thricothecenes B (NIV, DON, 3AcDON, 15AcDON and FUSX) were ionized in both negative and positive modes. In negative ionization, the $[M+HCOO]^-$ adduct was predominant, while in positive ionization mode, the $[M+H]^+$ ion was the most abundant. Although some authors have reported negative ionization mode for determination of thricothecenes B [33], in this work positive ionization led to better sensitivity for these compounds, and therefore it was selected for further experiments.

Once the precursor ion was selected, daughter scan acquisitions were performed at different collision energies in order to select product ions and optimum collision energies. Three SRM transitions were acquired for each compound to increase the confidence in the compound identification process. Product ions resulting from non-specific losses (such as H_2O or CO_2 losses) were avoided. The most abundant transition was commonly selected for quantification (Q) and the other two for confirmation purposes (q_i). The acquisition of two transitions is normally sufficient for a safe identification; however, the use of a third transition can be beneficial when dealing with complex analyte/matrix combinations, low analyte concentrations and/or non-specific transitions [34]. Although sodium adducts are not the best option due to their poor fragmentation, for T-2 triol at least monitoring of two product ions

was possible. Pseudo-MS/MS transition of the sodium adduct was selected as the additional confirmative transitions ($405 > 405$) as other product ions were not available.

The use of UHPLC requires fast analyzers, capable of working with very short dwell times as well as inter channel times, obtaining in this way enough points per chromatographic peak. In the new generation triple quadrupole instruments (as the one used in this work), sensitivity and repeatability are not affected by the dwell time used during acquisition. In this work, dwell times as low as 3 ms were used without significant reproducibility and/or sensitivity losses. This value was automatically calculated by the software depending on the peak width, the desired number of points per peak and the number of transitions acquired simultaneously.

Table 1. Experimental conditions of the optimized UHPLC–(ESI)-MS/MS method for the selected mycotoxins.

Compound	Retention time (min.)	Precursor ion	Cone voltage (V)	Product ion	Collision energy (eV)
Nivalenol (NIV)	0.70	[M+H] ⁺	313.1	175.1 (Q)	20
				159.1 (q1)	20
				91.0 (q2)	40
Deoxynivalenol (DON)	0.96	[M+H] ⁺	297.0	249.1 (Q)	10
				231.1 (q1)	10
				203.1 (q2)	10
Fusarenon X (FUSX)	1.49	[M+H] ⁺	355.1	30	20
				229.1 (q1)	20
				247.1 (q2)	20
Neosolaniol (NEO)	1.90	[M+NH ₄] ⁺	400.2	20	20
				185.1 (Q)	20
				305.1 (q1)	10
3 Acetyl Deoxynivalenol (3AcDON)	2.70	[M+H] ⁺	339.1	20	10
				231.1 (Q)	10
				213.1 (q1)	20
15 Acetyl Deoxynivalenol (15AcDON)	2.78	[M+H] ⁺	339.1	20	10
				261.1 (q1)	10
				297.1 (q2)	10
Aflatoxin G2 (AFG2)	3.42	[M+H] ⁺	331.1	30	30
				245.1 (Q)	30
				189.1 (q1)	40
Aflatoxin G1 (AFG1)	3.49	[M+H] ⁺	329.1	30	30
				243.1 (Q)	30
				200.1 (q1)	40
Aflatoxin B2 (AFB2)	3.56	[M+H] ⁺	315.1	30	30
				259.1 (Q)	30
				287.1 (q1)	30
Aflatoxin B1 (AFB1)	3.62	[M+H] ⁺	313.1	30	30
				243.1 (q2)	30
				285.1 (Q)	20
Diacetoxyscirpenol (DIA)	3.67	[M+NH ₄] ⁺	384.2	10	10
				247.1 (q1)	10
				349.2 (q2)	10
T-2 triol	3.72	[M+Na] ⁺	405.2	50	20
				303.1 (Q)	20
				273.1 (q1)	20
Fumonisin B1 (FB1)	3.85	[M+H] ⁺	722.2	30	40
				334.2 (Q)	40
				352.2 (q1)	30
HT-2 toxin (HT-2)	3.88	[M+NH ₄] ⁺	442.2	20	10
				263.1 (Q)	10
				215.1 (q1)	15
T-2 toxin (T-2)	3.99	[M+NH ₄] ⁺	484.2	20	20
				185.1 (Q)	20
				305.1 (q1)	10
Fumonisin B2 (FB2)	4.04	[M+H] ⁺	706.2	30	40
				336.2 (Q)	40
				318.2 (q1)	40
Zearalenone (ZEN)	4.07	[M-H] ⁻	317.1	20	25
				273.1 (q1)	20
				131.1 (q2)	35
Ochratoxin A (OTA)	4.08	[M+H] ⁺	404.2	30	30
				239.1 (Q)	30
				221.1 (q1)	35
					60

3.2. LC optimization

In order to optimize the chromatographic separation, different organic mobile phases (methanol and acetonitrile) with two additives (formic acid (HCOOH) and ammonium acetate (NH₄Ac), at various concentrations) were tested. A compromise between mobile phase composition and MS response for the 18 mycotoxins studied was required. Regarding the organic solvent, no significant differences in sensitivity (S/N) were observed between the use of methanol or acetonitrile as organic solvents. Finally, methanol was selected as a mobile phase due to a slight improvement in peak shape for the most polar compounds.

For those compounds determined under positive ionization mode, sensitivity improved when small amounts of NH₄Ac were added, in both water and methanol mobile phase solvents. The best results were obtained with 0.1 mM, as ionization suppression occurred at higher concentrations of this salt (≥ 0.25 mM). The addition of HCOOH to the previous mobile phases was required to improve the peak shape of some compounds, such as fumonisins and OTA. Aflatoxins also showed narrower peaks when HCOOH was used. However the addition of acid produced a slight decrease in the sensitivity of thricothecenes. Finally, the addition of 0.01% HCOOH was selected as a compromise for the determination of selected compounds.

Chromatographic separation of the positional isomers 3 AcDON and 15 AcDON was critical as they present similar fragmentation, and share the SRM transitions (**Fig. 1**). Two UHPLC Acquity BEH UPLC C18 (1.7 μ m) columns of different length (2.1 mm \times 50 mm and 2.1 mm \times 100 mm) were tested to obtain an efficient separation of both isomers. After testing different gradients in both columns, the shortest column (50 mm) was selected, as the separation of the isomers was satisfactorily achieved, reducing analysis time compared with the longest one.

Different flow rates were also tested. When working at 0.3 mL min⁻¹, no significant differences in sensitivity were observed with respect to 0.5 mL min⁻¹ flow. However, at 0.8 mL min⁻¹, the sensitivity decreased surely due to a less efficient ionization process.

Therefore, 0.5 mL min^{-1} was selected as working flow rate as separations could be achieved in less time (4.5 min for all the 18 mycotoxins), without a loss of sensitivity.

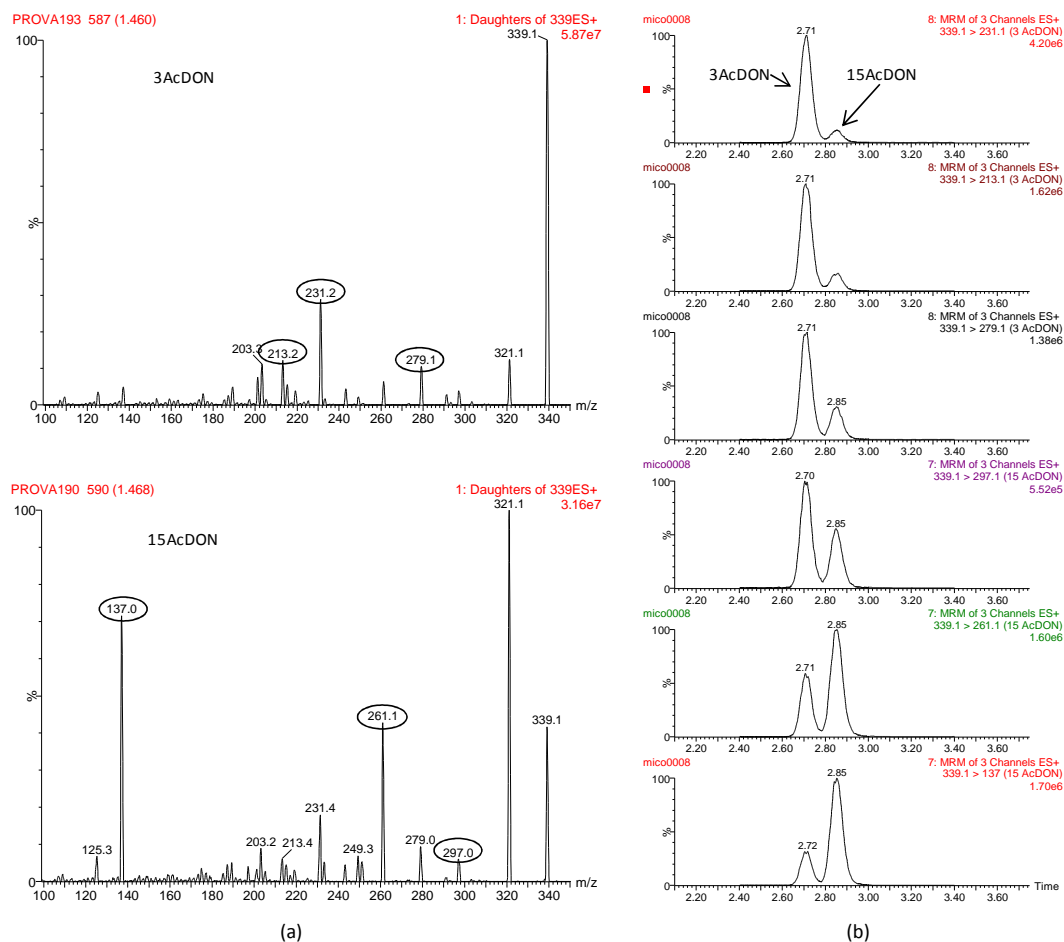


Fig. 1. (a) Product ion spectra of 3 AcDON and 15 AcDON protonated molecules at 10 eV collision energy and (b) SRM chromatograms for 3AcDON and 15AcDON.

3.3. Matrix effects

Due to the complexity and composition-diversity of the food samples under study, matrix effect was considered a critical parameter for the correct quantification of mycotoxins. As the use of isotopically-labeled standards for each compound could not be afforded due to their high cost, the possibility of reducing the quantity of matrix by simple dilution of the extracts was considered as a suitable approach [29]. However, this solution requires the use of highly sensitive instrumentation, capable to detect the low concentration levels expected in the samples.

In order to evaluate matrix effects, the peak area of the reference standards was compared with the peak area of a blank extract (2-fold, 4-fold and 10-fold diluted) spiked at the corresponding concentration. **Fig. 2** shows the matrix effects for some selected compounds in three different matrices (soya products, dried fruits and breakfast cereals). As expected, the higher dilution factor, the lower matrix effect. However, the results for some analyte/matrix combinations, indicated that 10-fold dilution was not enough to completely remove the matrix effect (see **Figure S1**, supplementary information (SI)). However, higher dilutions might compromise the analysis of some mycotoxins at low levels, near the regulated limits, specially for aflatoxins. As this further dilution was discarded, matrix-matched calibration was selected as a solution to compensate for matrix effects, but maintaining some dilution to decrease matrix effects. Finally, a 4-fold dilution together with matrix-matched calibration was applied as a compromise to reduce significantly matrix effects but maintaining satisfactory sensitivity.

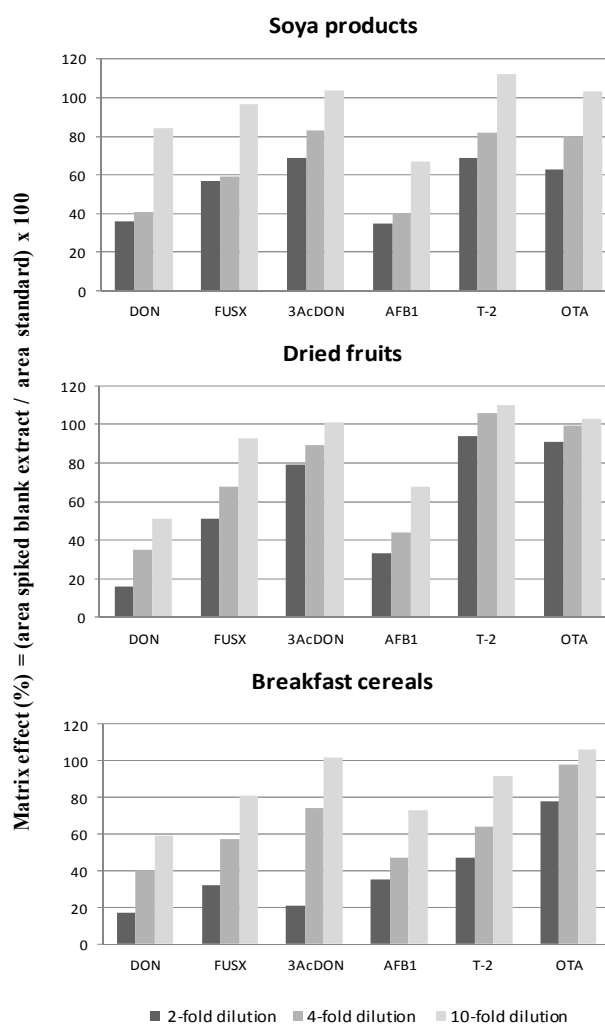


Fig. 2. Dilution of sample extract as a way to reduce matrix effects.

3.4. Method validation

Matrix-matched standard calibration showed good linearity in the studied range ($0.01\text{--}1\ \mu\text{g L}^{-1}$ for compounds of the *group A*; $0.1\text{--}10\ \mu\text{g L}^{-1}$ for *group B*; and $1\text{--}100\ \mu\text{g L}^{-1}$ for *group C*), with correlation coefficients ≥ 0.99 in all sample matrices.

The method was validated for the 24 food matrices selected in this work by spiking blank samples at two different concentrations, each in triplicate (0.4 and $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ for compounds of *group A*; 4 and $40 \mu\text{g kg}^{-1}$, *group B*; and 40 and $400 \mu\text{g kg}^{-1}$, *group C*). Accuracy and precision were estimated by means of recovery experiments at the spiking levels tested. The results obtained were satisfactory for most of mycotoxin/matrix combinations. With few exceptions, recoveries ranged between 70 and 120% and RSDs were below 20% (**Tables S2, S3 and S4**, supplementary information (SI)). The specificity of the method was tested by the analysis of blank samples. No peaks were observed in any of the matrices at the same retention time of target mycotoxins, indicating that there were no matrix compounds that might give a false positive signal in the samples.

Regarding the compounds for which the sensitivity was high (*group A*), **Table S2** gives an overview of the accuracy and repeatability obtained in recovery experiments as well as the LOD and LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) calculated for signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively. The lowest level validated for each compound with satisfactory recovery and precision was $0.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ for almost all matrix–analyte combinations. Acceptable recoveries (between 70 and 120%) were obtained for all the matrices and compounds with the exception of cheese, for which all recoveries were around 60%. However, very good RSDs (lower than 5% for almost all compounds) were obtained for this matrix. Olive oil was also a difficult matrix where the target analytes could not be validated at the lowest level tested ($0.4 \mu\text{g kg}^{-1}$). OTA was the most problematic compound, which could not be validated in some matrices from the *groups 2* (apple and pear, and yoghurt), *3* (beer and juices) and *4* (olive and sunflower oils) surely due to extraction problems. It is noteworthy that all regulated mycotoxins were validated at concentrations lower than maximum permitted level in the corresponding matrices [5]. Most LODs for analytes from *group A* were as low as $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$, or even lower.

Table S3 shows the validation results for the compounds belonging to *group B*. NEO, DIA, T-2, FB1, FB2 and ZEN were validated at two levels, being $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ the lowest concentration validated with satisfactory recovery and precision for almost all matrices. T-2 triol could be only validated at the highest level tested ($40 \mu\text{g kg}^{-1}$) due to its lower sensitivity. Furthermore, in some matrices (olives, eggs, cheese, orange juice and olive oil) it

was noticed that T-2 triol was not satisfactorily extracted from the matrix. Fumonisin (FB1 and FB2) gave extraction problems in olive oil and sunflower oil matrices, and they could not be validated at any concentration tested. ZEN was satisfactorily validated in all matrices regulated, with the only exception of breakfast cereals, for which recoveries of around 50% were obtained although with acceptable RSDs. DIA was not validated at $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ in rice due to the presence of interferences in the quantification transition. Satisfactory LODs ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$ or lower) were achieved for almost all studied matrices, which are far below the regulated levels.

Finally, compounds of *group C* (**Table S4**) were tested at 40 and $400 \mu\text{g kg}^{-1}$. The lowest concentration validated for each compound with satisfactory recovery and precision was $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ in all matrices, except for NIV which could only be determined at $400 \mu\text{g kg}^{-1}$. Accuracy and precision for nearly all analyte–matrix combinations were within the tolerable established range.

As an example, **Fig. 3** shows UHPLC–MS/MS chromatograms for some selected mycotoxins at the lowest level validated in soya products, yoghurt, and apple and pear.

A general overview of the validation data shows that regulated mycotoxins were satisfactorily validated at concentrations lower than established by 1881/2006/EC and its amendments in all the matrices regulated. Furthermore, for all analyte–matrix combinations with non-established regulatory limits, validation was performed at the lowest concentration level possible, obtaining satisfactory results for the wide majority of them.

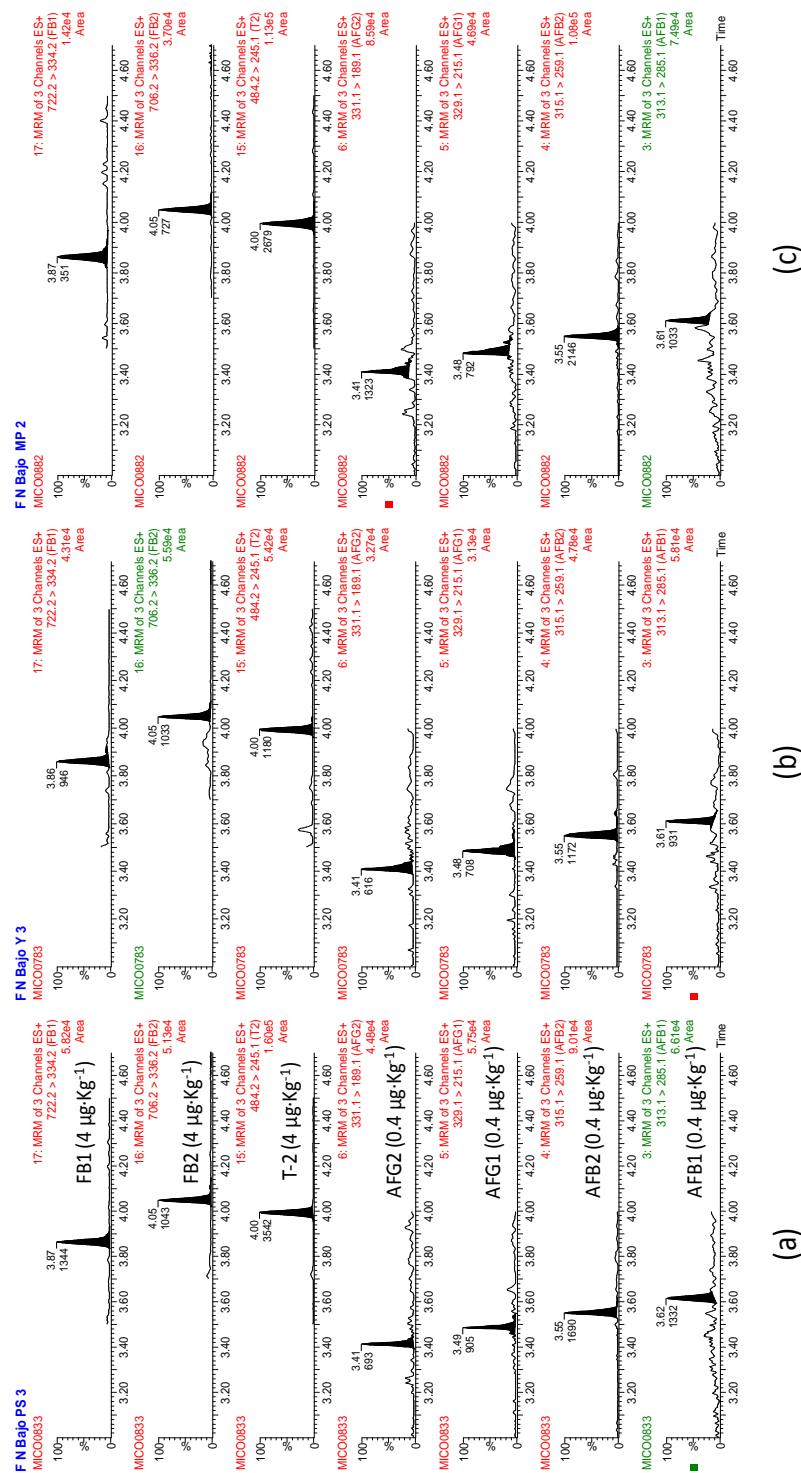


Fig.3. UHPLC-MS/MS chromatograms for selected mycotoxins at the lowest concentration level validated in: (a) soya products, (b) yoghurt, and (c) apple and pear.

3.5. Application to samples

The developed methodology was applied to the analysis of 240 samples (10 per each validated matrix) within a total-diet study performed at the Valencian region of Spain. Two quality control samples (QCs), i.e. “blank” samples (previously analyzed) fortified at the two validated levels were also analyzed together with the samples in every sequence of analysis. QC recoveries between 60 and 140% were required to consider the quantification of target analytes in the samples as satisfactory in the line of EU guidelines [32].

In a notable number of food matrices, mycotoxins were not detected. This occurred in rice, milk, olive oil, sunflower oil, cheese, yogurt, milk shakes and custard, orange juice, dried fruits, biscuits, olives and pickles, grapes, apple and pear, eggs and soya products. Among the positive samples, it is worth noting the presence of DON in the group of food matrices based on cereals (wheat bread (detected in 10 of 10 samples analyzed), sliced bread (10/10), cereals bread (10/10), pasta (10/10), breakfast cereals (7/10) and processed baked goods (10/10)). Estimated concentrations ranged from LOQ to a maximum value of 203 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in a sample of white bread. Fumonisin B1 was detected in all beer samples at concentrations between LOQ and 13 $\mu\text{g kg}^{-1}$. This mycotoxin was also detected in breakfast cereals (6/10) at concentration levels near the LOQ (3.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$). OTA was found in breakfast cereals (3/10), wheat bread (9/10) and cereal bread (10/10), at low concentrations, near the LOQ. ZEN was also detected in 6 of the wheat bread samples analyzed although at concentrations below the LOQ. **Fig. 4** shows the chromatograms for detected mycotoxins in cereals bread (DON and OTA), white bread (DON, ZEN and OTA), breakfast cereals (FB1 and OTA) and beer (FB1).

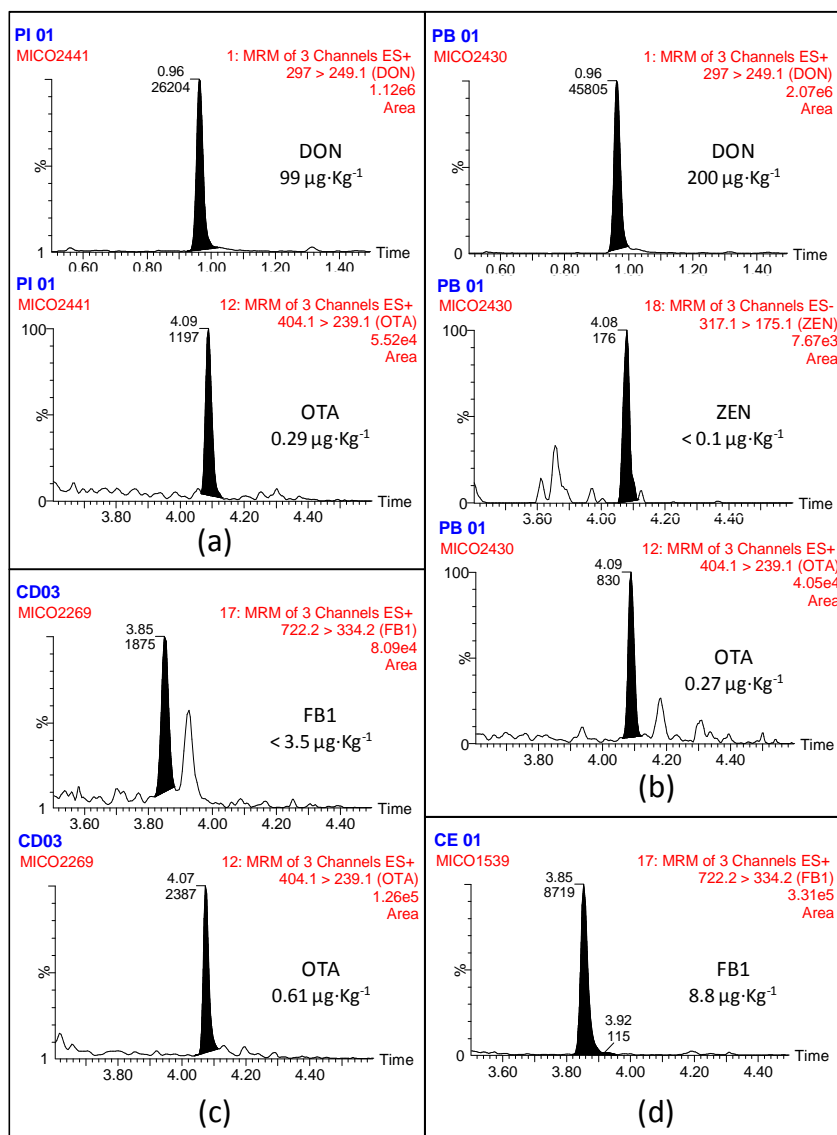


Fig. 4. UHPLC-MS/MS chromatograms for detected mycotoxins in: (a) cereals bread, (b) white bread, (c) breakfast cereals, and (d) beer.

It is remarkable that in none of the samples the concentration of mycotoxins exceeded the maximum levels established by Regulation 1881/2006/EC and their subsequent amendments.

All positive findings were confirmed by accomplishment of the Q/q ratios, with deviations lower than the limits established by the European Commission Decision 657/2002/EC [35], as well as by agreement of retention time, with deviations lower than 2.5% with respect to a reference standard. **Fig. 5** illustrates the confirmation of FB1 in breakfast cereals, DON in sliced bread and OTA in cereals bread. The Q/q ratios accomplishment between the obtained in the samples (Q_s) and standards (Q_{st}) can be seen in this figure.

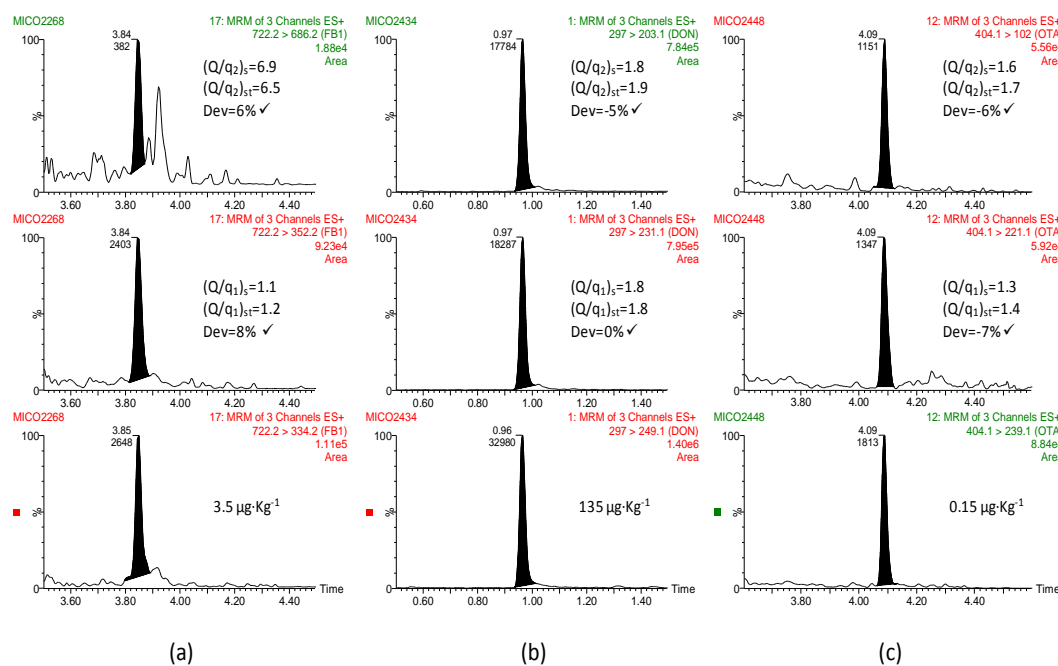


Fig. 5. Positive sample confirmation. UHPLC-MS/MS chromatograms corresponding to: (a) FB1 in breakfast cereals, (b) DON in sliced bread, and (c) OTA in cereals bread.
 $(Q/q)_s$: Q (quantification)/ q (confirmation) ratio in the sample.
 $(Q/q)_{st}$: Q (quantification)/ q (confirmation) ratio in the reference standard.

4. Conclusions

Highly sensitive, rapid and reliable methodology has been developed in order to determine 18 mycotoxins in different food commodities as required by the European Commission regulations. The method has been validated in 24 different matrices with satisfactory results at two different concentrations for each compound. Mycotoxins determination at very low concentrations has been achieved without any kind of pre-concentration. On the contrary, the dilution of the sample extract was a simple solution to minimize matrix effects. This was feasible thanks to the high sensitivity of the modern instrumentation used. Matrix-matched calibration has been used to correct some minor matrix effects that still remain for some analyte–matrix combination.

The validated methodology has been applied to the analysis of 240 samples within a total-diet study. Positive findings of DON have been reported in cereals matrices (e.g. white bread, cereals bread, and breakfast cereals) whereas FB1 was found in breakfast cereals and beer. Furthermore, other mycotoxins such as OTA and ZEN were detected in a few matrices at concentrations near the LOQ of the method. Confirmation of the compound identity was made by the accomplishment of the ion ratios and retention times deviations when compared with reference standards.

Disclaimer

The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the views of the Generalitat Valenciana.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from the Generalitat Valenciana, as research group of excellence PROMETEO/2009/054. The authors are very grateful to Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using the UPLC-TQS mass spectrometer. E.B. is grateful to University Jaume I for his pre-doctoral grant. This work

forms a part of the total-diet study performed at the Valencia region by Generalitat Valenciana. AINIA (Valencia) was the responsible of samples collection.

References

- [1] J.W. Bennett, M. Klich, *Clin. Microbiol. Rev.*, 16 (2003) 497-516.
- [2] F. Fung, R.F. Clark, J. *Toxicol-Clin. Toxic.*, 42 (2004) 217-234.
- [3] IARC, (2002). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (Vol.82). Lyon.
- [4] H.P. Van Egmond, R.C. Schothorst, M.A. Jonker, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 (2007) 147-157.
- [5] Commission Regulation (EC) No 1881/2006. *Official Journal of the European Communities*, L364 (2006) 5-24.
- [6] Commission Regulation (EC) No 1126/2007. *Official Journal of the European Communities*, L255 (2007) 14-17.
- [7] Commission Regulation (EC) No 105/2010. *Official Journal of the European Communities*, L35 (2010) 7-8.
- [8] P. Zöllner, B. Mayer-Helm, *J Chromatogr. A*, 1136 (2006) 123-169.
- [9] R. Krska, P. Schubert-Ullrich, A. Molinelli, M. Sulyok, S. MacDonald, C. Crews, *Food Addit. Contam.*, 25 (2008) 152-163.
- [10] P. Songsermsakul, E. Razzazi-Fazeli, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 31 (2008) 1641-1686.

- [11] R. Köppen, M. Koch, D. Siegel, S. Merkel, R. Maul, I. Nehls, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86 (2010) 1595-1612.
- [12] A.L. Capriotti, G. Caruso, C. Cavaliere, P. Foglia, R. Samperi, A. Laganà, *Mass Spectrom. Rev.*, 31 (2012) 466-503.
- [13] Y. Ren, Y. Zhang, S. Shao, Z. Cai, L. Feng, H. Pan, Z. Wang, *J. Chromatogr. A*, 1143 (2007) 48-64.
- [14] E. Varga, T. Glauner, R. Köppen, K. Mayer, M. Sulyok, R. Schuhmacher, R. Krska, F. Berthiller, *Anal. Bioanal. Chem.* (2012) 1-12.
- [15] E. Beltrán, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23 (2009) 1801-1809.
- [16] A.G. Frenich, J.L.M. Vidal, R. Romero-González, M.d.M. Aguilera-Luiz, *Food Chem.*, 117 (2009) 705-712.
- [17] M. Zachariasova, O. Lacina, A. Malachova, M. Kostelanska, J. Poustka, M. Godula, J. Hajslova, *Anal. Chim. Acta*, 662 (2010) 51-61.
- [18] H.G.J. Mol, P. Plaza-Bolaños, P. Zomer, T.C. De Rijk, A.A.M. Stolker, P.P.J. Mulder, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 9450-9459.
- [19] F. Soleimany, S. Jinap, A. Faridah, A. Khatib, *Food Control*, 25 (2012) 647-653.
- [20] E. Van Pamel, A. Verbeken, G. Vlaemynck, J. De Boever, E. Daeseleire, *J. Agric. Food Chem.*, 59 (2011) 9747-9755.
- [21] D. Guillarme, J. Schappler, S. Rudaz, J.-. Veuthey, *TrAC - Trend. Anal. Chem.*, 29 (2010) 15-27.

- [22] M.C. Spanjer, P.M. Rensen, J.M. Scholten, *Food Addit. Contam. A*, 25 (2008) 472-489.
- [23] M. Sulyok, R. Krska, R. Schuhmacher, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 (2007) 1505-1523.
- [24] W.M.A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli, *Mass Spectrom. Rev.*, 25 (2006) 881-899.
- [25] F. Hernández, J.V. Sancho, O.J. Pozo, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 934-946.
- [26] V.M.T. Lattanzio, S.D. Gatta, M. Suman, A. Visconti, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25 (2011) 1869-1880.
- [27] J. Rubert, C. Soler, J. Mañes, *Food Chem.*, 133 (2012) 176-183.
- [28] H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 1474-1482.
- [29] EFSA, FAO & WHO, 2011. State of the art on Total Diet Studies based on the replies to the EFSA/FAO/WHO questionnaire on national total diet study approaches. *Supporting Publications*, 206 (2011) 1-13.
- [30] Commission Regulation (EC) No 401/2006. *Official Journal of the European Communities*, L70 (2006) 12-34.
- [31] European Commission, 2011. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. *Document No. SANCO/12495/2011*.
- [32] M.K. Kokkonen, M.N. Jestoi, *Food Anal. Method.*, 2 (2009) 128-140.
- [33] Commission Decision (EC) 2002/657/EC. *Official Journal of the European Communities*, L221 (2002) 8-36.

Appendix A. Supplementary data

Table S1. Signal suppression/enhancement (SSE, in %) for selected mycotoxins in different food matrices.

Compound	Wheat bread	Sliced Bread	Cereals bread	Pasta	Rice	Dried fruits	Biscuits	Processed baked goods	Breakfast cereals	Soya products
Nilvalenol	60	63	54	84	71	45	51	42	29	61
Deoxynivalenol	70	73	52	86	80	51	51	59	59	84
Fusarenon X	80	80	72	99	94	92	54	77	81	97
Neosolaniol	75	89	74	107	100	72	89	94	97	95
3-Acetyldeoxynivalenol	88	91	85	104	94	101	87	87	103	104
15-Acetyldeoxynivalenol	83	89	80	102	86	98	86	92	92	104
Aflatoxin G2	87	90	90	108	83	69	95	98	88	69
Aflatoxin G1	91	80	70	101	86	54	89	90	68	64
Aflatoxin B2	95	90	81	112	100	63	99	104	84	76
Aflatoxin B1	80	78	74	97	82	68	70	84	72	67
Diacetoxyscimpinol	105	106	105	113	107	105	108	102	83	88
T2-Triol	55	43	43	61	101	30	52	64	48	56
Fumonisin B1	115	116	116	114	120	134	115	119	134	140
HT-2 Toxin	99	93	102	114	105	103	98	107	105	121
T2 Toxin	105	91	91	117	104	108	110	93	93	112
Fumonisin B2	156	152	154	168	146	137	186	144	179	165
Zearalenone	82	70	78	107	95	93	73	87	69	67
Ochratoxin A	94	109	93	105	94	103	119	100	107	103

SSE = (Slope matrix-matched calibration/slope standard calibration in solvent) x 100

Table S2. Average recovery (%) and RSD (% in parenthesis) after application of UHPLC-MS/MS procedure to different food matrices (n=3) fortified at 0.4 and 4 µg·Kg⁻¹ for compounds of group A (high sensitivity)

Matrix	AFG2			AFG1			AFB2			AFB1			OTA		
	0.4 µg/Kg	4 µg/Kg	LOD (µg/Kg)	0.4 µg/Kg	4 µg/Kg	LOD (µg/Kg)	0.4 µg/Kg	4 µg/Kg	LOD (µg/Kg)	0.4 µg/Kg	4 µg/Kg	LOD (µg/Kg)	0.4 µg/Kg	4 µg/Kg	LOD (µg/Kg)
Wheat bread	97(5)	95(1)	0.10	81(8)	91(3)	0.10	88(5)	93(2)	0.10	88(9)	78(5)	0.10	75(6)	85(2)	0.06
Sliced bread	80(1)	92(4)	0.15	107(12)	88(5)	0.40	80(1)	88(8)	0.30	80(2)	77(8)	0.40	80(8)	85(7)	0.08
Cereals bread	80(3)	83(3)	0.35	80(1)	83(3)	0.40	80(2)	80(1)	0.20	93(15)	81(3)	0.40	80(2)	80(5)	0.07
Pasta	93(5)	88(2)	0.09	80(1)	89(3)	0.05	80(2)	87(3)	0.03	80(1)	83(7)	0.12	80(2)	79(3)	0.11
Rice	89(10)	99(3)	0.07	100(3)	103(2)	0.07	103(7)	99(2)	0.04	84(9)	77(11)	0.13	73(7)	70(3)	0.11
Dried fruits	100(14)	98(2)	0.40	95(13)	96(5)	0.40	79(15)	95(9)	0.40	104(7)	97(4)	0.86	95(6)	100(1)	0.35
Biscuits	101(12)	80(2)	0.40	99(2)	79(5)	0.43	104(8)	83(6)	0.27	81(16)	80(6)	0.40	108(6)	72(2)	0.15
Processed baked goods	93(16)	105(5)	0.40	95(10)	110(1)	0.18	104(9)	103(2)	0.19	89(3)	97(2)	0.13	90(12)	94(2)	0.19
Breakfast cereals	88(5)	95(7)	0.40	92(13)	84(3)	0.40	72(12)	95(2)	0.35	103(12)	78(5)	0.40	99(2)	90(2)	0.29
Olives and pickles	118(14)	119(6)	0.40	112(11)	107(5)	0.40	113(15)	101(5)	0.03	-	92(5)	2.50	77(8)	67(9)	0.08
Apple and pear	113(13)	88(10)	0.23	103(3)	94(1)	0.09	95(9)	91(3)	0.03	95(11)	82(3)	0.40	-	-	-
Grapes	112(5)	105(5)	0.20	93(6)	107(5)	0.10	103(1)	90(7)	0.10	92(8)	87(6)	0.25	38(20)	62(11)	0.18
Eggs	117(11)	111(1)	0.09	100(5)	97(4)	0.38	98(13)	99(3)	0.03	82(9)	80(5)	0.40	45(8)	39(8)	0.17
Milk	95(7)	98(6)	0.03	95(5)	95(4)	0.05	80(13)	90(2)	0.05	83(4)	89(7)	0.03	75(7)	85(7)	0.33
Milk shakes and custards	108(3)	92(4)	0.40	73(16)	87(1)	0.29	70(18)	90(1)	0.16	83(12)	82(14)	0.40	57(15)	55(8)	0.16
Yoghurt	98(4)	94(7)	0.03	72(11)	82(3)	0.33	78(13)	96(4)	0.18	75(9)	72(8)	0.05	-	-	-
Cheese	65(12)	62(3)	0.25	58(4)	59(5)	0.19	69(3)	55(2)	0.25	58(2)	59(5)	0.28	56(8)	56(3)	0.40
Soya products	103(3)	92(7)	0.14	87(15)	89(4)	0.40	118(3)	91(3)	0.29	93(9)	86(9)	0.40	70(1)	69(10)	0.22
Wine	94(9)	96(1)	0.40	88(5)	86(1)	0.30	77(13)	84(4)	0.23	70(13)	71(5)	0.24	75(8)	81(5)	0.07
Beer	98(5)	93(5)	0.40	94(8)	91(1)	0.40	89(2)	93(2)	0.19	89(11)	83(2)	0.40	-	-	-
Juices (pine apple, grapes and peach)	96(12)	98(3)	0.06	70(5)	75(4)	0.23	76(8)	84(7)	0.03	-	77(10)	0.03	-	-	-
Orange juice	79(2)	76(7)	0.40	77(5)	71(3)	0.40	78(3)	73(6)	0.03	88(6)	77(9)	0.03	-	-	-
Olive oil	-	61(11)	0.77	-	50(5)	1.5	83(5)	0.43	0.13	-	77(5)	3.1	-	-	-
Sunflower oil	101(7)	95(2)	0.14	100(2)	93(1)	0.05	93(8)	96(1)	0.12	88(7)	92(2)	0.24	21(18)	33(3)	-

Table S3. Average recovery (%) and RSD (% in parenthesis) after application of UHPLC-MS/MS procedure to different food matrices (n=3) fortified at 4 and 40 µg·Kg⁻¹ compounds of group B (medium sensitivity)

Matrix	NEO			DIA			T-2 TRIOL			T-2		
	4 µg/Kg	40 µg/Kg	LOQ (µg/Kg)	4 µg/Kg	40 µg/Kg	LOQ (µg/Kg)	4 µg/Kg	40 µg/Kg	LOQ (µg/Kg)	4 µg/Kg	40 µg/Kg	LOQ (µg/Kg)
Wheat bread	97(2)	99(1)	0.1	88(2)	92(4)	0.4	-	98(17)	2.0	1.50	85(6)	95(8)
Sliced bread	96(4)	98(6)	1.1	89(7)	94(5)	0.4	-	83(20)	24.0	7.20	92(12)	97(3)
Cereals bread	91(5)	92(2)	1.4	81(3)	86(3)	0.4	-	101(5)	37.5	11.25	97(5)	85(6)
Pasta	91(3)	99(1)	0.4	79(3)	96(2)	0.3	-	78(14)	13.5	4.05	85(7)	99(3)
Rice	95(7)	103(3)	0.4	-	98(1)	1.2	-	100(3)	6.9	2.07	98(10)	102(2)
Dried fruits	101(4)	104(1)	2.6	81(1)	101(3)	0.9	-	96(3)	8.4	2.52	95(6)	105(2)
Biscuits	103(2)	75(4)	1.6	106(8)	73(2)	0.5	-	54(3)	40.0	12.00	109(4)	71(3)
Processed baked goods	101(11)	102(2)	2.7	110(9)	107(2)	1.0	-	99(4)	7.1	2.13	110(8)	110(2)
Breakfast cereals	110(2)	104(2)	2.7	87(14)	91(2)	1.5	-	87(9)	15.4	4.62	109(12)	99(6)
Olives and pickles	99(4)	101(1)	4.0	114(7)	119(1)	1.2	-	-	-	-	117(5)	115(1)
Apple and pear	103(5)	102(3)	1.1	114(11)	115(4)	0.8	-	79(15)	11.0	3.30	107(17)	119(1)
Grapes	101(10)	111(5)	1.3	112(7)	120(2)	0.7	-	105(14)	17.0	5.10	102(4)	105(3)
Eggs	112(2)	107(3)	2.4	116(7)	113(2)	0.8	-	-	-	-	102(7)	104(1)
Milk	91(3)	102(5)	0.7	104(9)	115(2)	0.7	-	83(4)	18.9	5.67	116(6)	112(4)
Milk shakes and custards	95(5)	94(4)	1.2	120(9)	115(3)	0.3	-	117(9)	15.6	4.68	83(14)	75(5)
Yoghurt	94(7)	98(1)	1.1	84(6)	92(3)	0.5	-	89(14)	9.3	2.79	117(18)	119(5)
Cheese	104(8)	92(4)	2.1	76(4)	71(1)	0.5	-	-	-	-	92(6)	83(2)
Soya products	106(1)	105(6)	1.5	116(12)	115(5)	0.6	-	102(11)	27.0	8.10	117(6)	120(5)
Wine	98(1)	99(2)	2.4	97(4)	100(2)	0.2	-	100(6)	40.0	12.00	102(3)	100(2)
Beer	90(2)	98(2)	4.0	88(3)	96(2)	0.4	-	93(13)	40.0	12.00	94(5)	97(4)
Juices (pine apple, grapes and peach)	83(5)	94(2)	2.3	91(6)	91(3)	0.5	-	92(3)	29.4	8.82	95(12)	95(5)
Orange juice	84(3)	93(2)	2.8	84(2)	77(1)	0.4	-	-	-	-	119(7)	119(2)
Olive oil	81(7)	111(3)	1.7	73(16)	73(4)	0.5	-	-	-	-	75(5)	72(3)
Sunflower oil	86(8)	87(4)	0.8	70(1)	72(5)	0.6	-	95(12)	8.0	2.40	77(4)	70(3)

Table S3.(CONT.) Average recovery (%) and RSD (%) in parenthesis) after application of UHPLC-MS/MS procedure to different food matrices (n=3) fortified at 4 and 40 µg·Kg-1 compounds of group B (medium sensitivity)

Matrix	FBI				FB2				ZEN				
	4 µg/Kg	40 µg/Kg	LOQ (µg/Kg)	LOD (µg/Kg)	4 µg/Kg	40 µg/Kg	LOQ (µg/Kg)	LOD (µg/Kg)	4 µg/Kg	40 µg/Kg	LOQ (µg/Kg)	LOD (µg/Kg)	
G1	Wheat bread	108(15)	92(3)	0.1	0.03	96(9)	90(6)	0.1	0.03	71(3)	72(1)	0.1	0.03
	Sliced bread	91(18)	89(11)	2.7	0.81	89(3)	87(10)	1.0	0.30	73(18)	82(5)	0.1	0.03
	Cereals bread	93(2)	93(2)	2.4	0.72	95(6)	85(4)	1.1	0.33	71(9)	73(2)	0.3	0.09
	Pasta	83(19)	91(7)	1.7	0.51	100(2)	83(1)	1.0	0.30	55(8)	81(1)	0.1	0.03
	Rice	99(16)	91(2)	0.6	0.18	109(3)	94(19)	0.2	0.06	79(9)	86(2)	0.1	0.03
	Dried fruits	81(20)	87(3)	2.7	0.81	80(7)	81(5)	3.7	1.11	93(2)	105(8)	0.8	0.24
	Biscuits	86(6)	65(2)	0.4	0.12	96(4)	70(4)	1.7	0.51	104(8)	76(2)	0.4	0.12
	Processed baked goods	75(13)	82(8)	4.0	1.20	93(13)	86(2)	2.7	0.81	86(11)	89(3)	0.8	0.24
	Breakfast cereals	110(1)	88(4)	3.5	1.05	105(11)	93(2)	1.4	0.42	52(19)	51(6)	1.1	0.33
	Olives and pickles	95(7)	99(5)	1.9	0.57	83(17)	71(4)	0.1	0.03	-	-	-	-
	Apple and pear	-	95(6)	6.0	1.80	71(12)	70(1)	0.5	0.15	48(16)	50(12)	0.3	0.09
	G2	Grapes	103(11)	111(4)	0.2	0.06	83(12)	91(7)	0.1	0.03	62(14)	78(12)	0.5
Eggs		71(11)	70(6)	2.2	0.66	53(20)	43(8)	0.4	0.12	-	-	-	-
Milk		108(15)	78(2)	1.1	0.33	109(9)	99(4)	0.7	0.21	76(13)	67(1)	0.8	0.24
Milk shakes and custards		89(13)	81(11)	1.3	0.39	82(7)	87(4)	0.7	0.21	-	-	-	-
Yoghurt		117(18)	101(1)	1.6	0.48	79(7)	84(2)	0.1	0.03	-	-	-	-
G3	Cheese	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Soya products	100(11)	102(8)	1.2	0.36	83(12)	84(10)	0.2	0.06	62(10)	61(13)	0.6	0.18
	Wine	93(4)	87(3)	0.4	0.12	69(7)	72(6)	0.2	0.06	106(20)	74(14)	0.1	0.03
	Beer	95(6)	98(1)	1.3	0.39	70(8)	71(4)	0.1	0.03	-	-	-	-
G4	Juices (pine apple, grapes and peach)	66(8)	80(4)	0.1	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
	Orange juice	78(11)	77(1)	0.2	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-
Olive oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39(10)	48(7)	0.4	0.12
Sunflower oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61(18)	58(1)	0.8	0.24

Table S4. Average recovery (%) and RSD (% in parenthesis) after application of UHPLC-MS/MS procedure to different food matrices (n=3) fortified at 40 and 400 µg·Kg⁻¹ for compounds of group C (low sensitivity)

Matrix	NIV						DON						FUSX					
	40 µg/Kg		400 µg/Kg		LOQ (µg/Kg)	LOD (µg/Kg)	40 µg/Kg		400 µg/Kg		LOQ (µg/Kg)	LOD (µg/Kg)	40 µg/Kg		400 µg/Kg		LOQ (µg/Kg)	LOD (µg/Kg)
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G1	Wheat bread	-	73(7)	310	93	108(5)	94(1)	2.4	0.7	90(3)	100(2)	2.5	0.8					
	Sliced bread	-	77(5)	330	99	100(3)	90(6)	6.5	2.0	91(10)	96(3)	4.3	12.9					
	Cereals bread	-	74(3)	400	120	81(1)	80(3)	24	7.2	81(7)	85(2)	40	12.0					
	Pasta	-	86(2)	400	120	88(2)	86(2)	6.0	1.8	74(6)	92(4)	7.1	2.1					
	Rice	-	93(3)	315	95	109(2)	101(3)	13	3.9	98(6)	102(1)	7.2	2.2					
	Dried fruits	-	94(9)	330	99	98(4)	106(3)	38	11.4	95(3)	103(1)	40	12.0					
	Biscuits	-	74(13)	400	120	99(3)	85(1)	38	11.4	87(10)	82(3)	2.9	0.9					
	Processed baked goods	-	73(6)	400	120	110(1)	92(1)	18	5.4	107(3)	99(2)	40	12.0					
	Breakfast cereals	-	65(3)	400	120	105(4)	88(5)	40	12.0	94(3)	96(1)	40	12.0					
	Olives and pickles	-	-	-	-	-	-	98(2)	91	27.3	101(1)	103(4)	40	12.0				
G2	Apple and pear	-	74(4)	160	48	85(2)	92(1)	7.8	2.3	100(5)	101(1)	23	6.9					
	Grapes	-	117(18)	310	93	90(3)	104(6)	12	3.6	93(5)	106(3)	2.5	7.5					
	Eggs	-	105(2)	260	78	107(3)	105(2)	14	4.2	116(3)	108(1)	19	5.7					
	Milk	-	103(5)	260	78	84(4)	108(2)	8.9	2.7	92(13)	97(5)	16	4.8					
	Milk shakes and custards	-	55(1)	360	108	93(1)	94(6)	11	3.3	90(2)	94(4)	40	12.0					
	Yoghurt	-	69(3)	330	99	90(3)	88(5)	14	4.2	95(5)	90(3)	14	4.2					
	Cheese	-	50(6)	315	95	74(3)	72(1)	29	8.8	81(6)	81(2)	29	7.7					
	Soya products	-	77(3)	260	78	94(3)	103(5)	8.6	2.6	90(11)	101(4)	29	8.7					
	Wine	-	89(8)	280	84	89(1)	96(1)	22	6.6	95(1)	98(1)	30	9.0					
	Beer	-	96(1)	120	36	96(10)	100(1)	40	12.0	91(4)	99(2)	35	10.5					
G3	Juices (pine apple, grapes and peach)	-	95(4)	310	93	106(9)	104(2)	31	9.3	86(12)	97(1)	40	12.0					
	Orange juice	-	87(2)	250	75	89(5)	83(1)	22	6.6	88(4)	93(2)	38	11.4					
G4	Olive oil	-	85(4)	314	94	72(6)	93(1)	25	7.5	74(17)	82(4)	22	6.6					
	Sunflower oil	-	70(5)	211	63	71(8)	77(2)	16	4.8	89(6)	84(2)	15	4.5					

Table S4 (CONT.) Average recovery (%) and RSD (% in parenthesis) after application of UHPLC-MS/MS procedure to different food matrices (n=3) fortified at 40 and 400 µg·Kg⁻¹ for compounds of group C (low sensitivity)

Matrix	3 AcDON				15 AcDON				HT-2				
	40 µg/Kg	400 µg/Kg	LOQ (µg/Kg)	LOD (µg/Kg)	40 µg/Kg	400 µg/Kg	LOQ (µg/Kg)	LOD (µg/Kg)	40 µg/Kg	400 µg/Kg	LOQ (µg/Kg)	LOD (µg/Kg)	
G.1	Wheat bread	97(5)	100(3)	2.3	0.7	103(2)	103(2)	1.5	0.5	95(9)	104(3)	2.7	0.8
	Sliced bread	97(4)	100(4)	11	3.3	95(4)	103(1)	30	9.0	99(14)	102(4)	8.1	2.4
	Cereals bread	103(2)	108(2)	13	3.9	105(14)	91(9)	17	5.1	85(14)	92(4)	17	5.1
	Pasta	79(2)	94(1)	2.0	0.6	70(3)	77(1)	4.6	1.4	85(16)	97(6)	2.9	0.9
	Rice	77(3)	105(1)	5.7	1.7	93(2)	109(2)	13	3.9	107(13)	101(6)	3.3	1.0
	Dried fruits	102(5)	105(1)	10	3.0	-	98(4)	50	15	95(10)	104(7)	10	3.0
	Biscuits	104(2)	87(2)	8.1	2.4	102(5)	83(1)	33	9.9	105(5)	70(4)	7.1	2.1
	Processed baked goods	90(10)	104(2)	9.1	2.7	95(6)	103(1)	20	6.0	114(7)	108(4)	13	3.9
	Breakfast cereals	102(2)	107(2)	14	4.2	99(5)	100(5)	33	9.9	99(11)	96(3)	20	6.0
	Olives and pickles	105(1)	102(3)	17	5.1	95(2)	93(5)	40	12.0	117(3)	107(3)	18	5.4
G.2	Apple and pear	100(4)	90(1)	17	5.1	109(9)	102(8)	12	3.6	101(5)	95(4)	13	3.9
	Grapes	90(4)	100(5)	8.7	2.6	104(9)	118(5)	14	4.2	88(18)	111(5)	3.6	1.1
	Eggs	112(3)	112(3)	13.5	4.1	93(8)	97(2)	16	4.8	93(10)	91(6)	13	3.9
	Milk	95(4)	108(1)	8.1	2.4	80(11)	98(2)	12	3.6	-	50(15)	75	22
	Milk shakes and custards	92(4)	99(3)	8.1	2.4	83(6)	97(5)	13	3.9	-	35(6)	60	18
	Yoghurt	91(3)	93(2)	8.2	2.5	99(11)	96(1)	4.2	1.3	72(19)	102(1)	29	8.7
	Cheese	97(5)	101(2)	9.7	2.9	101(3)	100(1)	17	5.0	87(2)	83(4)	7.0	2.1
	Soya products	103(3)	105(5)	5.5	1.7	85(9)	101(4)	21	6.3	106(12)	91(9)	0.5	0.2
	Wine	90(2)	98(2)	6.4	1.9	93(1)	97(1)	5.2	1.6	102(5)	102(2)	5.5	1.7
	Beer	92(3)	100(2)	9.3	2.8	94(2)	102(1)	12	3.6	102(5)	103(2)	0.7	0.2
G.3	Juices (pine apple, grapes and peach)	84(11)	97(1)	8.9	2.7	95(3)	94(4)	40	12.0	93(8)	96(2)	6.3	1.9
	Orange juice	94(3)	92(1)	8.1	2.4	86(3)	84(3)	23	6.9	104(2)	100(2)	6.8	2.0
G.4	Olive oil	90(11)	88(8)	10	3.0	-	113(1)	73	21.9	77(8)	80(3)	15	4.5
	Sunflower oil	107(5)	98(4)	9.3	2.8	74(7)	70(8)	29	8.7	76(5)	86(5)	18	5.4

2.2.2.3 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

El objetivo de los EDT es determinar la carga de contaminantes presentes en muestras de alimentos que son consumidos por el grupo de población objeto de estudio. Para ello se intentan reproducir las prácticas habituales de los consumidores, siguiendo el proceso de preparación tal cual son consumidos dichos alimentos. Las muestras analizadas en este trabajo correspondían a un EDT del tipo de estudios denominados de “cesta de la compra”, en los que tras evaluar los alimentos más comúnmente consumidos, se realiza un muestreo representativo de todos los alimentos seleccionados. En el Estudio de Dieta total de la Comunidad Valenciana se seleccionaron alrededor de 80 tipos de alimentos. Posteriormente, se seleccionaron las matrices objeto de estudio para la determinación de micotoxinas. Esta selección se realizó mediante búsqueda bibliográfica de las matrices propensas a presentar contaminación por micotoxinas o estar expuestas a

ser contaminadas por hongos. Del total de las matrices seleccionadas en el estudio de dieta total, se escogieron únicamente 24 matrices, la mayoría de ellas de origen vegetal, debido a su mayor exposición a contaminación fúngica.

Las concentraciones de contaminantes detectadas gracias a los EDT, junto con los datos de consumo, proporcionan información de la ingesta de contaminantes en la dieta humana, que se utilizará posteriormente para establecer la evaluación de riesgos (Sizoo & Van Egmond, 2005). Debido a la finalidad de estos estudios, los métodos analíticos deben presentar una elevada fiabilidad, selectividad y sobre todo elevada sensibilidad, con el objetivo de obtener la máxima información posible (Dorne, Dorne, Bordajandi, Amzal, Ferrari & Verger, 2009). Por este motivo, y basándonos en el **Artículo científico 1**, se desarrolló una metodología que permitiera la detección de micotoxinas a concentraciones menores a las alcanzadas en el trabajo previo.

Con el fin de mejorar la sensibilidad obtenida en el trabajo previo, se utilizó la técnica UHPLC-MS/MS utilizando como analizador un triple cuadrupolo de última generación (XEVO™-TQS). La mayor sensibilidad de este analizador se debe al nuevo sistema de introducción de iones en el analizador basado en la tecnología Stepwave™ el cual está equipado con un orificio de muestreo de iones mayor, que junto con una mejora en la configuración del sistema de vacío, permite una eficiente transferencia de los iones de la fuente al primer cuadrupolo. Adicionalmente el aumento de la velocidad de adquisición (*dwell time* entre 1-3 ms) permite la monitorización de un elevado número de compuestos simultáneamente sin una pérdida considerable de sensibilidad.

En esta ocasión se seleccionaron 18 compuestos para ser estudiados, entre los cuales se incluían los 11 compuestos estudiados en el trabajo previo. La optimización de los parámetros espectrométricos mostró resultados semejantes a los observados en el analizador TQD, obteniéndose los aductos amoniados preferentemente para los compuestos pertenecientes al grupo de los tricotecenos A (diacetoxiscirpenol y neosolaniol). Los compuestos pertenecientes al grupo de tricotecenos B (nivalenol,

fusarenon X, 3-acetildeoxinivalenol y 15-acetildeoxinivalenol) mostraron como ion precursor la molécula protonada al igual que sucedió en trabajo anterior.

Para el caso concreto de T-2 triol no se pudo seleccionar el ion amoniado o protonado como ión precursor, ya que presentó elevada afinidad por formar el aducto de sodio. Sin embargo, aunque este tipo de aductos se caracterizan por presentar baja fragmentación, se observó la posibilidad de monitorizar dos iones producto característicos a m/z 303 y 273.

Respecto a las condiciones cromatográficas, basándonos en el trabajo anterior se seleccionaron los disolventes de la fase móvil. Tras comprobar la concentración óptima de acetato de amonio, se observó que la mejor sensibilidad se obtenía cuando esta se añadía a 0.1 mM tanto en la fase acuosa como en la orgánica. El contenido de ácido fórmico también se redujo a 0.01% en ambas fases.

Se estudiaron diferentes gradientes cromatográficos con el objetivo de poder separar los compuestos isoméricos 3-AcDON y 15-AcDON debido a que fue imposible su distinción por vía espectrométrica. El estudio del espectro de iones producto de estos dos isómeros estructurales no mostró ninguna transición específica para ninguno de ellos. Este es el motivo por el cual muchos autores reportan estos dos compuestos como suma de ambos, ya que resulta complicado su separación tanto espectrométrica como cromatográfica (Desmarchelier, Oberson, Tella, Gremaud, Seefelder & Mottier, 2010, Zachariaso et al., 2008). Únicamente, algunos autores comentan la posibilidad de obtener una separación espectrométrica mediante la adquisición en modo de ionización negativo de una transición específica para el 3-AcDON. Así, la concentración del 15-AcDON se obtiene tras cuantificar simultáneamente ambos isómeros y posteriormente restar la concentración correspondiente al 3-AcDON (Berthiller, Schuhmacher, Buttinger & Krska, 2005, Razzazi-Fazeli, Böhm, Jarukamjorn & Zentek, 2003). En nuestro caso, al no poder obtener ninguna transición específica en modo de ionización positivo, ni ionizar los compuestos en modo negativo, se optó por intentar separarlos cromatográficamente.

Se probaron para ello 2 tipos de columnas, la Acquity UPLC C18 BEH (1.7 μm , 2.1 x 100 mm) y la UPLC C18 HSS T3 (1.8 μm , 2.1 x 100 mm). En ambos casos, se consiguió la separación de los dos isómeros introduciendo una etapa isocrática (20% MeOH) en el gradiente de separación. Es destacable, que aunque ambos compuestos fueron separados satisfactoriamente con esta etapa isocrática, el orden de elución fue distinto, lo que demuestra la diferente selectividad obtenida por la columnas BEH, con partículas híbridas, respecto a la HSS, con partículas de sílica tradicionales, a pesar de que ambas se encuentran funcionalizadas con grupos octadecilo (ver **Figura 1**). Finalmente, tras obtener resultados positivos con ambos tipos de columnas, se decidió comprobar la posibilidad de utilizar una columna de menor longitud con el objetivo de manteniendo la separación, aún reducir más el tiempo de análisis. Al no estar disponible la columna HSS de 5 cm en el laboratorio, se estudió la columna de relleno C18 BEH de 5 cm, la cual demostró ser apta para realizar dicha separación (ver **Figura 1, Artículo científico 2**).

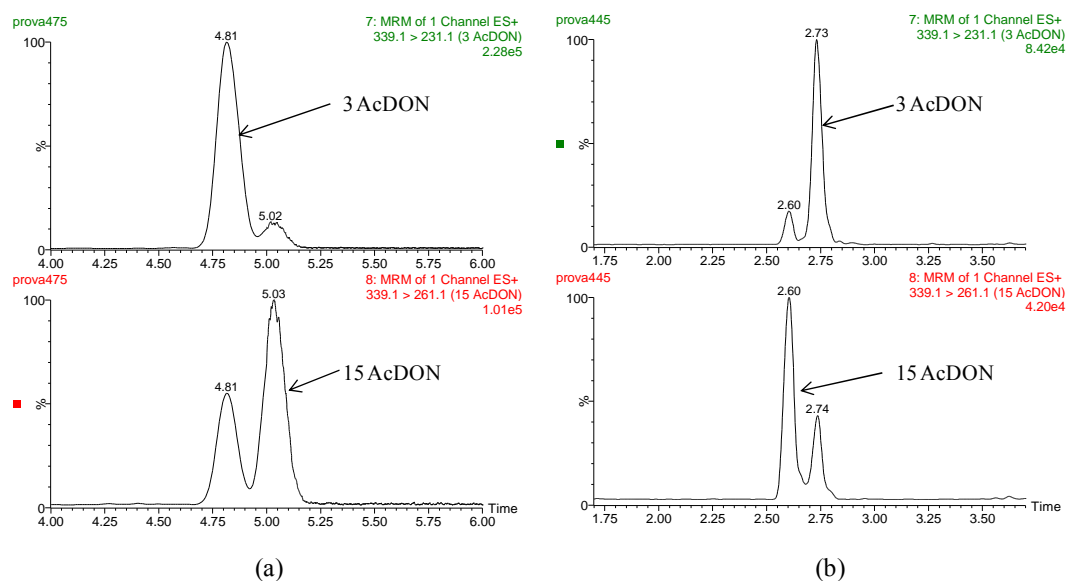


Figura 1. Cromatogramas UHPLC para 3 AcDON y 15 AcDON obtenidos mediante separación cromatográfica utilizando: a) Columna UPLC C18 BEH (1.7 μ m, 2.1 x100 mm), y b) Columna UPLC C18 HSS T3 (1.8 μ m, 2.1 x100 mm).

El flujo utilizado para la separación cromatográfica fue de 0.5 mL/min con el objetivo de obtener una cromatografía rápida y picos cromatográficos más estrechos. Aunque en UHPLC se recomienda trabajar a flujos entre 0.5 y 1 mL/min, no se utilizaron flujos mayores ya que se observó una ligera pérdida de sensibilidad, posiblemente debido a una menor eficiencia de ionización. Actualmente, todos los instrumentos están provistos de fuentes de ionización mejoradas con el objetivo de mejorar el proceso de desolvatación y poder trabajar a flujos mayores (Rodríguez-Aller, Gurny, Veuthey & Guillaume, 2013). La termostatación de la columna cromatográfica a 45°C permitió reducir la viscosidad de la fase móvil y evitar presiones demasiado elevadas sin observar ningún tipo de problema cromatográfico.

La metodología de extracción utilizada fue la optimizada en el trabajo anterior, basada en la extracción sólido-líquido con una mezcla acetonitrilo:agua (80:20) acidificada al 0.1% con ácido fórmico. Únicamente en el caso de matrices líquidas se eliminó la etapa de extracción, inyectando directamente las muestras al sistema cromatográfico tras una etapa de dilución con H₂O HPLC (*dilute and shoot*). En el caso de los aceites, se realizó una extracción líquido:líquido con acetonitrilo saturado en hexano posterior a la dilución de los aceites en hexano, siguiendo la metodología aplicada en diferentes publicaciones basadas en la determinación multiresiduo de plaguicidas (Ballesteros, García Sánchez & Ramos Martos, 2006, Garrido Frenich, Fernandez Moreno, Martinez Vidal & Arrebola Liebanas, 2007).

El estudio del efecto matriz es imprescindible en cualquier método basado en la técnica LC-MS. En este trabajo, la gran diversidad de matrices estudiadas y el amplio rango de propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados hizo necesario utilizar un tratamiento de muestra genérico. Como se ha comentado en la introducción, se evitó el uso de etapas de purificación que pudieran comprometer la determinación satisfactoria de algunos compuestos. La dilución de los extractos es una alternativa para la reducción de interferentes de matriz que puedan afectar el proceso de ionización (Hernández, Sancho & Pozo, 2005). Sin embargo, con la dilución de los extractos pueden verse comprometidos los niveles que se desean alcanzar debido a la insuficiente sensibilidad del equipo instrumental. Recientemente, se ha publicado un trabajo en el que se estudia que factor de dilución debería aplicarse para evitar el indeseable efecto matriz (Stahnke, Kittlaus, Kempe & Alder, 2012). En este trabajo se aprecia que el efecto matriz es tanto matriz como compuesto dependiente, observándose la necesidad de aplicar diluciones del orden de cien veces para poder eliminar totalmente el efecto matriz. En el presente trabajo se estudió el efecto matriz en extractos diluidos 2, 4 y 10 veces (**Figura 2**, y **Tabla S1** de supplementary data, **Artículo científico 2**). Se concluyó que la dilución de los extractos permitía reducir considerablemente el efecto matriz, pero la dilución por diez no conseguía la eliminación del efecto matriz para todas las combinaciones analito-

matriz estudiadas, por lo que se veía comprometida la cuantificación de los compuestos detectados. Por este motivo, se optó por diluir por cuatro las muestras y aplicar calibrado en matriz con el objetivo de compensar los posibles efectos matriz presentes y obtener una cuantificación exacta.

La metodología fue validada para cada una de las matrices estudiadas con el fin de asegurar la fiabilidad de esta metodología para todas las muestras analizadas. Se siguieron las directivas de la guía europea SANCO/12495/2011, en las que se estudia la exactitud y precisión del método mediante ensayos de recuperación, así como otros parámetros como la linealidad y especificidad del método. Como ya se ha comentado previamente, la cuantificación se llevo a cabo mediante calibrado en matriz intentando compensar posibles efectos matriz. Se seleccionaron 2 niveles de validación para cada uno de los compuestos (0.4, 4 y 40 $\mu\text{g/Kg}$, y 4, 40 y 400 $\mu\text{g/Kg}$) en función de la sensibilidad alcanzada para cada uno de los compuestos.

Las recuperaciones obtenidas se encontraron dentro del rango 70-120% para la mayoría de los compuestos analizados en las 24 matrices estudiadas, con desviaciones estándar inferiores al 20%. A modo de resumen, en la **Figura 2** se presentan los valores de recuperación obtenidos. Puede apreciarse que la mayoría de combinaciones micotoxina-matriz presentaron valores de recuperación dentro del rango deseado. En el caso de la matriz queso se observaron recuperaciones inferiores al 70% para una gran cantidad de micotoxinas, obteniendo valores dentro del rango 50-70% (en color amarillo).

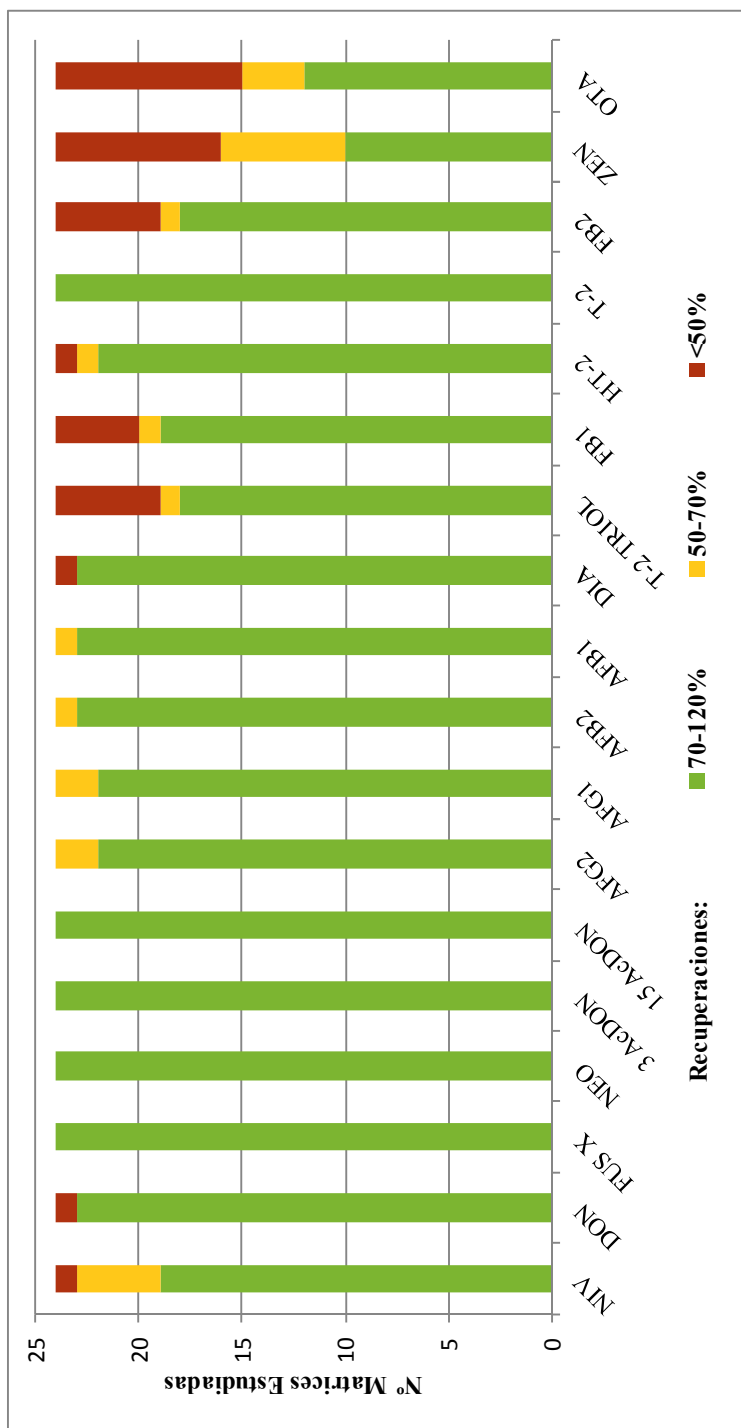


Figura 2. Recuperaciones obtenidas para el nivel más bajo validado en las 24 matrices estudiadas. En verde se representan las combinaciones analito-matriz que presentaron valores de recuperación dentro del rango considerado

Como puede observarse en la **Figura 2**, los compuestos más apolares (zearalenona y ocratoxina A), presentaron recuperaciones inferiores en algunas matrices, posiblemente debido a una extracción no eficiente. Por último, también se observó en algunas matrices recuperaciones menores para el caso de las fumonisinas, especialmente en las matrices con un contenido elevado en agua. La variabilidad entre matrices en los resultados de validación obtenidos para el caso de las fumonisinas puede ser debida a problemas en la etapa de extracción, los cuales ya se han mencionado previamente en diferentes trabajos (Desmarchelier, Oberson, Tella, Gremaud, Seefelder & Mottier, 2010, Frenich, Vidal, Romero-González & Aguilera-Luiz, 2009).

La utilización de instrumentación de última generación con una elevada velocidad de adquisición, permitió la monitorización de 3 transiciones SRM por compuesto, incrementando de este modo la fiabilidad de los resultados reportados, y realizando una confirmación inequívoca de los positivos detectados.

Para cada una de las matrices estudiadas se analizaron 10 muestras, con sus correspondientes controles de calidad (QCs), fortificados a los niveles validados. En un elevado número de matrices no se detectó la presencia de micotoxinas. Las matrices que mostraron un mayor número de resultados positivos fueron aquellas derivadas de cereales, como es el caso del pan, cereales de desayuno, productos de bollería y cerveza, en las que se detectó deoxynivalenol, zearalenona, ocratoxina A y fumonisina B1, principalmente. En todos los casos los resultados positivos detectados se confirmaron mediante el cumplimiento del tiempo de retención y los ratios entre las transiciones SRM, comparados con un patrón en matriz (ver **Figura 5** en **Artículo científico 2**).

**2.3. DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA
DE ELEVADA SENSIBILIDAD PARA LA
DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS Y
OCRATOXINA A EN ALIMENTOS INFANTILES Y
LECHE**

2.3.1. INTRODUCCIÓN

La comunidad Europea, basándose en la evaluación de riesgo, estableció en el año 2004 el reglamento por el cual se fijó el contenido máximo permitido de aflatoxina B1, Aflatoxina M1 y ocratoxina A en muestras de alimentos infantiles (EC/683/2004) (Reglamento 2004/653/CE). Estos límites fueron posteriormente reafirmados en el reglamento actual (1881/2006/CE) en el que se fijan los contenidos máximos de ciertos contaminantes en productos alimenticios (Reglamento 2006/1881/CE). En este reglamento se establece que los contaminantes que se consideren cancerígenos genotóxicos o en los casos en los que la exposición de la población o de los grupos vulnerables de la población se aproxime a la ingesta tolerable o la supere, deben establecerse contenidos máximos tan bajos como sea razonablemente posible (as low as reasonably achievable, ALARA). Este el caso de las aflatoxinas B1 y M1, así como la ocratoxina A en alimentos destinados a bebés y niños de corta edad, en los que se

establecen límites máximos permitidos extremadamente bajos, del orden de sub- $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Así, el límite máximo de ocratoxina A en alimentos infantiles se fijó en $0.5 \mu\text{g}/\text{Kg}$, mientras que la aflatoxina B1 y la aflatoxina M1 presentan límites de $0.1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ y $0.025 \mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente.

La tendencia actual al desarrollo de métodos multianalito que permitan la determinación simultánea de todos los compuestos regulados sin la utilización de ninguna técnica de purificación presenta la dificultad de determinar las micotoxinas de mayor peligrosidad a los bajos niveles máximos permitidos en alimentos infantiles. Un repaso por los diferentes métodos de análisis multianalito publicados recientemente basados en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas demuestra que los límites de cuantificación alcanzados para diferentes matrices estudiadas son superiores a los límites máximos en alimentos infantiles (Capriotti, Caruso, Cavaliere, Foglia, Samperi & Laganà, 2012, Desmarchelier, Oberson, Tella, Gremaud, Seefelder & Mottier, 2010, Spanjer, Rensen & Scholten, 2008). Del mismo modo, la aplicación de dichos métodos multianalito para el análisis de micotoxinas en alimentos infantiles pone de manifiesto la insuficiente sensibilidad para la determinación de las aflatoxinas B1 y M1 a los niveles establecidos por la regulación europea en dichas matrices (Beltrán, Ibáñez, Sancho & Hernández, 2009, Rubert, James, Mañes & Soler, 2012, Rubert, Soler & Mañes, 2012, Spanjer, Rensen & Scholten, 2008).

Una posible alternativa para la determinación de estos compuestos a niveles de sub- $\mu\text{g}/\text{Kg}$ es el empleo de alguna técnica de preconcentración. Una de las opciones es el uso de la SPE (Ren et al., 2007, Sørensen & Elbæk, 2005). Sin embargo, la alternativa más utilizada ha sido la utilización de columnas de inmunoafinidad, que se basan en el principio de unión específica anticuerpo-analito. Se trata de columnas en las que se ha añadido una fase estacionaria compuesta por un gel, normalmente de agarosa, que contiene anticuerpos específicos afines a una o varias micotoxinas. En el proceso de purificación únicamente las micotoxinas que presenten afinidad a los anticuerpos serán

retenidas en la fase estacionaria. La elución de las micotoxinas se produce mediante la desnaturalización del complejo antígeno-anticuerpo.

La unión específica anticuerpo-analito confiere a las columnas de inmunoafinidad una elevada especificidad. Sin embargo esta elevada especificidad puede convertirse en una desventaja ya que reduce la aplicabilidad de esta metodología al análisis de un único compuesto o grupo de compuestos químicamente relacionados. En los últimos años, han aparecido comercialmente nuevas columnas de inmunoafinidad diseñadas para el análisis simultáneo de varias micotoxinas, con el fin de ampliar la multiresidualidad de esta técnica (Göbel & Lusky, 2004, Lattanzio, Solfrizzo, Powers & Visconti, 2007, Romagnoli, Ferrari & Bergamini, 2010). Sin embargo, el número de micotoxinas estudiadas simultáneamente mediante columnas de inmunoafinidad continua siendo limitado para poder ser aplicado en métodos multimicotoxinas.

Respecto al análisis de micotoxinas en alimentos infantiles, y en especial las micotoxinas que podrían resultar más peligrosas debido a su carcinogenicidad, su análisis continúa realizándose mediante el uso de este tipo de columnas. La limitación de la capacidad multiresidual que impone el uso de estas columnas de inmunoafinidad implica que muchos de los análisis que se realizan en el campo de alimentos infantiles continúen llevándose a cabo mediante el uso de la cromatografía líquida con detectores de fluorescencia (Alvito, Sizoo, Almeida & van Egmond, 2010, Tam et al., 2006). La detección por fluorescencia en el campo de análisis de aflatoxinas es una técnica de rutina que continua utilizándose de modo satisfactorio debido a su elevada sensibilidad. Sin embargo, también presenta las desventajas de requerir un elevado tratamiento de muestra que incluye en muchas ocasiones una etapa de derivatización, así como de carecer de poder confirmativo.

El objetivo del **Artículo científico 3** fue desarrollar y validar metodología analítica para la determinación de la aflatoxinas y ocratoxina A en muestras de alimentos infantiles que permitiera la detección y cuantificación de dichos compuestos a concentraciones

inferiores a los límites máximos establecidos en la legislación 1881/2006/EC. Para ello se utilizó la cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem. Los resultados previos observados en el **Artículo científico 1** mostraron la necesidad de aplicar alguna técnica de preconcentración de los analitos que permitiera la detección de estos compuestos a concentraciones inferiores a las validadas en dicho trabajo. En este trabajo se estudió el uso de diferentes técnicas de preconcentración como la extracción en fase sólida y el uso de columnas de inmunoafinidad para conseguir dicho propósito.

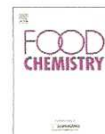
2.3.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 3

Food Chemistry 126 (2011) 737–744



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Analytical Methods

UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk

Eduardo Beltrán^a, María Ibáñez^a, Juan Vicente Sancho^a, Miguel Ángel Cortés^b, Vicent Yusà^b, Félix Hernández^{a,*}^a Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain^b Public Health Laboratory of Valencia-CSISP, E-46020 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 April 2010
Received in revised form 4 October 2010
Accepted 10 November 2010

Keywords:

Aflatoxins
Ochratoxin A
Baby food
Immunoaffinity columns
UHPLC
MS/MS

ABSTRACT

In this work, a method has been developed for the ultrasensitive and selective determination of various regulated mycotoxins (aflatoxins G1, G2, B1, B2, M1, and ochratoxin A) in baby food commodities and milk, using ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS). The high sensitivity required for these compounds made necessary the application of a pre-concentration step based on solid phase extraction with immunoaffinity columns, after sample extraction with acetonitrile:water (80:20). Thanks to the fast high-resolution of UHPLC and the enhanced selectivity obtained with the triple quadrupole mass analyser in SRM mode, the chromatographic separation was achieved in only 4 min.

Validation of the method was carried out in four different matrices (cereals infant formula, powdered milk for babies, milk with cereals for infants, and raw milk) by recovery experiments, using samples spiked at 0.025 and 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in quintuplicate. Satisfactory recoveries, between 80% and 110%, with RSDs lower than 15%, were obtained in all food matrices tested. Quantification was performed by external calibration with standards in solvent. The developed method has been applied to the analysis of samples collected from local markets. Positive findings were confirmed by acquiring two transitions (Q quantification, q confirmation) and evaluating their Q/q ratio.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mycotoxins are naturally toxic secondary metabolites produced by a wide variety of moulds. The growth of moulds in agricultural crops or harvest storage could produce the contamination of human food and animal feed, turning to a grave problem of human health. Nowadays, more than 300 mycotoxins are known, although it is well established that not all moulds produced toxic metabolites, and not all secondary metabolites are toxic (Hussein & Brasel, 2001).

Among all mycotoxins, aflatoxins are the most toxic and the strongest natural carcinogens. Besides aflatoxins, ochratoxin A is one of the most problematic mycotoxins due to its high toxicity (Songsermsakul & Razzazi-Fazeli, 2008). The International Agency for Research on Cancer (IARC) has defined aflatoxin B1 (AFB1) as carcinogen, included in the Group 1, whilst other aflatoxins and ochratoxin A (OTA) have been classified as possibly carcinogen (Group 2B) (IARC, 1993). In order to protect public health, maximum levels have been set up for mycotoxins in certain foods in European Regulation 1881/2006 (Commission Regulation, 2006).

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368.
E-mail address: felix.hernandez@qfa.uji.es (F. Hernández).

0308-8146/\$ - see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.056

Different factors play a role in the decision-making process of setting limits for mycotoxins, based on scientific factors as well as socio-economic issues (Van Egmond, Schothorst, & Jonker, 2007). In the case of aflatoxins and OTA regulation establishes maximum levels as low as reasonably achievable (Commission Regulation, 2006). Special attention has been paid in food for infants and young children, where more restrictive levels have been regulated. Thus, limits as low as of 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of AFB1 are set for baby foods and processed cereal-based foods for infants and young children, and 0.025 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for aflatoxin M1 (AFM1) and 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for OTA.

In order to achieve maximum levels established by the European Commission important analytical efforts are required to develop fast, sensitive and reliable methodologies. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) based techniques have been used for rapid mycotoxins screening (Turner, Subrahmanyam, & Piletsky, 2009) with the disadvantage of pseudo-positive results and, sometimes, unacceptable quantification accuracy, therefore requiring additional confirmatory analysis (Ren et al., 2007; Sforza, Dall'Asta & Marchelli, 2006).

Liquid chromatography (HPLC) coupled to different detection principles has become the most important technique for the determination of known mycotoxins in food and feed (Sforza,

UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk

Beltrán E.^a, Ibáñez M.^a, Sancho, J.V.^a, Cortés M.A.^b, Yusà V.^b, Hernández, F.^a

^a Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

^b Public Health Laboratory of Valencia-CSISP, Valencia, Spain

Abstract

In this work, a method has been developed for the ultrasensitive and selective determination of various regulated mycotoxins (aflatoxins G1, G2, B1, B2, M1, and ochratoxin A) in baby food commodities and milk, using ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS). The high sensitivity required for these compounds made necessary the application of a pre-concentration step based on solid phase extraction with immunoaffinity columns, after sample extraction with acetonitrile:water (80:20). Thanks to the fast high-resolution of UHPLC and the enhanced selectivity obtained with the triple quadrupole mass analyser in SRM mode, the chromatographic separation was achieved in only 4 min.

Validation of the method was carried out in four different matrices (cereals infant formula, powdered milk for babies, milk with cereals for infants, and raw milk) by recovery experiments, using samples spiked at 0.025 and 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in quintuplicate. Satisfactory recoveries, between 80% and 110%, with RSDs lower than 15%, were obtained in all food matrices tested. Quantification was performed by external calibration with standards in solvent. The developed method has been applied to the analysis of samples collected from local markets. Positive findings were confirmed by acquiring two transitions (*Q* quantification, *q* confirmation) and evaluating their *Q/q* ratio.

Keywords: Aflatoxins, Ochratoxin A, Baby food, Immunoaffinity columns, UHPLC, MS/MS

1. Introduction

Mycotoxins are naturally toxic secondary metabolites produced by a wide variety of moulds. The growth of moulds in agricultural crops or harvest storage could produce the contamination of human food and animal feed, turning to a grave problem of human health. Nowadays, more than 300 mycotoxins are known, although it is well established that not all moulds produced toxic metabolites, and not all secondary metabolites are toxic (Hussein & Brasel, 2001).

Among all mycotoxins, aflatoxins are the most toxic and the strongest natural carcinogens. Besides aflatoxins, ochratoxin A is one of the most problematic mycotoxins due to its high toxicity (Songsermsakul & Razzazi-Fazeli, 2008). The International Agency for Research on Cancer (IARC) has defined aflatoxin B1 (AFB1) as carcinogen, included in the Group 1, whilst other aflatoxins and ochratoxin A (OTA) have been classified as possibly carcinogen (Group 2B) (IARC, 1993). In order to protect public health, maximum levels have been set up for mycotoxins in certain foods in European Regulation 1881/2006 (Commission Regulation, 2006). Different factors play a role in the decision-making process of setting limits for mycotoxins, based on scientific factors as well as socio-economic issues (Van Egmond, Schothorst, & Jonker, 2007). In the case of aflatoxins and OTA regulation establishes maximum levels as low as reasonably achievable (Commission Regulation, 2006). Special attention has been paid in food for infants and young children, where more restrictive levels have been regulated. Thus, limits as low as of $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ of AFB1 are set for baby foods and processed cereal-based foods for infants and young children, and $0.025 \mu\text{g kg}^{-1}$ for aflatoxin M1 (AFM1) and $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ for OTA.

In order to achieve maximum levels established by the European Commission important analytical efforts are required to develop fast, sensitive and reliable methodologies. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) based techniques have been used for rapid mycotoxins screening (Turner, Subrahmanyam, & Piletsky, 2009) with the disadvantage of pseudo-positive results and, sometimes, unacceptable quantification accuracy, therefore requiring additional confirmatory analysis (Ren et al., 2007 and Sforza et al., 2006).

Liquid chromatography (HPLC) coupled to different detection principles has become the most important technique for the determination of known mycotoxins in food and feed (Sforza et al., 2006 and Songsermsakul and Razzazi-Fazeli, 2008). Thus, HPLC–fluorescence detection was the preferred approach for aflatoxins and OTA analysis (Jaimez et al., 2000 and Sizoo and Van Egmond, 2005), however, due to the different chemical properties of mycotoxins, most of the methods are focused on only individual mycotoxins or related groups, requiring a variety of clean-up protocols.

In the last years, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) has become the most universal approach for mycotoxin analysis (Krska et al., 2008 and Zöllner and Mayer-Helm, 2006). The high selectivity provided by LC–MS/MS allows the determination of several mycotoxins in one run. Many authors have avoided purification steps, injecting the crude extract, in order to increase the multi-analyte capacity of the method (Beltrán et al., 2009, Delmulle et al., 2006, Frenich et al., 2009, Herebian et al., 2009, Spanjer et al., 2008, Sulyok et al., 2006 and Sulyok et al., 2010).

Nowadays, several multi-mycotoxin methods have been developed in different food commodities. However, validated methods for baby food analysis are scarce due to the difficulties associated to the high sensitivity required to satisfy the strict regulation in this type of matrices (Beltrán et al., 2009 and Spanjer et al., 2008). Hence, a clean-up or enrichment technique is usually necessary to determine mycotoxins at the low EU limits allowed in baby food. The use of SPE can be an interesting approach to this aim. Ren et al. (2007) studied different sorbents for mycotoxins clean-up, obtaining the best results with multifunctional cartridges (Mycosep 226). Other authors have proposed the use of immunoaffinity columns (IAC) as they present high specificity and selectivity for selected analytes, removing matrix interferences (Shephard, 2009). IAC are generally designed for only one type of toxin, reducing the method multiresiduality. However, this drawback could be solved with the introduction of columns with specific antibodies for both aflatoxins and OTA, being an interesting alternative which reduces sample throughput and allows the simultaneous analysis

of all these compounds (Chan et al., 2004, Garcia-Villanova et al., 2004, Göbel and Lusky, 2004, Lattanzio et al., 2007 and Sizoo and Van Egmond, 2005).

The introduction of ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) has allowed faster efficient chromatographic separations, reducing run times. Besides, narrower peaks are obtained, which result in increased sensitivity and improved peak resolution. Some applications of this technique on mycotoxin analysis field have been recently reported in combination with tandem MS (Beltrán et al., 2009, Di Mavungu et al., 2009, Frenich et al., 2009, Fu et al., 2008, Ren et al., 2007 and Ventura et al., 2006). UHPLC coupled to triple quadrupole mass spectrometer (QqQ), in selected reaction monitoring (SRM) mode, is at present considered as one of the most selective and sensitive techniques for quantification and confirmation of organic contaminants and residues in food, mycotoxins analysis included, as illustrated by the most recent scientific literature.

In a recent work (Beltrán et al., 2009), we developed a rapid method with little sample manipulation for the simultaneous determination of eleven regulated mycotoxins in different food commodities by UHPLC–MS/MS. However, some difficulties had been found in order to reach the sensitivity required for aflatoxin B1 and its metabolite aflatoxin M1 in babyfood, accordingly to the low concentration levels permitted by the EC.

The aim of this work is the development of a sensitive UHPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in baby food and milk-based products at the low maximum levels required by the European Legislation. Special attention has been paid to the clean-up and pre-concentration steps required reaching the sensitivity needed in this type of samples. Immunoaffinity columns Aflaochra HPLCTM have been selected due to their high specificity, with the possibility to determine simultaneously aflatoxins and ochratoxin A. This methodology has been validated in four different matrices (cereals infant formula, infant milk, infant milk with cereals and raw milk) with highly satisfactory results, and applied to the analysis of samples collected from the markets.

2. Experimental

2.1. Reagents and chemicals

Standards of aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2) and OTA were supplied by Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). AFM1 was supplied by Supelco (from Sigma–Aldrich, Madrid, Spain). All standards have purity higher than 99%.

HPLC-grade water was obtained from distilled water passed through a MilliQ water purification system (Millipore LTD, Bedford, MA, USA). HPLC-grade methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). Formic acid (HCOOH) (>98%) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Ammonium acetate (NH4Ac) (>99%) was obtained from ScharLab.

Individually stock solutions, at around 100 mg L^{-1} , were prepared dissolving about 5 or 10 mg of solid reference standard in 50 or 100 mL of acetonitrile, respectively. AFM1 standard at 1 mg L^{-1} was prepared diluting 10 mg L^{-1} commercial solution in acetonitrile.

An intermediate mixed solution (MIX A) containing aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2) and OTA at a concentration of 1 mg L^{-1} was obtained after mixing individual stock solutions and diluting with acetonitrile. The mixed standard solution (around $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) was prepared adding 1 mL of MIX A, and 1 mL of AFM1 standard (1 mg L^{-1}) and diluting to 10 mL with water. Working standard solutions for LC–MS/MS analysis and for spiking samples were prepared by dilution of the $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ mixed solution with water. Stock and intermediate standard solutions were stored in a freezer at $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$, whereas working solutions were stored in a fridge at $4 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Immunoaffinity columns (Aflaochra HPLCTM) were supplied by Vicam (Tecasa, Madrid, Spain) and Oasis HLB (60 mg) cartridges were obtained from Waters (Mildford, MA, USA).

2.2. Instrumentation

An ultra-performance liquid chromatography (UPLCTM) system Acquity (Waters, Mildford, MA, USA) was interfaced to a triple quadrupole mass spectrometer (TQDTM, Waters Micromass, Manchester, UK) using an orthogonal Z-spray-electrospray interface. The LC separation was performed using an Acquity UPLC BEH C18 analytical column, 1.7 μm particle size, 2.1 \times 50 mm (Waters), at a flow rate of 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Mobile phase was a time-programmed gradient using A (H_2O 0.5 mM NH_4Ac , 0.1% HCOOH) and B (MeOH 0.5 mM NH_4Ac , 0.1% HCOOH). Organic solvent percentage in the mobile phase changed linearly as follows: 0 min., 10%; 4 min., 90%; 4.1 min., 10%; 7 min., 10%. The injection volume was 20 μL . Drying gas as well as nebulising gas was nitrogen. The gas flow was set to 1200 L/h. For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Praxair, Valencia, Spain) with a pressure of approximately 2.10–3 mbar in the T-wave collision cell. Capillary voltage of 3.5 kV in positive electrospray ionisation mode was applied. The interface temperature was set to 500 $^\circ\text{C}$ and the source temperature to 120 $^\circ\text{C}$. Temperature column was set to 40 $^\circ\text{C}$. Dwell times of 30 ms/scan were chosen. Masslynx v 4.1 (Waters, Manchester, UK) software was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and samples.

2.3. Samples

Samples of powdered milk for babies, milk with cereals for infants, cereals infant formula and raw milk used in the validation experiments were purchased in different supermarkets and drugstores of Castellon (Spain). Powdered baby milk (4.7 g) was reconstituted in 30 mL of water, as instructed by the manufacturer in order to express mycotoxins levels in product ready to use (Commission Regulation (EC) No. 1881, 2006).

2.4. Analytical procedure

Cereals infant formula samples were accurately weighed (5 g, precision 0.1 mg) and transferred to centrifuge tubes (50 mL). Samples were extracted by shaking with 20 mL

acetonitrile:water (80:20) on a mechanical shaker for 90 min. After that, extracts were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, and 10 mL supernatant was collected.

Liquid samples (raw milk, milk with cereals for infants and reconstituted powdered baby milk) were accurately weighed (8 g, precision 0.1 mg) into 50 mL centrifuge tube. Then, 32 mL of acetonitrile were added to extract mycotoxins from the sample as well as precipitate proteins and the whole mixture was extracted on a mechanical shaker for 90 min. Finally, extracts were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, and the supernatant was collected.

In order to prepare the extracts for the immunoaffinity cleanup, acetonitrile of the extract was removed by using a turbo evaporator system (water bath at 50 °C under gentle nitrogen stream). Then, the extracts were diluted with water up to 20 mL final volume.

The 20 mL aqueous extracts were passed through an AflaOchra HPLC™ column at 1–2 drops per second. Then, the column was washed with 5 mL of HPLC water. Aflatoxins and OTA were eluted from the column with 4 mL methanol. To ensure complete elution of the bound toxin from the antibody, the solvent was maintained in contact with the column at least 1 min before starting the elution. The methanolic eluates were dried under gentle nitrogen stream at 50 °C and reconstituted with 1 mL of HPLC-grade water. Finally, 20 µL extracts were injected into the UHPLC–ESI-MS/MS system. Quantification was performed by external calibration with standards in solvent.

2.5. Validation study

The method developed was validated for the six selected mycotoxins in four different matrices: cereals infant formula, raw milk, milk for babies and milk with cereals (for infants). The following parameters were evaluated in order to ensure the method quality: linearity, accuracy, precision, specificity, limits of quantification (LOQ), limits of detection (LOD) and Q/q ratios of the SRM transitions acquired, which were used for confirmation of positive findings.

Linearity of the method was estimated by analysis of eight standard calibration solutions, in duplicate, in the range 25–10.000 ng L⁻¹. Accuracy and precision were determined by recovery experiments, analysing fortified samples in quintuplicate. This experiment was performed at 0.1 µg kg⁻¹ for cereals infant formula and at 0.025 µg kg⁻¹ for milk and related products.

LOQ and LOD were estimated for a signal to noise ratio of 10 and 3, respectively, from the chromatograms of the samples spiked at the lowest level validated.

Q/q ratios were evaluated from reference standards in solvent and compared to those experimentally obtained from spiked samples.

3. Results and discussion

3.1. Method optimisation

Aflatoxin M1 ionisation conditions were obtained by infusion in electrospray source (ESI), operating in positive ionisation mode. Cone voltage was optimised to obtain the highest relative intensity for the $[M+H]^+$ precursor ion. MS/MS spectra were acquired in product ion scan mode at different collision energies. For the remaining compounds, MS conditions were selected based on our previous work (Beltrán et al., 2009).

Two selected reaction monitoring (SRM) transitions were acquired per compound: the most sensitive transition (Q) was used for quantification purposes and the other one for confirmation purposes (q). The selection of product ions resulting from non-specific losses, e.g. H_2O or NH_3 , was avoided to minimise risks of false positives (Hernández et al., 2005 and Pozo et al., 2006). Optimised MS parameters (precursor and product ions, cone voltages, and collision energies) as well as ion Q/q ratios are shown in **Table 1**.

Table 1. Optimised MS/MS parameters for selected toxins.

COMPOUND	IONIZATION MODE	PRECURSOR ION (m/z)	CONE VOLTAGE (V)	PRODUCT ION (m/z)	COLLISION ENERGY (eV)	ION RATIO (Q/q)
Aflatoxin G1 (AFG1)	ESI+	329.2	55	243.2 (Q)	25	2.3
				128.1 (q)	60	
Aflatoxin G2 (AFG2)	ESI+	331.2	55	189.2 (Q)	40	1.1
				243.2 (q)	30	
Aflatoxin B1 (AFB1)	ESI+	313.2	60	241.2 (Q)	35	1.3
				285.2 (q)	25	
Aflatoxin B2 (AFB2)	ESI+	315.2	60	287.2 (Q)	30	1.2
				259.2 (q)	35	
Aflatoxin M1 (AFM1)	ESI+	329.1	40	273.2 (Q)	25	2.4
				259.1 (q)	30	
Ochratoxin A (OTA)	ESI+	404.2	30	239.1 (Q)	25	1.8
				102.0 (q)	70	

Chromatographic separation was performed with an Acquity BEH C18 column. The selection of the mobile phase in LC-MS/MS methods may be important as it may have a notable effect on the detector response. In this paper water-methanol, both with formic acid 0.1% and ammonium acetate 0.5 mM, was selected as mobile phase. Efficient separation of all analytes was obtained under linear gradient, by increasing organic solvent from 10% to 90%, in only 4 min. This generic gradient was selected in our previous work for determination of 11 mycotoxins (Beltrán et al., 2009), and it also led to a satisfactory separation of AFM1 within the same UHPLC run. The flow rate was set up at 0.3 mL/min as sensitivity was notably reduced when working at higher flow rates due to the source design of our equipment (Beltrán et al., 2009).

3.2. Sample treatment

Milk for babies was purchased as powder and reconstituted with water following manufacturer instructions, as maximum levels established by the European Regulation are referred to products ready to use.

For solid matrices (cereals infant formula), extraction solvent was optimised by selecting different water/organic solvents (methanol and acetonitrile were tested) at different ratios. The best results were obtained using ACN:H₂O (80:20). Our previous experiments corroborated these results (Beltrán et al., 2009).

Regarding liquid samples, we tried to design a sample treatment similar to that developed for solid matrices, as milk with cereals contains milled cereals in suspension. For this purpose, ACN was added to liquid samples to obtain an acetonitrile-aqueous (80:20) solution similar to the extraction solvent used in solid matrices.

3.3. Pre-concentration and purification

The low maximum levels established by the European legislation made necessary a pre-concentration step as they were not feasible by direct injection of food extracts (Beltrán et al.,

2009). Two approaches have been studied in this work: the use of polymeric cartridges (Oasis HLB 60 mg, Waters) and immunoaffinity columns (Aflaochra HPLCTM, Vicam). **Fig. 1a** shows chromatograms for a cereals infant formula spiked at $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ after direct injection of the extract. As it can be seen, a pre-concentration step was necessary to reach the low analyte levels tested.

Extraction efficiency of HLB cartridges was firstly evaluated from the recovery values of a 25 ng L^{-1} reference standard mixed solution loaded into the cartridge (250 ng L^{-1} in final concentration). The maximum content of ACN to maintain analyte retention was found to be 10%. Therefore, standard solutions were prepared in 10% ACN, and 100 mL were loaded into the cartridge at a low flow rate. The cartridge was washed with 5 mL methanol:water (30:70) and eluted with 5 mL methanol. The eluate was evaporated under a gentle stream of nitrogen and finally dissolved in 1 mL water (**Fig. 1b1**). Absolute recoveries were calculated for all analytes comparing areas with those of a 250 ng L^{-1} mixed standard solution injected directly into the system (without being subjected to SPE clean-up). Recoveries in the range 75–113% were obtained for all analytes, showing that no significant losses took place during the SPE process. In a subsequent step, the procedure was tested for cereal infant formula samples spiked at $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Ten millilitres of the acetonitrile–aqueous (80:20) sample extract was ten-fold diluted with water to adjust the content of ACN, and 100 mL of the diluted extract were loaded into the cartridges. In this case, strong signal suppression was observed, making impossible to quantify aflatoxins, surely as a result of the matrix effect produced by coeluting matrix components (**Fig. 1c1**).

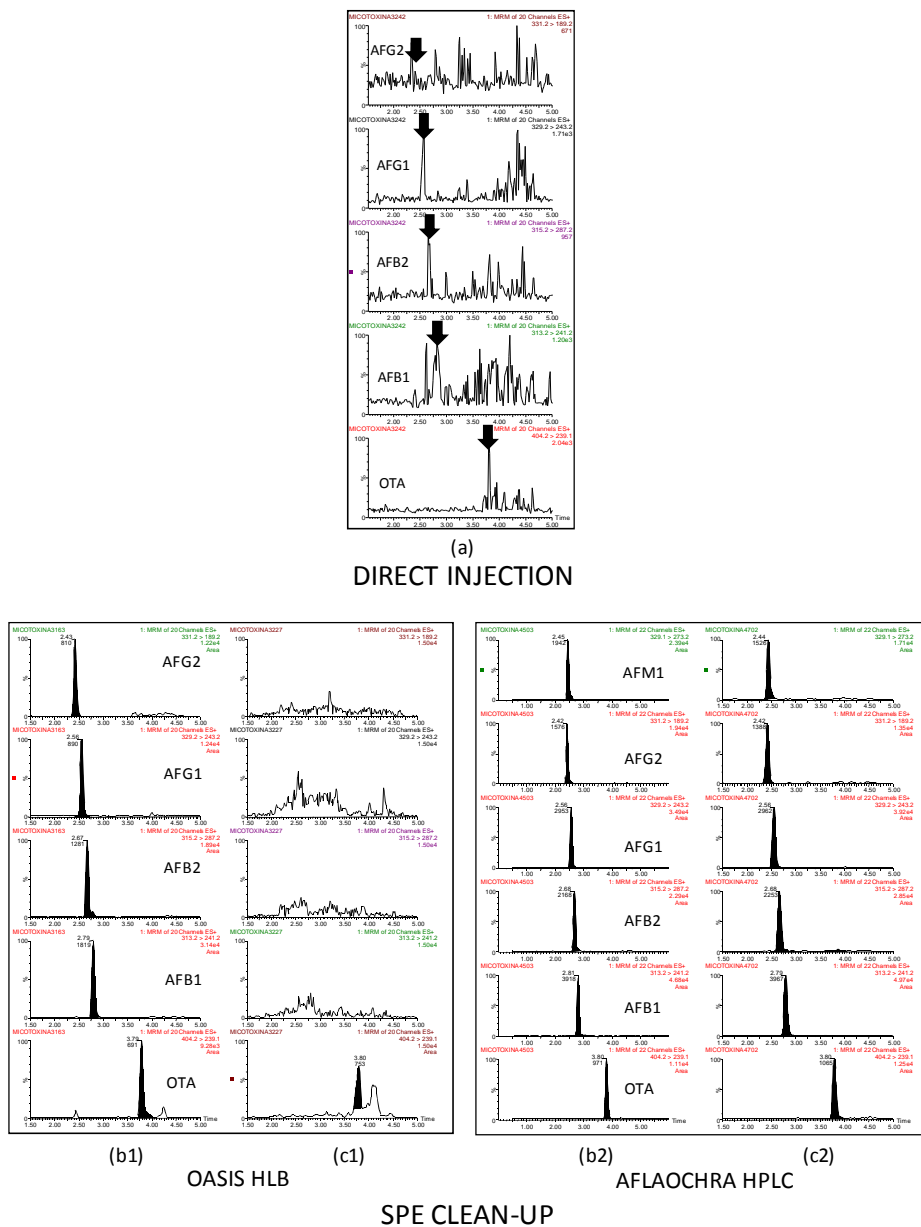


Fig. 1. UHPLC–MS/MS chromatograms for aflatoxins, metabolite AFM1 and ochratoxin A corresponding to: (a) cereal infant formula spiked at $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ after direct injection of the raw diluted extract, (b) 25 ng L^{-1} mixed standard solution after SPE procedure, and (c) cereal infant formula sample spiked at $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ after SPE procedure. 1: Polymeric cartridge Oasis HLB SPE. 2: Immunoaffinity Aflaochra HPLCTM SPE clean-up.

To reduce the presence of matrix interferences, the use of more selective cartridges was tested. Aflachra HPLC™ cartridges were selected based on their potential to pre-concentrate simultaneously aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2) and OTA. Recoveries for standards subjected to the SPE process were excellent in all cases (around 100%), showing the suitability of using these cartridges to retain these compounds (**Fig. 1b2**). Afterwards, these cartridges were tested for cereal infant formula samples spiked at $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Before loading the cartridges, 10 mL of sample extract (around 80% acetonitrile) was evaporated under nitrogen stream in order to remove the content of organic solvent, as even small amounts of acetonitrile led to a decrease in analyte recoveries during immunoaffinity purification. Our results showed that immunoaffinity columns allowed the simultaneous clean-up and analyte pre-concentration, obtaining satisfactory chromatograms, with recoveries in the range 79–112% (**Fig. 1c2**). Additionally, adequate retention of the metabolite AFM1 was also observed in the SPE cartridges. Although these immunoaffinity columns are not sold to retain AFM1, enough cross-reactivity seemed to occur, allowing the simultaneous determination of AFM1 together with AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 and OTA (Sizoo et al., 2005). It is noteworthy that immunoaffinity SPE clean-up was so efficient that matrix effects (typically ionisation suppression) were eliminated making feasible the accurate quantification with standards in solvent without the need of correction.

3.4. Method validation

The developed method was validated before application to sample analysis in four different matrices: cereals baby food infant formula (powder), raw milk, reconstituted milk for babies and milk with cereals for infants (**Table 2**).

Linear calibrations, with correlations coefficients higher than 0.99, were obtained for all compounds in the range $25\text{--}10.000 \text{ ng mL}^{-1}$.

Accuracy was estimated by spiking blank samples ($n = 5$) at the strict maximum levels established by the European legislation in baby food and milk derivatives. Thereby, cereals

infant formula was spiked at $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (maximum level for AFB1 in cereals for infant food) and milk-based liquid samples were spiked at $0.025 \mu\text{g kg}^{-1}$ (maximum level established for AFM1). Satisfactory recoveries, in the range 80–110%, were obtained for all analyte/matrix combinations tested, with RSDs lower than 10% (except OTA at $0.025 \mu\text{g kg}^{-1}$, with RSD 11%). These data can be taken as highly satisfactory taking into account the difficulty of this analysis. This fact is corroborated by chromatograms showed in **Fig. 2**, which correspond to the four matrices tested spiked at the 0.025 or $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ level.

The method was found to be highly specific as no relevant interferences were observed in the blanks at the analytes retention times. Estimated LOQs varied between 3 and 25 ng kg^{-1} , and LODs were in the range 1 – 8 ng kg^{-1} . Q/q ratios deviations below 20% were obtained for all compounds in the four spiked matrices selected in relation to these of standards in solvent. As stated in the previous section, the efficient SPE clean-up allowed to work with external calibration using standards in solvent due to the absence of relevant matrix effects that normally affect most of LC–MS/MS methods applied for mycotoxins determination.

Table 2. UHPLC-MS/MS method validation in selected matrices. Mean recoveries and relative standard deviation (% in brackets) of the overall analytical procedure (n=5) at the validated level. Estimated LOQs and LODs.

VALIDATED LEVEL	CEREALS INFANT FORMULA			MILK FOR INFANTS WITH CEREALS			RAW MILK			MILK FOR BABIES		
	Rec. (RSD) (%)	LOQ (ng Kg ⁻¹)	LOD (ng Kg ⁻¹)	Rec. (RSD) (%)	LOQ (ng Kg ⁻¹)	LOD (ng Kg ⁻¹)	Rec. (RSD) (%)	LOQ (ng Kg ⁻¹)	LOD (ng Kg ⁻¹)	Rec. (RSD) (%)	LOQ (ng Kg ⁻¹)	LOD (ng Kg ⁻¹)
Aflatoxin G1 (AFG1)	101 (7)	20	6	94 (3)	16	5	100 (5)	5	2	102 (5)	5	2
Aflatoxin G2 (AFG2)	96 (6)	25	8	88 (9)	18	5	81 (9)	1.5	5	90 (7)	5	2
Aflatoxin B1 (AFB1)	83 (5)	20	6	81 (7)	9	3	91 (10)	5	2	103 (7)	3	1
Aflatoxin B2 (AFB2)	85 (7)	18	5	91 (8)	15	5	81 (7)	5	2	97 (7)	3	1
Aflatoxin M1 (AFM1)	-	-	-	92 (7)	13	4	107 (7)	7	2	94 (4)	3	1
Ochratoxin A (OTA)	84 (5)	25	9	101 (11)	6	2	-	-	-	-	-	-

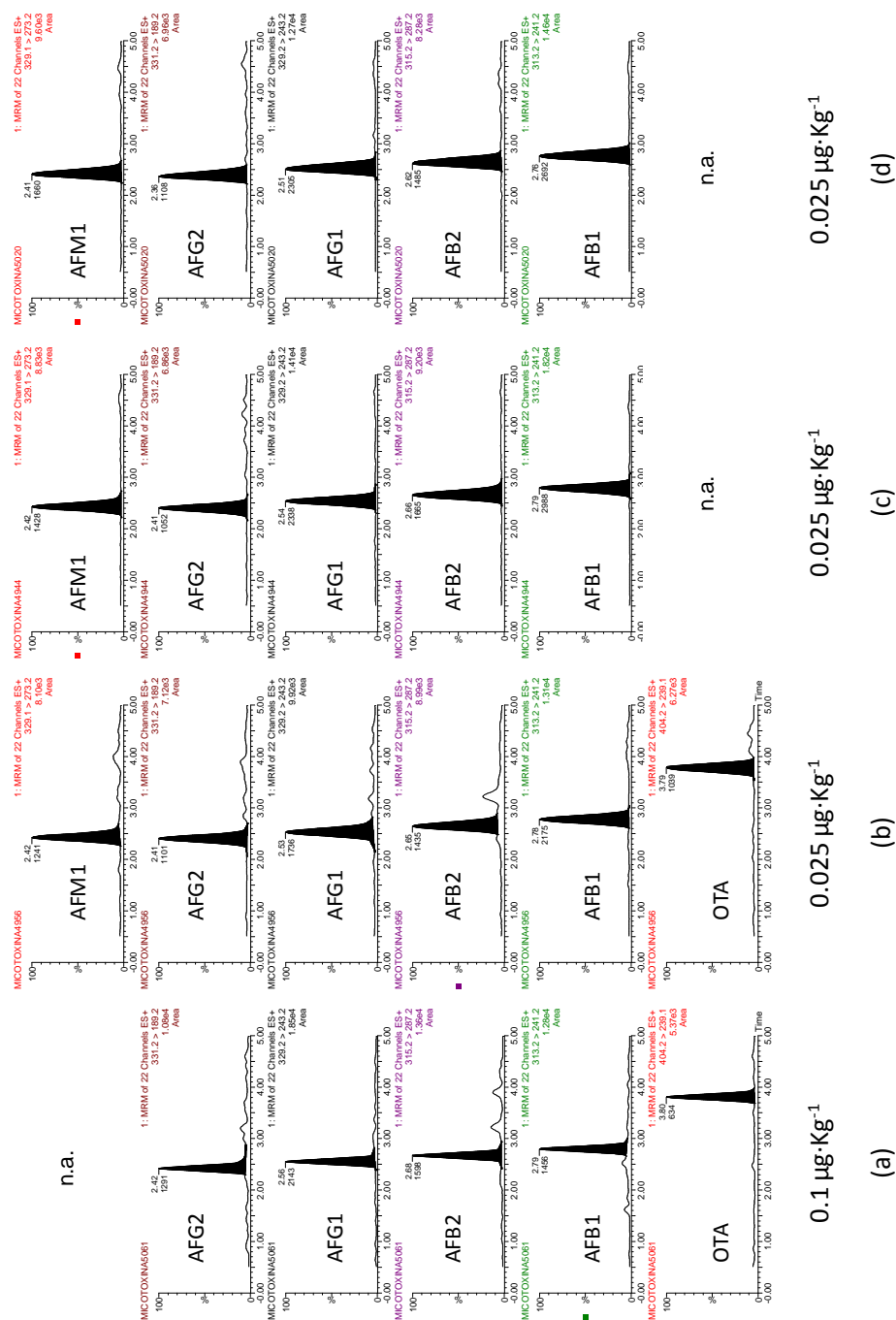


Fig. 2. UHPLC-MS/MS chromatograms for detected mycotoxins at the low concentration levels validated: (a) cereals in infant formula (0.1 µg·kg⁻¹), (b) milk with cereals for infants (0.025 µg·kg⁻¹), (c) raw milk (0.025 µg·kg⁻¹), and, (d) powdered milk for babies (0.025 µg·kg⁻¹). (n.a. = not applicable).

The method was found to be highly specific as no relevant interferences were observed in the blanks at the analytes retention times. Estimated LOQs varied between 3 and 25 ng kg⁻¹, and LODs were in the range 1–8 ng kg⁻¹. Q/q ratios deviations below 20% were obtained for all compounds in the four spiked matrices selected in relation to these of standards in solvent. As stated in the previous section, the efficient SPE clean-up allowed to work with external calibration using standards in solvent due to the absence of relevant matrix effects that normally affect most of LC–MS/MS methods applied for mycotoxins determination.

3.5. Application to samples

The optimised method was applied to the analysis of commercial products obtained from local supermarkets and drugstores. In total, 14 samples were analysed, three of them corresponding to cereals infant formula; seven to infant milk; two were raw milk and the remaining samples corresponded to infant milk with cereals.

Only three out of 14 samples showed mycotoxin contamination. Two of them corresponded to cereals infant formulas for babies, both being positive to OTA. The third one corresponded to milk for babies, which was positive for AFM1. **Fig. 3** shows the chromatograms for one of the cereal infant formula sample containing OTA at 0.050 µg kg⁻¹ and for the milk for babies sample contaminated by AFM1 at 0.006 µg kg⁻¹.

Positive samples were confirmed by the accomplishment of both *Q/q* ratio and retention time (deviations lower than 3% and 1%, respectively) (**Fig. 4**). It is relevant to mention the low *Q/q* ratios deviations ($\leq 3\%$) obtained for positive samples, even at very low levels (e.g. 0.006 µg kg⁻¹ of AFM1). In all three positives, concentration values found in samples were lower than maximum permitted levels.

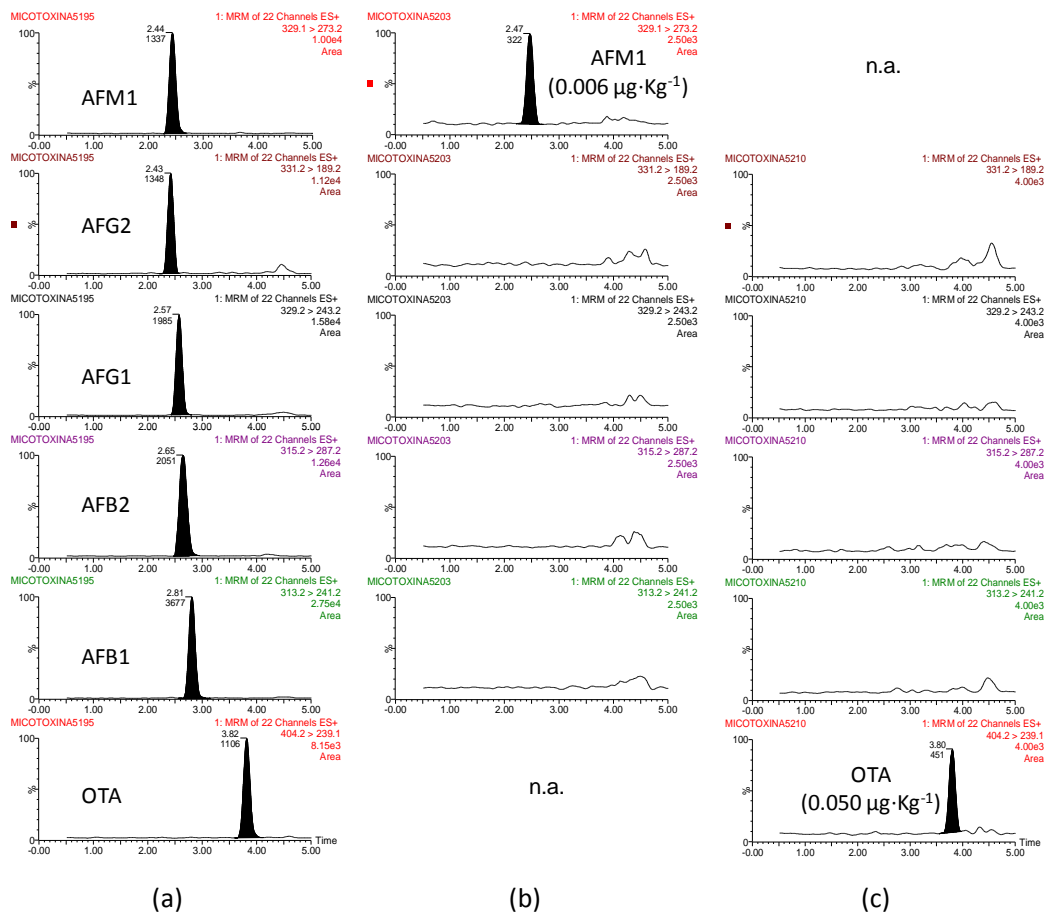


Fig. 3. UHPLC–MS/MS chromatograms: (a) mixed standard solution of 250 ng L⁻¹, (b) powdered milk for babies sample where AFM1 was detected, and, (c) cereals infant formula sample where OTA was detected. (n.a. = not applicable).

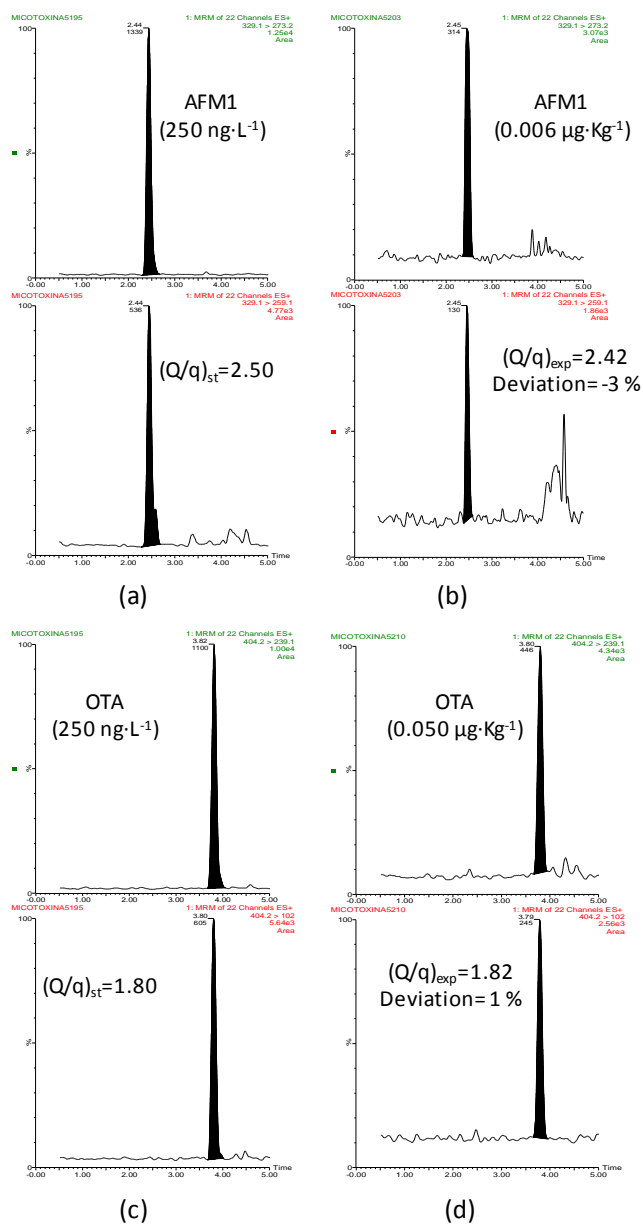


Fig. 4. Confirmation of positive samples by the accomplishment of Q/q ratios and retention times. UHPLC-MS/MS chromatograms corresponding to: (a) AFM1 $250 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ reference standard, (b) sample of powdered milk for babies, containing $0.006 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ of AFM1, (c) OTA $250 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ reference standard, (d) sample of cereals infant formula, containing $0.050 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ of OTA.

Q : quantification transition, q : confirmation transition. Q/q_{st} : intensity ratio for the reference standard. Q/q_{exp} : experimental intensity ratio in sample

4. Conclusions

An efficient, highly sensitive UHPLC–MS/MS method has been developed for the simultaneous determination of regulated aflatoxins, the metabolite AFM1 and ochratoxin A in babyfood and milk-based products. The work has been focused on these compounds due to the very low regulated levels, which cannot be easily achieved in multi-mycotoxin methods. Different approaches have been tested in order to minimise interferences and pre-concentrate analytes, with the aim of reaching the required selectivity and sensitivity in this type of analysis. Satisfactory results have been obtained using immunoaffinity SPE cartridges as a consequence of the high selectivity obtained with the use of specific antibodies.

The good performance of the method comes from different relevant aspects. Firstly, UHPLC has allowed reducing chromatographic run time down to 5 min per sample, with improved sensitivity due to the narrower chromatographic peaks in comparison to conventional HPLC. Secondly, the use of a mixed-mode antibodies column has made possible the determination of all targeted mycotoxins in one single analysis. Thirdly, the use of tandem mass spectrometry with triple quadrupole analyser has allowed the acquisition of two SRM transitions per compound with good sensitivity, providing a reliable confirmation of mycotoxins detected in samples.

The method has been validated in four different matrices (cereals infant formula, milk for babies, infant milk with cereals and raw milk) at the lowest concentration levels regulated by European legislation, obtaining highly satisfactory results in terms of accuracy and precision for all analyte/matrix combinations tested.

Acknowledgements

The Research Institute for Pesticides and Water is a member of the Food Safety Platform of Comunidad Valenciana, and has received financial support of Generalitat Valenciana to perform this work (Ref A-14/09). The authors acknowledge the financial support from the Generalitat Valenciana, as research group of excellence PROMETEO/2009/054. The authors are very grateful to Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using the UPLC-TQD mass spectrometer. E.B. is grateful to University Jaume I for his pre-doctoral grant.

References

Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2009). Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(12), 1801-1809.

Chan, D., MacDonald, S. J., Boughtflower, V., & Brereton, P. (2004). Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin a in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography- fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1059(1-2), 13-16.

Commission Regulation (EC) No 1881/2006. (2006). Commission Directive 2006/1881/EC of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs. *Official Journal of the European Communities*, L364, 5-24.

Delmulle, B., De Saeger, S., Adams, A., De Kimpe, N., & Van Peteghem, C. (2006). Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 16 mycotoxins on cellulose filters and in fungal cultures. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(5), 771-776.

Di Mavungu, J. D., Monbaliu, S., Scippo, M. -L., Maghuin-Rogister, G., Schneider, Y. -J., Larondelle, Y., Callebaut, A., Robbens, J., van Peteghem, C., & de Saeger, S. (2009). LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26(6), 885-895.

Frenich, A. G., Vidal, J. L. M., Romero-González, R., & Aguilera-Luiz, M. d. M. (2009). Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 117(4), 705-712.

Fu, Z., Huang, X., & Min, S. (2008). Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *Journal of Chromatography A*, 1209(1-2), 271-274.

García-Villanova, R. J., Cerdón, C., González Paramás, A. M., Aparicio, P., & García Rosales, M. E. (2004). Simultaneous immunoaffinity column cleanup and HPLC analysis of aflatoxins and ochratoxin A in Spanish bee pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7235-7239.

Göbel, R., & Lusky, K. (2004). Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in grains by new immunoaffinity column/liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 87(2), 411-416.

Herebian, D., Zühlke, S., Lamshöft, M., & Spiteller, M. (2009). Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap. *Journal of Separation Science*, 32(7), 939-948.

Hernández, F., Sancho, J. V., & Pozo, O. J. (2005). Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(4), 934-946.

Hussein, H. S., & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), 101-134.

IARC, (1993). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, vol 56, International Agency for research on Cancer. Lyon .

Jaimez, J., Fente, C. A., Vazquez, B. I., Franco, C. M., Cepeda, A., Mahuzier, G., & Prognon, P. (2000). Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 882(1-2), 1-10.

Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., & Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants*, 25(2), 152-163.

Lattanzio, V. M. T., Solfrizzo, M., Powers, S., & Visconti, A. (2007). Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(20), 3253-3261.

Pozo, O. J., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Hernández, F., & Niessen, W. M. A. (2006). Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Achievements and pitfalls. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 25(10), 1030-1042.

Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, H., & Wang, Z. (2007). Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1143(1-2), 48-64.

Sforza, S., Dall'Asta, C., & Marchelli, R. (2006). Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(1), 54-76.

Shephard, G. S. (2009). Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5), 1215-1224.

Sizoo, E. A., & Van Egmond, H. P. (2005). Analysis of duplicate 24-hour diet samples for aflatoxin B1, aflatoxin M1 and ochratoxin A. *Food additives and contaminants*, 22(2), 163-172.

Songsermsakul, P., & Razzazi-Fazeli, E. (2008). A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31(11-12), 1641-1686.

Spanjer, M. C., Rensen, P. M., & Scholten, J. M. (2008). LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Additives and Contaminants*, 25(4), 472-489.

Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chemistry*, 119(1), 408-416.

Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(18), 2649-2659.

Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632(2), 168-180.

Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., & Jonker, M. A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food : Perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(1), 147-157.

Ventura, M., Guillén, D., Anaya, I., Broto-Puig, F., Lliberia, J. L., Agut, M., & Comellas, L. (2006). Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for

the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(21), 3199-3204.

Zöllner, P., & Mayer-Helm, B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1136(2), 123-169.

2.3.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Como se ha comentado en el **Artículo científico 1**, para el análisis simultáneo de las micotoxinas reguladas, se requiere de metodología analítica en la que se llegue a una situación de compromiso que permita la determinación de todos los compuestos deseados en un solo análisis. Este hecho se encuentra con la dificultad de aplicar tratamientos de muestra que permitan el *clean-up* y preconcentración de los analitos. Así, en la mayoría de las metodologías publicadas el tratamiento de muestra se ha limitado a una etapa de extracción y posterior dilución del extracto previamente a la inyección directa al sistema cromatográfico (Capriotti, Caruso, Cavaliere, Foglia, Samperi & Laganà, 2012). Sin embargo, en situaciones concretas como es el caso de las aflatoxinas, y más concretamente las aflatoxinas B1 y M1, la sensibilidad de la técnica basada en la aproximación “*dilute and shoot*” no es suficiente para la determinación de estos

compuestos a los niveles máximos permitidos por la legislación en alimentos infantiles. En estos casos es necesario mejorar la etapa de tratamiento de muestra para conseguir alcanzar dichos niveles, que en el caso de la aflatoxina B1 es 0.1 µg/Kg, mientras que para la aflatoxina M1 es tan bajo como 0.025 µg/Kg.

En el presente trabajo, partiendo de las condiciones cromatográficas y espectrométricas optimizadas en el **Artículo científico 1**, se estudió la introducción de una etapa de pre-concentración que permitiera la detección simultánea de aflatoxinas y ocratoxina A en muestras alimenticias destinadas a bebés y niños de corta edad. Los métodos de *clean-up* estudiados fueron: la utilización de la SPE, el uso de cartuchos multifuncionales y la purificación mediante el uso de columnas de inmunoafinidad.

Los cartuchos multifuncionales utilizados (Bond Elut Mycotoxins[®]) consisten en adsorbentes basados en mezclas de carbón y alumina que actúan a modo de filtro. Por tanto se basa en una purificación por no retención, eluyendo los analitos de interés durante la carga y reteniendo en el adsorbente los interferentes de matriz. Aunque se trata de una metodología rápida que permite la reducción de compuestos que pueden ser problemáticos en el proceso de ionización, esta técnica no permite la preconcentración de los analitos. Por tanto, fue desestimada, pues la metodología no presentaba la sensibilidad requerida.

La extracción en fase sólida, especialmente con cartuchos poliméricos, ha sido ampliamente utilizada en el análisis de micotoxinas en diferentes matrices, aunque nunca en productos destinados a alimentación infantil en la que los niveles máximos son más restrictivos. Estos cartuchos poliméricos han sido satisfactoriamente utilizados para la determinación simultánea de micotoxinas en cereales (Van Pamel, Verbeken, Vlaemyneck, De Boever & Daeseleire, 2011), vinos (Pérez-Ortega, Gilbert-López, García-Reyes, Ramos-Martos & Molina-Díaz, 2012), productos cárnicos (Chen et al., 2012), así como suplementos alimenticios (di Mavungu et al., 2009), pero en ninguno de estos trabajos se han alcanzado límites de cuantificación del orden de los establecidos para alimentos

infantiles. En este trabajo se probó el uso de cartuchos poliméricos Oasis HLB[®] de 60 mg. Se optimizó la metodología mediante el uso de patrones, observando la necesidad de reducir el contenido de disolvente orgánico a un 10% en el proceso de carga de los extractos para poder asegurar la retención de todos los compuestos estudiados en el adsorbente seleccionado. Adicionalmente se estudió el posible efecto del volumen de ruptura, no observándose pérdidas cuando se pasaban 100 mL de muestra a través del cartucho. El estudio del proceso de lavado demostró una correcta retención de los compuestos siempre que no se superara un 30% de MeOH en la mezcla acuosa de lavado. Finalmente, la elución de los compuestos se realizó mediante el paso de 5 mL de MeOH a través del cartucho previamente secado a vacío. Posteriormente, este eluato era evaporado bajo corriente de nitrógeno y reconstituido con 1 mL de agua. Los resultados obtenidos mediante la preconcentración de los compuestos estudiados en solvente fueron muy satisfactorios, con recuperaciones dentro del rango esperado.

La metodología desarrollada se testeó utilizando muestras fortificadas extraídas según el procedimiento optimizado. Sin embargo, la preconcentración de los analitos cuando se encontraban en matriz no fue satisfactoria. Cuando se intentó comparar los resultados obtenidos para una muestra de papilla multicereales fortificada a 0.1 µg/Kg, a la cual se le aplicó el tratamiento de muestra desarrollado, con un patrón correspondiente a la concentración teórica presente en el extracto después de la preconcentración (0.25 µg/L) se observó la completa desaparición de la señal para todos los compuestos a excepción de la ocratoxina A (ver **Figura 1, Artículo científico 3**). Todos los indicios apuntaron a un ineficiente *clean-up* de la muestra, lo que produjo una preconcentración de los interferentes de matriz, y por tanto un efecto de supresión en la ionización aún más acusado. Con el fin de confirmar las sospechas, se procesaron extractos blanco a través de los cartuchos poliméricos. Después de ser reconstituido el eluato con agua se fortificó y se inyectó en el sistema cromatográfico. Los resultados demostraron la hipótesis, no observándose picos cromatográficos debido al marcado efecto matriz. Por este motivo, se

tuvo que descartar la aplicación de esta metodología de preconcentración para el análisis de micotoxinas a concentraciones sub-ppb.

Como alternativa, se planteó el uso de las columnas de inmunoafinidad. Esta aproximación ha sido ampliamente utilizada en muchos trabajos basados en la determinación de micotoxinas debido a su elevada especificidad (Şenyuva & Gilbert, 2010). Sin embargo la elevada especificidad limita en ocasiones la determinación simultánea de varios analitos. En este trabajo se seleccionaron las columnas de inmunoafinidad AflaOchra™ de Vicam debido a su paralela afinidad por aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) y ocratoxina A.

Para la carga de los extractos en las columnas de purificación fue necesario eliminar el acetonitrilo presente en el extracto ya que podría producir la desnaturalización del anticuerpo presente en la columna. El estudio de muestras fortificadas a 0.1 µg/Kg demostró una purificación y preconcentración de los analitos satisfactoria, eliminando la presencia de interferentes de matriz que interfirieran en el proceso de ionización. La elevada selectividad de estas columnas permitió la preconcentración de aflatoxinas y ochratoxina A junto con la eliminación de los interferentes de matriz. Asimismo, se observó la capacidad de las columnas AflaOchra™ para la determinación de aflatoxina M1, presumiblemente debido a procesos de reactividad cruzada. Este efecto, dependiente del anticuerpo utilizado como antígeno, ha sido comentado anteriormente por algunos autores (Zhang et al., 2009; Devi et al., 1999)

La metodología fue validada en cuatro matrices distintas (papilla multicereales, leche entera, leche reconstituida para bebés y leche con cereales destinada a bebés) según la guía de validación SANCO (European Commission, 2009). Los resultados obtenidos fueron altamente satisfactorios para todas las matrices estudiadas permitiendo la cuantificación de aflatoxinas y ochratoxina A a niveles de 0.025 µg/Kg o incluso inferiores debido a la eficiente eliminación de interferentes de matriz. Es destacable este hecho, pues la práctica eliminación de estos interferentes permitió la cuantificación de los

compuestos sin la necesidad de aplicar ninguna corrección por el efecto matriz como habitualmente es necesario aplicar.

La aplicación de esta metodología a muestras reales permitió la detección de algunos compuestos a niveles de concentración extremadamente bajos. Es importante remarcar que en los ejemplos mostrados en la **Figuras 3 y 4 del Artículo científico 3** se demuestra la capacidad para determinar estos compuestos a niveles de pocos ng/Kg incluso asegurando una confirmación inequívoca de la identidad de los compuestos.

La búsqueda bibliográfica indica que, actualmente, la metodología utilizada para la determinación de aflatoxina B1, aflatoxina M1 y ocratoxina A en muestras de alimentos infantiles continúa siendo la cromatografía líquida acoplada a detectores de fluorescencia (Afshar, Shokrzadeh, Kalhori, Babae & Saeedi Saravi, 2013, Alvito, Sizoo, Almeida & van Egmond, 2010, Meucci, Razzuoli, Soldani & Massart, 2010). La falta de suficiente sensibilidad en metodologías basadas en el uso de la espectrometría de masas por inyección directa ha hecho que muchos laboratorios continúen utilizando estas técnicas. Sin embargo, aunque estos métodos basados en detección por FD presenten una elevada sensibilidad carecen de la capacidad confirmativa de los métodos por espectrometría de masas.

2.4. DETERMINACIÓN DE LA MICOTOXINA PATULINA EN MANZANAS Y PRODUCTOS DERIVADOS MEDIANTE UHPLC-MS/MS. ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ CON DIFERENTES INTERFASES DE IONIZACIÓN A PRESIÓN ATMOSFÉRICA (API)

2.4.1. INTRODUCCIÓN

La patulina es una micotoxina producida principalmente por hongos del género *Penicillium* especialmente en manzanas, aunque también puede encontrarse en otras frutas y cereales. Aunque en sus inicios se consideró como un posible antibiótico, se han demostrado sus propiedades negativas para la salud en humanos, presentando tanto efectos de toxicidad aguda como crónica (Moake, Padilla-Zakour & Worobo, 2005). Por este motivo la JECFA fijó una ingesta máxima diaria de 0.4 µg/Kg de peso corporal en adultos. Siguiendo estas indicaciones se ha establecido el contenido máximo de esta micotoxina en diferentes alimentos. La Unión Europea en su Reglamento 1881/2006/EC estableció los límites máximos de esta micotoxina en diferentes alimentos, fijándose en 50 µg/Kg en zumos de frutas y todo tipo de bebidas derivadas de manzana, mientras que en productos sólidos elaborados con manzana el nivel máximo exigido es 25 µg/Kg.

El tratamiento de muestra más comúnmente utilizado para la determinación de patulina se ha basado en una extracción líquido-líquido, o el uso de SPE y posterior determinación por cromatografía líquida utilizando detectores UV. Esta técnica presenta una sensibilidad adecuada para la determinación de esta micotoxina debido a la elevada absorción a 275 nm. Sin embargo la baja selectividad de este detector hace que esté expuesta a una gran cantidad de interferentes. El 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (producto formado por la descomposición térmica de los azúcares) es el principal interferente en productos derivados de frutas (Zöllner & Mayer-Helm, 2006; Sforza, Dall'Asta & Marchelli, 2006).

Otra técnica que ha sido también utilizada es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para ello, es necesario la derivatización de la patulina mediante el uso de agentes sililizantes. La necesidad de aplicar una derivatización previa ha sido el principal hándicap de esta técnica, pues aporta una elevada imprecisión al método que debe ser corregida mediante el uso de un patrón interno, a poder ser el propio compuesto marcado isotópicamente (Rychlik & Schieberle, 1999).

El uso de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas también ha sido utilizado para la determinación de esta micotoxina, especialmente en muestras líquidas. En este tipo de matrices se ha aplicado una etapa de preconcentración mediante el uso de la SPE, tanto en modo off-line (Ito, Yamazaki, Inoue, Yoshimura, Kawaguchi & Nakazawa, 2004) como on-line (Takino, Daishima & Nakahara, 2003).

La ionización en modo negativo ha sido la opción preferida en la mayoría de los trabajos publicados ya que la patulina presenta propiedades ácidas (Zöllner & Mayer-Helm, 2006). Sin embargo, en una publicación reciente en la que se determina patulina simultáneamente con otras micotoxinas, ésta se determina en modo positivo mediante la monitorización de los aductos metanólicos como alternativa cuando no es posible realizar “*switching*” positivo-negativo (Malysheva et al., 2012). Es común que este compuesto no se incluya en métodos multimicotoxinas ya que presenta propiedades singulares que

dificultan su determinación en este tipo de métodos. Así, Sulyok et al. demostró que la extracción de la patulina utilizando una mezcla agua:acetonitrilo acidificada era muy poco eficiente (Sulyok, Berthiller, Krska & Schuhmacher, 2006). Como es común en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, la fuente de ionización más utilizada es la fuente electrospray. Sin embargo, la baja retención de este compuesto en la columna cromatográfica debido a su elevada polaridad, aumenta las probabilidades de estar expuesto a sufrir efectos matriz debido a su coelución con interferentes polares de la matriz. En algunos estudios multianálisis utilizando la fuente ESI en los que se ha incluido este compuesto se ha observado una elevada supresión de señal (Jackson, Kudupoje & Yiannikouris, 2012), mientras que en otros este efecto de supresión iónica no ha sido tan marcado (Sulyok, Berthiller, Krska & Schuhmacher, 2006). En el estudio de este compuesto se han utilizado también otras fuentes de ionización como es la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI) (Sewram, Nair, Nieuwoudt, Leggott & Shephard, 2000, Takino, Daishima & Nakahara, 2003).

En el presente trabajo, **Artículo científico 4**, se ha desarrollado metodología analítica basada en la técnica UHPLC-MS/MS para la determinación de la micotoxina patulina en manzana y productos derivados. Para ello, se evaluó y comparó el uso de las interfases ESI y APCI, optimizando las condiciones de ionización y los parámetros instrumentales del analizador para ambos modos de ionización, prestando especial atención al efecto matriz. Asimismo, se evaluó el efecto de inyectar mayores volúmenes en la columna para obtener la máxima sensibilidad posible que permitiera la determinación de patulina a los niveles máximos permitidos por la legislación Europea. Con el objetivo de aumentar la capacidad identificativa se adquirieron tres transiciones en modo SRM debido a la menor selectividad de las transiciones SRM en moléculas pequeñas.

2.4.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 4

Food Chemistry 142 (2014) 400–407



Analytical Methods

Determination of patulin in apple and derived products by UHPLC-MS/MS. Study of matrix effects with atmospheric pressure ionisation sources



Eduardo Beltrán, María Ibáñez, Juan Vicente Sancho, Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2013
Received in revised form 12 July 2013
Accepted 16 July 2013
Available online 24 July 2013

Keywords:

Mycotoxins
Patulin
ESI
APCI
UHPLC
Tandem MS

ABSTRACT

Sensitive and reliable analytical methodology has been developed for the measurement of patulin in regulated foodstuffs by using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) with triple quadrupole analyser. Solid samples were extracted with ethyl acetate, while liquid samples were directly injected into the chromatographic system after dilution and filtration without any clean-up step. Chromatographic separation was achieved in less than 4 min. Electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) sources were evaluated, in order to assess matrix effects. The use of ESI source caused strong signal suppression in samples; however, matrix effect was negligible using APCI, allowing quantification with calibration standards prepared in solvent. The method was validated in four different apple matrices (juice, fruit, puree and compote) at two concentrations at the low $\mu\text{g kg}^{-1}$ level. Average recoveries ($n = 5$) ranged from 71% to 108%, with RSDs lower than 14%.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Patulin is a toxic secondary metabolite produced by a wide range of fungal species of the genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssochlamys*. Among the different genera, the most important patulin producer is *Penicillium expansum* (Moake, Padilla-Zakour, & Worobo, 2005). Patulin has been found as a contaminant in many mouldy fruits, vegetables, cereals and other foods. However, the major sources of contamination are apples and apple products, which are also the most important source of patulin in the human diet (Baert et al., 2007; Murillo-Arbizu, Amézqueta, González-Peñas, & de Cerain, 2009; Reddy et al., 2010).

The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified patulin as not carcinogenic (group 3), although it has been shown to cause neurotoxic and mutagenic effects in animals (IARC, 2002). In 1995, the Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA) recommended a provisional tolerable daily intake (pTDI) of 0.4 $\mu\text{g patulin/kg body weight/day}$ based on long-term exposure (JECFA, 1995). As a result, the levels of patulin in fruits are subjected to legislative control. The Codex Alimentarius recommends levels of patulin in fruits and fruit juices to be lower than 0.05 mg kg^{-1} . In 2006, European Commission established the

following maximum levels of patulin in apple products: 0.05 mg kg^{-1} for fruit juices and other drinks derived from apple or apple juice; 0.025 mg kg^{-1} for solid apple products; and, 0.01 mg kg^{-1} for apple products intended for infants and young children, and baby foods which are not cereals-based products (Commission Regulation No 1881/2006, 2006).

Considering the maximum levels allowed for patulin, it is necessary to apply sensitive, selective and reliable analytical methodology for its determination. Several strategies have been developed for patulin determination in a wide range of matrices, especially in apple products, based on thin layer chromatography (Martins, Gimeno, Martins, & Bernardo, 2002), capillary electrophoresis (Murillo-Arbizu, González-Peñas, Hansen, Amézqueta, & Østergaard, 2008), gas chromatography (GC) with derivatisation (Cunha, Faria, & Fernandes, 2009) and liquid chromatography (LC), mainly using UV detection (Fernández-Cruz, Mansilla, & Tadeo, 2010; González-Osnaya, Soriano, Moltó, & Mañes, 2007); the latter has been adopted as AOAC official method for patulin in apple juice (AOAC International, 2000). The main disadvantage of this approach is the lack of selectivity, 5-hydroxymethylfurfural and phenolic compounds being typical interferences from apple-based products (Desmarchelier, Mujahid, Racault, Perring, & Lancova, 2011). Therefore, additional sample treatments, such as SPE or matrix solid-phase dispersion are required to remove sample interferences (Li, Wu, Hu, & Wang, 2007; Wu, Dang, Niu, & Hu, 2008).

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368.
E-mail address: felix.hernandez@uji.es (F. Hernández).

Determination of patulin in apple and derived products by UHPLC-MS/MS. Study of matrix effects with atmospheric pressure ionisation sources

Beltrán E., Ibàñez M., Sancho, J.V., Hernández, F.

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

Abstract

Sensitive and reliable analytical methodology has been developed for the measurement of patulin in regulated foodstuffs by using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) with triple quadrupole analyser. Solid samples were extracted with ethyl acetate, while liquid samples were directly injected into the chromatographic system after dilution and filtration without any clean-up step. Chromatographic separation was achieved in less than 4 min. Electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) sources were evaluated, in order to assess matrix effects. The use of ESI source caused strong signal suppression in samples; however, matrix effect was negligible using APCI, allowing quantification with calibration standards prepared in solvent. The method was validated in four different apple matrices (juice, fruit, puree and compote) at two concentrations at the low $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ level. Average recoveries ($n = 5$) ranged from 71 to 108%, with RSDs lower than 14%.

Keywords: Mycotoxins, Patulin, ESI, APCI, UHPLC, Tandem MS

Highlights

UHPLC-MS/MS method for patulin determination in apple matrices.

Matrix effect was negligible using APCI.

ESI source caused strong signal suppression in samples.

Liquid samples are diluted and directly injected into the chromatographic system.

1. Introduction

Patulin is a toxic secondary metabolite produced by a wide range of fungal species of the genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssochlamys*. Among the different genera, the most important patulin producer is *Penicillium expansum* (Moake, Padilla-Zakour, & Worobo, 2005). Patulin has been found as a contaminant in many mouldy fruits, vegetables, cereals and other foods. However, the major sources of contamination are apples and apple products, which are also the most important source of patulin in the human diet (Baert et al., 2007, Murillo-Arbizu et al., 2009 and Reddy et al., 2010).

The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified patulin as not carcinogenic (group 3), although it has been shown to cause neurotoxic and mutagenic effects in animals (IARC, 2002). In 1995, the Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA) recommended a provisional tolerable daily intake (pTDI) of 0.4 µg patulin/kg body weight/day based on long-term exposure (JECFA, 2005). As a result, the levels of patulin in fruits are subjected to legislative control. The Codex Alimentarius recommends levels of patulin in fruits and fruit juices to be lower than 0.05 mg·kg⁻¹. In 2006, European Commission established the following maximum levels of patulin in apple products: 0.05 mg·kg⁻¹ for fruit juices and other drinks derived from apple or apple juice; 0.025 mg·kg⁻¹ for solid apple products; and, 0.01 mg·kg⁻¹ for apple products intended for infants and young children, and baby foods which are not cereals-based products (Commission Regulation 1881/2006, 2006).

Considering the maximum levels allowed for patulin, it is necessary to apply sensitive, selective and reliable analytical methodology for its determination. Several strategies have been developed for patulin determination in a wide range of matrices, especially in apple products, based on thin layer chromatography (Martins, Gimeno, Martins, & Bernardo, 2002), capillary electrophoresis (Murillo-Arbizu, González-Peñas, Hansen, Amézqueta, & Østergaard, 2008), gas chromatography (GC) with derivatisation (Cunha, Faria, & Fernandes, 2009) and liquid chromatography (LC), mainly using UV detection (Fernández-Cruz et al., 2010 and González-Osnaya et al., 2007); the latter has been adopted as AOAC official

method for patulin in apple juice (AOAC International, 2000). The main disadvantage of this approach is the lack of selectivity, 5-hydroxymethylfurfural and phenolic compounds being typical interferences from apple-based products (Desmarchelier, Mujahid, Racault, Perring, & Lancova, 2011). Therefore, additional sample treatments, such as SPE or matrix solid-phase dispersion are required to remove sample interferences (Li et al., 2007 and Wu et al., 2008).

More recently, LC coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) has rapidly grown as one of the most advanced techniques in mycotoxins determination (Cappriotti et al., 2012 and Malik et al., 2010.). Patulin has not been usually included in the analyte target list, due to its high polarity and low molecular mass, which commonly lead to low recoveries and/or low sensitivity, hampering its determination at the regulatory levels (Beltrán et al., 2009 and Sulyok et al., 2006). For these reasons, specific LC-MS/MS methodologies need to be developed for its analysis, especially in regulated matrices.

Making use of LC-MS/MS methods, different atmospheric pressure ionisation (API) sources have been applied, usually in negative ionisation mode, for patulin determination: electrospray (ESI) (Desmarchelier et al., 2011, Ito et al., 2004 and Kataoka et al., 2009), atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) (Sewram, Nair, Nieuwoudt, Leggott, & Shephard, 2000) and atmospheric pressure photoionisation (APPI) (Takino et al., 2003 and Zöllner et al., 2006). Although LC-MS/MS has clear advantages for mycotoxin analysis with its excellent sensitivity and selectivity, API sources (especially ESI) are prone to suffer ionisation problems, due to the presence of matrix compounds that compete with the analyte in the ionisation process. This matrix effect normally leads to signal suppression, although signal enhancement may also occur on some occasions. Matrix effects notably affect quantitative analysis preventing accurate quantification unless they are reduced or corrected. The use of isotopically labelled reference standard or extensive sample treatment have been used to deal with matrix effects in patulin determination (Desmarchelier et al., 2011, Ito et al., 2004 and Kataoka et al., 2009).

The aim of this paper is to develop a rapid and sensitive analytical methodology for patulin determination in regulated foodstuffs, by using ultra-high-performance liquid

chromatography coupled to MS/MS. The signal suppression caused by co-eluted matrix interferences in ESI and APCI has been evaluated and sample treatment has been minimised avoiding any clean-up step. The method has been validated in four different apple matrices (juice, fruit, puree and compote) at concentration levels of a few $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Unambiguous identification has been assured by the acquisition of three selected reaction monitoring (SRM) transitions and evaluation of their Q/q ratios.

2. Experimental section

2.1. Reagents and chemicals

Patulin pure standard (>98%) was purchased from Sigma-Aldrich Spain (Madrid, Spain). HPLC-grade water was obtained from water passed through a Milli-Q water purification system (Millipore Ltd, Bedford, MA). Supragradient HPLC-grade acetonitrile (ACN), supragradient HPLC-grade methanol (MeOH), residue-analysis-grade acetone, ammonium acetate (NH_4Ac), triethylamine (Et_3N), residue-analysis-grade methyltert-butyl ether (MTBE), ultra-trace-analysis-grade ethyl acetate (AcOEt), residue-analysis-grade anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4), and LC-MS-grade formic acid (HCOOH) were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). Anhydrous sodium sulfate was dried for 18 h at 300 °C before use.

2.2. Apparatus

A mechanical shaker (S.B.S. Instruments S.A, Barcelona, Spain) was used for extraction of the samples. Nylon filters (Iso-disc, 0.22 μm ; Supelco, Bellefonte, PA) were used for filtering the final extract before injection.

2.3. UHPLC-MS/MS

A UPLCTM system (Acquity, Waters, Milford, MA) was interfaced to a triple quadrupole mass spectrometer (TQD, Waters Micromass, Manchester, UK). LC separation was performed with an Acquity UPLC BEH C18 analytical column (50 × 2.1mm, 1.7 μm; Waters). The mobile phases employed consisted on water (A) and acetonitrile (B) without modifiers, at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. The gradient program started with 2% B for 1 min. Then, the linear gradient was programmed up to 90% B for 2 min. and maintained for 1 min. Finally the gradient was returned to initial conditions (2% B) in order to re-equilibrate the column. Temperature column was set to 40 °C; injection volume was 100 μL.

APCI-MS and ESI-MS experiments were performed on a TQD triple quadrupole mass spectrometer (Waters Micromass, Manchester, UK). The MS parameters were optimised by direct infusion of 1 mg·L⁻¹ patulin in methanol:water (1:1) at a flow rate of 20 μL·min⁻¹. Source temperature was 120 °C. Drying as well as nebulising gas was nitrogen (Praxair, Valencia, Spain). The gas flow was set to 800 L·h⁻¹ and the cone gas to 60 L·h⁻¹. For operating in MS/MS mode, collision gas was argon (99.995%; Praxair, Valencia, Spain) with a pressure of approximately 4 × 10⁻³ mbar in the collision cell (0.15 mL min⁻¹). For APCI mode the corona discharge needle voltage, probe temperature and corona discharge current were set at 2.5 kV, 600 °C and 20 μA, respectively. For ESI, capillary voltage and desolvation gas temperature were set at 3.0 kV and 500 °C respectively. TargetLynx (MassLynx v. 4.1, Waters, Manchester, UK) software was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and samples.

2.4. Sample preparation

2.4.1. Solid Samples

For solid samples (fruit, puree and compote), a 5-g portion was weighed into a 50-mL tube. After adding 20 mL of ethyl acetate samples were shaken for 30 minutes in a mechanical automated shaker. Samples were filtered through a paper filter with anhydrous

Na₂SO₄, in order to remove water. The extract was collected in a volumetric flask and the final volume was adjusted to 25 mL with ethyl acetate. A 10-mL aliquot was evaporated to dryness at 40 °C under a gentle N₂ stream and reconstituted with 1 mL of 0.01% HCOOH aqueous solution. Finally, the extract was filtered through a 0.2-µm nylon filter before being injected into the chromatographic system.

2.4.2. Liquid Samples

Liquid samples (juices – 5 mL) were 4-fold diluted with water. After being filtered through a 0.2-µm nylon syringe filter, the samples were directly injected into the LC-MS/MS system.

2.5. Validation study

Validation of the method was performed by evaluating the following parameters:

-Linearity: The calibration curves were obtained by injecting seven reference standard solutions in duplicate (2.5–250 µg·L⁻¹). Linearity was assumed when the regression coefficient was greater than 0.995 with residuals lower than 20%.

-Accuracy and precision: Accuracy was evaluated by means of recovery experiments, analysing three different solid matrices (fruit, puree and compote) at two different concentration levels (0.01 and 0.05 mg·kg⁻¹). Regarding liquid matrices, apple juice was validated at three different concentration levels (0.05, 0.1 and 0.5 mg·L⁻¹). In all cases, recovery experiments were performed in quintuplicate. Precision, expressed as the repeatability of the method, was determined in terms of relative standard deviation (RSD) from recovery experiments at each fortification level ($n = 5$ in each case). Quantitation was performed by means of external calibration curves. Acceptable recoveries (70–120%) and RSDs (below 20%) were established according to Document SANCO/12495/2011 (Document SANCO, 2011).

-Limit of quantification. LOQ was estimated for a signal-to-noise ratio of 10 from the chromatogram of samples spiked at the lowest fortification level tested.

-Limit of detection. The LOD was estimated, from the quantification transition, as the analyte concentration that produced a peak signal 3 times the background noise from the chromatogram at the lowest fortification tested.

3. Results and discussion

3.1. MS/MS optimisation

Full scan and MS/MS spectra of patulin were obtained from infusion of 1 mg·L⁻¹ methanol:water (50:50) solution at a flow rate of 20 μL·min⁻¹. Experiments were carried out in both positive and negative ionisation modes. In this work two different atmospheric pressure ionisation (API) interfaces were used to compare their suitability for the determination of patulin in different matrices.

When checking electrospray ionisation (ESI) in full scan mode, no signal was obtained in positive ionisation mode. However, negative ionisation mode presented an abundant [M-H]⁻ for patulin at *m/z* 153 (**Fig. 1a**). MS/MS spectra of the precursor ion [M-H]⁻ were acquired in product ion scan mode at different collision energies to obtain optimum product ions. As can be seen in **Fig. 1 (b)**, three different product ions were selected for patulin determination. The most abundant ion at *m/z* 109, optimized at 10 eV collision energy and corresponding to [M-CO₂]⁻ was chosen for quantification purposes. Two less abundant ions, at *m/z* 81.0 and 53.0, respectively corresponding to [C₅H₅O]⁻ and [C₄H₅]⁻, were selected for confirmation purposes (*qi*) (**Table 1**).

In the same way, when the atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) source was tested, the scan spectrum only showed signal in negative ionisation mode. In this ionisation mode, apart from the deprotonated molecule [M-H]⁻ (*m/z* 153), the molecular radical ion [M]⁻ at *m/z* 154 was also observed and its in-source fragment corresponding to the loss of

water at m/z 136 (**Fig. 1c**). This is in accordance with the literature (Takino et al., 2003), which reports that ionisation of patulin by APCI in negative ion mode simultaneously proceeds via electron capture and/or charge exchange to produce $[M]^-$, with proton transfer to produce $[M-H]^-$.

Fragmentation of the molecule radical ion $[M]^-$ (m/z 154) and of the deprotonated molecule $[M-H]^-$ was studied under product ion scan mode at different collision energies. As can be seen in **Fig. 1d**, the same fragmentation obtained in ESI ionisation was observed for $[M-H]^-$. However, the molecule radical ion (m/z 154) followed a different fragmentation pathway (**Fig. 1e**). The most abundant product ions observed were at m/z 124 (10 eV collision energy) corresponding to $[M-H_2CO]^-$, and at m/z 123 (20 eV collision energy) corresponding to $[M-H_3CO]^-$. An additional product ion at m/z 64 $[C_5H_4]^-$ was obtained as a product of the fragmentation of the in-source fragment m/z 136 (**Fig. 1f**).

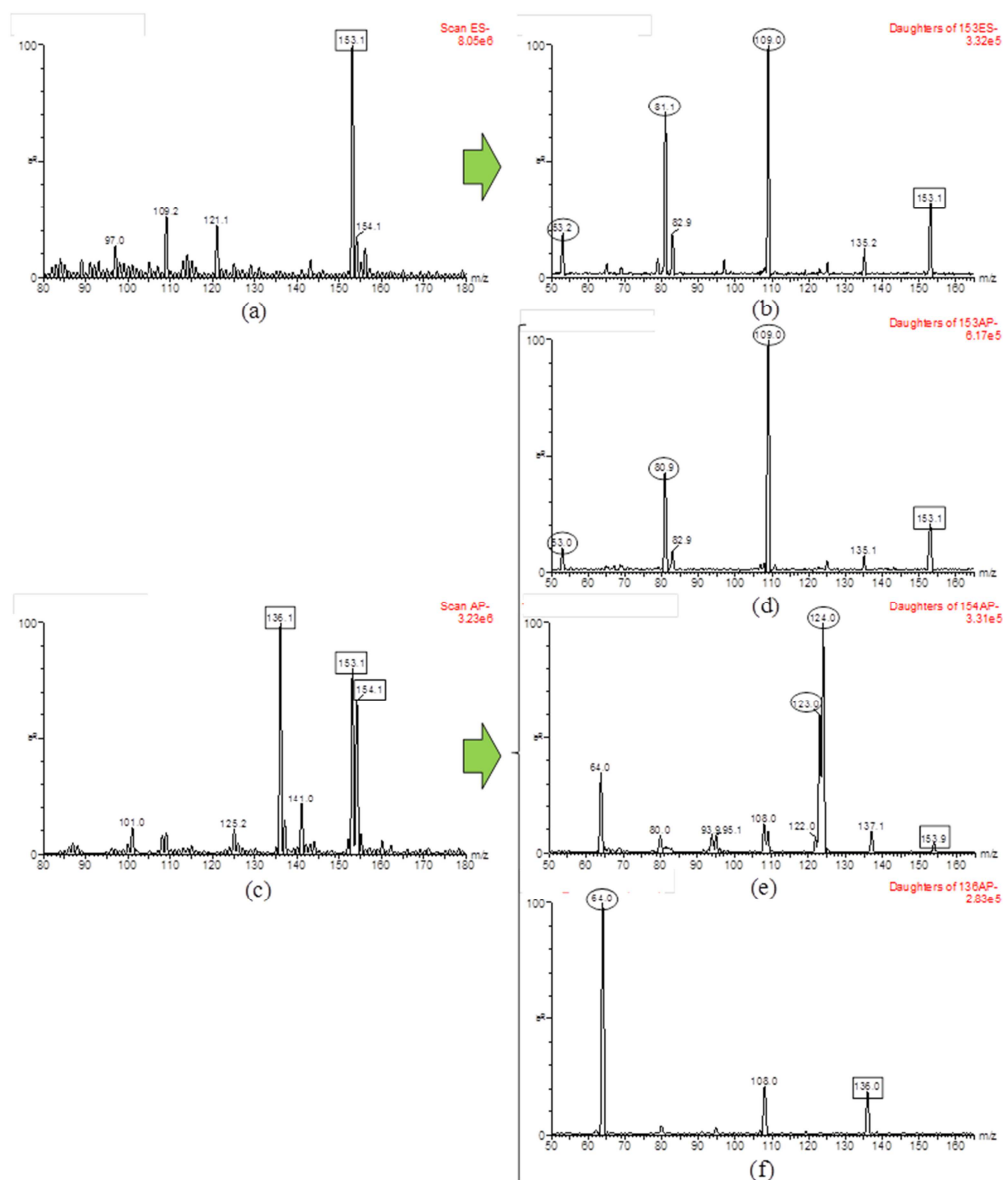


Figure 1. MS and MS/MS spectra for patulin. (a) ESI MS scan, (b) product ion scan for m/z 153. (c) APCI MS scan, (d) product ion scan for m/z 153, (e) product ion scan for m/z 154, and (f) product ion scan for m/z 136.

3.2. LC optimisation

An Acquity UPLC BEH C18 analytical column (50×2.1 mm, $1.7 \mu\text{m}$) was selected in this work to perform the analysis of patulin. ESI and APCI experiments were performed at $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. When working in APCI the selection of higher flow rates is common, due to ionisation in the APCI ion source being mass dependent. For this reason, additional experiments were carried out at higher flow rates using an Atlantis C18 (4.6×100 mm, $5 \mu\text{m}$ particle size) column (Waters), which allows working at higher flows, due to its higher particle size. Furthermore, its stationary phase is designed to enhance the retention of polar compounds, when compared with traditional reversed phase columns. Results obtained with the Atlantis column ($5 \mu\text{m}$ particle size) working at $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ showed a similar behaviour in terms of sensitivity as experiments carried out with the Acquity column ($1.7 \mu\text{m}$ particle size) working at $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Finally, the Acquity column was selected due to the lower time and solvents used per chromatographic run.

The selection of the mobile phase can be relevant to enhance the detector response. In the present work, water-methanol and water-acetonitrile with and without modifiers (ammonium acetate and triethylamine) were tested in order to select the most suitable mobile phase, i.e., that leading to the highest sensitivity maintaining a good chromatographic peak shape. The use of ammonium acetate was dismissed as its use impaired the peak shape. Triethylamine was tested in order to maximise the deprotonation of the molecule, although no differences were observed when it was present in the mobile phase (Grimalt, Pozo, Marín, Sancho, & Hernández, 2005). As modifiers caused no improvement in sensitivity, solvents were used without modifiers. Acetonitrile was preferred to methanol, as narrower peaks were obtained.

Finally, although different SRM transitions could be acquired for patulin, depending on ionisation *via* electron capture or proton transfer, SRM transitions based on ionisation *via* electron capture were preferred as they showed higher sensitivity. The most sensitive transition (m/z 154 \rightarrow 124) was selected for quantification and the next two most sensitive transitions (m/z 154 \rightarrow 123, and m/z 136 \rightarrow 64) were selected for confirmation purposes (**Table 1**).

Table 1. Optimized MS/MS parameters for patulin in ESI and APCI ionization modes. (Q: Quantification transition; qi: confirmation transitions)

Ionisation source	Precursor Ion	Cone (V)	Product ion	Collision energy (eV)	Ion ratio
ESI	153.1 [M-H] ⁻	20	109.0 (Q)	10	
			81.0 (q ₁)	10	1.3
			53.0 (q ₂)	15	4.4
APCI	154.0 [M] ⁺	20	124.0 (Q)	10	
	136.0 [M-H ₂ O] ⁺	20	123.0 (q ₁)	20	5.7
			64.0 (q ₂)	10	5.3

3.3. Extraction/sample treatment

Liquid samples were injected into the chromatographic system after a 4-fold dilution step with water, avoiding tedious sample treatments, such as liquid-liquid extraction or SPE processes. Desired sensitivity was achieved increasing the sample volume injection up to 100 μL . Regarding solid samples, it was necessary to apply an extraction step. Different solvents (ethyl acetate, methyl *tert*-butyl ether, acetone and acetonitrile) were tested in apple matrix to determine the extraction efficiency. The best recoveries for the overall process in apple spiked at $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ were obtained with ethyl acetate (94%). Acceptable recoveries were also obtained for methyl *tert*-butyl ether (89%), whereas acetone and acetonitrile showed lower recoveries (62% and 69%, respectively), probably due to the high content of co-extracted interferences that could affect the ionisation process. On the basis of these results, ethyl acetate was selected as extractant solvent due to the favourable recoveries obtained in apple matrix and its supported use in official methods (AOAC International, 2000). Anhydrous Na_2SO_4 was added in the filtration step, in order to remove water traces present in the sample that could complicate the evaporation process. Dried extracts were reconstituted with water acidified with 0.01% HCOOH , in order to preserve patulin, as it is known to be unstable under alkaline conditions (Desmarchelier et al., 2011).

3.4. Matrix effect

It is well known that co-eluted matrix components may compete in the ionisation process, typically producing signal suppression. Matrix effect was investigated in both ESI and APCI interfaces, by comparison of spiked extracts and reference standards in solvent, in apple juice (as an example of liquid sample) and in fruit (as solid sample). The ratio was expressed in terms of percentage, corresponding to signal decrease values below 100%.

When matrix effects were studied in the ESI ionisation source, a strong signal suppression was observed for apple and juice, showing only 16% and 5%, respectively, of the expected signal when compared with that of reference standard. These results showed the need for reducing or compensating matrix effect for an accurate quantification of patulin. Although different approaches could be applied to correct matrix effect, such as matrix-matched calibration or the use of isotopomer internal standards, these strategies were not evaluated as the method would not show enough sensitivity to reach required levels in studied matrices.

On the contrary, when APCI ionisation was used, matrix effects were tolerable in this source, showing low signal suppression in apple and juice (92% and 85%, respectively, when compared with the reference standard). This allowed the quantification of patulin using an external calibration curve, without the need of applying any correction as would be the case in the ESI source. **Fig. 2** shows the LC-MS/MS chromatograms obtained for a reference standard and a spiked apple juice using both ionisation sources. It can be seen that the sensitivity for the standard in solvent was similar, or even slightly higher in the case of ESI. However, the strong matrix suppression did not allow the desired sensitivity in ESI to be achieved; therefore, APCI was selected for subsequent experiments.

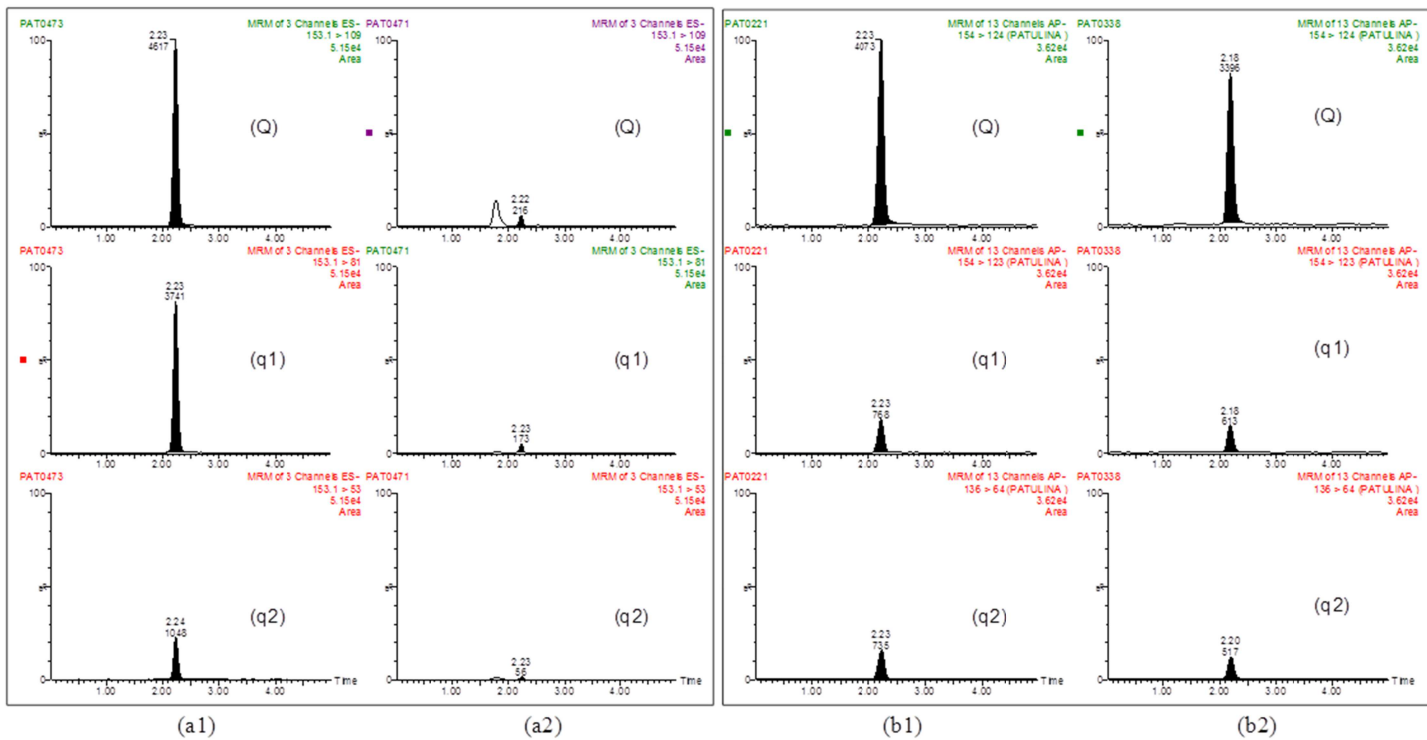


Figure 2. UHPLC-MS/MS chromatograms for patulin in: (a1) reference standard at 0.1 mg·L⁻¹ under ESI ionization and (a2) apple juice spiked at 0.5 mg·L⁻¹ (0.1 mg·L⁻¹ in extract) under ESI ionization. (b1) reference standard 0.1 mg·L⁻¹ under APCI ionization and (b2) apple juice spiked at 0.5 mg·L⁻¹ (0.1 mg·L⁻¹ in extract) under APCI mode. (Q: Quantification transition; q₁: confirmation transitions)

3.5. Method validation

For validation purposes three different matrices (apple fruit, compote and fruit puree) were used as representative solid matrices, whilst apple juice was selected as liquid sample. Samples were analysed before use as blanks in the validation, in order to determine the absence of patulin. The method was found highly specific as no relevant signals were observed in the blanks at the patulin retention time. Linearity of the method was studied in the range 2.5-250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, obtaining satisfactory results, with linear correlation coefficients higher than 0.99 and residuals below 20%.

Accuracy and precision (repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD) in%) of the overall analytical procedure were evaluated by spiking blank samples, at two different concentration levels at least, and analysing them in quintuplicate. For solid samples, validation was carried out at 0.01 and 0.05 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, and for liquid samples at 0.05, 0.1 and 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

The method was found to have satisfactory precision and accuracy, with recoveries between 70-108% and $\text{RSD} < 14\%$ in solid samples. The results obtained in liquid samples were also satisfactory, showing recoveries in the range of 71-75% with RSDs lower than 9%. (**Table 2**). The lower recoveries (around 75%) in liquid matrices were attributed to slight signal suppression in the ionisation process.

As can be seen in **Table 2**, LOQs were fixed in the range of the lowest level validated, whereas LODs were established over the range 0.002-0.003 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in solid samples and 0.015 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in liquid samples. **Fig. 3** shows the SRM chromatograms for the quantification (Q) and confirmation ($q1$ and $q2$) transitions for the four matrices studied at the lowest level validated (0.01 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for solid samples and 0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in liquid samples).

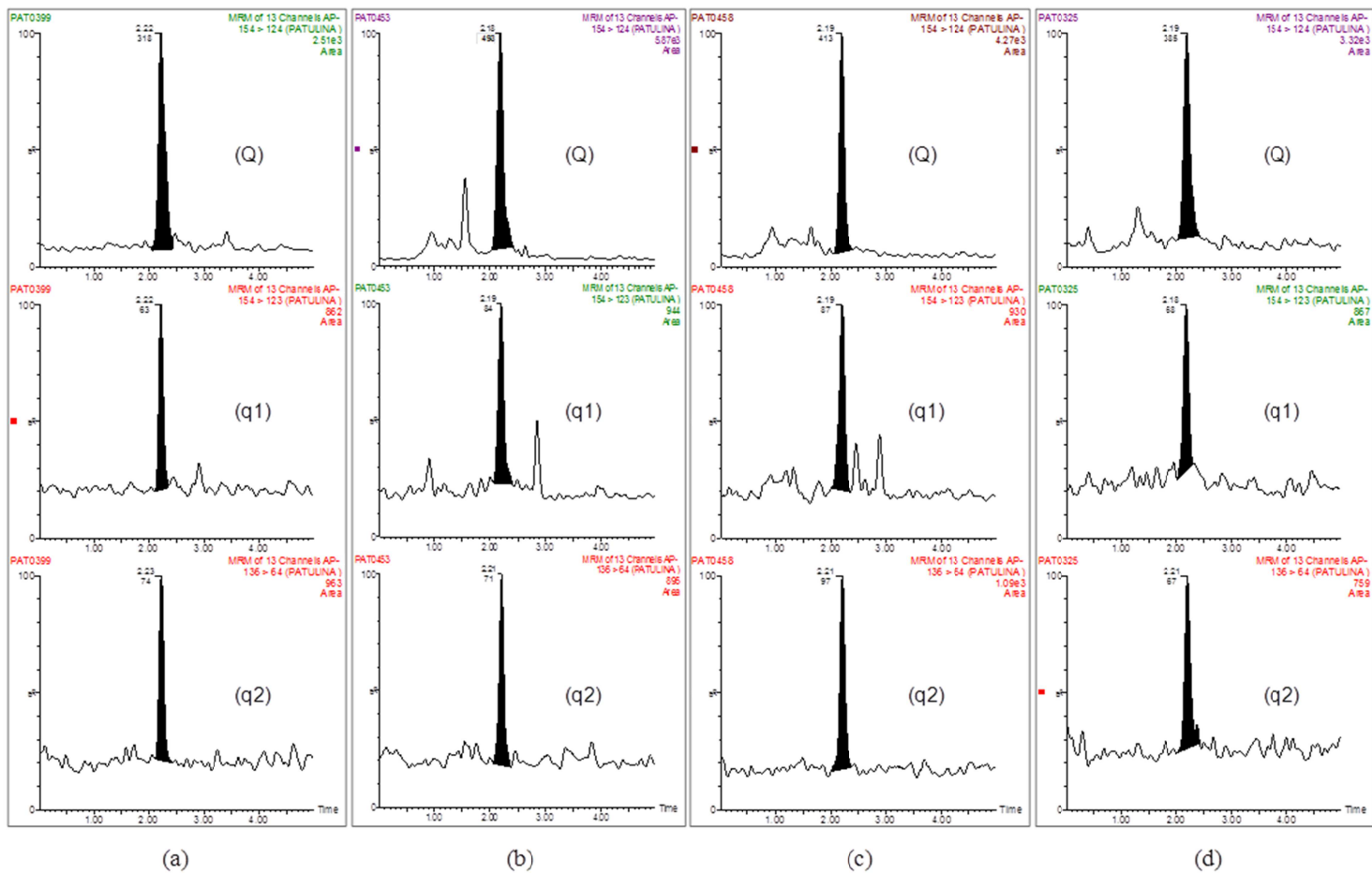


Figure 3. UHPLC-MS/MS chromatograms for patulin at the lowest level validated in: (a) fruit , (b) puree , (c), compote and (d) juice. (Q: Quantification transition; q_i: confirmation transitions)

Table 2. Validation of the UHPLC-MS/MS method for patulin determination. Mean recoveries (%) and relative standard deviation (% in brackets) of the overall procedure (n=5). Estimated limits of detection (LOD).

Matrix	Spiked Level		LOQ (mg·Kg ⁻¹)	LOD (mg·Kg ⁻¹)
	0.01 mg·Kg ⁻¹	0.05 mg·Kg ⁻¹		
Fruit	70 (11)	89 (6)	0.007	0.002
Compote	98 (13)	93 (14)	0.008	0.003
Puree	108 (10)	79 (14)	0.006	0.002

Matrix	Spiked Level			LOQ (mg·L ⁻¹)	LOD (mg·L ⁻¹)
	0.05 mg·L ⁻¹	0.1 mg·L ⁻¹	0.5 mg·L ⁻¹		
Apple juice	75 (7)	71 (9)	71 (3)	0.047	0.015

3.6. Confirmation and application to real samples

Following EU guidelines recommendation, in order to assure analyte identification, at least two transitions should be acquired (Document SANCO, 2011). In this work, up to three SRM transitions have been used for confirmation purposes at concentration levels as low as the LOQ. The Q/q ratio, defined as the ratio between the signal obtained from the quantification transition (Q) and the signal obtained from the confirmation transitions (qi), was used to confirm the identity of the peak in the samples.

The method was applied to ensure that patulin levels were under the legislation level in nine samples (three apple juice, three apple fruit samples, two compotes and one puree) randomly selected from big supermarkets and organic produce retail outlets in Castellon (Spain). Quality control (QC) samples prepared from blank samples spiked at the highest and lowest level validated were included in each sample batch. Satisfactory recoveries (between 70 and 120%) were obtained for all QCs, ensuring the reliability of the method. In the absence of positive samples, Q/q ratios were calculated in the spiked samples and compared with the Q/q ratios obtained with reference standards in solvent, in order to demonstrate the applicability of Q/q ratios criteria to ensure a correct confirmation of the peak identity in matrix. Deviations in the Q/q ratio did not exceed 15% in any of the studied matrices. **Fig. 4** shows the SRM chromatograms for all SRM transitions corresponding to a spiked blank apple and spiked blank apple juice samples used as quality control.

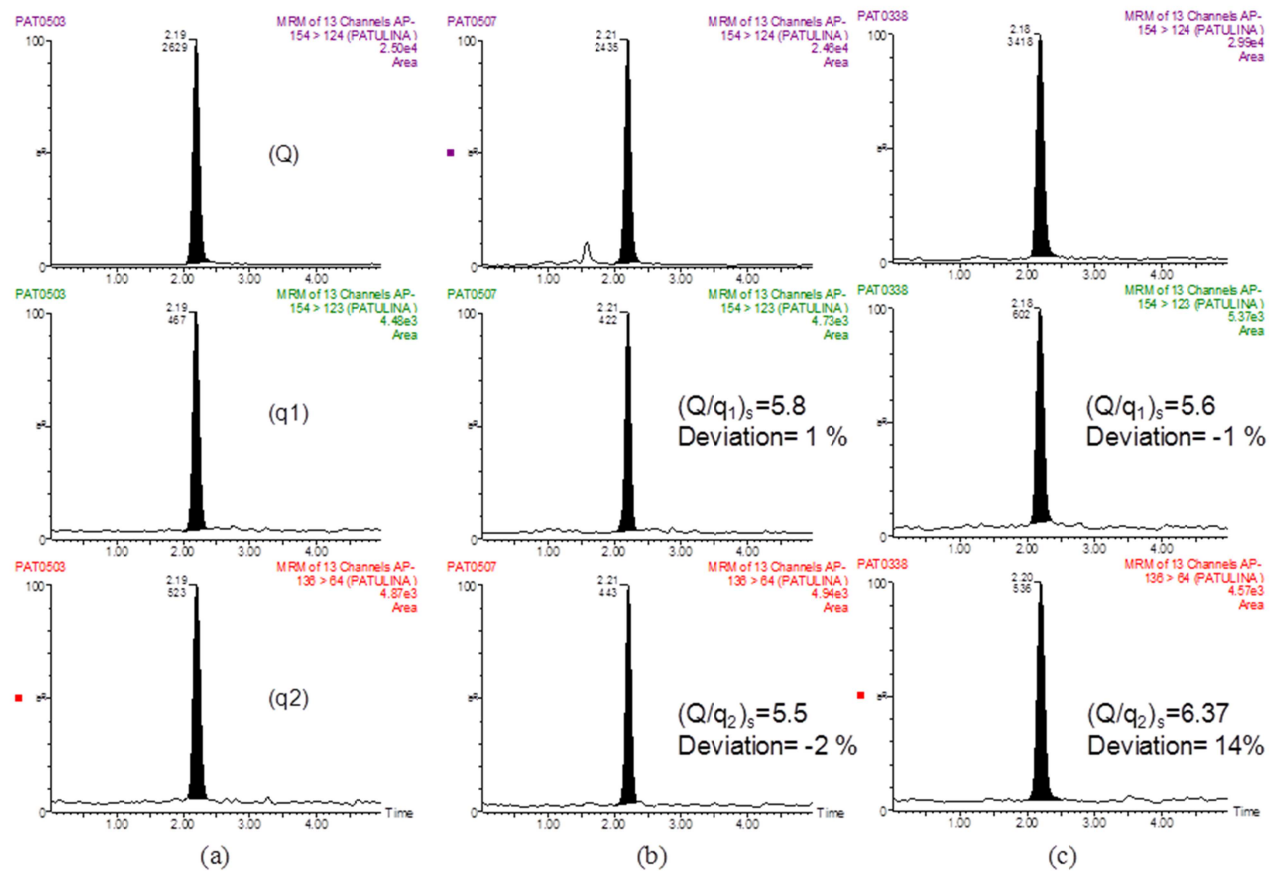


Figure 4. UHPLC-MS/MS chromatograms for patulin in: (a) reference standard $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (b) apple juice sample spiked at $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in extract), and (c) apple sample spiked at $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in extract). (Q: Quantification transition; qi: confirmation transitions)

4. Conclusions

A sensitive and reliable method has been optimised for the determination of patulin in apple and apple-derived products by using UHPLC-MS/MS system with a QqQ analyser. Two different atmospheric ionisation sources have been compared in order to choose the optimal source. Although ESI and APCI showed similar behaviour when patulin standards in solvent were tested, differences were magnified in the presence of matrix. ESI showed a strong signal suppression that hampered the determination of patulin at the 0.05 mg·kg⁻¹ required by the European Commission (Commission Regulation 1881/2006, 2006). However, ionisation in the APCI source was not affected by the presence of matrix interferences, allowing an accurate patulin determination using calibration in solvent. The sensitivity achieved with APCI source allowed the determination of patulin in juices by direct injection. A main advantage of this methodology is the minimisation of sample treatment, avoiding tedious tasks, such as SPE.

The method applicability to different solid matrices as well as liquid matrices was confirmed by the analysis of different spiked samples in the method validation, with satisfactory results in terms of accuracy and precision. The use of three SRM transitions, one of them for quantification purposes and the other two for confirmation purposes, is an excellent approach that would make feasible a reliable positive confirmation of patulin by measuring *Q/q* ratios.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from the Generalitat Valenciana, as research group of excellence PROMETEO/2009/054. The authors are very grateful to Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using the UPLC-TQD mass spectrometer. E.B. is grateful to University Jaume I for his pre-doctoral grant.

References

AOAC International (2000), Official Method 2000.02. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed. Genthersburg, MD

Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M. M., Rajković, A., Verlinden, B., Nicolaï, B., Debevere, J., & De Meulenaer, B. (2007). Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *International journal of food microbiology*, 119(3), 170-181.

Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2009). Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(12), 1801-1809.

Cappriotti, A.L., Caracciolo, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Pozzi, D., Samperi, R., Laganà, A. (2012). Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 31 (4), 466-503.

Commission Regulation (EC) No 1881/2006. (2006). Commission Directive 2006/1881/EC of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs. *Official Journal of the European Communities*, L364, 5-24.

Cunha, S. C., Faria, M. A., & Fernandes, J. O. (2009). Determination of patulin in apple and quince products by GC-MS using 13C5-7 patulin as internal standard. *Food Chemistry*, 115(1), 352-359.

Desmarchelier, A., Mujahid, C., Racault, L., Perring, L., & Lancova, K. (2011). Analysis of patulin in pear- and apple-based foodstuffs by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7659-7665.

Document SANCO, 2011. European Commission Document N° SANCO/12495 (2011). Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed

Fernández-Cruz, M. L., Mansilla, M. L., & Tadeo, J. L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1(2), 113-122.

González-Osnaya, L., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2007). Exposure to patulin from consumption of apple-based products. *Food additives and contaminants*, 24(11), 1268-1274.

Grimalt, S., Pozo, Ó. J., Marín, J. M., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2005). Evaluation of different quantitative approaches for the determination of noneasily ionizable molecules by different atmospheric pressure interfaces used in liquid chromatography tandem mass spectrometry: Abamectin as case of study. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(10), 1619-1630.

IARC, (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol 82, International Agency for research on Cancer. Lyon .

Ito, R., Yamazaki, H., Inoue, K., Yoshimura, Y., Kawaguchi, M., & Nakazawa, H. (2004). Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination in Japan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7464-7468.

JECFA, (2005). Evaluation of certain food additives and contaminants: forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series No.859, 9241208597, Geneva

Kataoka, H., Itano, M., Ishizaki, A., & Saito, K. (2009). Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(18), 3746-3750.

Li, J. -, Wu, R. -, Hu, Q. -, & Wang, J. -. (2007). Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. *Food Control*, 18(5), 530-534.

Malik, A.K., Blasco, C., Picó, Y. (2010) Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A*, 1217 (25), 4018-4040.

Martins, M. L., Gimeno, A., Martins, H. M., & Bernardo, F. (2002). Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food additives and contaminants*, 19(6), 568-574.

Moake, M. M., Padilla-Zakour, O. I., & Worobo, R. W. (2005). Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(1), 8-21.

Murillo-Arbizu, M., Amézqueta, S., González-Peñas, E., & de Cerain, A. L. (2009). Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. *Food Chemistry*, 113(2), 420-423.

Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., Hansen, S. H., Amézqueta, S., & Østergaard, J. (2008). Development and validation of a microemulsion electrokinetic chromatography method for patulin quantification in commercial apple juice. *Food and Chemical Toxicology*, 46(6), 2251-2257.

Reddy, K. R. N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H. K., Abel, C. A., & Shier, W. T. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*, 29(1), 3-26.

Sewram, V., Nair, J. J., Nieuwoudt, T. W., Leggott, N. L., & Shephard, G. S. (2000). Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 897(1-2), 365-374.

Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(18), 2649-2659.

Takino, M., Daishima, S., & Nakahara, T. (2003). Liquid chromatography/mass spectrometric determination of patulin in apple juice using atmospheric pressure photoionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(17), 1965-1972.

Wu, R. -, Dang, Y. -, Niu, L., & Hu, H. (2008). Application of matrix solid-phase dispersion-HPLC method to determine patulin in apple and apple juice concentrate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(7), 582-586.

Zöllner, P., & Mayer-Helm, B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1136(2), 123-169.

2.4.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

La primera etapa que se llevó a cabo en la optimización de la metodología analítica para la determinación de patulina fue la infusión del compuesto en el sistema espectrométrico con el objetivo de determinar las masas correspondientes al ion precursor e iones producto utilizados en las transiciones SRM. Esta optimización se realizó tanto en la fuente ESI como en la APCI. Los resultados para ambas fuentes mostraron que el compuesto no presentaba ionización en modo positivo, y si la mostraba, era una señal muy débil comparada con la obtenida en modo de ionización negativo. Este comportamiento se justifica por la presencia de un grupo alcohol ligeramente ácido.

El espectro de infusión “*full-scan*” en modo ESI negativo mostró un ión predominante a m/z 153, correspondiente a la desprotonación de la molécula, $[M-H]^-$. Tras fragmentar este ión precursor, se seleccionaron los tres iones producto más

abundantes correspondientes a las relaciones m/z 109, 81 y 53. Cuando se estudió el espectro “*full-scan*” en modo negativo para la fuente APCI se observó la presencia simultánea de 3 iones, relacionados con la patulina, a m/z 154 [$M^{\cdot-}$], 153 [$M-H$] $^-$ y 136 [$M-H_2O$] $^-$. Así, de acuerdo con Takino et al. (Takino, Daishima & Nakahara, 2003), la ionización de la molécula se produce siguiendo dos mecanismos distintos: el basado en la pérdida de un protón que genera el ión a m/z 153 [$M-H$] $^-$, y el mecanismo basado en la captura de un electrón para obtener el anión radical (m/z 154 [$M^{\cdot-}$]) y su fragmento en la fuente por pérdida de agua (m/z 136 [$M-H_2O$] $^-$). El estudio de la fragmentación de los iones precursores obtenidos mediante ambos mecanismos de ionización (transferencia de protones y captura de un electrón) demostró que la fragmentación seguía caminos distintos. Así, el ión desprotonado con m/z 153 mostró una fragmentación idéntica a la observada en la fuente ESI. Sin embargo, en el caso del ión radical con m/z 154 se observaron únicamente dos iones producto importantes correspondientes a m/z 124 y 123, ya que el ión observado como fragmento de fuente (m/z 136) presentaba muy poca abundancia. La imposibilidad de poder monitorizar ningún otro ion producto que presentara una abundancia considerable promovió que se estudiara también la fragmentación del ión fragmento obtenido en la fuente (m/z 136 [$M-H_2O$] $^-$). La optimización de sus iones producto demostró que con energías relativamente bajas (10 eV) éste se fragmentaba completamente para obtener el ión producto con m/z 64.

Aunque la patulina es un compuesto de elevada polaridad, su separación cromatográfica se pudo llevar a cabo a través de una columna en fase reversa (Acquity BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 μ m)). Para obtener una correcta retención del compuesto en la columna, y evitar que éste eluyera rápidamente de la misma con los compuestos más polares y sales en el tiempo muerto de la columna, fue necesario acondicionar la columna con un fase móvil en la que el contenido de agua inicial era del 98%. Se estudió tanto el uso de metanol como de acetonitrilo en la fase móvil a un flujo de 0.3 mL/ min. Los resultados fueron semejantes, aunque finalmente se seleccionó el acetonitrilo ya que proporcionó picos más estrechos que los obtenidos con metanol. Con el objetivo de

mejorar la sensibilidad de esta metodología se planteó el uso de modificadores en la fase móvil que promovieran la desprotonación de la molécula. Para ello se estudió el uso de acetato amónico y trimetilamina. Se descartó el uso de acetato amónico ya que producía un ensanchamiento del pico cromatográfico. La adición de trietilamina también fue descartada ya que no se observó el aumento de señal esperado por la adición de este compuesto básico que podría favorecer la desprotonación de la patulina.

Después de realizar la optimización cromatográfica mediante el uso de la columna Acquity BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 μm), se probó también la utilización de una columna de mayor diámetro que permitiera trabajar a flujos mayores. Está descrito que la ionización mediante APCI es dependiente de la masa de flujo (Ardrey, 2003), por lo que se planteó trabajar a mayores flujos (0.8 mL/min) con el objetivo de mejorar la sensibilidad obtenida. Para ello se seleccionó la columna Atlantis C18 (4.6 x 100 mm, 5 μm), la cual se caracteriza por presentar una afinidad mejorada para la retención de compuestos de elevada polaridad. Los resultados aunque fueron aceptables no mejoraron los obtenidos mediante la columna de UHPLC. Se descartó el uso de la columna Atlantis debido a que se obtenían análisis más rápidos con la columna UHPLC, y además se reducía el consumo de disolventes de fase móvil al trabajar a menores flujos.

Tras optimizar las condiciones cromatográficas y espectrométricas, tanto para la ionización mediante APCI como ESI, se pensó en cual debía ser la estrategia a llevar a cabo para el tratamiento de muestra. En el caso de muestras líquidas se probó la inyección directa de las muestras en el sistema cromatográfico. Al tratarse de zumos, con un elevado contenido de azúcares, se decidió inyectar las muestras diluídas. Para ello, se diluyeron las muestras 4 veces con agua como situación de compromiso que permitiera la inyección de estas muestras sin la pérdida de sensibilidad que producirían diluciones mayores. Además se estudió la posibilidad de inyectar volúmenes mayores en el sistema cromatográfico a los utilizados normalmente. Finalmente se decidió inyectar 100 μL en el sistema cromatográfico ya que no se observó ensanchamiento o mala forma de pico cromatográfico. De este modo se conseguía la sensibilidad necesaria para alcanzar los

límites establecidos por la legislación Europea sin la necesidad de aplicar una etapa de SPE para la preconcentración del analito.

Por lo que respecta a las muestras sólidas, se estudiaron diferentes disolventes para aplicar extracciones sólido-líquido mediante extracción mecánica de las matrices de manzana y productos derivados como la compota y el puré de manzana. La extracción con acetonitrilo ha sido utilizada por algunos autores como González-Osnaya et al., aunque la determinación posterior se ha realizado mediante cromatografía de gases (González-Osnaya, Soriano, Moltó & Mañes, 2007). Otros autores, realizaron la extracción con acetonitrilo, utilizando la metodología QuEChERS (Desmarchelier, Mujahid, Racault, Perring & Lancova, 2011). Sin embargo, en nuestro caso, los mejores resultados se obtuvieron utilizando acetato de etilo, siendo éste además el disolvente recomendado en los métodos oficiales de análisis de la AOAC (AOAC International, 2002).

El estudio del efecto matriz fue determinante para la selección de la fuente de ionización más idónea para la determinación de patulina. La cuantificación de extractos blancos de manzana y zumo de manzana fortificados con patulina mostraron una marcada supresión de la señal cuando se utilizó la fuente ESI, observando únicamente un 16% y 5%, respectivamente, de la señal esperada. Sin embargo, cuando estos mismos extractos fueron inyectados en el sistema provisto de fuente APCI, las señales obtenidas fueron semejantes a la del patrón en solvente (**Figura 2, Artículo científico 4**). Esta observación fue crucial para la selección de la fuente APCI como la interfase a utilizar en este trabajo. Además, la no influencia de la matriz en el proceso de ionización permitió la cuantificación de muestras mediante calibrado en solvente.

Existen diferentes metodologías publicadas en las que se utiliza la interfase ESI para la determinación de patulina, aunque es difícil obtener una conclusión respecto al efecto matriz. Así, algunos autores no comentan este tipo de efecto, otros reportan no observar un efecto matriz considerable en matrices de cereales (Sulyok, Berthiller, Krska

& Schuhmacher, 2006) y otros, en cambio, observan una marcada supresión de señal en matrices semejantes (Jackson, Kudupoje & Yiannikouris, 2012). Una aproximación que se evaluó con el fin de minimizar el efecto matriz y poder continuar considerando la fuente ESI como candidata para la determinación de patulina fue mediante el cambio de selectividad en la separación cromatográfica. Para ello se seleccionó una columna basada en la interacción hidrofílica (columnas con rellenos de fase normal y disolventes típicos de fase reversa), diseñada para la separación de compuestos de elevada polaridad. Sin embargo, no se alcanzó el objetivo deseado, pues el compuesto presentaba baja retención en la columna y mala forma cromatográfica.

El método fue validado en cuatro matrices, tres sólidas, formadas por la manzana, el puré de manzana y la compota, y una líquida, zumo de manzana. En el caso del zumo de manzana, el nivel más bajo validado fue 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, correspondiente con el nivel máximo establecido por la legislación Europea en este tipo de matrices. Por lo que respecta a las matrices sólidas, estas fueron satisfactoriamente validadas mediante el uso de muestras blanco fortificadas al nivel 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Los límites de detección y cuantificación se establecieron según la relación señal/ruido 3 y 10, respectivamente.

Aunque en el presente trabajo no se detectaron muestras positivas en patulina, se siguió el criterio establecido por la guía SANCO en cuanto a la confirmación (European Commission, 2011). Por ello se adquirieron 3 transiciones SRM y se comprobó el cumplimiento de las Q/q ratios. Al no disponer de muestras positivas, se compararon las relaciones de abundancia entre los patrones y las muestras artificialmente contaminadas con el objetivo de demostrar el potencial de la metodología para realizar una correcta confirmación.

2.5. REFERENCIAS

- Afshar, P., Shokrzadeh, M., Kalhori, S., Babae, Z., & Saeedi Saravi, S. S. (2013). *Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in human breast milk in Sari, Iran*. Food Control, 31(2), 525-529.
- Alvito, P. C., Sizoo, E. A., Almeida, C. M. M., & van Egmond, H. P. (2010). *Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal*. Food Analytical Methods, 3(1), 22-30.
- AOAC International (2002). Official Method 2000.02. Official Methods of Analysis of AOAC International 17th ed. Genthersburg. MD
- Ardrey, R.E. (2003) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. Ed. Wiley. ISBN: 0-471-49801-7
- Ariño, A., Estopañan, G., Juan, T., & Herrera, A. (2007). *Estimation of dietary intakes of fumonisins B1 and B2 from conventional and organic corn*. Food Control, 18(9), 1058-1062.
- Ballesteros, E., García Sánchez, A., & Ramos Martos, N. (2006). *Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1111(1), 89-96.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2009). *Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 23(12), 1801-1809.
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). *Mycotoxins*. Clinical Microbiology Reviews, 16(3), 497-516.

- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G., & Krska, R. (2005). *Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1062(2), 209-216.
- Borutova, R., Aragon, Y. A., Nährer, K., & Berthiller, F. (2012). *Co-occurrence and statistical correlations between mycotoxins in feedstuffs collected in the Asia-Oceania in 2010*. Animal Feed Science and Technology, 178(3-4), 190-197.
- Cano-Sancho, G., Gauchi, J. -, Sanchis, V., Marín, S., & Ramos, A. J. (2011). *Quantitative dietary exposure assessment of the catalonian population (spain) to the mycotoxin deoxynivalenol*. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 28(8), 1098-1109.
- Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R., & Laganà, A. (2012). *Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry*. Mass spectrometry reviews, 31(4), 466-503.
- Chen, D., Cao, X., Tao, Y., Wu, Q., Pan, Y., Huang, L., Wang, X., Wang, Y., Peng, D., Liu, Z., & Yuan, Z. (2012). *Development of a sensitive and robust liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and a pressurized liquid extraction for the determination of aflatoxins and ochratoxin A in animal derived foods*. Journal of Chromatography A, 1253, 110-119.
- Cigic, I. K., & Prosen, H. (2009). *An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins*. International Journal of Molecular Sciences, 10(1), 62-115.
- Decisión 2002/657/CE de la Comisión de 12 de Agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario oficial de la Unión Europea L221 (2002) pp 8-36.

- Desmarchelier, A., Mujahid, C., Racault, L., Perring, L., & Lancova, K. (2011). *Analysis of patulin in pear- and apple-based foodstuffs by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(14), 7659-7665.
- Desmarchelier, A., Oberson, J. -, Tella, P., Gremaud, E., Seefelder, W., & Mottier, P. (2010). *Development and comparison of two multiresidue methods for the analysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(13), 7510-7519.
- Devi, K. T., Mayo, M. A., Reddy, K. L. N., Delfosse, P., Reddy, G., Reddy, S. V., & Reddy, D. V. R. (1999). *Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B1*. Letters in applied microbiology, 29(5), 284-288.
- di Mavungu, J. D., Monbaliu, S., Scippo, M. -, Maghuin-Rogister, G., Schneider, Y. -, Larondelle, Y., Callebaut, A., Robbens, J., van Peteghem, C., & de Saeger, S. (2009). *LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements*. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 26(6), 885-895.
- Dorne, J. L. C. M., Dorne, J. L. C. M., Bordajandi, L. R., Amzal, B., Ferrari, P., & Verger, P. (2009). *Combining analytical techniques, exposure assessment and biological effects for risk assessment of chemicals in food*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 28(6), 695-707.
- EFSA, 2011. *Towards a harmonised Total Diet Study approach: a guidance document*. EFSA Journal, 9(11), 2450-2515.
- European Commission, 2009. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Document No. SANCO/10684/2009.

- European Commission, 2011. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Document No. SANCO/12495/2011.
- Food and Agriculture Organization (2004). *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. FAO Food and Nutrition Paper 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Garrido-Frenich, A., Vidal, J. L. M., Romero-González, R., & Aguilera-Luiz, M. d. M. (2009). *Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Food Chemistry*, 117(4), 705-712.
- Garrido Frenich, A., Fernandez Moreno, J. L., Martinez Vidal, J. L., & Arrebola Liebanas, F. J. (2007). *Application of gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry for the multiresidue analysis of pesticides in olive oil*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8346-8352.
- Göbel, R., & Lusky, K. (2004). *Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in grains by new immunoaffinity column/liquid chromatography*. *Journal of AOAC International*, 87(2), 411-416.
- González-Osnaya, L., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2007). *Exposure to patulin from consumption of apple-based products*. *Food additives and contaminants*, 24(11), 1268-1274.
- Hernández, F., Sancho, J. V., & Pozo, O. J. (2005). *Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(4), 934-946.

- Hussein, H. S., & Brasel, J. M. (2001). *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals*. *Toxicology*, 167(2), 101-134.
- IARC, 2002. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 82, Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. World health organization-International agency for research on cancer (2002), Lyon
- Ito, R., Yamazaki, H., Inoue, K., Yoshimura, Y., Kawaguchi, M., & Nakazawa, H. (2004). *Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination in Japan*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7464-7468.
- Jackson, L. C., Kudupoje, M. B., & Yiannikouris, A. (2012a). *Simultaneous multiple mycotoxin quantification in feed samples using three isotopically labeled internal standards applied for isotopic dilution and data normalization through ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(23), 2697-2713.
- Kokkonen, M. K., & Jestoi, M. N. (2009). *A multi-compound LC-MS/MS method for the screening of mycotoxins in grains*. *Food Analytical Methods*, 2(2), 128-140.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., & Nehls, I. (2010). *Determination of mycotoxins in foods: Current state of analytical methods and limitations*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1595-1612.
- Krska, R., & Molinelli, A. (2007). *Mycotoxin analysis: State-of-the-art and future trends*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(1), 145-148.
- Lattanzio, V. M. T., Solfrizzo, M., Powers, S., & Visconti, A. (2007). *Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid*

- chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 21(20), 3253-3261.
- Malysheva, S. V., Diana di Mavungu, J., Boonen, J., De Spiegeleer, B., Goryacheva, I. Y., Vanhaecke, L., & De Saeger, S. (2012). *Improved positive electrospray ionization of patulin by adduct formation: Usefulness in liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-mycotoxin analysis*. Journal of Chromatography A, 1270, 334-339.
- Martos, P. A., Thompson, W., & Diaz, G. J. (2010). *Multiresidue mycotoxin analysis in wheat, barley, oats, rye and maize grain by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. World Mycotoxin Journal, 3(3), 205-223.
- Meucci, V., Razzuoli, E., Soldani, G., & Massart, F. (2010). *Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy*. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 27(1), 64-71.
- Moake, M. M., Padilla-Zakour, O. I., & Worobo, R. W. (2005). *Comprehensive review of patulin control methods in foods*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 4(1), 8-21.
- Pérez-Ortega, P., Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Ramos-Martos, N., & Molina-Díaz, A. (2012). *Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1249, 32-40.
- Razzazi-Fazeli, E., Böhm, J., Jarukamjorn, K., & Zentek, J. (2003). *Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 796(1), 21-33.

Reglamento 2004/683/CE de la Comisión de 13 de abril de 2004 que modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas y a la ocratoxina A en los alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad. Diario Oficial de la Unión Europea L106 (2004) pp 3-5.

Reglamento 2006/401/CE de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L70 (2006) pp 12-34.

Reglamento 2006/1881/CE de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L364 (2006) pp 5-24.

Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, H., & Wang, Z. (2007). *Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1143(1-2), 48-64.

Rodriguez-Aller, M., Gurny, R., Veuthey, J. -, & Guillard, D. (2013). *Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications*. Journal of Chromatography A, 1292, 2-18.

Romagnoli, B., Ferrari, M., & Bergamini, C. (2010). *Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 45(9), 1075-1080.

Royer, D., Humpf, H. -, & Guy, P. A. (2004). *Quantitative analysis of Fusarium mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid*

chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. Food additives and contaminants, 21(7), 678-692.

Rubert, J., James, K. J., Mañes, J., & Soler, C. (2012). *Applicability of hybrid linear ion trap-high resolution mass spectrometry and quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry for mycotoxin analysis in baby food*. Journal of Chromatography A, 1223, 84-92.

Rubert, J., Soriano, J. M., Mañes, J., & Soler, C. (2013). *Occurrence of fumonisins in organic and conventional cereal-based products commercialized in France, Germany and Spain*. Food and Chemical Toxicology, 56(0), 387-391.

Rubert, J., Soler, C., & Mañes, J. (2012). *Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods*. Food Chemistry, 133(1), 176-183.

Rychlik, M., & Asam, S. (2008). *Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 390(2), 617-628.

Rychlik, M., & Schieberle, P. (1999). *Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(9), 3749-3755.

sanco, g. null.

Şenyuva, H. Z., & Gilbert, J. (2010). *Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review*. Journal of Chromatography B, 878(2), 115-132.

Serrano, A. B., Font, G., Ruiz, M. J., & Ferrer, E. (2012). *Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area*. Food Chemistry, 135(2), 423-429.

Sewram, V., Nair, J. J., Nieuwoudt, T. W., Leggott, N. L., & Shephard, G. S. (2000). *Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid*

- chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 897(1-2), 365-374.
- Sforza, S., Dall'Asta, C., & Marchelli, R. (2006). *Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 25(1), 54-76.
- Silva, L., Fernández-Franzón, M., Font, G., Pena, A., Silveira, I., Lino, C., & Mañes, J. (2009). *Analysis of fumonisins in corn-based food by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detectors*. Food Chemistry, 112(4), 1031-1037.
- Sirot, V., Fremy, J., & Leblanc, J. (2013). *Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study*. Food and Chemical Toxicology, 52(0), 1-11.
- Sizoo, E. A., & Van Egmond, H. P. (2005). *Analysis of duplicate 24-hour diet samples for aflatoxin B1, aflatoxin M1 and ochratoxin A*. Food additives and contaminants, 22(2), 163-172.
- Songsermsakul, P., & Razzazi-Fazeli, E. (2008). *A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins*. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 31(11-12), 1641-1686.
- Sørensen, L. K., & Elbæk, T. H. (2005). *Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 820(2), 183-196.
- Spanjer, M. C., Rensen, P. M., & Scholten, J. M. (2008). *LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio,*

- wheat, maize, cornflakes, raisins and figs*. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 25(4), 472-489.
- Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G., & Alder, L. (2012). *Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed?* Analytical Chemistry, 84(3), 1474-1482.
- Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). *Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds*. Food Chemistry, 119(1), 408-416.
- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2006). *Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20(18), 2649-2659.
- Takino, M., Daishima, S., & Nakahara, T. (2003). *Liquid chromatography/mass spectrometric determination of patulin in apple juice using atmospheric pressure photoionization*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 17(17), 1965-1972.
- Tam, J., Mankotia, M., Mably, M., Pantazopoulos, P., Neil, R. J., Calway, P., & Scott, P. M. (2006). *Survey of breakfast and infant cereals for aflatoxins B1, B2, G1 and G2*. Food additives and contaminants, 23(7), 693-699.
- Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). *Analytical methods for determination of mycotoxins: A review*. Analytica Chimica Acta, 632(2), 168-180.

- Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., & Jonker, M. A. (2007). *Regulations relating to mycotoxins in food : Perspectives in a global and European context*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389(1), 147-157.
- Van Pamel, E., Verbeken, A., Vlaemyneck, G., De Boever, J., & Daeseleire, E. (2011). *Ultrahigh-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multimycotoxin method for quantitating 26 mycotoxins in maize silage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(18), 9747-9755.
- Varga, E., Glauner, T., Köppen, R., Mayer, K., Sulyok, M., Schuhmacher, R., Krska, R., & Berthiller, F. (2012). *Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 402(9), 2675-2686.
- Vishwanath, V., Sulyok, M., Labuda, R., Bicker, W., & Krska, R. (2009). *Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 395(5), 1355-1372.
- Zachariasova, M., Lacina, O., Malachova, A., Kostelanska, M., Poustka, J., Godula, M., & Hajslova, J. (2010). *Novel approaches in analysis of Fusarium mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 662(1), 51-61.
- Zachariasova, M., Hajslova, J., Kostelanska, M., Poustka, J., Krplova, A., Cuhra, P., & Hochel, I. (2008). *Deoxynivalenol and its conjugates in beer: A critical assessment of data obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 625(1), 77-86.

Zhang, D., Li, P., Zhang, Q., Zhang, W., Huang, Y., Ding, X., & Jiang, J. (2009). *Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure*. *Analytica Chimica Acta*, 636(1), 63-69.

Zöllner, P., & Mayer-Helm, B. (2006). *Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1136(2), 123-169.



CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE FICOTOXINAS
EN AGUAS Y MOLUSCOS BIVALVOS
MEDIANTE CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASAS EN
TÁNDEM (LC-MS/MS)

CAPÍTULO 3. DETERMINACIÓN DE FICOTOXINAS EN AGUAS Y MOLUSCOS BIVALVOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS)

3.1. Introducción

3.2. Determinación de microcistinas y nodularina en aguas a niveles de concentración sub-ppb mediante SPE-UHPLC-MS/MS línea

3.2.1. Introducción

3.2.2. Artículo científico 5

Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction-ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry

Journal of Chromatography A (2012) 1266, 61-68

3.2.3. Discusión de los resultados obtenidos

3.3. Determinación de toxinas marinas en moluscos bivalvos mediante cromatografía líquida de fase iónica acoplada a espectrometría de masas en tándem. Estudio de depuración del ácido domoico

3.3.1. Introducción

3.3.2. Artículo científico 6

N-Acetylcysteine boosts xenobiotic detoxification in shellfish

Aquatic Toxicology (Enviado para su publicación)

3.3.3. Discusión de los resultados obtenidos

3.4. Referencias

3.1. INTRODUCCIÓN

Las ficotoxinas, según su nombre indica (*phycos*=alga y *toxikon*=toxina), son tóxicos producidos por microalgas unicelulares, principalmente cianobacterias, dinoflagelados y diatomeas, como resultado de su metabolismo secundario. Al igual que en el caso de las micotoxinas, estos metabolitos no son tóxicos para los organismos que los producen, pero sí para animales y humanos. Entre la gran cantidad de microalgas que se pueden encontrar, únicamente algunas especies son productoras de metabolitos tóxicos y la mayoría de ellas, únicamente bajo ciertas condiciones ambientales.

El papel de estos compuestos tóxicos producidos en el metabolismo secundario de muchas bacterias y organismos eucariotas ha sido objeto de debate. La mayoría de los autores los han considerado como un mecanismo de defensa frente a otros organismos o contra la predación por parte de organismos presentes en niveles superiores de la cadena trófica. Estos metabolitos secundarios producidos por organismos acuáticos presentan estructuras químicas diversas. Así, los organismos dinoflagelados producen poliéteres,

mientras que muchas cianobacterias se caracterizan por producir péptidos cíclicos (Botana L.M., 2000).

Las ficotoxinas pueden ser bioacumuladas a través de la cadena trófica acuática (especialmente en organismos filtrantes como son los moluscos) y convertirse en un vector de exposición a estas toxinas por parte de animales y humanos a través del consumo de pescados y mariscos contaminados. Otras fuentes de exposición son el consumo o contacto con aguas contaminadas o simplemente la transmisión a través del aire (Dawson, 1998, Van Dolah, 2000).

El crecimiento desmesurado de algas y microalgas capaces de teñir el color del agua se conoce como “*bloom*”, y se reconoce por las siglas HAB (*harmful algal bloom*). El aumento de casos de HABs en las últimas décadas se ha asociado a la contaminación de las aguas debido a la actividad humana (aumento del contenido de nutrientes los cuales favorecen el proceso de eutrofización), y el cambio climático (aumento de temperatura del agua, cambio pH, etc) (Miraglia et al., 2009).

Aunque un crecimiento descontrolado de microalgas podría ser indicativo de la presencia de ficotoxinas en el agua, su aparición no es indicio suficiente pues es conocido que solo un número reducido de microalgas son productoras de tóxicos. Es más, hay que tener presente que no es necesario la detección de un episodio de HAB para la detección de este tipo de tóxicos ya que se ha reportado que algunos de los episodios más graves de contaminación por ficotoxinas se han producido sin detectar ningún HABs (Quilliam, 2003).

Las ficotoxinas representan un grupo muy amplio de toxinas debido a la diversidad tanto de organismos productores (dinoflagelados, cianobacterias, diatomeas,..) como de toxinas producidas, tanto desde el punto de vista estructural como tóxico. Una primera clasificación podría ser en función de los ambientes en los que se detectan estas micotoxinas, pudiéndose diferenciar entre toxinas presentes en ambientes marinos y aquellas que se detectan en aguas dulces.

Entre las ficotoxinas más comúnmente encontradas en aguas dulces destacan las microcistinas. Este grupo de heptapéptidos cíclicos producidos por cianobacterias (algas azul-verdoso) se caracterizan por presentar propiedades cancerígenas y hepatotóxicas. La presencia de estos compuestos ha sido reportada en aguas superficiales en gran variedad de regiones extendidas por todo el mundo. Todo esto, unido al uso de aguas superficiales como aguas de consumo hace necesario el control de este tipo de contaminantes en aguas (Codd, Morrison & Metcalf, 2005). Ya en 1998 la agencia americana de protección del medioambiente (EPA) incluyó en su lista de compuestos candidatos a ser regulados en aguas de consumo a las cianobacterias y sus tóxicas (Richardson & Ternes, 2011). De igual modo, la microcistina-LR ha sido incluida en la legislación de diferentes países, estableciendo niveles máximos dentro del rango 1-1.5 $\mu\text{g/L}$. En el **apartado 3.2.** se tratará con más detalle los tóxicos producidos por cianobacterias en aguas dulces presentándose la metodología de análisis en el **Artículo científico 5.**

Por lo que respecta a los tóxicos presentes en ambientes marinos cabe destacar la gran heterogeneidad que presentan, así como la diversidad de efectos que producen en el ser humano. La mayoría de organismos productores de toxinas marinas son dinoflagelados y diatomeas. Normalmente, la intoxicación por este tipo de toxinas se produce por la ingesta de marisco o pescado contaminado (debido a su bioacumulación en estos organismos). Las toxinas marinas se clasifican en función de los efectos que producen en el ser humano tras la ingesta de alimentos contaminados. Así, estos tóxicos se han clasificado en 5 grupos dependiendo de la intoxicación observada, dividiéndose en las toxinas amnésicas (ASP), paralíticas (PSP), neurotóxicas (PSP), diarreicas (DSP) y por último la intoxicación por consumo de pescado con ciguatera (CFP) (Garthwaite, 2000). Con el objetivo de garantizar la seguridad alimentaria se han establecido los contenidos máximos de este tipo de contaminantes, especialmente en mariscos (Reglamento 2004/853/CE). La empresa productora es la responsable de asegurar que los productos en el mercado presenten concentraciones inferiores a las establecidas. En caso de detectar concentraciones superiores, estos productos deben someterse a procesos de

depuración con el fin de minimizar el contenido de contaminantes por debajo del límite máximo establecido. En el **apartado 3.3.** se presentará información referente al análisis de toxinas marinas en moluscos bivalvos y su depuración (**Artículo científico 6**).

3.2. DETERMINACIÓN DE MICROCISTINAS Y NODULARINA EN AGUAS A NIVELES DE CONCENTRACIÓN SUB-PPB MEDIANTE SPE-UHPLC-MS/MS EN LÍNEA

3.2.1. INTRODUCCIÓN

La eutrofización de aguas dulces y salobres debida a la interacción de diferentes factores (contenido nutrientes, temperatura, luz, turbidez, flujo del agua, salinidad, pH, ...) favorece la formación de florecimientos de cianobacterias (*blooms*). Aunque la presencia de estas cianobacterias es beneficiosa para el medio pues son fijadoras de nitrógeno en suelo y agua, el crecimiento descontrolado de ellas provoca el crecimiento de cepas productoras de toxinas perjudiciales para la salud humana (Chorus, I., Bartram, J. (Eds), 1999).

En la actualidad se conocen alrededor de 150 géneros de cianobacterias, aunque sólo 40 son productoras de cianotoxinas. Entre los géneros productores de cianobacterias destacan los siguientes: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lungbya*, *Microcystis*, *Nostoc* y *Oscillatoria (Planktothrix)* (Van Apeldoorn, Van Egmond, Speijers & Bakker, 2007).

Las cianotoxinas se han clasificado en diferentes grupos en función de su efecto tóxico en los seres vivos, principalmente, basándose en el órgano que es dañado. Se dividen en cinco grupos:

- Hepatotoxinas (incluye las microcistinas y nodularinas)
- Neurotoxinas (anatoxinas y saxitoxinas)
- Citotoxinas (Cilindrospermopsin)
- Toxinas irritantes
- Toxinas gastrointestinales

En la actualidad no se conoce con exactitud la cantidad de cianotoxinas que existen ya que se desconoce el número de toxinas por descubrir (Codd, Morrison & Metcalf, 2005, Funari & Testai, 2008). La primera cita científica en la que se menciona la toxicidad de las cianotoxinas corresponde al año 1878, cuando se produjo la muerte de animales domésticos en Australia, aunque se conocen referencias a este tipo de envenenamiento en China en el milenio anterior (Chorus, I., Bartram, J. (Eds), 1999). Entre todas las cianotoxinas, el grupo que más comúnmente se encuentran en *blooms* de aguas dulces y salobres son las hepatotóxicas que producen péptidos cíclicos tóxicos de las familias de las microcistinas y nodularinas (Van Apeldoorn, Van Egmond, Speijers & Bakker, 2007).

Las microcistinas son heptapéptidos cíclicos cuyas masas moleculares se encuentran en general dentro del rango de masas entre 900 y 1100 Da. Los siete aminoácidos que conforman el péptido cíclico presentan la estructura general siguiente: ciclo-(D-alanina-X-D-MeAsp-Y-Adda-D-glutamato-Mdha), donde X y Y son L-aminoácidos variables de una microcistina a otra (ver **Figura 1, Artículo científico 5**). D-MeAsp es el ácido D-eritro-β-metilaspártico, Mdha corresponde a N-metildehidroalanina y Adda es el ácido (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6

dienoico. Aunque se han documentado variaciones de los 7 aminoácidos que conforman las microcistinas, las sustituciones más comunes son las que corresponden a los L-aminoácidos. En este sentido, los aminoácidos más comunes en la posición X suelen ser leucina, arginina o tirosina, mientras que en Y son arginina o leucina (Van Apeldoorn, Van Egmond, Speijers & Bakker, 2007). Se conocen alrededor de 60 congéneres que presentan la estructura cíclica de 7 aminoácidos en los cuales únicamente varían los aminoácidos X y Y (Hitzfeld, Höger & Dietrich, 2000).

Las nodularinas son pentapéptidos monocíclicos. La estructura general de las nodularinas es: ciclo-(D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-glutamate-Mdhh), donde D-MeAsp es ácido D-eritro- β -metilaspártico, L-Arg corresponde al aminoácido L-arginina, y Mdhh es el ácido 2-(metilamonio)-2-dehidrobutírico. El aminoácido Adda, al igual que en el caso de las microcistinas corresponde al ácido (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6 dienoico. Actualmente se conocen algunas variantes de la nodularina debido a metilaciones en algunos aminoácidos o sustituciones de algunos de ellos (Van Apeldoorn, Van Egmond, Speijers & Bakker, 2007).

Las más de 80 variantes de microcistinas y las 7 variantes de nodularinas, conocidas hasta el momento, presentan la característica común de contener el aminoácido Adda, responsable de la toxicidad asociada a este tipo de péptidos cíclicos. La microcistina-LR se ha considerado como la microcistina con mayor poder hepatotóxico (Nishiwaki-Matsushima et al., 1992). Esta toxicidad es debida al mecanismo específico de inhibición que produce sobre las proteínas fosfatasas serina/treonina (PP1 y PP2A), causando la hiperfosforilación de las proteínas que conforman el citoesqueleto, y provocando una deformación de los hepatocitos (Funari & Testai, 2008, MacKintosh, Beattie, Klumpp, Cohen & Codd, 1990). La intoxicación aguda por microcistinas puede causar la muerte de seres humanos y animales debida a la cascada de eventos que produce la inhibición de las proteínas fosfatasas. Se ha demostrado que la exposición a este tipo de tóxicos en bajas dosis provoca la aparición en ratas de tumores en hígado y piel de ratas,

por lo que se consideran como sustancias posiblemente cancerígenas (Pearson, Mihali, Moffitt, Kellmann & Neilan, 2010, McElhiney & Lawton, 2005).

Debido al gran número de enfermedades que puede causar el consumo de aguas contaminadas con este tipo de tóxicos, tanto la organización mundial de la salud (OMS) como otros organismos gubernamentales han establecido límites máximos de estos tóxicos en aguas. En el caso de la OMS se ha establecido un valor guía recomendado de 1 µg/L de microcistina-LR en aguas de consumo (WHO, 1998). Otros organismos, como es el caso de la legislación española, ha establecido el valor máximo de 1 µg/L de microcistinas según el Real Decreto 140/2003 en el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua para consumo humano (Real Decreto 140/2003).

La creciente preocupación por la calidad del agua, así como por el cumplimiento de los límites máximos establecidos en la legislación, se ha traducido en la aparición de gran cantidad de métodos analíticos para su determinación, desde métodos de barrido basados en principios biológicos a métodos analíticos más sofisticados.

Entre los métodos biológicos se podrían destacar el método del bioensayo en ratón, el uso de ensayos basados en inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA) y el ensayo por inhibición de la proteína fosfatasa. Se caracterizan por ser rápidos y relativamente baratos aunque únicamente se obtienen resultados cualitativos o semicuantitativos (Msagati, 2006). Para la obtención de información más específica, es necesario recurrir a técnicas analíticas basadas en principios fisicoquímicos, las cuales permiten la identificación y correcta cuantificación de los compuestos presentes. Entre las técnicas que se han utilizado para la determinación de microcistinas y nodularinas se encuentran el uso de la HPLC o la CE acopladas a distintos tipos de detectores (McElhiney & Lawton, 2005).

El uso de la HPLC acoplada a detectores UV o DAD se ha convertido en una herramienta útil para el análisis rutinario de microcistinas (Lawton, Edwards & Codd, 1994). Sin embargo, estas técnicas se caracterizan por ser poco selectivas, incapaces de

identificar diferentes toxinas u otros compuestos que puedan co-eluir, como es el caso de diferentes aditivos de plásticos, comúnmente presentes en aguas, los cuales presentan absorciones a la misma longitud de onda (Msagati, Siame & Shushu, 2006).

Con el objetivo de evitar los problemas citados anteriormente, el uso del HPLC-MS proporciona una mayor sensibilidad y selectividad frente a otros detectores. En la actualidad existen diversos métodos para la determinación de microcistinas en aguas mediante el uso de la LC-MS/MS. Aunque la mayoría de estos métodos presentan una gran sensibilidad, sigue siendo necesaria la aplicación de una etapa de preconcentración para determinar estos compuestos al nivel de 1 µg/L sugerido por la OMS (Cong, Huang, Chen, Lu, Zhang & Ren, 2006, Mekebri, Blondina & Crane, 2009, Triantis, Tsimeli, Kaloudis, Thanassoulis, Lytras & Hiskia, 2010, Barco, Flores, Rivera & Caixach, 2004).

En los últimos años, con la aparición de la UHPLC, se han desarrollado nuevos métodos para la determinación de microcistinas en los que se ha reducido considerablemente el tiempo de análisis (Oehrle, Southwell & Westrick, 2010, Wang, Pang, Ge & Ma, 2007, Xu et al., 2008). Como ya se ha comentado en la sección 1.2.2.1., la técnica UHPLC se caracteriza por utilizar columnas con fases estacionarias formadas por partículas porosas de tamaño inferior a 2 µm. De este modo se consigue mejorar la eficacia de separación de la columna, reduciendo el tiempo de análisis frente a la cromatografía convencional y mejorando la sensibilidad del método debido a la obtención de picos más estrechos. A pesar de estas ventajas, en los métodos UHPLC-MS/MS publicados, no ha sido posible alcanzar directamente niveles tan bajos como 1 µg/L de microcistina-LR en aguas, por lo que la mayoría de autores han utilizado alguna técnica de preconcentración.

Para este fin, la SPE es la técnica preferida, utilizándose materiales basados en cromatografía de fase reversa que permiten la pre-concentración directa de analitos presentes en matrices acuosas (Hennion, 1999). En el caso de las microcistinas, la SPE basada en el uso de cartuchos con relleno C18 o polimérico tipo OASIS ha sido una de las

opciones seleccionadas por muchos autores (Msagati, Siame & Shushu, 2006)(Mekebri, Blondina & Crane, 2009, Wang, Pang, Ge & Ma, 2007). El uso de cartuchos con rellenos basados en polímeros impresos es otra de las alternativas utilizadas (Chianella et al., 2002, Mbukwa, Msagati & Mamba, 2013). Este es el caso de los polímeros con grupos terminales arginina, los cuales presentan elevada afinidad a la guanidina presente en todas las microcistinas. Por último, no cabe olvidar la utilización de cartuchos de inmunoafinidad caracterizados por la elevada selectividad, aunque presentan un elevado coste debido a la dificultad de producción (Sangolkar, Maske & Chakrabarti, 2006).

La técnica SPE se puede realizar de dos modos; la más comúnmente utilizada es conocida como SPE “*off-line*”, mientras que la SPE “*on-line*” es un proceso caracterizado por una mayor automatización. En la modalidad “*off-line*” se utilizan habitualmente cartuchos desechables, de los cuales se eluye la fracción que contiene los analitos deseados. Estos extractos, después de ser evaporados y reconstituidos con un disolvente compatible con el proceso cromatográfico son inyectados al sistema.

Sin embargo, en el caso de la modalidad “*on-line*”, mediante el uso de válvulas de alta presión, se consigue la automatización completa del proceso, reduciendo la cantidad de muestra a pre-concentrar y el volumen de disolvente utilizado en el proceso de elución (ver **Figura 1**). Para ello, se utiliza un cartucho o precolumna (C-1) capaz de tolerar elevados flujos (normalmente 1-5 mL/min). Además, debe ser capaz de soportar la inyección de volúmenes elevados de muestra (variables entre 1 hasta 100 mL, dependiendo del enriquecimiento deseado). Es importante estudiar el volumen de ruptura del cartucho, es decir, el volumen máximo de muestra que se puede cargar en un cartucho sin que se produzcan pérdidas. Es por este motivo que la longitud de C-1 dependerá de la cantidad de muestra que se desee pre-concentrar. Siempre se seleccionará la longitud de pre-columna o cartucho menor posible que permita la retención de los compuestos satisfactoriamente para evitar posibles ensanchamientos de pico. En separaciones por UHPLC, en las que una de las bondades destacadas es el corto tiempo de análisis, es deseable reducir el volumen de muestra a inyectar con el fin de evitar que el tiempo

necesario para la inyección pueda superar el tiempo de separación cromatográfica. Otro aspecto a recalcar es la necesaria compatibilidad del cartucho de SPE y la columna analítica (C-2). Aunque es recomendable que ambas columnas (C-1 y C-2) sean semejantes tanto en diámetro y tamaño de partícula, es habitual utilizar empaquetados para C-1 con tamaño de partícula mayor (15-40 μm). Este hecho permite trabajar a mayores flujos sin observar pérdida de eficiencia debido a las reducidas dimensiones del cartucho (Hennion, 1999).

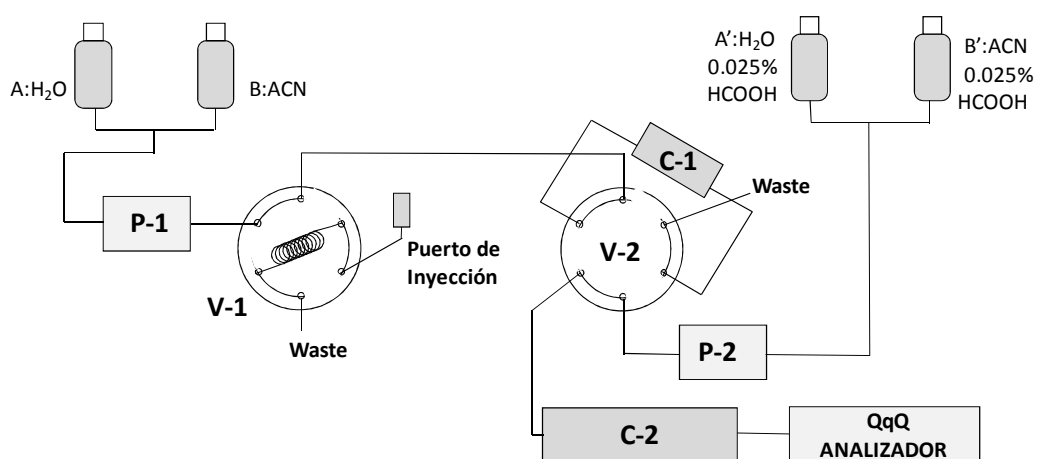


Figura 1. Acoplamiento SPE-UHPLC utilizado para la determinación de microcistinas en aguas. P1: Bomba HPLC, P2: Bomba UHPLC; V1: Válvula de seis vías; V2: Válvula de seis vías de alta presión; C-1: Cartucho polimérico; C-2: Columna cromatográfica UHPLC.

En el proceso de SPE “*on-line*” la muestra es cargada en el “*loop*” de muestra presente en V-1. Una vez cargado, mediante giro de V-1 se produce la transferencia de los analitos a C-1 gracias a la bomba (P-1). Los analitos son retenidos en cabeza de columna C-1, y posteriormente, tras una etapa de lavado, son eluidos en contracorriente (*backflush*) hacia la columna analítica (C-2) mediante giro de la válvula (V-2) con la

ayuda de la fase móvil (P-2). Posteriormente, mientras se produce la separación cromatográfica de los analitos en C-2, se realiza el lavado y posterior acondicionamiento de C-1 para la pre-concentración de la siguiente muestra mediante los disolventes bombeados por P-1.

Es recomendable en cualquier método cuantitativo por SPE “*on-line*” que los patrones analíticos utilizados en el proceso de cuantificación, bien sea a través de calibrado externo, calibrado en matriz, etc., sean sometidos al mismo procedimiento que las muestras. De este modo se compensan las posibles pérdidas en el proceso de extracción y se obtienen resultados más exactos.

La utilización de esta técnica acoplada a sistemas HPLC ha sido ampliamente utilizada con el objetivo de mejorar la sensibilidad, selectividad y rapidez de muchos métodos multiresiduales (Marín, Sancho, Pozo, López & Hernández, 2006, Pozo et al., 2006, Stoob, Singer, Goetz, Ruff & Mueller, 2005). Recientemente, se ha producido el salto tecnológico que ha permitido el acoplamiento al sistema UHPLC, gracias al diseño de sistemas de inyección rápidos y capaces de trabajar a presiones más elevadas. Por este motivo, la aplicación de la SPE a técnicas de UHPLC resulta bastante novedosa, siendo aún pocos los trabajos realizados (Chiuminatto et al., 2010, Gallart-Ayala, Moyano & Galceran, 2010, Gosetti et al., 2010, Núñez, Gallart-Ayala, Martins & Lucci, 2012, Vega-Morales, Sosa-Ferrera & Santana-Rodríguez, 2012).

En el **Artículo científico 5**, se muestra el desarrollo, validación y aplicación de un método analítico basado en el acoplamiento SPE “*on-line*” a UHPLC-MS/MS para la determinación de seis microcistinas y nodularina, tanto para aguas de consumo como superficiales.

Un aspecto importante y diferencial de este trabajo respecto a otros trabajos corresponde a la utilización de la técnica SPE en modo “*on-line*” acoplada a la separación UHPLC permitiendo la detección de los analitos a concentraciones del orden de ng/L en tiempos de análisis realmente cortos. La aplicación del acoplamiento SPE-UHPLC resulta

novedosa ya que los sistemas de inyección de grandes volúmenes previos no estaban diseñados para su acoplamiento al UHPLC, debido a las elevadas presiones en el sistema cromatográfico. Para llevar a cabo este trabajo fue necesario el diseño de un nuevo sistema que permitiera minimizar al máximo el tiempo de inyección con el fin de no perder las ventajas que en términos de velocidad de análisis brinda la cromatografía de ultra resolución. Para ello se utilizó el “*sample manager*” Waters 2777, un robot modulable que permite la inyección y tratamiento de muestra automático de un modo rápido.

A continuación se presenta el **Artículo científico 5**.

3.2.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 5

Journal of Chromatography A, 1266 (2012) 61–68



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction–ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry

Eduardo Beltrán, María Ibáñez, Juan Vicente Sancho, Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2012
Received in revised form
27 September 2012
Accepted 8 October 2012
Available online 16 October 2012

Keywords:

Microcystins
Nodularin
On-line SPE-UHPLC-MS/MS
Water

ABSTRACT

Microcystins and nodularin are cyclic peptides hepatotoxins produced by cyanobacterial genera (blue-green algae). Toxic cyanobacterial blooms are a worldwide problem, as reported in several countries, like China, Australia, or the United States. Therefore, it is necessary to develop sensitive and reliable analytical methodology to determine this type of toxins in water at parts per billion levels, or even lower. In this work, the potential of solid-phase extraction coupled on-line to ultra-high-pressure liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry (SPE-UHPLC-MS/MS) has been investigated for the efficient quantification and confirmation of microcystins LR, RR, YR, LY, LW, LF and nodularin in surface and drinking water samples, at sub-ppb levels. The method developed involves the injection of only 1 mL of water sample into the on-line SPE-UHPLC-MS/MS system and allows the rapid determination of the compounds selected (8 min of chromatographic run), avoiding laborious sample treatment. The method was validated in surface and drinking water by means of recovery experiments at 0.25 and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Average recoveries ($n=5$) ranged from 71 to 116%, with relative standard deviations (RSDs) lower than 15%. For microcystins LR, RR, YR and nodularin, a third level was also assayed (0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$) obtaining satisfactory data too. Limits of detection between 0.002 and 0.0405 $\mu\text{g L}^{-1}$ were estimated (0.0005 $\mu\text{g L}^{-1}$ for nodularin). The developed method was applied to the analysis of water samples collected in the province of Castellón (Spain). The acquisition of three MS/MS transitions for each compound allowed the unequivocal confirmation of positive samples, which was supported by the accomplishment of ion intensity ratios and retention time when compared with reference standards.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Microcystins (MCs) and nodularin (NOD) are the most frequently detected cyanotoxins, produced by cyanobacteria (blue-green algae), in blooms of fresh and brackish water [1,2]. These cyanobacterial toxins are categorized as hepatotoxins and tumour promoters [3]. Microcystins are cyclic heptapeptides constituted by a common structure of five invariant amino acids and two variable amino acids, which characterize each microcystin. Nodularin is a pentapeptide, structurally similar to microcystins [3,4] (Fig. 1). Toxicity of cyclic peptides is associated to the presence of the characteristic amino acid Adda (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-dienoic acid) capable of inhibiting protein phosphatases 1 and 2A, which have a vital role in cell control and intracellular structure [5].

The proliferation of cyanobacterial blooms in raw waters utilized as drinking water source is a problem for human health [4]. The exposition to contaminated waters can result in several intoxication cases as it was reported in Caruaru (Brazil) where 52 patients died after receiving renal dialysis treatment with microcystins contaminated water [6,7].

In order to protect human health, in 1998, the World Health Organization (WHO) set a guideline value of 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for total microcystin-LR (free plus cell-bound) in drinking water [8]. Nowadays, several countries have adopted this value as it is the case of Spain, where a limit of 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for microcystins was implemented in 2003 [9]. The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) has proposed microcystin-LR to be included on a new list of contaminant candidate list (CCLs) [10]. To ensure drinking water safety, selective, sensitive and reliable quantitative analytical methods are required for cyanotoxins analysis.

Several methods for microcystins determination can be found in the literature, some of them based on bioassay detection such as protein phosphatase inhibition assays (PPIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [11,12]. Nevertheless, HPLC

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368.
E-mail address: felix.hernandez@qfa.uji.es (F. Hernández).

Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction-ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry

Beltrán E., Ibáñez M., Sancho, J.V., Hernández, F.

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

Abstract

Microcystins and nodularin are cyclic peptides hepatotoxins produced by cyanobacterial genera (blue-green algae). Toxic cyanobacterial blooms are a worldwide problem, as reported in several countries, like China, Australia, or the United States. Therefore, it is necessary to develop sensitive and reliable analytical methodology to determine this type of toxins in water at parts per billion levels, or even lower. In this work, the potential of solid-phase extraction coupled on-line to ultra-high-pressure liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry (SPE-UHPLC-MS/MS) has been investigated for the efficient quantification and confirmation of microcystins LR, RR, YR, LY, LW, LF and nodularin in surface and drinking water samples, at sub-ppb levels. The method developed involves the injection of only 1 mL of water sample into the on-line SPE-UHPLC-MS/MS system and allows the rapid determination of the compounds selected (8 min of chromatographic run), avoiding laborious sample treatment. The method was validated in surface and drinking water by means of recovery experiments at 0.25 and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Average recoveries ($n = 5$) ranged from 71 to 116%, with relative standard deviations (RSDs) lower than 15%. For microcystins LR, RR, YR and nodularin, a third level was also assayed (0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$) obtaining satisfactory data too. Limits of detection between 0.002 and 0.04 $\mu\text{g L}^{-1}$ were estimated (0.0005 $\mu\text{g L}^{-1}$ for nodularin). The developed method was applied to the analysis of water samples collected in the province of Castellón (Spain). The acquisition of three MS/MS transitions for each

compound allowed the unequivocal confirmation of positive samples, which was supported by the accomplishment of ion intensity ratios and retention time when compared with reference standards.

Keywords: Microcystins, Nodularin, On-line SPE UHPLC-MS/MS, Water

1. Introduction

Microcystins (MCs) and nodularin (NOD) are the most frequently detected cyanotoxins, produced by cyanobacteria (blue-green algae), in blooms of fresh and brackish water [1] and [2]. These cyanobacterial toxins are categorized as hepatotoxins and tumour promoters [3]. Microcystins are cyclic heptapeptides constituted by a common structure of five invariant amino acids and two variable amino acids, which characterize each microcystin. Nodularin is a pentapeptide, structurally similar to microcystins [3] and [4] (**Fig. 1**). Toxicity of cyclic peptides is associated to the presence of the characteristic amino acid Adda (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-dienoic acid) capable of inhibiting protein phosphatases 1 and 2A, which have a vital role in cell control and intracellular structure [5].

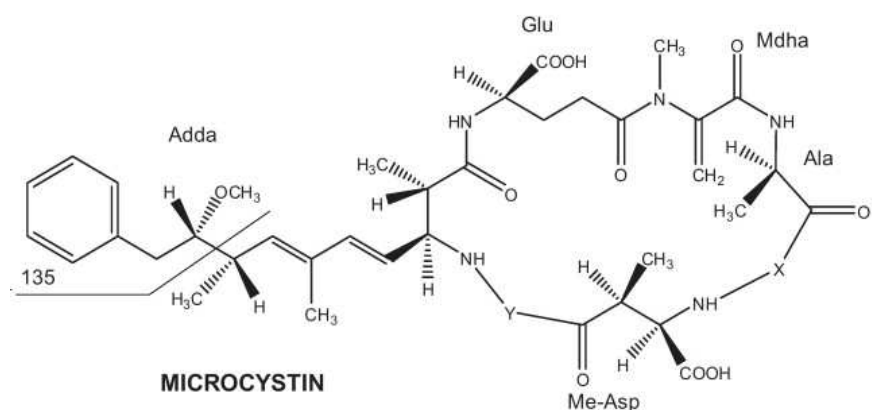
The proliferation of cyanobacterial blooms in raw waters utilized as drinking water source is a problem for human health [4]. The exposition to contaminated waters can result in several intoxication cases as it was reported in Caruaru (Brazil) where 52 patients died after receiving renal dialysis treatment with microcystins contaminated water [6] and [7].

In order to protect human health, in 1998, the World Health Organization (WHO) set a guideline value of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ for total microcystin-LR (free plus cell-bound) in drinking water [8]. Nowadays, several countries have adopted this value as it is the case of Spain, where a limit of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ for microcystins was implemented in 2003 [9]. The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) has proposed microcystin-LR to be included on a new list of contaminant candidate list (CCLs) [10]. To ensure drinking water safety, selective, sensitive and reliable quantitative analytical methods are required for cyanotoxins analysis.

Several methods for microcystins determination can be found in the literature, some of them based on bioassay detection such as protein phosphatase inhibition assays (PPIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [11] and [12]. Nevertheless, HPLC combined with different detectors, such as UV and MS, are the most common instrumental analytical tools for the determination of microcystins. Although HPLC is an adequate tool to separate specific toxins, UV detection cannot reach the sensitivity and the selectivity achieved by LC–

MS even with extensive sample preparation [13] and [14]. LC-MS under selected ion monitoring (SIM) [15] or even better LC-MS/MS under selected reaction monitoring (SRM) [14],[16-19], have been chosen nowadays as the preferred technique for microcystins analysis. However, despite the improvements in sensitivity and selectivity obtained when using LC-MS, it is common to find some problems due to the low concentration level required by guidelines ($1 \mu\text{g L}^{-1}$). Thus, different methodologies have been proposed to enhance sensitivity, such as large volume injection up to (100 μL) [16] or the use of solid phase extraction (SPE) for preconcentration. Sample volumes between 10 and 100 mL are typically pre-concentrated in order to reach LODs of few ng L^{-1} [14], [18] and [19]. Considering the reduction in analysis time offered by UHPLC technology, sample preparation using SPE becomes the limiting step in terms of total analysis time. A feasible alternative is the on-line automation of SPE pre-concentration. On-line-pre-concentration presents several advantages compared to conventional off-line SPE, as the reduction in time and organic solvent consumption, as well as an important minimization of sample manipulation and sample size. This methodology has been satisfactorily applied in several fields, such as pesticides [20] and [21], pharmaceuticals [21-24] and oestrogen [25] determination in environmental and waste water samples.

The aim of this work is to develop an analytical strategy for the determination of microcystins LR, RR, YR, LF, LY, LW and nodularin in surface and drinking water, using on-line SPE-UHPLC-(ESI)-MS/MS with triple quadrupole (QqQ) mass analysers for an accurate and sensitive quantification, and confident identification of these analytes. The use of on-line SPE-UHPLC in combination of MS/MS is innovative in the field of microcystins and it is expected to notably improve the method performance, allowing the efficient determination at concentration levels as low as few ng L^{-1} , with minimum sample manipulation.



	X	Y
MICROCYSTIN-LR	LEUCINE	ARGININE
MICROCYSTIN-RR	ARGININE	ARGININE
MICROCYSTIN-YR	TYROSINE	ARGININE
MICROCYSTIN-LY	LEUCINE	TYROSINE
MICROCYSTIN-LW	LEUCINE	TRYPTOPHAN
MICROCYSTIN-LF	LEUCINE	PHENYLALANINE

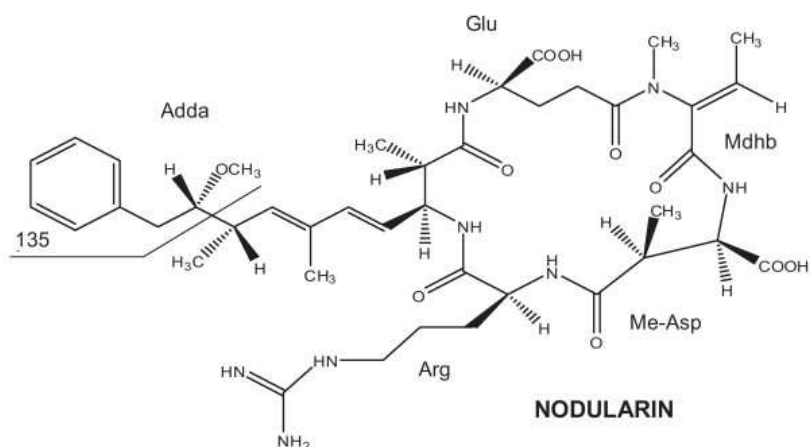


Fig. 1. Chemical structure of microcystins and nodularin. Adda (3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,6,8-trimethyldeca-4,6-dienoic acid); Glu (iso-glutamic acid); Mdha (methyl-dehydro-alanine); Ala (alanine); Me-Asp (methyl aspartic acid); Mdhb (methyl-dehydro-butyryne); Arg (arginine).

2. Experimental

2.1. Reagents and chemical

Analytical standard solutions of selected microcystins (between 5.3 and 10.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were purchased from Riedel de Haën (Sigma–Aldrich, Seelze, Germany). Nodularin (99%) was purchased from Sigma (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).

HPLC-grade water was obtained from distilled water passed through a Milli-Q water purification system (Millipore Ltd., Bedford, MA, USA). HPLC-grade acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). Formic acid (HCOOH) (>98%) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland).

Individual stock solutions were prepared in methanol (1 mg L⁻¹). A mixed standard solution of 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ was obtained mixing 1 mL of individual stock solutions and diluting to 10 mL with water. Aqueous dilutions of the 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ mixed standard solution were used as standard solutions for the preparation of calibration curves and for spiking samples. Stock standard solutions were stored in a freezer at -20 °C, whereas mixed standard solutions were stored in a fridge at 4 °C.

2.2. On-line SPE–UHPLC–MS/MS set-up

Determination was carried out in selected reaction monitoring (SRM) using a triple quadrupole mass spectrometer (TQD™, Waters Micromass, Manchester, UK) with an orthogonal Z-spray-electrospray interface under optimized condition shown in **Table 1**. Drying as well as nebulizing gas was nitrogen obtained from pressurized air in a N₂ LC–MS (Claind, Teknokroma, Barcelona, Spain). The gas flow was set to 800 L h⁻¹. For operation in MS/MS mode, collision gas was argon (99.995%, Praxair, Madrid, Spain) with a pressure of approximately 4 × 10⁻³ mbar in the collision cell. Experiments were performed in positive

ionization mode, applying a capillary voltage of 3.5 kV. The desolvation gas temperature was set to 500 °C and the source temperature to 120 °C. Temperature column was set to 40 °C. Dwell times of 25 ms per transition were chosen. TargetLynx software (MassLynx v 4.1, Waters, Manchester, UK) was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and samples.

The triple quadrupole mass spectrometer was interfaced to a UHPLC system consisting on three modules: an Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) binary pump (P-1) used to conditioning and washing the SPE column; an Acquity UPLC (Waters, Mildford, MA, USA) binary pump (P-2) used for the chromatographic separation; and, a Waters 2777 autosampler (Waters, Manchester, UK) consisting of two switching valves (injection valve (V1) and SPE valve (V2)), a 5 mL syringe and a sample loop of 1 mL used for loading the sample. Sample enrichment was carried out using an Oasis Hydrophilic-Lypophilic Balance (HLB) on-line column (C1) (25 µm, 2.1 mm × 20 mm; Waters). LC separation was performed using an Acquity UPLC BEH C18 analytical column (C2) (1.7 µm particle size, 2.1 mm × 50 mm; Waters). Mobile phases for P-1 were H₂O (A) and ACN (B). The gradient used in the P-1 changed as follows: 0 min, 0% B; 2.5 min, 0% B; 2.6 min, 100% B; 4.5 min, 100% B; 4.6 min, 0% B; 6.5 min, 0% B. Mobile phases for P-2 were a time-programmed gradient using water (A') and ACN (B'), both with 0.025% of HCOOH. The percentage of organic modifier (B') was linearly changed as follows: 0 min, 5% B'; 1.5 min, 5% B'; 2.5 min, 25% B'; 3 min, 25% B'; 3.5 min, 95% B'; 6 min, 95% B'; 6.1 min, 5% B'.

Standard solutions used for calibration curves were also pre-concentrated by the on-line SPE system using the same procedure as described above.

Table 1. MS/MS optimized conditions using positive electrospray ionization (ESI+) source.

Compound	Cone voltage (V)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Q/q ratio
Microcystin-LR	80	995.2 [M+H] ⁺	135.0 (Q)	70	
			106.9 (q1)	70	3.2
			85.9 (q2)	80	5.0
Microcystin-RR	40	519.6 [M+2H] ²⁺	135.0 (Q)	30	
			103.0 (q1)	70	1.8
			69.9 (q2)	70	2.4
Microcystin-YR	90	1045.2 [M+H] ⁺	135.0 (Q)	80	
			213.0 (q1)	60	3.8
			106.8 (q2)	80	4.6
Microcystin-LY	70	1002.5 [M+H] ⁺	135.0 (Q)	70	
			127.0 (q1)	80	1.9
			107.0 (q2)	100	2.0
Microcystin-LW	100	1025.5 [M+H] ⁺	135.0 (Q)	60	
			127.0 (q1)	90	1.9
			213.0 (q2)	50	2.3
Microcystin-LF	90	986.5 [M+H] ⁺	135.0 (Q)	90	
			107.0 (q1)	90	1.2
			213.0 (q2)	40	1.8
Nodularin	60	825.5 [M+H] ⁺	135.0 (Q)	60	
			103.0 (q1)	100	2.0
			107.0 (q2)	100	5.6

2.3. Validation study

Calibration curves were obtained by analysing standard solutions in duplicate at seven concentration levels between 0.025 and 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ and subjected to the overall on-line procedure. Linearity was assumed satisfactory if the r^2 value was higher than 0.99.

Method accuracy and precision were evaluated by recovery experiments (in quintuplicate) using two blank samples (surface and drinking water) spiked at three concentration levels each (0.1, 0.25 and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$). Accuracy was considered satisfactory if recoveries were in the range 70–120%, and precision was acceptable when relative standard deviations (RSDs) were lower than 15%. Blank samples were also analysed to test the specificity of the method.

The limit of quantification (LOQ) was estimated for a signal-to-noise (S/N) ratio equal to 10 from the chromatograms of the samples spiked at the lowest validated level, while the limit of detection (LOD) was calculated for S/N = 3 from the same chromatograms.

2.4. Confirmation

Confirmation of the identity of positive findings was carried out by calculating the peak area ratios between the quantitation (Q) and confirmation ($q1$ and $q2$) transitions, and by comparison with the ion-ratio for reference standards. The findings were considered as positive when the sample ion ratio was within the maximum deviation established by 657/2002/EC [26]. In addition, the retention time deviation should be lower than $\pm 2.5\%$ when compared with the retention time of reference standards.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of MS/MS conditions

Full scan mass spectra and product ion scan mass spectra of selected toxins were obtained by chromatography of individual stock solutions of 1 mg L^{-1} in methanol:water 50:50. Although some of the studied presented signal under both ionization modes, all analytes showed more abundant ionization in positive ion mode, being $[\text{M}+\text{H}]^+$ the most abundant ion. The only exception was microcystin RR, which showed a double charged ion $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, characteristic of the presence of two arginine groups.

Microcystins and nodularin are cyclic peptides containing several amino acids. As it can be seen in **Fig. 1**, some amino acids moieties are common in all these toxins. Fragmentation of microcystins and nodularin presented a common product ion at m/z 135, corresponding to the cleavage at the methoxy group on the Adda moiety (**Fig. 2**). This fragment $[\text{PheCH}_2\text{CHOCH}_3]^+$ of the Adda moiety was the most abundant product ion. Although the acquisition of two SRM transitions is commonly used for compound identity confirmation, some drawbacks have been reported using this approach [27] and [28]. Sharing one of the transitions selected (in nominal mass) by unknown sample compounds is more common than expected and this can complicate the compliance of Q/q ratios. Therefore, in this work, three SRM transitions have been acquired in order to increase the confidence in the confirmation process. The use of non-specific transitions (due for example loss of water, CO_2 , etc.) was avoided. Besides, the selection of product ions for confirmation with similar abundance than those selected for quantification was favoured to facilitate the confirmation of the identity at low concentrations. The mass spectrometry parameters selected, as precursor and product ions, cone voltage, collision energy and Q/q ratios for each compound are summarized in **Table 1**.

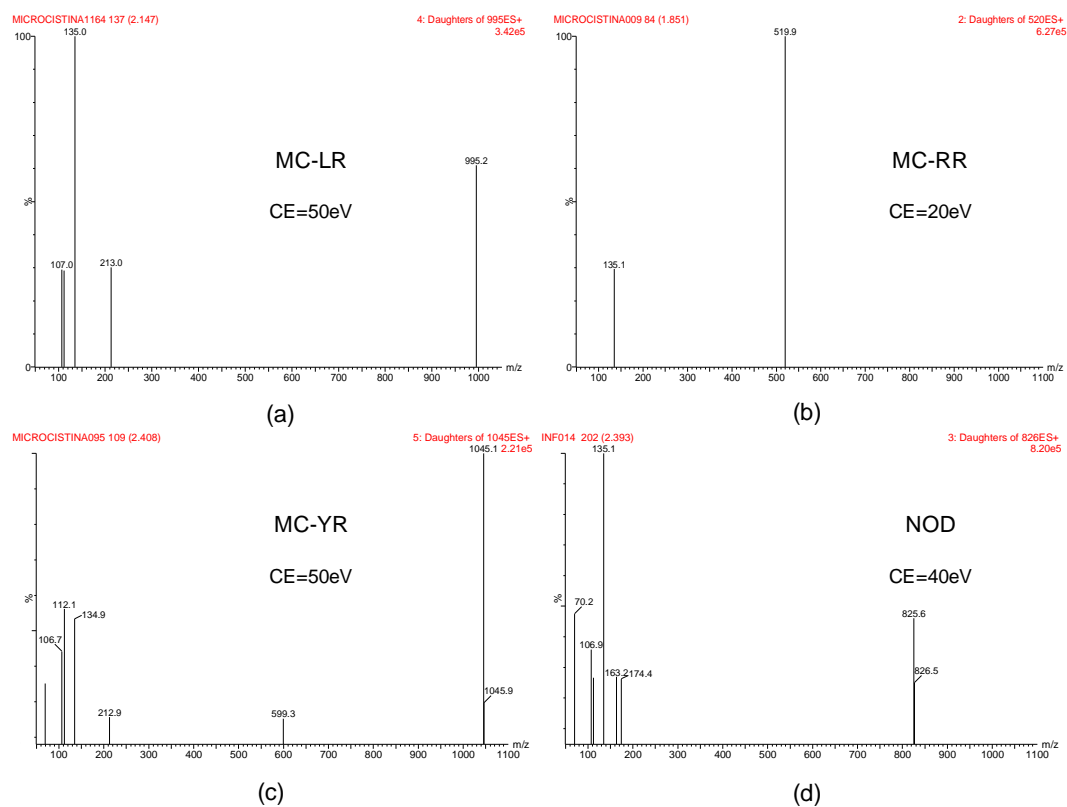


Fig. 2. Product ion spectra of (a) MC-LR, (b) MC-RR, (c) MC-YR and, (d) NOD (CE: collision energy).

3.2. SPE-UHPLC optimization

Automation of SPE presents several advantages in comparison with the off-line process such as reduction of sample manipulation, sample size and organic solvent consumption together with an important reduction in analysis time. As a consequence of the benefits obtained with on-line SPE combined with the lower chromatographic run time offered by UHPLC, the on-line SPE-UHPLC approach led to overall analysis time of a few minutes.

For pre-concentration, a polymeric SPE column (Oasis HLB) was selected due to its capability for retaining a wide range of compounds with different polarity. The suitability of

Oasis HLB cartridges for microcystins off-line SPE enrichment has been already reported in the literature [18], [19] and [29].

The injection volume was set at 1 mL, being enough to achieve the desired concentration levels. So, keeping the injection volume as low as possible while reaching the sensitivity required, minimized the run time per sample and, moreover, it reduced potential breakthrough losses in the SPE column during sample loading.

A mobile phase H₂O:ACN was used in the binary pump P-1. Water was used to transfer the sample from the loop to the SPE column, as well as to wash the sample loop and the cartridge. As soon as the analytes were back-flushed transferred to the chromatographic column, P-1 was responsible of the SPE column cleaning, firstly with acetonitrile and afterwards with H₂O for conditioning the cartridge for the next injection. Cleaning and reconstitution of SPE column were made at the same time then the chromatographic process was running in a second binary pump (P-2) in order to minimize analysis time.

For the chromatographic separation P-2 was used and an UPLC BEH C18 column was selected with different mobile phases being tested. Although the use of H₂O:ACN gradient without modifiers resulted as the most suitable for some compounds in terms of sensitivity, the results were not satisfactory for MC-LF, MC-LW and MC-LY, which presented poor chromatographic peak shape. Despite producing a slight decrease in sensitivity, the addition of small percentage of HCOOH improved the peak shape of all compounds. Finally, after testing different percentages (0.01%, 0.025%, 0.05% and 0.1%), 0.025% HCOOH in both solvents was selected as a compromise between peak shape and sensitivity. **Fig. 3** shows the chromatograms for standards of selected compounds at 1 µg L⁻¹ obtained before (a) and after (b) adding formic acid in the mobile phase.

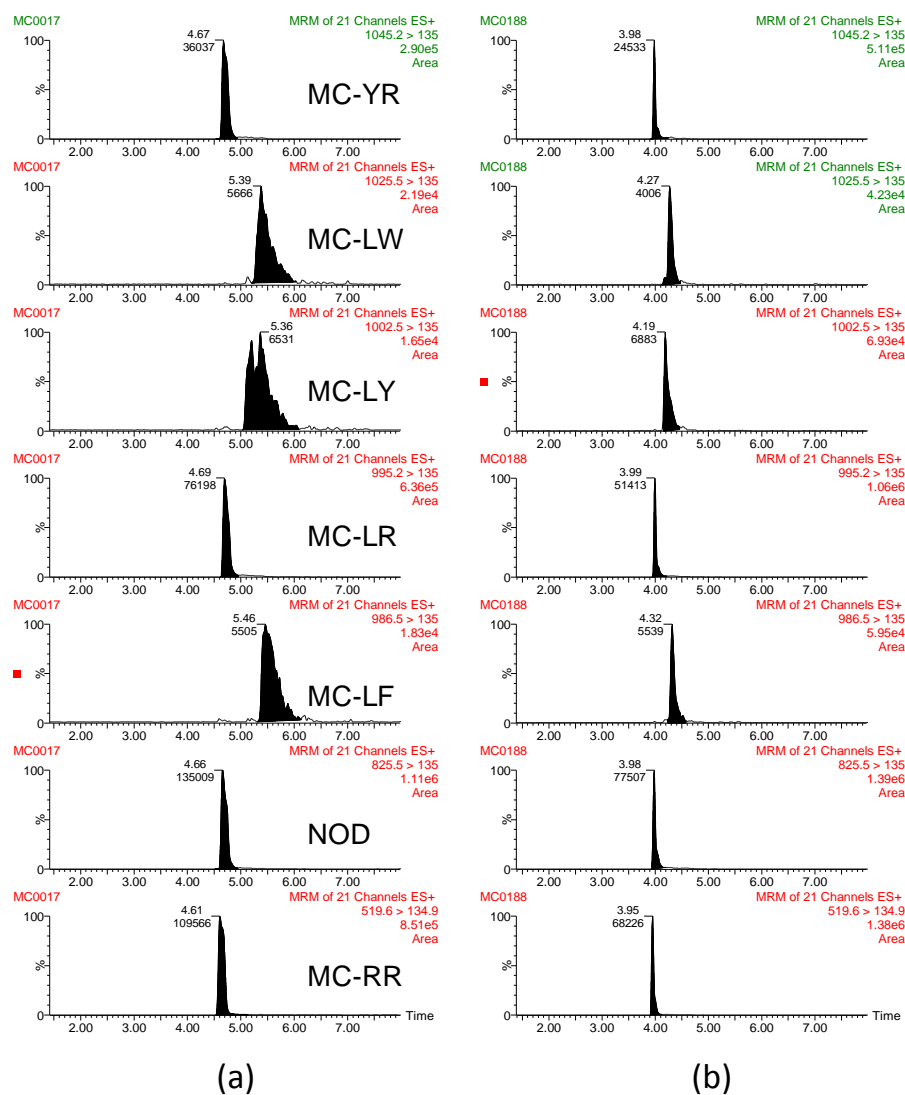


Fig. 3. SPE-UHPLC-MS/MS chromatograms for selected compounds at $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Effect of formic acid in the mobile phase (ACN:H₂O gradient): (a) without HCOOH and (b) with 0.025% HCOOH.

3.3. Matrix effects

Matrix effects resulting from the presence of inorganic salts and other matrix components are commonly present in electrospray analysis, resulting in ionization suppression or, less frequently, in enhancement of the signal. To evaluate possible matrix effects, matrix-matched standard solutions were injected and compared with standards in solvent. The results showed a strong signal suppression in microcystins ionization, obtaining a signal reduction of up to 90% for some microcystins in the surface waters tested. This problem was not observed when a small percentage of HCOOH (0.025%) was added to the mobile phase. This change of pH towards acidic values seemed to avoid the coelution of sample interferences responsible of matrix effects, making external calibration with standards in solvent feasible for microcystins quantification.

Although working at acid pH matrix effects seemed not to compromise a correct quantification, we considered the possibility of using internal standards to prevent uncontrolled matrix effects resulting from the variability between different water matrices. The ideal and simplest way is the use of an isotopically labelled analyte for each compound. However, in this case this approach was not feasible due to the lack of commercial isotopically labelled compounds, making necessary the choice of an analogous compound with similar behaviour to the analytes. The use of NOD was proposed as internal standard due to its similar structure to microcystins as internal standard [30] and [31]. This toxin was considered as a brackish-water cyanobacterial toxin not present in freshwater. However, after testing this approach, the use of this analyte was dismissed as no improvements in recovery were observed. Furthermore, a recent publication based on the study of toxic algal blooms has reported the presence of NOD in freshwater samples [32]. Obviously this fact indicates that NOD cannot be used as IS, but should be included in the list of target contaminants under control.

3.4. Method validation

Precision and accuracy of the method were evaluated in surface and drinking water spiked at 0.1, 0.25, and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (in quintuplicate). As **Table 2** shows, recoveries were satisfactory (between 70% and 120%) for almost all compounds at the three fortification levels assayed, although three microcystins (MC-LY, MC-LW and MC-LF) could not be validated at the lowest concentration tested.

Good precision, with relative standard deviations (RSDs) lower than 15% was also obtained. **Fig. 4** shows selected chromatograms for microcystin standards (a), a surface water (b) and a drinking water (c), both spiked at the lowest validated concentration (0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for MC-LR, MC-RR, MC-YR and NOD, and, 0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$ for MC-LY, MC-LW and MC-LF).

The method was found to be specific as no relevant signals were observed in the blank samples used for recovery experiments at analyte retention times for any of the transitions monitored.

Table 2. Method validation. Recovery (%) and relative standard deviation RSD (% in brackets) for five replicates. LOQ and LOD of the method.

Spiked conc.	Surface water			Drinking water			LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
	1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		
MC-LR	97 (6)	103 (7)	102 (5)	100 (5)	113 (11)	101 (9)	0.005	0.002
MC-RR	72 (6)	83 (7)	71 (13)	82 (5)	78 (14)	100 (5)	0.005	0.002
MC-YR	114 (5)	105 (7)	102 (13)	107 (6)	112 (5)	116 (6)	0.006	0.002
MC-LY	79 (4)	89 (6)	-	106 (6)	113 (5)	-	0.125	0.040
MC-LW	79 (14)	87 (11)	-	93 (8)	95 (14)	-	0.120	0.036
MC-LF	73 (9)	100 (7)	-	89 (11)	96 (10)	-	0.110	0.033
Nodularin	76 (4)	85 (4)	76 (8)	107 (3)	80 (12)	89 (9)	0.002	0.0005

LODs and LOQs were calculated from the chromatograms of samples spiked at the lowest level validated. As it can be seen in **Table 2**, concentrations as low as $0.002 \mu\text{g L}^{-1}$ could be detected for four of the analytes under study ($0.0005 \mu\text{g L}^{-1}$ for NOD), which could be quantified at levels even below $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$. The three remaining microcystins (MC-LY, MC-LF, MC-LW) could be detected and quantified at concentrations around 0.04 and $0.12 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

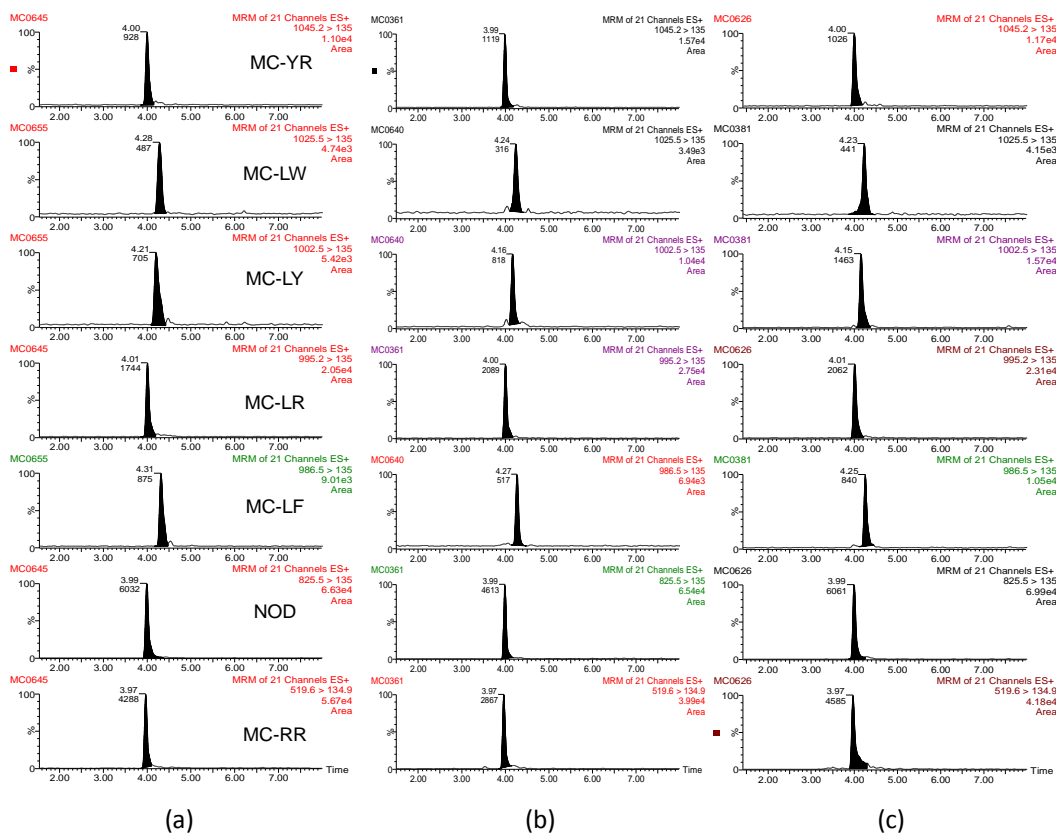


Fig. 4. SPE-UHPLC-MS/MS chromatograms for selected compounds: (a) standard mixture; (b) surface water and (c) drinking water. Both (b) and (c) were spiked at the lowest level validated ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ for NOD, MC-LR, MC-RR, MC-LY; $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$ for MC-LW, MC-LY, MC-LF).

3.5. Application to samples

The methodology developed in this work was applied to the analysis of 5 drinking waters and 11 surface waters collected from reservoirs and lakes located in the Castellón province, Spain. The waters were filtrated through a nylon syringe filter (0.22 μm) before being directly injected into the automated SPE–UHPLC–MS/MS system. A calibration curve was injected, at the beginning and at the end of each batch of samples. Two blank waters (surface or drinking water) spiked at the intermediate validated level (0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$) were also analysed together with the samples and were used as quality controls (QCs).

Only a positive of microcystin LR was found in a surface water sample, at a concentration of 0.140 $\mu\text{g L}^{-1}$. Fig. 5 shows the results for the surface water where the MC-LR was detected. The identity of this microcystin was confirmed by the compliance of Q/q ratios with deviation within the established tolerance [26].

In addition, the retention time for sample and reference standard was identical. This positive finding on microcystin LR did not exceed the maximum permitted concentration of microcystins (1 $\mu\text{g L}^{-1}$) established by present regulations. In relation to QCs results, all recoveries were within the range accepted (i.e. 60–140).

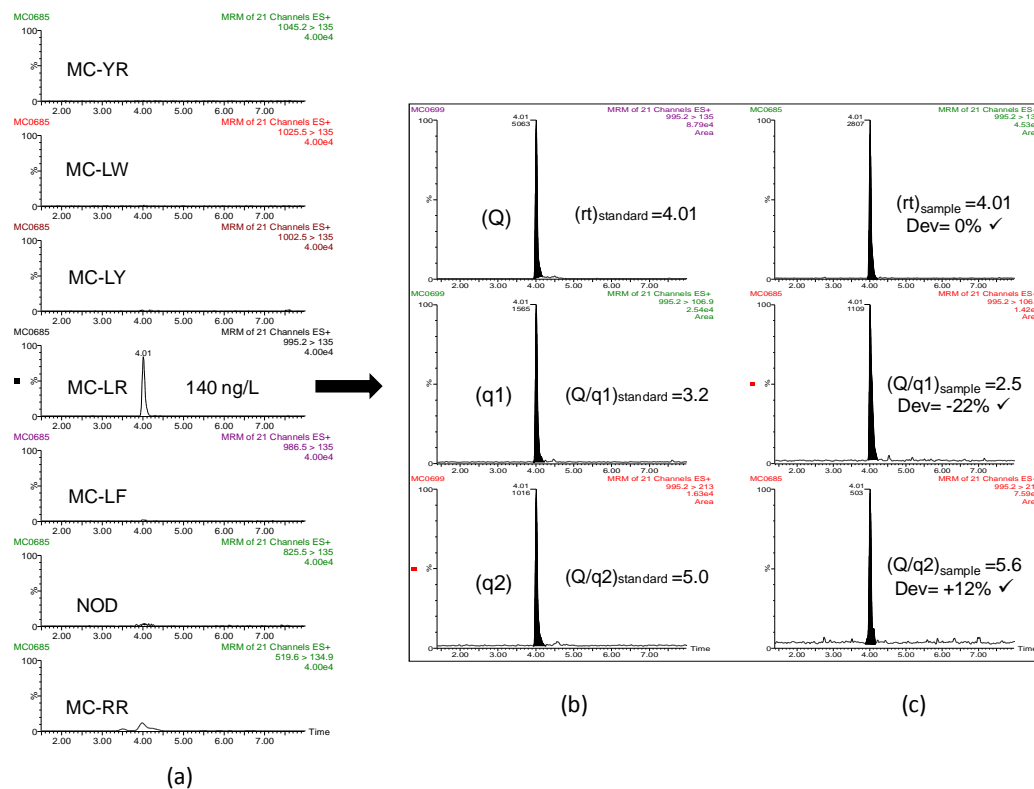


Fig. 5. Positive sample confirmation. SPE–UHPLC–MS/MS chromatograms corresponding to: (a) surface water sample from a Castellón reservoir; (b) selected SRM transitions for microcystin-LR in a 0.25 µg L⁻¹ reference standard; (c) selected SRM transitions for microcystin-LR in the positive surface water sample. Notice that retention time and Q/q ratio deviations are within the tolerances established by 657/2002/EC [26].

4. Conclusions

Rapid and highly sensitive analytical methodology, based on the use of on-line SPE–UHPLC–MS/MS with triple quadrupole analyser has been developed for the determination of microcystins and nodularin in waters. The method allows the simultaneous determination of all selected analytes at concentrations below the $1 \mu\text{g L}^{-1}$, the maximum level established for microcystin LR by Spanish legislation and recommended by WHO guidelines.

On-line SPE allows the automation of the procedure, making the overall analytical process faster than the conventional and more widely used off-line SPE, also minimizing the sample manipulation. Other advantages of the on-line approach are the reduction of costs, in terms of the volume of solvents and disposable SPE cartridges.

The method has been validated in surface and drinking waters at three concentration levels obtaining satisfactory accuracy and precision. These results support its applicability for monitoring microcystins and nodularin in surface and drinking waters at sub-ppb levels.

Application of the developed methodology to the analysis of surface and drinking waters revealed a positive finding for microcystin-LR in surface water at $0.140 \mu\text{g L}^{-1}$. Unequivocal confirmation of positive findings was assured by the acquisition of three SRM per analyte, and compliance of Q/q ratios and retention time.

Acknowledgements

The Research Institute for Pesticides and Water acknowledges the financial support from the Generalitat Valenciana, as research group of excellence PROMETEO/2009/054. The authors are very grateful to Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using the UPLC-TQD mass spectrometer and Waters Corporation for loaning 2777 Autosampler. E.B. is grateful to University Jaume I for his pre-doctoral grant.

References

- [1] M.E. Van Apeldoorn, H.P. Van Egmond, G.J.A. Speijers, G.J.I. Bakker, *Mol. Nutr. Food Res.*, 51 (2007) 7-60.
- [2] L.N. Sangolkar, S.S. Maske, T. Chakrabarti, *Water Res.*, 40 (2006) 3485-3496.
- [3] T.A.M. Msagati, B.A. Siame, D.D. Shushu, *Aquat. Toxicol.*, 78 (2006) 382-397.
- [4] S. Merel, M. Clément, O. Thomas, *Toxicol.*, 55 (2010) 677-691.
- [5] I.R. Falconer, A.R. Humpage, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2 (2005) 43-50.
- [6] S.M.F.O. Azevedo, W.W. Carmichael, E.M. Jochimsen, K.L. Rinehart, S. Lau, G.R. Shaw, G.K. Eaglesham, *Toxicology*, 181-182 (2002) 441-446.
- [7] M. Yuan, W.W. Carmichael, E.D. Hilborn, *Toxicol.*, 48 (2006) 627-640.
- [8] World Health Organization, Guidelines for Drinking-Water Quality. Second edition, Addendum to Volume 2, Health Criteria and Other Supporting Information, Geneva, 1998.
- [9] BOE Real Decreto 140/2003, BOE no. 45 (2003) 7228-7245.
- [10] S.D. Richardson, T.A. Ternes, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 4616-4648.
- [11] W.W. Carmichael, *J. An. Nat. Toxins*, 7 (1999) 377-385.
- [12] J. McElhiney, L.A. Lawton, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 203 (2005) 219-230.
- [13] M. Barco, J. Rivera, J. Caixach, *J. Chromatogr. A*, 959 (2002) 103-111.
- [14] A. Mekebri, G.J. Blondina, D.B. Crane, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 3147-3155.

- [15] M. Barco, C. Flores, J. Rivera, J. Caixach, *Toxicon*, 44 (2004) 881-886.
- [16] O. Allis, J. Dauphard, B. Hamilton, A.N. Shuilleabhain, M. Lehane, K.J. James, A. Furey, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 3436-3447.
- [17] W. Xu, Q. Chen, T. Zhang, Z. Cai, X. Jia, Q. Xie, Y. Ren, *Anal. Chim. Acta*, 626 (2008) 28-36.
- [18] L. Cong, B. Huang, Q. Chen, B. Lu, J. Zhang, Y. Ren, *Anal. Chim. Acta*, 569 (2006) 157-168.
- [19] J. Wang, X. Pang, F. Ge, Z. Ma, *Toxicon*, 49 (2007) 1120-1128.
- [20] J.M. Marín, J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 1133 (2006) 204-214.
- [21] K. Stoob, H.P. Singer, C.W. Goetz, M. Ruff, S.R. Mueller, *J. Chromatogr. A*, 1097 (2005) 138-147.
- [22] R. López-Serna, S. Pérez, A. Ginebreda, M. Petrović, D. Barceló, *Talanta*, 83 (2010) 410-424.
- [23] O.J. Pozo, C. Guerrero, J.V. Sancho, M. Ibáñez, E. Pitarch, E. Hogendoorn, F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 1103 (2006) 83-93.
- [24] J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, M. Callejón, *Anal. Chim. Acta*, 550 (2005) 116-122.
- [25] A. Salvador, C. Moretton, A. Piram, R. Faure, *J. Chromatogr. A*, 1145 (2007) 102-109.
- [26] Commission Decision 2002/657/EC of August 2002.

- [27] O.J. Pozo, J.V. Sancho, M. Ibáñez, F., Hernández, W.M.A. Niessen, *TrAC - Trend. Anal. Chem.*, 25 (2006) 1030-1042.
- [28] E. Gracia-Lor, J.V. Sancho, F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 622-632.
- [29] T. Triantis, K. Tsimeli, T. Kaloudis, N. Thanassoulas, E. Lytras, A. Hiskia, *Toxicon*, 55 (2010) 979-989.
- [30] K.L. Howard, G.L. Boyer, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 5980-5986.
- [31] C. Flores, J. Rivera, J. Caixach, 4th International Workshop on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for screening and trace level quantitation in environmental and food samples, February 2008, Barcelona, Spain.
- [32] R. Akcaalan, H. Mazur-Marzec, A. Zalewska, M. Albay, *Harmful Algae*, 8 (2009) 273-278.

3.2.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

El objetivo de esta investigación era la determinación de toxinas cianobacterianas (microcistinas y nodularinas) en muestras de aguas potencialmente expuestas a ser contaminadas. Las dos matrices estudiadas fueron: agua superficial y agua de consumo.

En cuanto a la selección de las toxinas objeto de análisis, se hizo un especial hincapié en determinar el número máximo de toxinas posible, seleccionando todas aquellas de las que se pudo obtener su correspondiente patrón analítico de referencia.

Una vez disponibles los patrones analíticos (6 microcistinas y nodularina), se optimizaron las condiciones espectrométricas mediante cromatografía de los patrones

individuales de cada compuesto. Se adquirieron los espectros en modo *full scan* y *MS/MS* de cada uno de ellos, recopilándose información sobre el mayor número posible de iones producto, optimizando el voltaje y energía de colisión. Se observó que era necesario el uso de voltajes de cono bastante elevados (80-110 V) para la introducción de los iones en el sistema espectrométrico, debido a su elevado peso molecular. Se empleó la transición más sensible para la cuantificación y 2 transiciones adicionales para la confirmación de los analitos. Los iones precursores seleccionados fueron en todos los casos el $[M+H]^+$, a excepción de la microcistina-RR que presentó un abundante ión precursor doblemente cargado $[M+2H]^{2+}$. Todos los compuestos estudiados presentaron como ion producto más abundante el ion con relación masa/carga (m/z) 135, correspondiente a un fragmento del aminoácido Adda. Se descartó, en lo posible, el uso de transiciones poco específicas, como son aquellas debidas a pérdidas de agua $[M-H_2O]$ o CO_2 $[M-CO_2]$. Se seleccionaron tres transiciones SRM por compuesto con el objetivo de asegurar una detección fiable. El objetivo de seleccionar una transición SRM adicional a las dos transiciones recomendadas (European Commission, 2011), se realizó con el fin de aumentar la confianza del método en lo referente a la identificación de los resultados positivos, debido a la similitud estructural de los compuestos estudiados.

Una vez definidas las condiciones espectrométricas, se estudió la cromatografía. Así, en el proceso de selección de la fase móvil, se probó el uso de diferentes combinaciones de agua, metanol y acetonitrilo. Se comprobó que el uso de agua y acetonitrilo favorecía la obtención de picos con mayor relación S/N que con el uso de agua y metanol. La forma de pico sin embargo era semejante. La adición de modificadores como ácido fórmico y acetato amónico se descartó ya que se observó una disminución de la señal de los picos cromatográficos. La columna utilizada fue una UPLC C₁₈ BEH (Waters), (2.1x50mm, 1.7 μ m), la cual incorpora ligandos trifuncionales donde las cadenas hidrocarbonadas C₁₈ se enlazan a un sustrato híbrido de sílice con puentes de etileno.

La inyección directa de muestras de aguas fortificadas (aguas superficiales y consumo) al sistema cromatográfico demostró que estos compuestos se veían sometidos a marcados efectos matriz de supresión iónica en el proceso de ionización. Al comparar las respuestas de las muestras fortificadas con la de los patrones en agua HPLC se observaron valores alrededor del 10% respecto a los valores esperados. Estas bajas “recuperaciones” se atribuyeron a procesos de supresión iónica. Con el fin de minimizar el efecto matriz, se añadió una pequeña cantidad de ácido fórmico a la fase móvil. Así, con el cambio del pH de la fase móvil se consiguió un cambio en la cromatografía, obteniendo picos cromatográficos más estrechos, aunque con menor sensibilidad que cuando se realizó la cromatografía sin aditivos en la fase móvil. Sin embargo, este cambio en la retención cromatográfica permitió que los compuestos estudiados no se vieran afectados por coeluciones con interferentes de la matriz y de este modo obtener recuperaciones aceptables para todos los compuestos estudiados.

Una vez corregido el efecto matriz, se estudió la sensibilidad del método por inyección directa del agua. Los resultados mostraron que para algunas compuestos (microcistina-LR, microcistina YR, microcistina RR y Nodularina), se podía alcanzar un LOQ de 0.5 µg/L mediante la inyección de 20 µL. Sin embargo, para otros compuestos como la microcistina-LY, el LOQ alcanzado por inyección directa era de 5 µg/L y en el caso de las microcistinas-LF y LW, 10 µg/L. Dado que el objetivo era alcanzar un LOQ inferior a 1 µg/L para todos los compuestos estudiados, se planteó utilizar una técnica de pre-concentración de los analitos.

Con el fin de preconcentrar los analitos, se seleccionó la técnica SPE “*on-line*” la cual mediante el acoplamiento al sistema UHPLC, permitió detectar los analitos a concentraciones inferiores a 1 µg/L de un modo totalmente automatizado con la inyección de tan solo 1 mL de muestra. De este modo, se evitó la utilización de cartuchos desechables de SPE, se redujo considerablemente el tratamiento de muestra y se minimizó el consumo de disolventes. Además, la automatización del proceso permitió

aumentar el “*sample throughput*”, es decir, el número de muestras que pueden ser analizadas por día.

Mediante el acoplamiento SPE-UHPLC-MS/MS se consiguió validar una metodología analítica que, con la inyección de tan solo 1 mL de muestra, mostró la sensibilidad suficiente para determinar los analitos seleccionados a concentraciones de 0.25 y 1 µg/L, con precisión y exactitud satisfactoria de un modo totalmente automatizado en tan solo 8 minutos. Para otros analitos, como es el caso de MC-RR, MC-LR, MC-YR y NOD, la metodología pudo ser validada para un nivel adicional (0.1µg/L) cumpliendo los parámetros de validación establecidos.

La metodología desarrollada fue aplicada al análisis de muestras de aguas de consumo y superficiales de la provincia de Castellón. Entre un total de 16 muestras (5 de aguas de consumo y 11 muestras de agua superficial), únicamente se detectó MC-LR a una concentración de 140 ng/L en una muestra de agua superficial. En la actualidad existen diversas publicaciones en las que se hace referencia a la presencia de este tipo de contaminantes en aguas españolas, siendo común la detección de microcistinas a concentraciones del orden de sub-ppb a ppb en muestras de aguas de lagos y embalses (Barco, Flores, Rivera & Caixach, 2004, Moreno, Repetto, Carballal, Gago & Cameán, 2005, Romo, Fernández, Ouahid & Barón-Sola, 2012)

**3.3. DETERMINACIÓN DE TOXINAS MARINAS EN
MOLUSCOS BIVALVOS MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE PARES IÓNICOS
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN
TÁNDEM. ESTUDIO DE DEPURACIÓN DEL ÁCIDO
DOMOICO**

3.3.1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos conocidos como toxinas marinas son metabolitos secundarios producidos por algas unicelulares (dinoflagelados y diatomeas) normalmente bajo ciertas condiciones ambientales que favorecen la proliferación de grandes densidades de microalgas. La ingesta de estas algas por parte de organismos filtradores, zooplancton y peces herbívoros es el vector de transmisión de estos tóxicos al ser humano, bien por su ingesta directa o mediante su transferencia a niveles tróficos superiores (Van Dolah, 2000).

Las toxinas marinas presentan una elevada diversidad estructural y funcional por lo que han sido clasificadas según los síntomas que causan al ser humano. Como ya se ha comentado anteriormente, se distinguen 5 grupos conocidos como: ASP (toxinas amnésicas), PSP (toxinas paralizantes), DSP (toxinas diarreicas), NSP (toxinas neurotóxicas) y CFP (intoxicación por consumo de pescado con ciguatera) (Botana L.M., 2000). En cada grupo se encuentran diferentes toxinas marinas las cuales suelen presentar estructuras químicas similares. Así, dentro de las toxinas ASP se distingue el ácido

domoico (DA) y sus isómeros, que presentan una relativa elevada polaridad e hidrofilia. Las toxinas PSP son también compuestos de elevada polaridad. Este grupo está compuesto por la saxitoxina (STX) y sus compuestos análogos, de los cuales se han descrito 57 variantes. Entre ellos la saxitoxina, la neosaxitoxina y la gonyautoxina 1 son los compuestos con mayor toxicidad. El grupo de las toxinas diarreicas está formado por compuestos poliéteres, tanto de cadena lineal como cíclicos y se caracterizan por presentar una elevada lipofilia. Entre ellos destacan por su toxicidad el ácido ocadaico (OA) y las dinofisistoxinas, aunque otros tóxicos también están incluidos en este grupo como las yesotoxinas y las pectenotoxinas. Las toxinas neurotóxicas están formadas por el grupo de las brevetoxinas, las cuales son compuestos lipofílicos al igual que los compuestos que conforman el grupo de las DSP. Por último, la ciguatera es una toxina lipofílica que se encuentra en pescados de zonas tropicales y subtropicales (Paredes, Rietjens, Vieites & Cabado, 2011).

El continuo descubrimiento de nuevas toxinas y metabolitos hace que algunos de estos compuestos nuevos no encajen en alguno de los grupos anteriormente descritos debido a su estructura química y mecanismo de acción. Entre estos tóxicos se podrían enumerar los azaspirázidos, tetrodotoxinas, iminas cíclicas, palitoxinas,... Por este motivo se está imponiendo una clasificación basada en su polaridad, distinguiéndose 2 grupos, el correspondiente a las de mayor polaridad y las apolares o lipofílicas.

Por lo que respecta a su regulación, la Comisión Europea estableció mediante el Reglamento 853/2004/CE los valores límite de toxinas marinas que podían estar presentes en organismos bivalvos para poder ser comercializados (**ver Tabla 1**) (Reglamento 2004/853/CE). Concentraciones superiores a estos niveles supondrían el cierre de la zona al marisqueo, con la necesidad de demostrar la depuración de dichos contaminantes en los moluscos previa su posterior comercialización.

Tabla 1. Límites máximos de toxinas marinas en moluscos bivalvos para poder ser comercializados según el Reglamento 853/2004/CE

Grupo Toxinas	Límites EU en moluscos bivalvos
Toxinas DSP	160 µg OA eq./kg
Toxinas PSP	800 µg PSP/Kg
Toxinas ASP	20 mg DA/Kg
Azaspiracidos	160 µg AZA/kg
Pectenotoxinas	160 µg OA eq./kg
Yesotoxinas	1 mg YTX/Kg

Adicionalmente, en el Reglamento 2074/2005/EC se establecieron los métodos de ensayo para dichas determinaciones. En este reglamento se destacó que se podría utilizar cualquier método reconocido internacionalmente para la detección de toxinas marinas, estableciendo el bioensayo en ratón como método de referencia para la determinación de toxinas PSP y toxina lipofílicas (toxinas DSP, azaspiracidos, pectenotoxinas y yesotoxinas). En el caso del ácido domoico y sus isómeros (toxinas ASP), se estableció que el método de referencia sería la cromatografía de alta resolución (sin especificar el sistema de detección) (Reglamento 2005/2074/CE).

El comité de expertos de EFSA en respuesta a la petición de la comisión Europea referente a dicha regulación sugirió que los límites establecidos para las toxinas DSP, PSP, ASP y azaspirácidos no eran suficientemente bajos para asegurar una suficiente protección del consumidor. Asimismo, se puso en duda el método del bioensayo en ratones tanto desde un punto de vista ético como analítico debido a la elevada

variabilidad en los resultados, insuficiente capacidad de detección y especificidad limitada. Por este motivo se propuso la sustitución del método del bioensayo por la utilización de métodos multi-toxina por LC-MS/MS para la detección de toxinas lipofílicas debido a su elevado potencial, tanto desde el punto de vista de la especificidad como en los límites de detección (EFSA, 2009).

En el año 2011, tras la propuesta de EFSA a la Comisión Europea se estableció mediante el Reglamento 15/2011/CE la sustitución del método del bioensayo en ratón por la LC-MS/MS como técnica de referencia para la determinación de toxinas lipofílicas en moluscos, permitiendo la utilización de ambas técnicas hasta final del año 2014 (Reglamento 2011/15/CE).

A pesar de haber sido el bioensayo en ratón la metodología de referencia para la detección de toxinas marinas hasta el año 2011, se ha observado en la última década un aumento de los métodos basados en HPLC para la determinación de dichos tóxicos. La separación mediante columnas de fase reversa ha sido la opción preferida para la determinación mediante LC-MS/MS tanto del ácido domoico (toxinas ASP) como de toxinas lipofílicas (Fux, McMillan, Bire & Hess, 2007, García-Altare, Diogène & de la Iglesia, 2013, Gerssen, Van Olst, Mulder & De Boer, 2010, McNabb, Selwood & Holland, 2005, Ciminiello et al., 2006). Sin embargo, para el caso de las toxinas PSPs, debido a su elevada polaridad se han encontrado dificultades para su determinación mediante cromatografía de fase reversa requiriéndose el uso de formadores de pares iónicos que incrementen su retención en la columna cromatográfica (Dahlmann, Budakowski & Luckas, 2003, Hashimoto, Nishio, Nishibori, Yoshioka & Noguchi, 2002). Otras aproximaciones que se han llevado a cabo para la determinación cromatográfica de estas toxinas ha sido el uso de cromatografía iónica (Jaime, Hummert, Hess & Luckas, 2001). Sin embargo, en los últimos años se ha extendido el uso de columnas basadas en interacción hidrofílica, conocidas como HILIC, las cuales han sido aplicadas al análisis de estos compuestos. (Dell'Aversano, Hess & Quilliam, 2005, Diener, Erler, Christian & Luckas, 2007, Sayfritz, Aasen & Aune, 2008, Turrell, Stobo,

Lacaze, Piletsky & Piletska, 2008). Aunque inicialmente las columnas HILIC utilizadas eran de base Amida, con el objetivo de mejorar la separación cromatográfica se introdujo el uso de columnas HILIC de base “*zwitteriónica*”, las cuales mostraron un mayor potencial para mejorar la resolución de los picos cromatográficos (Christian & Luckas, 2008b).

La gran diversidad de propiedades fisico-químicas de las ficotoxinas marinas ha dificultado la determinación simultánea de toxinas pertenecientes a diferentes grupos. Es por este motivo que este tipo de metodologías son escasas (Dahlmann, Budakowski & Luckas, 2003). Alcanzar una situación de compromiso que permita la detección simultánea de las diferentes toxinas, tanto por lo que respecta a la extracción como su separación cromatográfica, se encuentra alejada de las condiciones idóneas de análisis de cada grupo de toxinas.

Una aproximación para la determinación simultánea de compuestos apolares y compuestos de elevada polaridad o iónicos mediante cromatografía de fase reversa requiere el uso de reactivos formadores de pares iónicos. Esta técnica consiste en la adición de un agente formador del par iónico, es decir, un ion de carga opuesta al analito, de modo que al asociarse a él en medio acuoso la carga global sea neutra y pueda ser retenido en la fase estacionaria como una única especie. Su uso es muy común en compuestos muy ácidos y muy básicos, ofreciendo excelentes resultados para mejorar la eficiencia en la retención del compuesto en la columna C18 (Hernández, Sancho, Pozo, Villaplana, Ibáñez & Grimalt, 2003, Marín, Pozo, Beltrán & Hernández, 2006, Ripollés, Marín, Sancho, López & Hernández, 2011, Sancho, Ibáñez, Grimalt, Pozo & Hernández, 2005). No se recomienda el uso de formadores de par iónico con baja volatilidad cuando se utilicen analizadores de masas ya que estas sales podrían contaminar la fuente de ionización y desestabilizar el proceso de ionización observando una supresión de la señal. Por tanto es recomendable el uso de formadores de par iónico volátiles. En el caso de especies que se encuentran en forma aniónica se recomienda emplear sales de amonio cuaternarias solubles en agua como es el caso del acetato de tetrabutilamonio (TBA). Para

especies en forma catiónica deberá emplearse un ácido volátil, recomendándose el uso de compuestos perfluorados como son el ácido heptafluorobutírico (HFBA) o el ácido tridecafluoroheptanoico (TFHA).

En el **Artículo científico 6** se muestran los resultados del análisis de muestras de vieiras procedentes de un estudio de depuración de toxinas marinas. En el trabajo se utiliza la metodología HPLC-MS/MS para la determinación de la concentración de toxinas marinas, detectándose la presencia de ácido domoico. El estudio de las muestras recogidas a diferentes tiempos desde su contaminación permite establecer la cinética de depuración de las vieiras.

3.3.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 6

Enviado para su publicación en la revista *Aquatic Toxicology*.

N-Acetylcysteine boosts xenobiotic detoxification in shellfish

Peña-Llópis S.^{1,2}, Serrano R.³, Pitarch E.³, Beltrán E.³, Ibáñez M.³, Hernández F.³, Peña J.B.¹

¹Institute of Aquaculture Torre de la Sal (CSIC), E-12595 Ribera de Cabanes (Castellón), Spain.

²Department of Genetics and Complex Diseases, Harvard School of Public Health, 665 Huntington Avenue, I-512, Boston, MA 02115, USA.

³Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, 12071 Castellón, Spain.

Abstract

Water pollution represents a threat of increasing importance to human health. Bivalve mollusks are filter-feeding organisms that can accumulate chemical and microbiological contaminants in their tissues from very low concentrations in the water or sediments. Consumption of contaminated shellfish is one of the main causes of seafood poisoning. Thus, marine bivalves are normally depurated in sterilized seawater for 48 hours to allow the removal of bacteria. However, this depuration time might be insufficient to eliminate chemical contaminants from their tissues. We have developed a novel technology that accelerates up to fourfold the excretion rate of xenobiotics in bivalves by treatment with the antioxidant and glutathione (GSH) pro-drug N-acetylcysteine (NAC) during the depuration period. NAC improved dose-dependently the detoxification of the organophosphate (OP) pesticide fenitrothion in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, diminishing its levels up to nearly a hundred fold compared to conventional depuration, by enhancing glutathione S-transferase (GST) activity and inducing GSH anabolism (GSH synthesis and reduction by glutathione reductase). Notably, this induction in GSH anabolism and GST activity was also observed in uncontaminated bivalves treated with NAC. Since the GSH pathway is involved in the detoxification of many pollutants and biotoxins from harmful algal blooms, we validated this proof of principle in king scallops (*Pecten maximus*) that naturally accumulated the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid. We illustrate here a method that

enhances the elimination of organic contaminants in shellfish, opening new avenues of depuration of marine organisms.

Keywords: N-acetyl-L-cysteine, bivalve molluscs, toxicokinetics, organophosphorus pesticides, toxins, oxidative stress.

1. Introduction

Marine bivalves such as mussels, oysters, clams, cockles, and scallops are filter-feeding organisms that can accumulate chemical and biological (bacteria and viruses) contaminants in their tissues. This can even occur in environments where the water or sediments contain very low concentrations of pollutants. Consumption of shellfish containing methylmercury can cause neurotoxicity whereas polychlorinated biphenyls (PCBs), dioxins, and pesticides can increase the risk of cancer (2003). This is of particular concern to vulnerable people, such as pregnant women, nursing mothers, children, and those with compromised immune systems (2003; Mascarelli, 2013). The consumption of shellfish that have accumulated natural toxins of certain species of dinoflagellates or diatoms from harmful microalgae blooms ('red tides') can result in severe and life-threatening neurological effects, such as amnesic (ASP), neurotoxic (NSP), and paralytic (PSP) shellfish poisoning (Isbister and Kiernan, 2005). In addition, gastrointestinal problems might occur caused by microorganisms or diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins (Isbister and Kiernan, 2005). In Canada there was an outbreak in 1987 of ASP due to the consumption of mussels contaminated with domoic acid (Perl et al., 1990).

Before commercialization, marine bivalves are normally placed in clean and sterilized seawater for one or two days to deplete their possible contamination. However, although bacteria like *Escherichia coli* are completely removed in less than 48 h (Bernard, 1989), many public health hazards, such as algal-derived toxins, virus, and chemicals are not fully eliminated within standard depuration times. When biotoxins are detected, shellfish extraction is forbidden until natural depuration occurs. This requires the closure of harvesting areas for several months, causing enormous economic losses worldwide. Sometimes recurrent toxic blooms emerge before shellfish have been completely depurated, preventing their exploitation for the whole season. Consequently, effective methods for depuration are required.

The Ebro Delta (NE Spain) contains many shellfish farms that are exposed to several pollutants, such as organophosphate (OP) pesticides, organochlorine compounds, and

polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Solé et al., 2000). Consumption of bivalves farmed in bays of the Ebro Delta does not pose a threat to wildlife or to humans, except after aerial applications of OP pesticides in the rice crop fields in summer, being the organothiophosphate insecticide fenitrothion the most extensively used OP compound (Solé et al., 2000). We previously demonstrated the effectiveness of the glutathione (GSH) precursor *N*-acetylcysteine (NAC) in enhancing the recovery (Peña-Llopis et al., 2003b) and survival (Peña-Llopis et al., 2003a) of OP-poisoned fish. NAC is one of the best antioxidants against OP poisoning, because it reacts directly with reactive oxygen species, prevents the induction of pro-inflammatory genes, and is easily deacetylated to L-cysteine, the limiting amino acid for GSH synthesis (Peña-Llopis, 2005). We show here that NAC enhances the depuration of xenobiotics in marine bivalves.

2. Material and Methods

2.1. Exposure of mussels to the OP pesticide fenitrothion

Adult mussels (*Mytilus galloprovincialis*) (length, 45 ± 3 mm; weight, 9 ± 2 g) were obtained from a shellfish farm in the Fangar Bay of the Ebro Delta (Tarragona, Spain). Bivalves were acclimatized for three weeks to laboratory conditions in 150-L fiberglass tanks containing well-aerated seawater drawn from 300 m offshore and filtered through 1- μ m pore size. Water quality parameters were as follows: temperature, 17 ± 1 °C; salinity, 37.5 ± 0.3 g/L; pH, 7.5 ± 0.4 ; dissolved oxygen, 7.6 ± 0.3 mg/L. Mussels were fed a daily diet of the microalga *Tetraselmis suecica*. Acclimation and selection of bivalves for toxicity tests were carried out according to the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) guidelines (1996a).

Accumulation and depuration experiments were performed in agreement with U.S. EPA (1996b) using a factorial design (Supplementary Figure 1). Four hundred and twenty animals were randomly allocated into four 150-L fiberglass tanks containing 125 L of filtered and ultraviolet-sterilized seawater (Wedeco, Madrid, Spain). Half of the bivalves were exposed for 20 days to a nominal concentration of 0.2 mg/L of technical-grade fenitrothion (*O,O*-dimethyl *O*-4-nitro-*m*-tolyl phosphorothioate) (96% purity, Afrasa, Paterna, Spain) dissolved in acetone through a semi-static system. The other half was exposed to 2.9 μ L/L acetone, the concentration of carrier used for dissolving the pesticide. Animals were fed approximately 20,000 cells of *T. suecica* per ml during the exposure period to avoid undernourishment. Water, pesticide, and microalgae were renewed every 48 h. Water samples were taken before and after each renewal to measure the concentration of fenitrothion. Temperature was measured daily during the exposure period and maintained at 16.7 ± 0.7 °C. Five animals were removed from each tank at 1, 3, 7, 13, and 20 days after the start of the exposure. Two were rinsed with clean seawater and the soft tissues were removed and kept frozen at -80 °C for pesticide analysis. Three mussels were weighed, their lengths measured, and their digestive glands removed and frozen at -80 °C until biochemical analyses were performed.

2.2. Depuration of *OP*-intoxicated mussels with NAC

Immediately after the 20-day exposure period, 75 mussels from each of the four tanks were randomly distributed in three 40-L aquaria containing 35 L of 0, 50, or 250 mg/L *N*-acetyl-L-cysteine (Sigma) in filtered and sterilized seawater. Water and NAC concentrations were renewed every 48 h. No diet was administered during the depuration phase. Temperature was measured daily and maintained at 17.0 ± 0.4 °C for the depuration period. Five animals were removed from each aquarium at 8, 24, 48, 96, and 168 h after the start of the depuration period and handled as indicated before (two mussels for pesticide analysis and three for biochemical analyses).

2.3. Depuration of microalgae-intoxicated king scallops with NAC

King scallops (*Pecten maximus*) (length, 40 ± 4 mm; weight, 10 ± 3 g) were collected from a shellfish farm in Fuengirola (Malaga, Spain) in February 2006 after an algae bloom attributed to *Pseudo-nitzschia sp.* Specimens were immediately transported to the laboratory. The adductor muscle and digestive gland of six of the individuals were removed, representing time 0 from the natural contamination. Other 114 scallops were randomly distributed in three 40-L aquaria containing 35 L of 0, 50, or 250 mg/L *N*-acetyl-L-cysteine in filtered and sterilized seawater. Water and NAC concentrations were renewed every 48 hours. Temperature was measured daily and maintained at 10.6 ± 0.7 °C for the depuration period. Animals were fed a daily diet of the microalga *T. suecica*. Three animals were removed from each aquarium at 1, 2, 4, 8, 16, and 32 days after the starting of depuration. The adductor muscle was dissected out and stored at -20 °C until analysis.

2.4. Fenitrothion analysis in seawater

A procedure based on the multiresidual method developed by Hernández et al. (1993) was used to measure the concentration of fenitrothion in seawater. Triplicate liquid-liquid extraction with dichloromethane (100+50+50 ml) was used to extract fenitrothion from seawater. Water residues in the extract were eliminated with anhydrous sodium sulfate (pesticide residue analysis quality, Baker). After it was concentrated with Kuderna-Danish, the extract was dried under a gentle stream of nitrogen gas and then dissolved in *n*-hexane for

injection into gas chromatography coupled to mass spectrometry detection (GC-MS). The recovery of fenitrothion from spiked seawater at 200 ng/ml was $85 \pm 5\%$. The limit of detection was less than 0.1 ng/ml.

2.5. *Fenitrothion analysis in mussels*

A procedure developed by Serrano and Hernández (1998) was applied for the analysis of fenitrothion content in mussels. Fenitrothion is normally biotransformed into more polar metabolites, which are more readily excreted. In mollusks, fenitrothion is metabolized primarily by demethylation to demethyl-fenitrothion, hydrolysis to 3-methyl-4-nitrophenol, and reduction to amino-fenitrothion and demethyl-amino-fenitrothion (Takimoto et al., 1987). All fenitrothion derivatives are not of important toxicological relevance except fenitrooxon and 3-hydroxymethyl-fenitrooxon, because they inhibit the enzyme acetylcholinesterase (AChE) (Hemingway et al., 1991). We observed previously that the half-life for oxon derivatives in mussel tissues is so short that it is not possible to obtain significant data in their analysis unless bivalves were exposed to a massive amount of pesticide (Serrano et al., 1997b), similarly as reported in rats (Roy et al., 2004). Therefore, we focused on the levels of the parent compound as a measure of fenitrothion toxicity. The two mussels for pesticide analysis collected from each aquarium and each sampling time of exposure and depuration periods were thawed at room temperature, triturated, and pooled with anhydrous sodium sulfate. The extraction was carried out with acetonitrile:acetone (10:1, v/v) (pesticide residue analysis quality, Scharlab) by means of a blender (Ultraturrax). Clean-up of the extracts was carried out with normal phase-HPLC using a Silica Novapack column (Waters, Milford, MS). A mixture of hexane/ethyl acetate 99:5 (v/v) was used as the mobile phase for the elution of fenitrothion in a 2-ml fraction free of fat and was directly injected into the GC-MS system (Supporting Methods). Recoveries of the procedure at 400 and 40 ng/g were $89 \pm 9\%$ and $95 \pm 7\%$, respectively. The limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) were 10 and 1 ng/g, respectively. Concentrations below LOD for each treatment were considered as 1 ng/g for calculations but removed in subsequent sampling times. Fenitrothion concentration in mussels was expressed as ng of fenitrothion per grams of total wet weight (ng/g tww).

2.6. GC-MS analysis of fenitrothion

GC-MS was performed with a Hewlett-Packard 5890 series II which was equipped with a HP 7673 autosampler and a MSD 5971 mass selective detector. Splitless injections of 2 μ l were performed into a fused silica Ultra 2 capillary column coated with crosslinked 5% phenyl methyl silicone with a length of 25 m \times 0.20 mm I.D. and a film thickness of 0.33 μ m. Helium was applied as carrier gas at a flow of 0.7 ml/min; nitrogen was used as make up gas at 30 ml/min. The injector temperature was 270 $^{\circ}$ C. The oven temperature was programmed as follows: 90 $^{\circ}$ C (1 min), 10 $^{\circ}$ C/min to 140 $^{\circ}$ C, 5 $^{\circ}$ C/min to 270 $^{\circ}$ C with a final hold for 10 min. Mass detector settings were as follows: electron impact (70 eV) mode with electron multiplier voltage of 1700; dwell time 100 ms; temperature of transfer line was 280 $^{\circ}$ C. Analysis was carried out in selected ion monitoring mode using the single ion 277 (M^+) and 125. Linearity was studied from 1 to 100 ng/g, with $r^2 > 0.99$. Isotopically-labelled fenitrothion was used in the analysis as a quality control. 40 ng of 98% fenitrothion (*O,O*-dimethyl- d_6) (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) was added before the extraction of each sample as an internal standard to correct for variations in recovery.

2.7. Microalgae-derived toxins analyses in king scallops

An analytical procedure based on LC coupled to triple quadrupole mass spectrometry analyzer (LC-MS(QqQ)) was developed and validated for the determination of domoic and okadaic acid in the samples. Linearity of method was evaluated in a range from 1 to 100 μ g/L, taking five standard solutions of domoic and okadaic acid, which were analyzed in duplicate ($r=0.9981$ and 0.9988 , respectively). Precision and accuracy (expressed as recovery) of the method were studied with the aim of mussel certified reference material for domoic and okadaic acid provided by NRC Certified Reference Materials Program (NRC CRM-ASP-mus-c, 41 ± 2 mg/Kg domoic acid and NRC CRM-DSP-mus-b, 10.1 ± 0.8 mg/Kg okadaic acid). The method was found to be precise (RSD=2% for both) and accurate by triplicate, with satisfactory recovery (99 and 91 %, respectively). Additionally, homogenate mussel samples spiked with domoic acid were also used to validate the method at three concentration levels: 0.1 μ g/g, 2 μ g/g and 50 μ g/g, determined within-day by analyzing fortified real samples in quintuplicate at three spiking levels. Fortification of samples with domoic acid for

recovery experiments was performed by delivering 1 mL of 0.2 µg/mL, 4 µg/mL or 100 µg/mL standard solutions to 2 g of homogenized sample in order to yield fortification levels of 0.1 µg/g, 2 µg/g or 50 µg/g, respectively. These fortified samples were equilibrated for 1 h prior to extraction. The method was found to be accurate, with recoveries in the range 88-104%, and precise (RSD < 14%). The limit of quantification for domoic acid (LOQ) was established at 0.1 µg/g, the lowest concentration assayed. Instrumental LOD was determined for both domoic and okadaic acid at 1 ng/L. Concentrations below LOQ for each treatment were considered as 0.1 µg/g for calculations but removed in subsequent sampling times. Domoic and okadaic acid concentrations in the king scallops were expressed as µg of toxin per grams of total wet weight (µg/g tww).

2.8. Toxicokinetic analyses

First-order kinetics was assumed for the calculation of the toxicokinetic parameters for xenobiotic accumulation and depuration in mussels and scallops. The kinetic equation describing uptake and depuration $C_m = k_1/k_2 \cdot C_w(1 - e^{-k_2 t})$ was used. C_m (ng/g tww) and C_w (µg/L) denote the concentrations of fenitrothion in the mussels and seawater at time (t) after the start of the experiment, and k_1 (L/(Kg·day)) and k_2 (1/day) represent the toxicokinetic uptake and elimination rate constants, respectively. The bioconcentration factor (BCF) at steady state was calculated as k_1/k_2 by fitting data to the kinetic equation using the non-linear least-squares method (Serrano et al., 1997a). The depuration constant (k_2) was estimated from the slope of the one-compartment elimination model, $\ln C_m = \ln C_0 - k_2 t$, where C_0 indicates the xenobiotic concentration in the organism at the beginning of the depuration phase. The half-life ($t_{1/2}$) of fenitrothion in mussels and domoic acid in scallops was calculated using $t_{1/2} = -(\ln 0.5)/k_2$. The time necessary for a 99% depuration from tissues (t_{99}) was obtained using $t_{99} = -(\ln 0.01)/k_2$.

2.9. *Glutathione determination*

Digestive gland samples were homogenized with 5 volumes of ice-cold 5% 5-sulfosalicylic acid per gram of wet weight tissue, sonicated, and centrifuged at 20,000g for 10 minutes at 4 °C. Total glutathione content (tGSx) and oxidized glutathione (GSSG) content were determined as previously described (Peña-Llopis et al., 2002).

2.10. *Enzyme Assays*

Digestive glands were homogenized with 5 volumes of a modification of the Henriksson stabilizing medium, which contained 50% glycerol, 20 mM phosphate buffer pH 7.4, 0.5 mM EDTA, and 0.02% defatted bovine serum albumin, but not β -mercaptoethanol because it interferes with the determination of GR activity (Peña-Llopis et al., 2003a). Homogenates were centrifuged at 20,000g for 20 minutes at 4 °C. Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) activity was determined through the increase of absorbance at 415 nm with reference wavelength at 595 nm (1989) using the following final concentrations: 0.075 mM DTNB, 0.1 mM NADPH, and 1 mM GSSG (1988). GST (EC 2.5.1.18) activity was measured through the conjugation of GSH with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) at 340 nm in a microplate reader (Tecan Ultra Evolution, Switzerland) (1974). Every 96-well plate contained a standard curve of known activities of purified enzymes using GR (type III) from baker's yeast and GST from equine liver, whose activities were determined in quartz cuvettes using a Hitachi U-2001 UV/Vis spectrophotometer (Hitachi Instruments, San Jose, CA) at 412 and 340 nm, respectively. Specific enzyme activities were expressed as nmoles of substrate hydrolyzed per min per milligram of protein (mU/mg prot).

2.11. *Protein Determination*

Protein content was determined by the Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) based on the Bradford dye-binding procedure, using bovine serum albumin as standard.

2.12. *Statistics*

The statistical analysis of the bioconcentration of xenobiotics was carried out with Statgraphics 7.0. Goodness of fit was determined by analysis of variance (ANOVA) and *F* test ($\alpha < 0.05$). SPSS 12 was used for all other statistical analyses. Since there was no effect of tank replication in the ANOVA analyses, the two tank/aquarium replicates were pooled, giving six animals per treatment and time. The effects of fenitrothion exposure, exposure time, and their interaction on studied variables were analyzed by a two-factor ANOVA using multivariate general linear models (GLM) with type III sum-of-squares. The effects of fenitrothion pre-exposure, NAC treatment, depuration time, and their interactions were also analyzed by two-factor ANOVAs and a three-factor ANOVA. Means were compared by *a priori* contrasts between selected single levels of factors using syntax subcommands in the GLM. The strength of association between two variables was calculated using the Spearman's correlation. When correlating with fenitrothion concentration in mussels, it was considered an estimate because its levels were determined in the whole bodies of a pool of two different individuals. Sequential Bonferroni correction was applied to multiple significance tests to avoid spurious significant differences (Rice, 1989). Principal component analysis of the glutathione levels and enzyme activities was performed on individual values for each time point using Partek Genomics Suite.

3. Results

3.1. *Sublethal exposure of mussels to the OP pesticide fenitrothion impaired the glutathione metabolism*

Mussels were exposed for 20 days to fenitrothion at a nominal concentration of 0.2 mg/L, which was similar to the highest fenitrothion concentration detected in the waters of the Ebro Delta (178 $\mu\text{g/L}$) (Oubiña et al., 1996). No mortality was observed during the exposure and depuration periods. Fenitrothion concentration in seawater showed agreement with the nominal concentration and remained reasonably constant during the exposure period (**Supplementary Table 1**). Uptake of the OP pesticide in mussels was rapid during the

bioconcentration phase, reaching approximate steady-state conditions after 5 days (**Figure 1A**). Mussels exhibited a bioconcentration factor (BCF) for fenitrothion of 9.2 ± 1.5 L/Kg tww, which corresponded to a BCF of 611 ± 103 L/Kg of lipids ($\log \text{BCF} = 2.79$), assuming lipid content of mussels was 1.5% (Serrano et al., 1997a). The lipid-based bioconcentration was lower than expected, based on its *n*-octanol/water partition coefficient ($\log P_{\text{ow}} = 3.16$) (Moody et al., 1987), because fenitrothion has a relatively slow uptake and a high excretion rate in clams and mussels (McLeese et al., 1979), but a fast uptake and elimination in fish (Sancho et al., 1998).

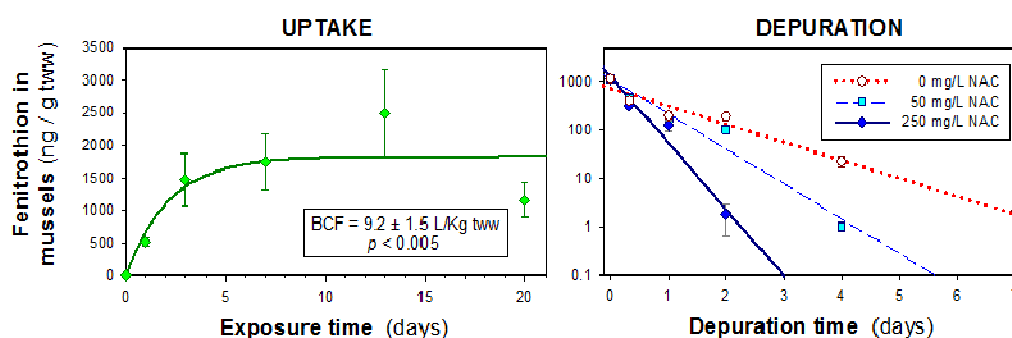


Figure 1. Bioaccumulation profile of fenitrothion in mussels exposed for 20 days to 0.2 mg/L of the pesticide and depuration kinetics with different NAC concentrations (mean \pm SD).

Mussels presented 30% decrease of GSH content in the digestive gland during the first seven days after fenitrothion intoxication (**Figure 2A**). Conversely, GSSG levels increased by 20% after 13 and 20 days of exposure (**Figure 2B**). As a consequence, the GSH/GSSG ratio declined by 42% after one day of exposure, then increased over time, but was still significantly lower than controls for 13 days after pesticide exposure (**Figure 2C**). The oxidized redox state of glutathione may be due in part to the inhibition of the GR activity by the pesticide (23% inhibition on average), whose inhibition decreased over time (**Figure 2D**). GST activity was only significantly inhibited by 24% after 20 days (**Figure 2E**). Therefore, the global effects of fenitrothion exposure in mussels included depletion and oxidation of glutathione, resulting in a substantial decrease of the GSH/GSSG ratio in addition to an

inhibition of the GST and, especially, GR enzyme activities (**Table 1**). Moreover, GSH and GSSG content, glutathione redox status, and GR activity were time-dependent since they increased over the duration of exposure. GSH and GSSG levels exhibited an interaction between the pesticide exposure and the exposure time, because the mean differences in glutathione levels varied with time.

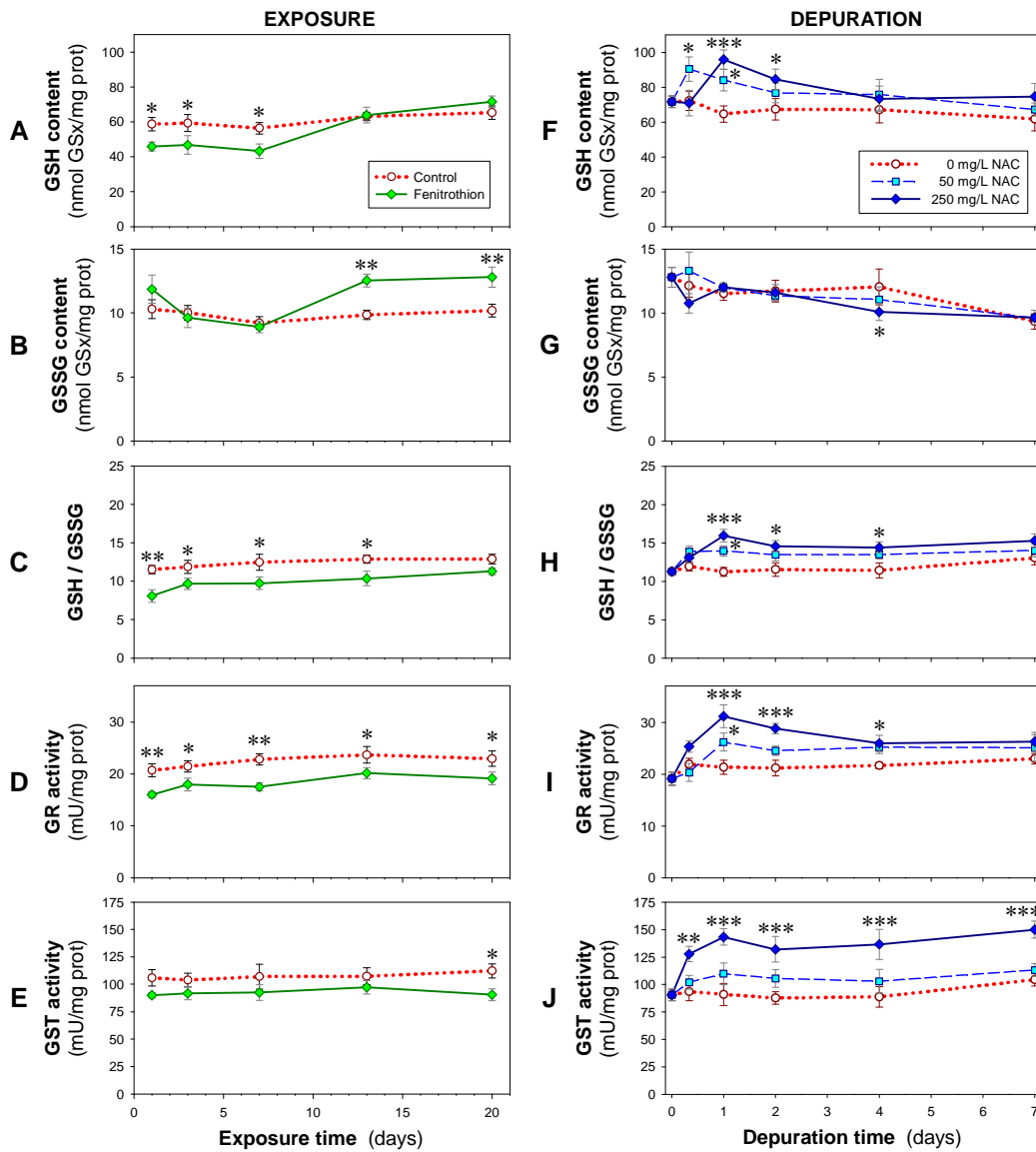


Figure 2. Effect of the exposure to 0.2 mg/L fenitrothion and depuration with different NAC concentrations on the GSH and GSSG content, the glutathione redox status, and GR and GST enzyme activities in the digestive gland of mussels (mean \pm SE, n=6). *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001 by a priori contrasts in the two-factor ANOVA.

TABLE 1. Effect of fenitrothion exposure, exposure time, and the interaction between exposure and time (Exp × t) (two-way ANOVA) on the glutathione levels and enzyme activities.

	Exposure (df = 1, 60)		time (df = 4, 60)		Exp × t (df = 4, 60)	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
GSH	6.42	0.014	8.56	2·10⁻⁵	2.75	0.038
GSSG	8.75	0.005	4.94	0.002	2.63	0.045
GSH/GSSG	27.66	3·10⁻⁶	2.71	0.040	0.40	0.81
GR	31.03	10⁻⁶	2.62	0.046	0.24	0.92
GST	11.55	0.0013	0.18	0.95	0.20	0.93

Abbreviations: df, degrees of freedom.

3.2. NAC treatment increases glutathione anabolism

Control mussels that were exposed to the carrier solvent acetone for 20 days were treated with different NAC concentrations to determine the effect of NAC treatment in the absence of toxicants. Treatment of bivalves with 250 mg/L NAC increased significantly the GSH content after 1, 2, and 7 days up to 46% (**Figure 3A**). A non-significant decrease of the GSSG levels during the first day of depuration (**Figure 3B**) caused a 50% increase in the GSH/GSSG ratio during the first 48 h (**Figure 3C**). The glutathione redox status in mussels treated with both concentrations was 25% less oxidized than untreated animals after seven days. Treatment with 50 or 250 mg/L NAC induced 20 or 30%, respectively, the GR activity at the beginning (8 h) and end (168 h) of depuration (**Figure 3D**), whereas GST activity was induced up to 45% between 2 and 7 days of treatment with 250 mg/L NAC (**Figure 3E**).

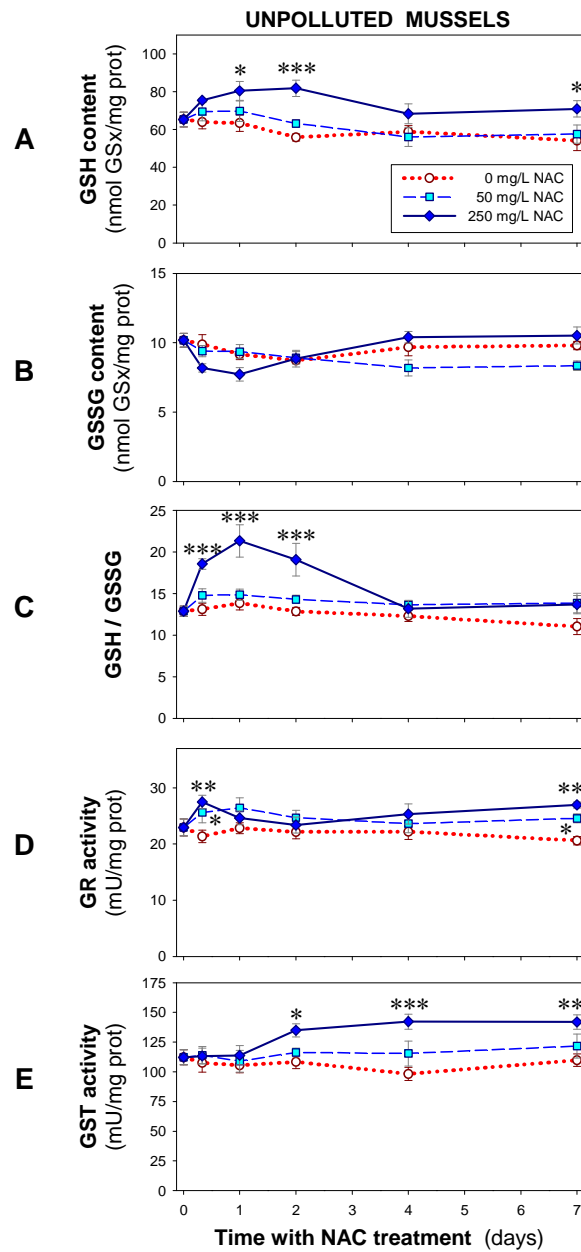


Figure 3. Effect of NAC treatment on the GSH and GSSG content, the glutathione redox status, and GR and GST enzyme activities in the digestive gland of unpolluted mussels (mean \pm SE, $n=6$). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared to untreated animals by *a priori* contrasts in the two-factor ANOVA

The two-factorial ANOVA showed that GSH content was significantly different between the three NAC concentrations used during treatment, and it also was different between the five sampling times after starting the treatment (**Table 2**). GSSG content illustrated an interaction between the effects of these two factors. The GSH/GSSG ratio showed all three effects, whereas the GR and GST activities only showed the NAC treatment effect. We then performed *post hoc* comparisons to analyze the differences within the different NAC concentrations (**Table 3**). GSH content in mussels treated with 250 mg/L NAC was higher than controls and those treated with 50 mg/L, whereas GSSG content was lower in the bivalves treated with 50 mg/L NAC compared to controls. The GSH/GSSG ratio and GST enzyme activity in bivalves treated with 50 mg/L NAC were significantly higher than controls, but lower than those treated with 250 mg/L. GR activity in animals treated either with 50 or 250 mg/L NAC was higher than controls.

TABLE 2. Effect of NAC treatment, time of treatment, and the interaction between NAC and treatment time (NAC \times t) (two-way ANOVA) on the glutathione levels and enzyme activities in the digestive gland of uncontaminated mussels.

	NAC (df = 2, 90)		Treatment time (df = 4, 90)		NAC \times t (df = 8, 90)	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
GSH	19.90	10^{-7}	3.85	0.007	0.74	0.66
GSSG	2.00	0.14	1.64	0.17	3.93	0.0006
GSH/GSSG	24.73	$6 \cdot 10^{-9}$	7.85	$2 \cdot 10^{-5}$	2.70	0.011
GR	11.66	$4 \cdot 10^{-5}$	0.62	0.65	1.04	0.41
GST	13.54	$9 \cdot 10^{-6}$	2.23	0.07	1.37	0.23

Abbreviations: df, degrees of freedom.

Table 3. Post hoc comparisons (Fisher least significant difference) between NAC treatment groups of unpolluted and OP poisoned mussels based on mean factor scores in the two-way ANOVAs (mean \pm SE, n=30)

[NAC] (mg/L)	Unpolluted mussels			Fenitrothion-intoxicated mussels		
	0	50	250	0	50	250
GSH (nmol GSx/mg prot)	59.2 \pm 1.7	63.2 \pm 2.2	75.4 \pm 2.0 ^{‡,§}	66.6 \pm 2.6	78.9 \pm 3.1 [‡]	79.9 \pm 3.3 [‡]
GSSG (nmol GSx/mg prot)	9.4 \pm 0.2	8.8 \pm 0.2 [‡]	9.1 \pm 0.3	11.4 \pm 0.4	11.5 \pm 0.4	10.8 \pm 0.3
GSH/GSSG	12.6 \pm 0.4	14.3 \pm 0.3 [‡]	17.2 \pm 0.8 ^{‡,§}	11.8 \pm 0.4	13.8 \pm 0.3 [‡]	14.7 \pm 0.4 [‡]
GR (mU/mg prot)	21.8 \pm 0.5	25.0 \pm 0.7 [‡]	25.5 \pm 0.6 [‡]	21.8 \pm 0.5	24.3 \pm 0.8 [‡]	27.5 \pm 0.8 ^{‡,§}
GST (mU/mg prot)	106 \pm 3	115 \pm 4 [‡]	129 \pm 4 ^{‡,§}	93 \pm 4	107 \pm 4 [‡]	138 \pm 4 ^{‡,§}

[‡] $p < 0.05$ versus corresponding control group (0 mg/L NAC), [§] $p < 0.05$ versus 50 mg/L NAC treatment.

3.3. Depuration of mussels with NAC mitigates the impairment of the glutathione metabolism caused by the OP pesticide exposure

When mussels were exposed to 0.2 mg/L fenitrothion for 20 days, NAC treatment increased the GSH levels up to 48% within 48 h compared to conventional depuration (**Figure 2F**) and decreased the GSSG content 16% after 96 h of treatment (**Figure 2G**). The GSH/GSSG ratio and GR activity were elevated to 42 and 46%, respectively, during the 24 and 96 h time-points of depuration with 250 mg/L NAC, although they were only significant after 24 h when treated with 50 mg/L NAC (**Figures 2H and 2I**). The GST activity was induced by 50% during NAC depuration (**Figure 2J**). However, only bivalves depurated with 250 mg/L NAC showed significant differences compared with mussels depurated only with water at each depuration time.

The two-factor ANOVA illustrated that NAC treatment influenced considerably the GSH content, GSH/GSSG levels, and GR and GST enzyme activities ($p = 0.002$, $p = 5 \cdot 10^{-7}$, $p = 4 \cdot 10^{-7}$, and $p = 3 \cdot 10^{-11}$, respectively, **Table 4**). A three-way ANOVA, considering the bivalves not exposed to fenitrothion, showed higher effects of NAC treatment over those

variables ($p = 8 \cdot 10^{-8}$, $p = 7 \cdot 10^{-15}$, $p = 4 \cdot 10^{-11}$, and $p = 10^{-16}$, respectively, Supplementary Table 2). GSSG content was not significantly affected by NAC treatment, but decreased over the depuration time (Table 4). Fisher *post hoc* comparisons showed that mussels treated with either 50 or 250 mg/L NAC presented higher GSH content, GSH/GSSG ratio, and GR and GST enzyme activities than shellfish depurated only with seawater (Table 3). In addition, GR and GST activities were higher in the bivalves treated with 250 mg/L NAC than in those treated with 50 mg/L. Notably, NAC treatment was dose-dependent according to Spearman correlation (Table 5). The higher the NAC concentration used for shellfish depuration, the higher the levels of GSH, the GSH/GSSG ratio, the GR and GST enzyme activities in the digestive gland and the lower the fenitrothion content in tissues (Table 5).

TABLE 4. Effect of depuration with NAC, depuration time, and the interaction between NAC and time (NAC \times t) on the glutathione levels and enzyme activities in the digestive gland of fenitrothion-intoxicated mussels.

	NAC (df = 2, 90)		Depuration time (df = 4, 90)		NAC \times t (df = 8, 90)	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
GSH	6.51	0.002	2.02	0.10	1.38	0.22
GSSG	0.92	0.40	4.92	0.0014	0.85	0.56
GSH/GSSG	17.62	$5 \cdot 10^{-7}$	1.16	0.33	0.89	0.53
GR	17.90	$4 \cdot 10^{-7}$	2.35	0.06	1.39	0.22
GST	34.33	$3 \cdot 10^{-11}$	1.50	0.21	0.20	0.99

Abbreviations: df, degrees of freedom.

To account to the global consequences of the glutathione metabolism caused by fenitrothion exposure and depuration with different NAC concentrations, we performed principal component analysis (PCA). This analysis shows that whereas fenitrothion exposure shifts variability towards the left in the main principal component, which account for 39.3% of all sources of variability, NAC treatment shifts variability dose dependently towards the right (Figure 4, Supplementary Figure 2). Thus, the glutathione metabolism impaired by the

OP pesticide is restored and enhanced by NAC treatment. Notably, the ellipsoids of the mussels depurated only with seawater overlapped with the ones exposed to fenitrothion (**Figure 4, Supplementary Figure 2**), indicating that the variability in the glutathione metabolism in these groups is not much different. However, bivalves depurated with 50 mg/L NAC were different than those exposed to the OP pesticide and similar to controls. Mussels treated with 250 mg/L NAC showed differences with the control group but in the opposite direction as the fenitrothion exposure, suggesting that their glutathione metabolism has been enhanced and would be able to tolerate higher exposure to fenitrothion or other xenobiotics that impair the glutathione metabolism.

TABLE 5. Spearman's rho correlations coefficients among NAC concentrations, depuration time, glutathione levels, enzyme activities, and estimated fenitrothion content in mussels (C_m) exposed for 20 days to the pesticide.

	NAC	time	GSH	GSSG	GSH/GSSG	GR
GSH	0.32**	-0.20				
GSSG	-0.05	-0.45***	0.68***			
GSH/GSSG	0.52***	0.15	0.65***	-0.04		
GR	0.55***	0.06	<i>0.23*</i>	-0.04	0.37***	
GST	0.67***	0.11	0.12	-0.11	0.34**	0.57***
C_m	-0.36***	-0.90***	0.06	0.40***	-0.31**	-0.29**

, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.001$. Bold correlation coefficients indicate significant p values at $\alpha = 0.05$ after sequential Bonferroni correction for multiple tests ($n = 90$). Correlations with $p < 0.05$ that were non-significant after controlling for time or NAC treatment using partial correlations were represented by boxes or in italics, respectively.*

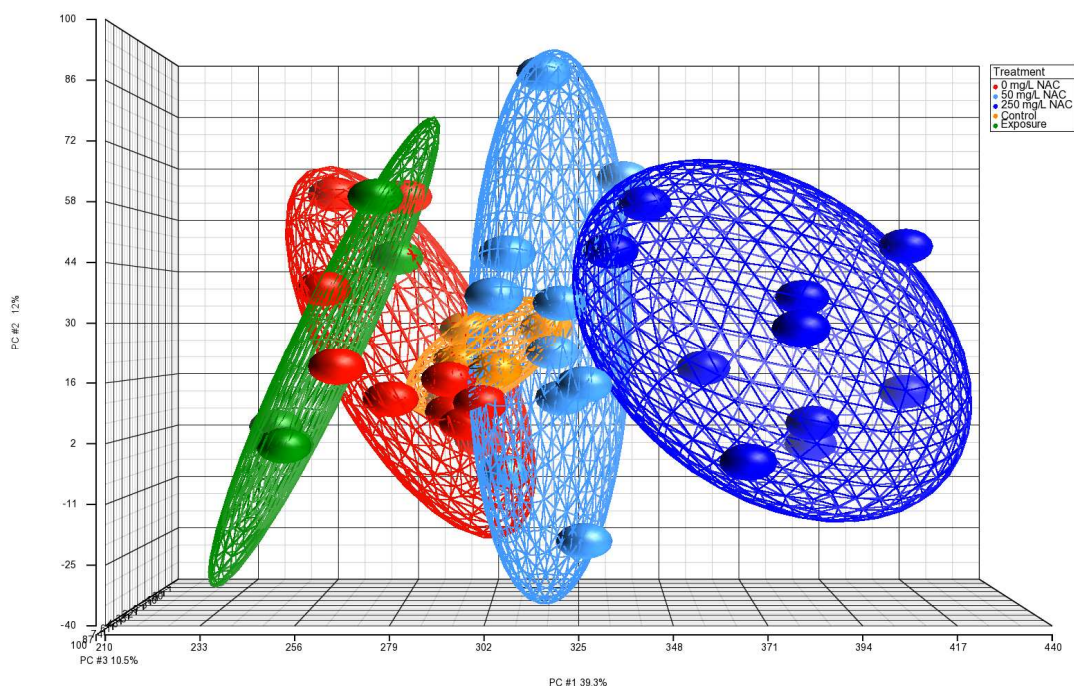


Figure 4. Principal component analysis (PCA) of the glutathione metabolism (glutathione levels and enzyme activities) in mussels exposed (or not) to the OP pesticide fenitrothion and treated with different NAC concentrations.

3.4. *Mussels depurated with NAC eliminate the OP pesticide more efficiently*

Depuration efficiency of mussels exposed for 20 days to 0.2 mg/L fenitrothion was higher with NAC treatment. Toxicokinetic analyses showed that the elimination rate constant (k_2) increased two-fold in bivalves treated with 50 mg/L NAC, whereas it increased four-fold in those treated with 250 mg/L NAC (Table 6). As a consequence, treatment of shellfish with 50 and 250 mg/L NAC increased two- and four-fold, respectively, the velocity of fenitrothion elimination, because the half-life of the pesticide in bivalve tissues ($t_{1/2}$) was half and one quarter compared to controls (Table 6, Figure 1B). Hence, whereas untreated mussels needed 130 h to eliminate 99% of the pesticide from its tissues, those treated with 50 and 250 mg/L NAC only needed 66 h and 35 h, respectively. The estimated amount of fenitrothion that remained in the tissues of bivalves after 24 and 48 h of depuration in seawater was 42.5% and

18.2%, respectively (**Table 6**). However, the estimated pesticide amount in shellfish treated with 50 mg/L NAC was 2- and 5-fold lower than controls after 24 and 48 h of depuration. The estimated fenitrothion quantity in bivalves treated with 250 mg/L NAC for 24 and 48 h was 5- and 93-fold lower than in mussels depurated only in seawater (4.3 and 0.2%). Thus, treatment of mussels with NAC allowed the elimination of more than the 95% of the OP pesticide in their tissues after 48 h of depuration, regardless of the initial concentration.

Table 6. Toxicokinetics of fenitrothion depuration by treatment with different NAC concentrations (mean \pm SD).

NAC concentration (mg/L)	Depuration rate k_2 (h ⁻¹)	Half-life $t_{1/2}$ (h)	Time for 99% depuration t_{99} (h)	Percent after 24 h	Percent after 48 h
0	0.036 \pm 0.005	19.6 \pm 2.7	130 \pm 18	42.5 \pm 5.0	18.2 \pm 4.2
50	0.069 \pm 0.001	9.99 \pm 0.05	66.4 \pm 0.3	18.9 \pm 0.2	3.58 \pm 0.06
250	0.132 \pm 0.014	5.3 \pm 0.5	35.1 \pm 3.6	4.3 \pm 1.4	0.20 \pm 0.12

3.5. *King scallops naturally contaminated with the marine toxin domoic acid showed enhanced depuration with NAC treatment*

To extend and validate the findings of NAC treatment in OP-exposed mussels, we were interested in studying the effect of NAC treatment in the depuration of shellfish naturally contaminated by harmful algae. We selected the scallop because it is one of the bivalve species with the slowest depuration rate (Blanco et al., 2002). Sea-cage cultured king scallops (*Pecten maximus*) collected after an algae bloom from the Western Mediterranean coast were analyzed in order to confirm the presence of domoic acid in their tissues. Okadaic acid was not detected in the naturally contaminated specimens. Domoic acid was found in the digestive gland at 7.6 μ g/g and in the adductor muscle at 1.0 μ g/g, which are both below the regulatory level of 20 μ g/g. Since scallops are normally eviscerated and the digestive gland is removed, we focused the analyses in the edible parts, such as the adductor muscle. Depuration of microalgae-contaminated scallops with 50 mg/L NAC showed no effect. However, treatment with 250 mg/L NAC decreased the levels of domoic acid in the pectinid muscle

(Figure 5). Notably, the elimination rate constant (k_2) increased four-fold compared to standard depuration (Table 7), decreasing four-fold the half-life and time required for 99% depuration. This four-fold increase with the highest NAC concentration was consistent with the one achieved in mussels exposed to fenitrothion (Table 6). The estimated concentration of domoic acid after 2 and 7 days of depuration with 250 mg/L NAC is 2- and 20-fold smaller, respectively, than depuration with either 0 or 50 mg/L NAC. Thus, only the highest NAC concentration was able to enhance the removal of the ASP toxin from the muscle of king scallops.

Table 7. Toxicokinetics of domoic acid depuration by treatment with different NAC concentrations (mean \pm SD)

NAC concentration (mg/L)	Depuration rate k_2 (days ⁻¹)	Half-life $t_{1/2}$ (days)	Time for 99% depuration t_{99} (days)	Percent after 48 h	Percent after 7 days
0	0.130 \pm 0.001	5.3 \pm 0.1	35.4 \pm 0.3	77.1 \pm 0.2	40.2 \pm 0.3
50	0.119 \pm 0.010	5.9 \pm 0.5	38.9 \pm 3.3	78.9 \pm 1.6	43.6 \pm 3.0
250	0.560 \pm 0.025	1.2 \pm 0.1	8.2 \pm 0.4	32.7 \pm 0.12	2.0 \pm 0.3

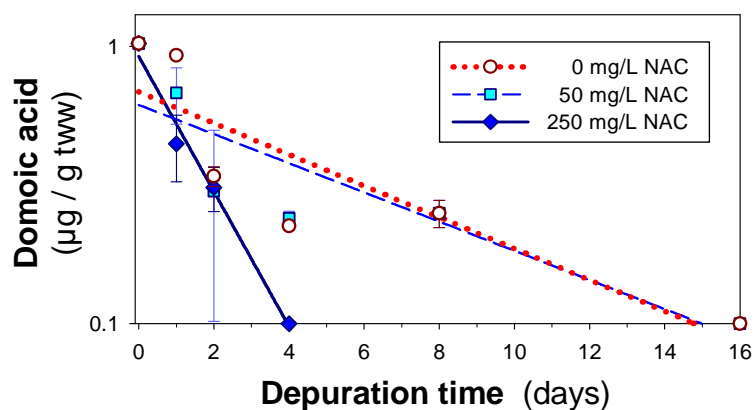


Figure 5. Depuration kinetics of the naturally-accumulated domoic acid in the king scallop by treatment with different amounts of NAC.

4. Discussion

Contamination of marine organisms represents a public health problem of increasing importance as a consequence of anthropogenic factors, such as water pollution, which can lead to the accumulation of organic contaminants in aquatic animals (Hites et al., 2004; Serrano et al., 2003). Although fenitrothion is rapidly absorbed and extensively metabolized in humans (Meaklim et al., 2003), chronic exposure to pesticides is associated with higher risk of developing cancer and certain neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease (Alavanja et al., 2004; Kamel, 2013).

Fenitrothion exposure in mussels resulted in depletion of GSH levels in the digestive gland over a period of 7 days after intoxication. Thereafter, GSH synthesis was induced in response to the depletion caused by the pesticide, as was observed in fish (Hasspieler et al., 1994; Peña et al., 2000; Stein et al., 1992), because glutathione biosynthesis is regulated by feedback inhibition of GSH (Richman and Meister, 1975). On the other hand, GSSG levels increased after exposures of 13 and 20 days. As a consequence, the glutathione redox status was highly oxidized at the beginning of the exposure and was reduced over the exposure time. Thus, fenitrothion caused oxidative stress in mussels, because the GSH/GSSG ratio is an index of the cellular redox status and a biomarker of oxidative damage (Peña-Llopis, 2005). The oxidation of the glutathione redox status may be due in part to the inhibition of the GR activity by the pesticide, whose inhibition also decreased over time. Fenitrothion also inhibited slightly the GST activity.

Treatment of uncontaminated mussels with 250 mg/L NAC increased GSH synthesis and GR activity in the digestive gland, raising the GSH/GSSG ratio. The GST activity was also induced by NAC in the absence of any toxicant. The depuration of contaminated shellfish with NAC increased transiently the GSH levels, the GSH/GSSG ratio, and the GR activity, whereas GST activity was highly induced during the entire depuration phase. The induction of GR activity enhanced the reduction of GSSG to GSH, resulting in a faster recovery of the oxidation of the glutathione redox status caused by fenitrothion. Similar results were observed in fish and rats exposed to sublethal concentrations of pesticides (Kamboj et al., 2006; Peña-Llopis et al., 2003b).

The principal component analysis allowed a visual summarization of the global effect of the OP exposure and NAC treatment on the glutathione metabolism. Interestingly, NAC treatment went dose dependently in the opposite direction of the pesticide exposure. Notably, this effect went beyond control mussels for the highest NAC concentration, indicating that the glutathione metabolism in these bivalves was more prepared to tolerate an additional exposure of the OP pesticide and, possibly, other xenobiotics that can alter the glutathione metabolism.

The strongest effect of NAC treatment in shellfish was on the induction of GST activity. GSTs catalyze the conjugation of GSH with nonpolar compounds that contain an electrophilic carbon, nitrogen, or sulphur atom. This allows the detoxification of xenobiotics (like chemical carcinogens and environmental pollutants, such as pesticides and PAHs) and the inactivation of endogenous products of oxidative stress (Hayes et al., 2005). Elevation of GST activity in insects contributes to the development of insecticide resistance by facilitating the excretion of the pesticide through direct conjugation to GSH or through detoxification processes that require GSH as cofactor, or just by removing the lipid peroxidation products generated (Enayati et al., 2005). Conversely, GST inhibitors increase synergistically the toxic effects of insecticides (Sívori et al., 1999). Since fenitrothion and fenitrooxon are demethylated by GSTs by transferring the methyl group to GSH and generating poor AChE inhibitors (Hemingway et al., 1991), the increase in GST activity and GSH content in mussels treated with NAC may have accelerated this demethylation process, improving markedly xenobiotic detoxification.

GSTs also catalyze the GSH-dependent detoxification of other organic contaminants, such as PCBs (Lee et al., 2005), dioxins (Machala et al., 1998), furans (Boyd, 1981), endocrine disruptors (Leffers et al., 2001; Nishizawa et al., 2005), and algal-derived toxins like domoic acid (Bard, 2000), which causes ASP; okadaic acid (Ainbinder et al., 1997), which causes DSP; brevetoxins (Radwan et al., 2005), which cause NSP; and saxitoxin and gonyautoxins (Bard, 2000; Gubbins et al., 2000), which cause PSP. As a validation of this proof of concept, we treated king scallops that were naturally exposed to harmful microalgae with different NAC concentrations. Depuration with the highest NAC concentration decreased drastically the levels of domoic acid in the adductor muscle of the pectinids. These results

suggest that treatment of pectinids with 250 mg/L NAC before commercialization might diminish the risk of shellfish poisoning.

5. Conclusions

This study demonstrated that treatment of shellfish with NAC boosted their depuration capacity up to four-fold, allowing them to remove more efficiently the ASP toxin domoic acid and the OP pesticide fenitrothion by increasing the GST activity and inducing the GSH anabolism (GSH synthesis and GR activity). Above all, NAC treatment also increased GST activity and GSH anabolism in uncontaminated bivalves. Therefore, since GSTs might detoxify a large number of xenobiotics (including toxins from harmful algal blooms), these results suggest that NAC has the potential to be a safe and efficient drug for removing organic contaminants from shellfish.

Acknowledgments

The submitted paper is the subject of the Spanish patent application P2306567. We thank Dr. J. Cano for providing the contaminated king scallops after a harmful algal bloom and M.J. Diez for her valuable technical assistance. S.P-L. was partially supported by a Postdoctoral Fellowship from *Generalitat Valenciana (Conselleria de Empresa, Universitat y Ciencia, Spain)*. E.B. was supported by a pre-doctoral fellowship from University Jaume I. This work has been developed in the framework of the Research Unit of Marine Ecotoxicology IATS (CSIC)-IUPA (UJI) and was supported by a grant from the Spanish Government (*Ministerio de Educación y Ciencia, PTR95-0991.OP*) to J.B.P. and R.S. and from *Generalitat Valenciana* as a research group of excellence (PROMETEO/2009/054). The authors are very grateful to *Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC)* of University Jaume I for using the Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer.

References

- 1996a. Bivalve acute toxicity test (embryo-larval), OPPTS Harmonized Tests Guidelines. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- 1996b. Oyster BCF, OPPTS Harmonized Tests Guidelines. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
2003. Draft Report on the Environment. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Ainbinder, E., Bergelson, S., Pinkus, R., Daniel, V., 1997. Regulatory mechanisms involved in activator-protein-1 (AP-1)-mediated activation of glutathione-S-transferase gene expression by chemical agents. *Eur. J. Biochem.* 243, 49-57.
- Alavanja, M.C., Hoppin, J.A., Kamel, F., 2004. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health* 25, 155-197.
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357-389.
- Bernard, F.R., 1989. Uptake and elimination of coliform bacteria by four marine bivalve mollusks. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 46, 1592-1599.
- Blanco, J., Acosta, C.P., Bermudez de la Puente, M., Salgado, C., 2002. Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. *Aquat Toxicol* 60, 111-121.
- Boyd, M.R., 1981. Toxicity mediated by reactive metabolites of furans. *Adv. Exp. Med. Biol.* 136, 865-879.

- Cribb, A.E., Leeder, J.S., Spielberg, S.P., 1989. Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 183, 195-196.
- Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect. Mol. Biol.* 14, 3-8.
- Gubbins, M.J., Eddy, F.B., Gallacher, S., Stagg, R.M., 2000. Paralytic shellfish poisoning toxins induce xenobiotic metabolising enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar. Environ. Res.* 50, 479-483.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione *S*-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hasspieler, B.M., Behar, J.V., Di Giulio, R.T., 1994. Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameriurus nebulosus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 28, 82-90.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
- Hemingway, J., Miyamoto, J., Herath, P.R.J., 1991. A possible novel link between organophosphorus and DDT insecticide resistance genes in *Anopheles*: supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 39, 49.
- Hernández, F., Morell, I., Beltran, J., López, F.J., 1993. Multiresidue procedure for the analysis of pesticides in groundwater. Application to samples from the Comunidad Valenciana, Spain. *Chromatographia* 37, 303-312.
- Hites, R.A., Foran, J.A., Carpenter, D.O., Hamilton, M.C., Knuth, B.A., Schwager, S.J., 2004. Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science* 303, 226-229.
- Isbister, G.K., Kiernan, M.C., 2005. Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurol.* 4, 219-228.

- Kamboj, A., Kiran, R., Sandhir, R., 2006. Carbofuran-induced neurochemical and neurobehavioral alterations in rats: attenuation by *N*-acetylcysteine. *Exp. Brain Res.* 170, 567-575.
- Kamel, F., 2013. Epidemiology. Paths from pesticides to Parkinson's. *Science* 341, 722-723.
- Lee, J.Y., Kim, J.W., Lim, H.S., Joo, W.H., Cho, Y.K., Moon, J.Y., 2005. Changes in antioxidant defense systems by 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl exposure in neuronal SK-N-MC cells. *Toxicol. Lett.* 157, 139-149.
- Leffers, H., Naesby, M., Vendelbo, B., Skakkebaek, N.E., Jorgensen, M., 2001. Oestrogenic potencies of Zeranol, oestradiol, diethylstilboestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Hum. Reprod.* 16, 1037-1045.
- Machala, M., Drabek, P., Neca, J., Kolarova, J., Svobodova, Z., 1998. Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in trout liver. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 107-111.
- Mascarelli, A., 2013. Growing up with pesticides. *Science* 341, 740-741.
- McLeese, D.W., Zitko, V., Sergeant, D.B., 1979. Uptake and excretion of fenitrothion by clams and mussels. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 800-806.
- Meaklim, J., Yang, J., Drummer, O.H., Killalea, S., Staikos, V., Horomidis, S., Rutherford, D., Ioannides-Demos, L.L., Lim, S., McLean, A.J., McNeil, J.J., 2003. Fenitrothion: toxicokinetics and toxicologic evaluation in human volunteers. *Environ. Health Perspect.* 111, 305-308.
- Moody, R.P., Carroll, J.M., Kresta, A.M., 1987. Automated high performance liquid chromatography and liquid scintillation counting determination of pesticide mixture octanol/water partition rates. *Toxicol. Ind. Health* 3, 479-490.

- Nishizawa, H., Imanishi, S., Manabe, N., 2005. Effects of exposure in utero to bisphenol A on the expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos. *J. Reprod. Dev.* 51, 593-605.
- Oubiña, A., Ferrer, I., Gascón, J., Barceló, D., 1996. Disappearance of aerially applied fenitrothion in rice crop waters. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3551-3557.
- Peña-Llopis, S., 2005. Antioxidants as potentially safe antidotes for organophosphorus poisoning. *Curr. Enzyme Inhibit.* 1, 147-156.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2002. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. *Chemosphere* 47, 485-497.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2003a. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by *N*-acetylcysteine. *Aquat. Toxicol.* 65, 337-360.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2003b. Increased recovery of brain acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels *Anguilla anguilla* by bath treatment with *N*-acetylcysteine. *Dis. Aquat. Organ.* 55, 237-245.
- Peña, S., Peña, J.B., Ríos, C., Sancho, E., Fernández, C., Ferrando, M.D., 2000. Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 51-56.
- Perl, T.M., Bedard, L., Kosatsky, T., Hockin, J.C., Todd, E.C., Remis, R.S., 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *The New England journal of medicine* 322, 1775-1780.
- Radwan, F.F., Wang, Z., Ramsdell, J.S., 2005. Identification of a rapid detoxification mechanism for brevetoxin in rats. *Toxicol. Sci.* 85, 839-846.

- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225.
- Richman, P.G., Meister, A., 1975. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* 250, 1422-1426.
- Roy, S., Roy, S., Kumar, R., Sharma, C.B., Pereira, B.J., 2004. Biodegradation and bioaccumulation of fenitrothion in rat liver. *Biomed. Chromatogr.* 18, 132.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Lleó, C., Andreu-Moliner, E., 1998. Pesticide toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 245-250.
- Serrano, R., Hernández, F., 1998. Sample clean-up and fractionation of organophosphorus pesticide residues in mussels using normal-phase LC. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 70, 3-18.
- Serrano, R., Hernández, F., López, F.J., Peña, J.B., 1997a. Bioconcentration and depuration of chlorpyrifos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33, 47-52.
- Serrano, R., López, F.J., Roig-Navarro, A., Hernández, F., 1997b. Automated sample clean-up and fractionation of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl and metabolites in mussels using normal-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 778, 151-160.
- Serrano, R., Simal-Julian, A., Pitarch, E., Hernández, F., Varó, I., Navarro, J.C., 2003. Biomagnification study on organochlorine compounds in marine aquaculture: the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3375-3381.
- Sívori, J.L., Casabé, N.B., Zerba, E.N., Wood, E.J., 1999. Fenitrothion toxicity in *Triatoma infestans* synergized by quercetin or thymol blue. *Pestic. Sci.* 55, 18-26.
- Smith, I.K., Vierheller, T.L., Thorne, C.A., 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175, 408-413.

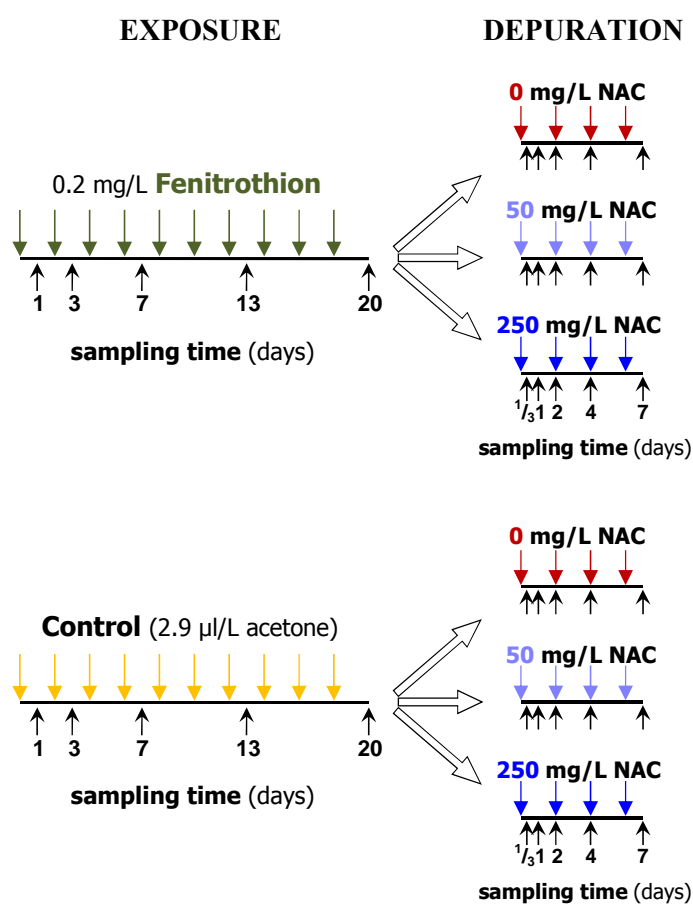
Solé, M., Porte, C., Barceló, D., Albaigés, J., 2000. Bivalves residue analysis for the assessment of coastal pollution in the Ebro Delta (NW Mediterranean). *Mar. Pollut. Bull.* 40, 746-753.

Stein, J.E., Collier, T.K., Reichert, W.L., Casillas, E., Hom, T., Varanasi, U., 1992. Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects: Studies with benthic fish in Puget Sound, Washington. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 701-714.

Takimoto, Y., Ohshima, M., Miyamoto, J., 1987. Comparative metabolism of fenitrothion in aquatic organisms. II. Metabolism in the freshwater snails, *Cipangopaludina japonica* and *Physa acuta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 13, 118-125.

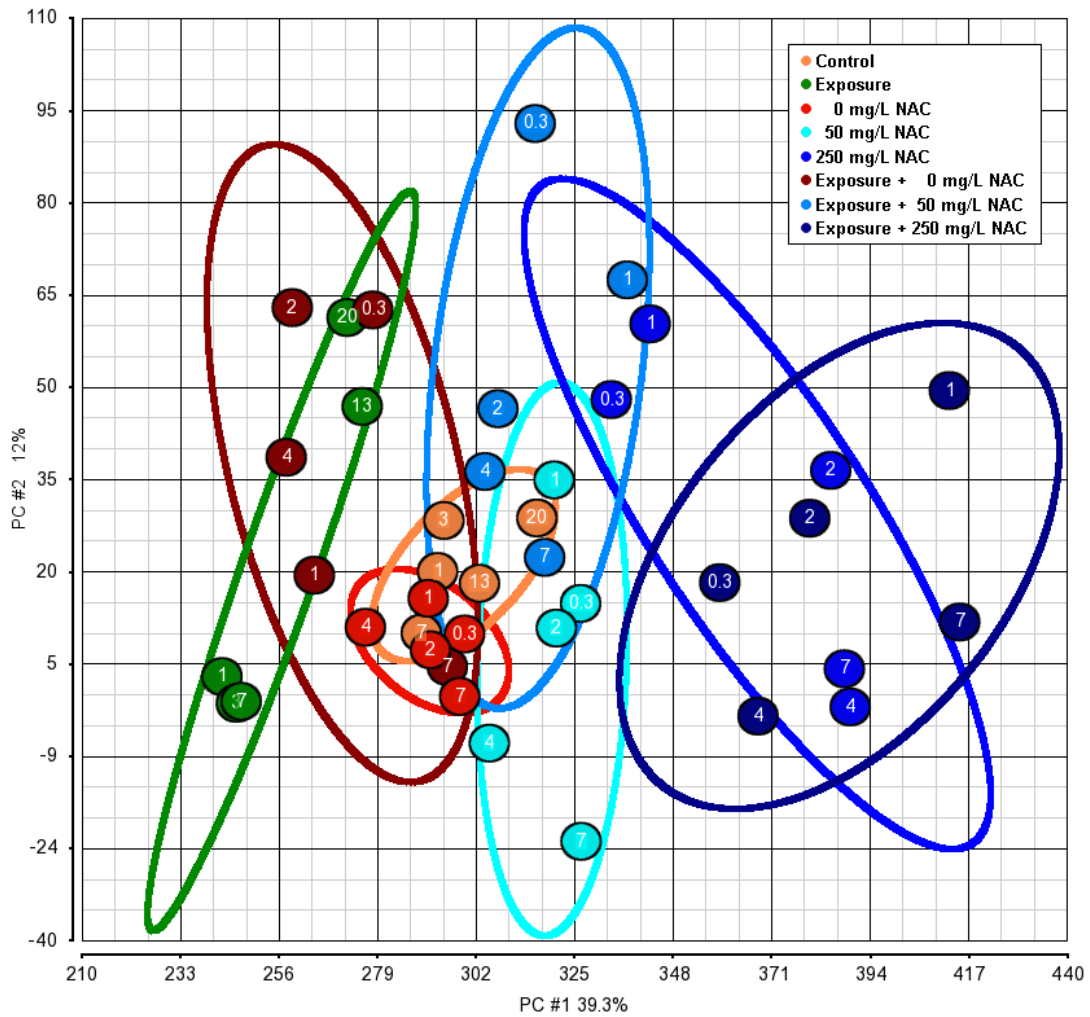
Appendix A. Supplementary Data

The following Supplementary Data section includes one figure explaining the experimental design, one figure describing the principal component analysis (PCS) of the glutathione metabolism, one table regarding the concentration of fenitrothion and phytoplankton in experimental tanks, and one table about the three-factorial ANOVA.



SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Schematic representation of the factorial experimental design used in the study of exposure of mussels to the OP pesticide fenitrothion and depurated/treated with different amounts of *N*-acetylcysteine (NAC). This experimental design was performed in duplicate, removing five mussels per treatment and sampling time during exposure and depuration (two for

pesticide analysis and three for biochemical analyses).



SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Principal component analysis of the glutathione metabolism (glutathione levels and enzyme activities) in mussels exposed (or not) to the OP pesticide fenitrothion and treated with different amounts of *N*-acetylcysteine (NAC). The numbers indicate the amount of days of exposure or deuration/treatment.

SUPPLEMENTARY TABLE 1. Measured concentrations of fenitrothion and phytoplankton in experimental tanks during the bioconcentration phase^a.

Days of Exposure	Fenitrothion concentration (ng/ml)	Phytoplankton concentration (10³ cells/ml)
0	209	18.4
2	219	19.2
4	217	18.4
6	210	19.2
8	190	20.4
10	241	19.2
12	228	20.0
14	196	19.2
16	204	19.6
18	219	17.6

^aSea water samplings were carried out before the renewal of the water solution, obtaining variation coefficients below 8%.

SUPPLEMENTARY TABLE 2. Effect of fenitrothion pre-exposure, NAC treatment, and depuration/treatment time (three-way ANOVA) on glutathione levels and enzyme activities.

	Pre-exposure (df = 1, 180)		NAC Treatment (df = 2, 180)		time (df = 4, 180)		Pre-exp × NAC (df = 2, 180)		Pre-exp × t (df = 4, 180)		Pre-exp × NAC × t (df = 8, 180)			
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p		
GSH	21.30	8·10⁻⁶	18.23	8·10⁻⁸	5.00	0.0008	2.81	0.06	0.13	0.97	1.72	0.10	0.66	0.73
GSSG	75.52	6·10⁻¹⁵	1.05	0.35	2.12	0.08	1.39	0.25	5.94	2·10⁻⁴	1.92	0.06	1.46	0.18
GSH/GSSG	14.19	2·10⁻⁴	40.90	7·10⁻¹⁵	4.81	0.0011	3.47	0.034	6.11	10⁻⁴	2.29	0.024	1.81	0.08
GR	0.66	0.42	28.03	4·10⁻¹¹	1.36	0.25	2.36	0.10	1.84	0.12	0.40	0.92	2.07	0.042
GST	2.03	0.16	47.03	10⁻¹⁶	2.59	0.039	5.07	0.007	1.00	0.41	0.81	0.60	0.52	0.84

Abbreviations: df, degrees of freedom

3.3.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

En el **Artículo científico 6** se han mostrado los resultados del análisis de ácido domoico en un estudio de depuración en moluscos bivalvos mediante la técnica HPLC-MS/MS.

Para la obtención de los resultados referentes a la depuración del ácido domoico en vieiras, se desarrolló previamente metodología analítica sensible que permitiera la detección de una amplia variedad de toxinas marinas que pudieran estar presentes en este tipo de organismos bivalvos. Para ello, se llevó a cabo la optimización de un método basado en HPLC-MS/MS capaz de detectar simultáneamente las toxinas más comúnmente reportadas en aguas europeas. La instrumentación analítica utilizada consistió en un sistema LC (Waters Alliance 2690) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Quattro LC,

Micromass) provisto de una interfase electrospray de tipo Z-spray. La selección de los compuestos a introducir en esta metodología se hizo en base a los patrones analíticos de referencia disponibles comercialmente en el momento de iniciar dicho estudio. En la **Figura 1** se pueden ver las estructuras químicas de todos los compuestos estudiados.

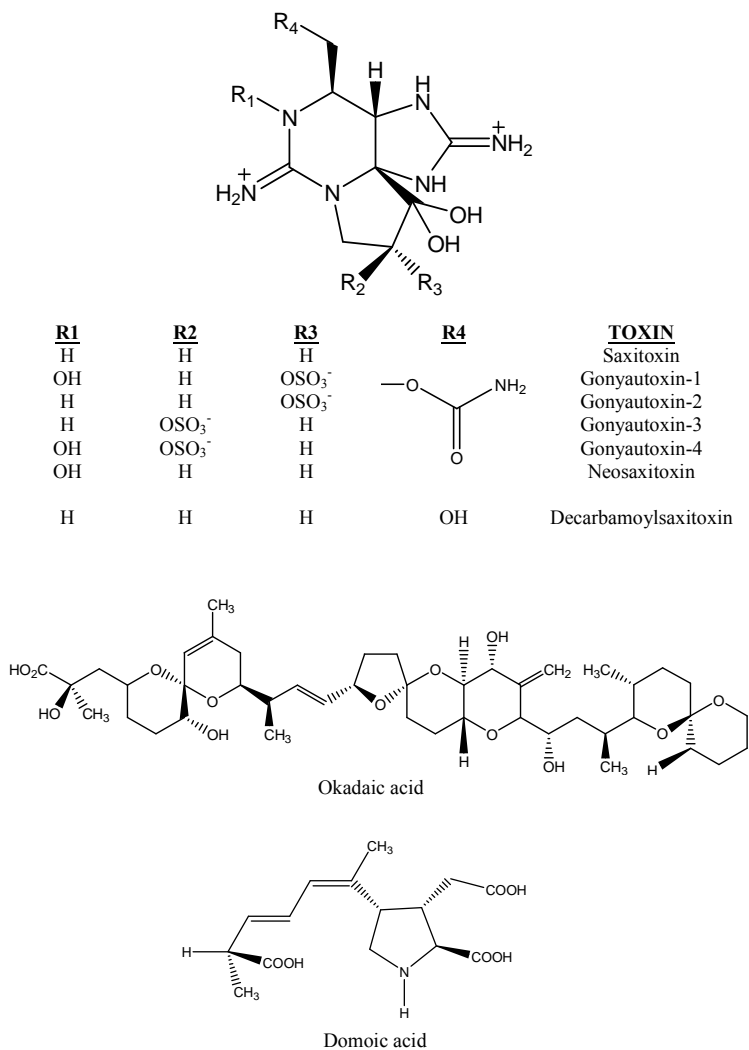


Figura 1. Estructura química de las toxinas marinas estudiadas.

Todos los patrones, a excepción del ácido domoico, se adquirieron disueltos en metanol (concentraciones en el rango 1-2.5 mg/L) en la Comisión Nacional de Investigación del Instituto de Biociencia Marina de Halifax, Canada (NRC-IMB). El ácido domoico se obtuvo en forma sólida de la casa comercial Fluka. Con la selección de estos compuestos se pretendió cubrir el análisis simultáneo de toxinas marinas correspondientes tanto al grupo de las DSP de elevado carácter lipofílico como toxinas ASP y PSP, con una elevada polaridad.

A continuación se describe el desarrollo y optimización de dicha metodología analítica:

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ESPECTROMÉTRICAS

La optimización de las condiciones espectrométricas para la determinación de las toxinas marinas se realizó mediante la adquisición de los correspondientes espectros en modo “*full-scan*” y “*product ion-scan*” de los patrones analíticos individuales a una concentración de 50 µg/L inyectados en el sistema cromatográfico.

Los espectros en modo *full-scan* utilizando una fuente de ionización electrospray mostraron que todos los compuestos presentaban ionización en modo positivo, observándose para la mayoría de ellos su correspondiente molécula protonada $[M+H]^+$. Sin embargo, tanto para el caso de las gonyautoxinas 1&4 como las gonyautoxinas 2&3, no se observó su correspondiente ión molecular ya que se produjo la pérdida de SO_3 por fragmentación en la fuente incluso trabajando a valores extremadamente bajos de energía de cono (2 V).

En el caso del ácido ocadaico (OA), se estudió su ionización tanto en modo positivo como en negativo ya que se encuentra reportado en bibliografía su determinación en ambos modos (Ciminiello et al., 2006, Dahlmann, Budakowski & Luckas, 2003, Fux, McMillan, Bire & Hess, 2007, García-Altare, Diogène & de la Iglesia, 2013, Gerssen, Van Olst, Mulder & De Boer, 2010). En la monitorización del ion molecular desprotonado $[M-H]^-$ en el espectro adquirido en modo *full-scan* no se observó ninguna señal a la masa 803.5, la cual debería corresponder a la masa del ion molecular desprotonado del ácido ocadaico. Por este motivo, se estudió el comportamiento de este compuesto bajo ionización en modo positivo. En esta ocasión se observó únicamente un pico a m/z 827.8 correspondiente al ion $[M+Na]^+$

posiblemente a consecuencia de la elevada afinidad de los cationes metálicos a unirse a los centros oxigenados (Ito & Tsukada, 2002). Debido a la falta de robustez que suelen presentar los aductos de sodio en su fragmentación se intentó promover la formación del aducto protonado o amoniado mediante la adición de acetato de amonio, aunque no se observaron los resultados deseados. La siguiente opción que se barajó fue la adición de sales de litio con el objetivo de minimizar el aducto de sodio y favorecer la formación de aductos de litio los cuales se caracterizan por presentar mejor fragmentación (Grimalt, Pozo, Marín, Sancho & Hernández, 2005). No obstante, tampoco se alcanzó el objetivo deseado y finalmente se seleccionó como ion precursor para el ácido ocaidaico su aducto de sodio. El estudio de la fragmentación de este compuesto demostró la imposibilidad de obtener iones fragmento por lo que la única alternativa posible fue monitorizar la transición 827.8>827.8, es decir una “pseudo” transición MS/MS. Esta alternativa ha sido aplicada en diferentes trabajos en los que ha sido imposible seleccionar un ión producto debido a las características físico químicas de la molécula (Hernández, Sancho & Pozo, 2005, Olsson et al., 2004, Sancho, Pozo & Hernández, 2000). La selección de una pseudo transición MS/MS optimizada a alta energía de colisión presenta las ventajas de una reducción en el ruido y mayor selectividad frente a una adquisición en modo SIM.

Con el fin de confirmar la identidad de los compuestos detectados, se seleccionaron 2 transiciones SRM por compuesto, normalmente seleccionando la transición con mayor intensidad con fines cuantitativos (Q) y la otra transición con el objetivo de confirmar (q). El OA fue la única excepción, ya que como se ha comentado anteriormente, únicamente se pudo monitorizar una transición SRM para este compuesto. Siempre que fue posible se evitó la selección de transiciones correspondientes a pérdidas poco específicas como es el caso de agua. En la **Tabla 1** se muestran las transiciones seleccionadas para cada uno de los compuestos estudiados, así como los voltajes de cono y energías de colisión optimizadas al igual que la relación de intensidades entre ambas transiciones.

Tabla 1. Parámetros espectrométricos optimizados para las toxinas seleccionadas.

Compuesto	t_r (min)	Ion Precursor (m/z)	Ion Producto (m/z)	Energía Cono (V)	Energía Colisión (eV)	Q/q ratio
DA	8.6	312.2	\underline{Q} 266.1 q 161.0	35	15 25	2.1
OA	15.2	827.8	\underline{Q} 827.8	55	35	-
STX	6.2	300.2	\underline{Q} 203.9 q 137.7	30	25 30	1.5
NEO	6.2	316.1	\underline{Q} 109.8 q 298.0	35	20 50	1.2
DcSTX	5.9	257.1	\underline{Q} 125.9 q 83.90	35	20 35	1.7
GTX-1&4	2.9	332.1	\underline{Q} 314.0 q 107.9	30 20	30 20	1.5
GTX-2&3	2.9	316.1	\underline{Q} 148.0 q 219.9	35	25 25	1.3

STX: saxitoxina; NEO: neosaxitoxina; DcSTX: decarbamoylsaxitoxina; GTX-1&4: gonyautoxina-1&4; GTX-2&3: gonyautoxina-2&3; DA: ácido domoico; OA: ácido ocaidaico

\underline{Q} : Transición cuantificación

q : Transición confirmación

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

La determinación simultánea de compuestos con elevada polaridad y compuestos apolares hizo necesario la optimización de una separación cromatográfica de compromiso que permitiera alcanzar este objetivo. Como ha sido descrito en la bibliografía, los compuestos lipofílicos como es el caso del ácido ocadaico, presentan una retención adecuada para ser analizados mediante cromatografía de fase reversa utilizando columnas C18 (Christian & Luckas, 2008a). Sin embargo, las toxinas correspondientes al grupo de las toxinas parálíticas (PSP) presentan una elevada polaridad lo cual dificulta su retención en columna de fase reversa. Este problema ha sido resuelto utilizando columnas cromatográficas de interacción hidrofílica o columnas de intercambio iónico (Dell'Aversano, Hess & Quilliam, 2005, Diener, Erler, Christian & Luckas, 2007, Jaime, Hummert, Hess & Luckas, 2001). Sin embargo, estas aproximaciones no son adecuadas para determinar compuestos de menor polaridad como es el ácido ocadaico y el ácido domoico. En este trabajo se planteó el uso de formadores de pares iónicos que permitieran la retención de compuestos iónicos gracias a la adición de un contraión el cual forma una especie neutra capaz de ser retenida en la columna C18.

Se utilizó el HFBA como formador del par iónico ya que las toxinas PSP se encontraban en forma catiónica. Se estudió la respuesta de los analitos y su retención en la columna cromatográfica tras la adición de diferentes concentraciones del formador de par iónico tanto en la fase móvil, como directamente en el extracto de muestra, así como en ambos lugares a la vez. La principal razón para adicionar el formador de par iónico en el vial de muestra fue evitar la continua entrada de este reactivo en el espectrómetro de masas. La pre-formación del par iónico en el vial ha sido una metodología utilizada satisfactoriamente en diferentes trabajos, obteniendo una retención en la columna adecuada, mejorando la sensibilidad a la obtenida cuando el reactivo está presente en la fase móvil (Hernández, Sancho, Pozo, Villaplana, Ibáñez & Grimalt, 2003).

Inicialmente, se añadió HFBA únicamente en el vial (25 mM) con el objetivo de minimizar la introducción de este reactivo en la fuente de ionización. Se observó que a excepción del grupo de las gonyautoxinas los compuestos presentaban una retención en la

columna adecuada con buena forma de pico (**Figura 2a**). Con el objetivo de favorecer la formación del par iónico en el grupo de las gonyautoxinas se comprobó el efecto de adicionar el formador de par iónico en la fase móvil (0.25 mM). Como puede observarse en la **Figura 2b**, la retención de los compuestos catiónicos mejoró, y en el caso de las gonyautoxinas se mejoró su señal. Sin embargo, esta adición continua al sistema del formador de par iónico produjo una disminución de la señal para el ácido ocadaico. La adición del HFBA tanto en el extracto como en la fase móvil mejoró la sensibilidad para STX y DcSTX, aunque comportó una reducción considerable en la señal del ácido ocadaico (**Figura 2c**). Finalmente, se decidió aumentar la concentración de HFBA a 0.5 mM en la fase móvil, aunque únicamente en la fase acuosa. Con ello se consiguió una adecuada retención de las toxinas PSP con buena forma de pico cromatográfico. Además, la adición de acetato de sodio (NaOAc) a una concentración 100 μ M en la fase orgánica permitió aumentar la reproducibilidad del ácido ocadaico mediante el aporte continuo de sodio a la fuente de ionización (**Figura 2d**). Se estudió el uso de concentraciones superiores de HFBA en la fase móvil, aunque fueron descartadas debido a un descenso en la señal de los compuestos.

Tabla 2. Parámetros cromatográficos

Columna Analítica:	Atlantis C18 5 μ m, 2.1 x 100 mm (Waters)
Flujo:	0.2 mL/min
Fase móvil:	A: H ₂ O 500 μ M HFBA B: ACN 100 μ M NaOAc
Gradiente:	0 min, 5% B 5 min, 25% B 9 min, 70% B 19 min, 90% B 19.1 min, 5% B

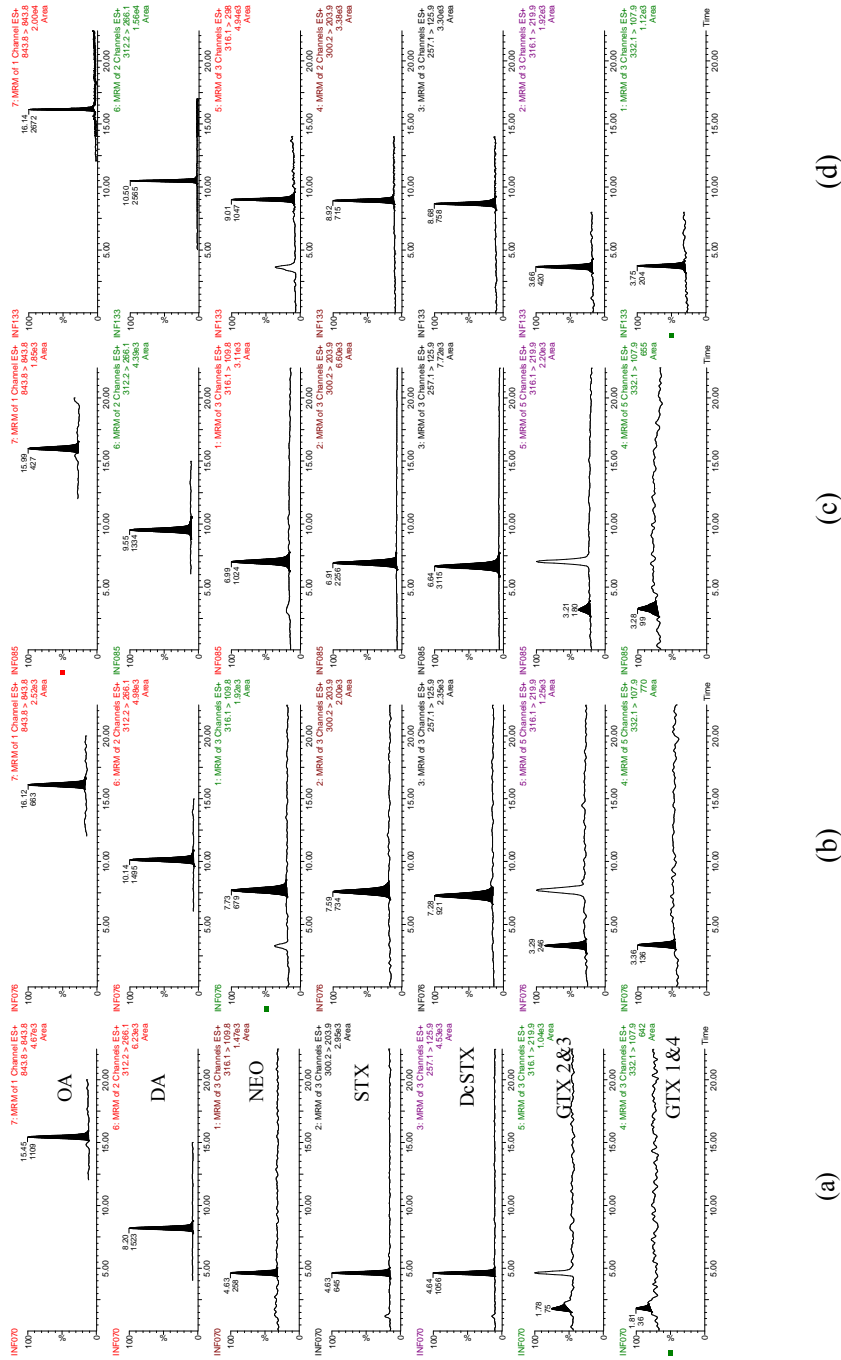


Figura 2. Cromatogramas LC-MS/MS obtenidos para una mezcla de patrones a 50 µg/L después de añadir: (a) HFBA 25 mM en el vial; (b) HFBA 0.25 mM en la fase móvil; (c) HFBA 25 mM en el vial y 0.25 mM en la fase móvil; y, (d) HFBA 0.5 mM en la fase móvil.

Como puede observarse en la **Figura 2**, los pares estereoisoméricos que forman las toxinas GTX1 y GTX4, al igual que las GTX2 y GTX3 se determinaron de manera conjunta ya que no fue posible su separación cromatográfica utilizando una columna de fase reversa C18. Este problema de separación cromatográfica se ha resuelto recientemente con el uso de columnas HILIC (Zhuo et al., 2013).

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

La extracción se llevo a cabo mediante el uso de un homogeneizador de alta velocidad (Ultra-Turrax® T25). Para ello, se pesaron 2 g de la parte comestible de molusco bivalvo (1 g en el caso de glándula digestiva) y se extrajeron durante 2 min. a 8000 rpm con 7.5 mL de una mezcla agua:metanol (1:1). A continuación, el extracto se centrifugó durante 15 minutos a 3500 rpm. Posteriormente, se recogió el sobrenadante y se llevó a un matraz aforado de 10 mL el cual se enrasó con la mezcla de extracción. Después, se tomó una alícuota de 1 mL del extracto, previamente filtrado a través de un filtro de jeringa de nylon de 0.45 μm , y se diluyó con agua HPLC a un volumen final de 10 mL con el objetivo de reducir el contenido de disolvente orgánico y minimizar la presencia de matriz. Finalmente 20 μL del extracto diluido se inyectaron al sistema cromatográfico siguiendo las condiciones optimizadas en los apartados anteriores (**Tablas 1 y 2**).

El proceso de cuantificación se llevó a cabo mediante el uso de curvas de calibrado preparadas con patrones de referencia en solvente. Para realizar la validación de la metodología, así como las muestras de control de calidad (QCs) se utilizaron muestras blanco de mejillones (*Mytilus Galloprovincialis*) adquiridas en un mercado local.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La metodología desarrollada fue validada antes de ser aplicada al análisis de muestras.

La precisión y exactitud del método, expresada como recuperación, se estudió mediante el uso de materiales de referencia certificados para el caso del ácido domoico y ocaidaico suministrados por el NRC-IMB de Canadá. En ambos casos se trataba de muestras de mejillón (NRC CRM-ASp-mus-c, 41 ± 2 mg/Kg de ácido domoico, y NRC CRM-DSP-mus-b, 10.1 ± 0.8 mg/Kg de ácido ocaidaico). Los resultados obtenidos mostraron recuperaciones satisfactorias (99 y 91%, respectivamente) con una precisión expresada como desviación estándar relativa (RSD) del 2% para ambos compuestos ($n=3$).

Adicionalmente, se evaluó la precisión y exactitud del método para el ácido domoico mediante ensayos de recuperación en muestras de mejillón fortificadas a diferentes concentraciones. Para ello, se fortificó una muestra blanco de mejillón con ácido domoico a 3 niveles de concentración (0.1, 2 y 50 mg/Kg). El experimento se realizó por quintuplicado. Los resultados mostraron recuperaciones satisfactorias (88-104 %), con RSDs comprendidas entre 6 y 14 %. En la **Figura 3** se puede observar a modo de ejemplo los cromatogramas correspondientes a la transición SRM de cuantificación para cada una de las toxinas estudiadas en una muestra blanco (**Fig. 3a**), muestra blanco fortificada al nivel 0.1 mg/Kg con ácido domoico (**Fig. 3b**), y un patrón mezcla de toxinas de 25 $\mu\text{g/L}$ (**Fig. 3c**). Asimismo, el análisis de un blanco de procedimiento unido al análisis de la muestra blanco y la muestra fortificada permitió evidenciar la especificidad del método.

Todos los compuestos estudiados mostraron curvas de calibrado lineales con coeficientes de correlación (R^2) con valores superiores a 0.99. Se establecieron los límites de detección instrumentales (LODs) como la concentración más baja para la cual la relación S/N fue 3, obteniendo valores en el rango 1-5 $\mu\text{g/L}$. En el caso del ácido domoico, al disponer de muestras fortificadas, se estableció su límite de cuantificación (LOQ) como la concentración más baja validada correspondiendo a 0.1 mg/Kg.

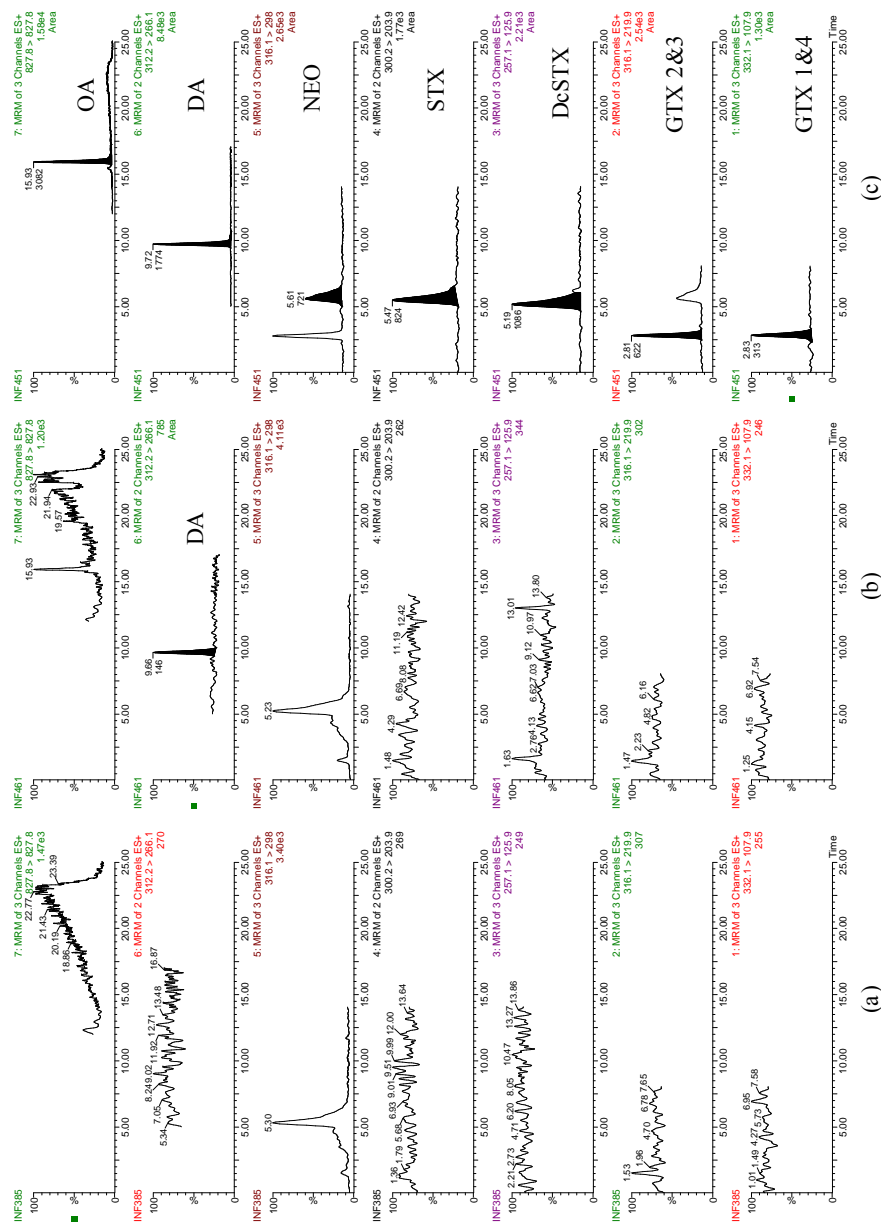


Figura 3. Cromatogramas LC-MS/MS en muestras de mejillón:
 (a) Muestra de mejillón blanco
 (b) Blanco de mejillón fortificado al nivel mas bajo validado (0.1 mg/Kg)
 (c) Mezcla de patrones a 25 µg/L

APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS

El procedimiento optimizado se aplicó al análisis de muestras de vieiras (*Pecten Maximus*) correspondientes a un ensayo de depuración mediante el uso de N-acetil-L-cisteína (NAC) como acelerante del proceso de depuración (Peña-Llopis, Ferrando & Peña, 2003, Peña-LLópez, S., Peña, J.B., Serrano, R., 2006). Las muestras se recogieron en Febrero de 2006 en la costa occidental mediterránea, después de un “bloom” de algas atribuido a la especie de diatomeas *Pseudo-nitzchia sp.* Después de su recogida, estas muestras se llevaron al laboratorio y se introdujeron en 3 tanques distintos (0, 50 y 250 mg/L NAC) en los que se llevó a cabo su depuración. Se tomaron muestras a 0, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 días después de introducirse en los tanques de depuración según se detalla en el apartado “Depuration of microalgae-intoxicated King scallops with NAC” en **Artículo científico 6**.

Todas las muestras, tras su recolección, se diseccionaron en 2 partes, la parte comestible que contenía el musculo aductor y el manto, y la fracción correspondiente a la glándula digestiva. Cada una de las partes se analizó siguiendo el procedimiento descrito. Para asegurar el control de calidad en el análisis, se añadieron muestras blanco fortificadas con ácido domoico a los niveles LOQ (0.1 mg/Kg) y 10 LOQ (1 mg/Kg) como controles de calidad (QC), los cuales fueron cuantificados del mismo modo que las muestras. Para dar validez a los resultados obtenidos se requirió que la concentración de ácido domoico cuantificada en las muestras QC estuviera dentro del rango 80-120 % del valor esperado. Los resultados demostraron la presencia de ácido domoico tanto en la parte comestible como en la glándula digestiva de la muestra correspondiente a tiempo cero, es decir, sin depurar. En la parte comestible se detectó una concentración de 1.0 mg/Kg, mientras que en la glándula digestiva esta concentración alcanzó los 7.6 mg/Kg. En el resto de muestras, la concentración de ácido domoico fue disminuyendo con el tiempo a medida que se producía la depuración.

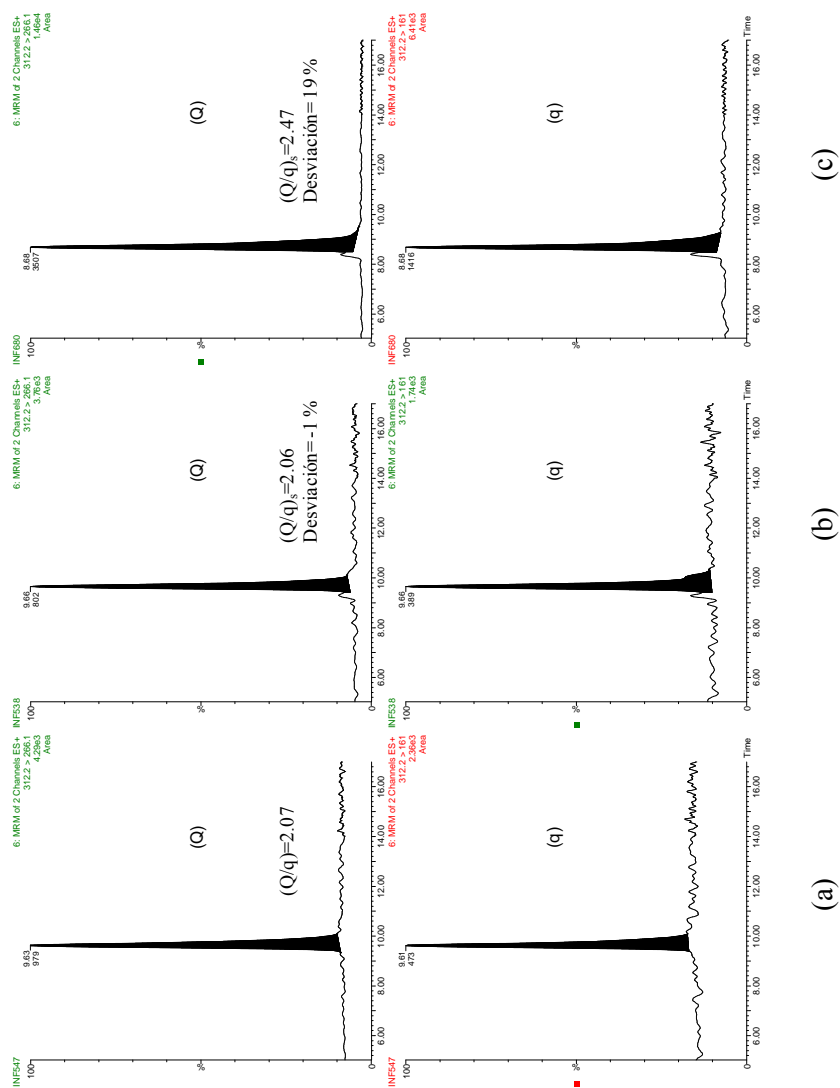


Figura 4. Cromatogramas LC-MS/MS para una muestra de vieira:

- (a) Patrón de ácido domoico 25 µg/L
- (b) Parte comestible vieira (21 µg/L ácido domoico en extracto, 1 mg/Kg en muestra)
- (c) Glandula digestiva (79 µg/L ácido domoico en extracto, 7.6 mg/kg en muestra)

Todos los resultados positivos detectados se confirmaron mediante el cálculo de la relación de intensidades entre la transición de cuantificación y la de confirmación. Se estableció una desviación máxima de un 20% respecto al valor calculado en una muestra patrón (European Commission, 2011). En la **Figura 4**, se muestra a modo de ejemplo la confirmación de las muestras de parte comestible y glándula digestiva contaminadas con ácido domoico correspondientes a tiempo cero.

ANÁLISIS TOXICOCINÉTICO

El análisis de las muestras recogidas a diferentes tiempos de depuración, mostró como era de esperar una disminución de la concentración de ácido domoico con el tiempo. Se asumió una cinética de depuración del ácido domoico en vieiras de primer orden, por lo que se representó el logaritmo neperiano de la concentración de ácido domoico en la parte comestible de las vieiras frente al tiempo de depuración y se ajustó a una recta ($\ln C_t = \ln C_0 - k_2 t$) como puede observarse en la **Figura 5** del **Artículo científico 6**. Los valores toxicocinéticos de depuración del ácido domoico tras la adición de NAC pueden observarse en la **Tabla 7** del **Artículo científico 6**.

Los resultados demostraron que las vieiras naturalmente contaminadas con ácido domoico necesitaron 35 días para conseguir la depuración, mientras que este valor se redujo 4 veces ante la presencia de 250 mg/L de NAC. Además, puede observarse que la depuración es dependiente de la concentración de NAC. Únicamente las muestras tratadas con una concentración mayor de NAC consiguieron reducir drásticamente la concentración de ácido domoico en las partes comestibles de la vieira, disminuyendo de este modo la posible intoxicación por consumo de alimentos contaminados con toxinas marinas.

3.4. REFERENCIAS

- Barco, M., Flores, C., Rivera, J., & Caixach, J. (2004). *Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of Planktothrix (Oscillatoria) rubescens in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS*. *Toxicon*, 44(8), 881-886.
- Botana L.M. (2000). *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, physiology and detection*. Ed. Marcel Dekker.
- Chianella, I., Lotierzo, M., Piletsky, S. A., Tothill, I. E., Chen, B., Karim, K., & Turner, A. P. F. (2002). *Rational design of a polymer specific for microcystin-LR using a computational approach*. *Analytical Chemistry*, 74(6), 1288-1293.

- Chiuminatto, U., Gosetti, F., Dossetto, P., Mazzucco, E., Zampieri, D., Robotti, E., Gennaro, M. C., & Marengo, E. (2010). *Automated online solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry for determination of forty-two therapeutic drugs and drugs of abuse in human urine*. *Analytical Chemistry*, 82(13), 5636-5645.
- Chorus, I., Bartram, J. (Eds) (1999). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Published by WHO, Spon Press.
- Christian, B., & Luckas, B. (2008a). *Determination of marine biotoxins relevant for regulations: From the mouse bioassay to coupled LC-MS methods*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1), 117-134.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Santelia, F., & Tsoukatou, M. (2006). *Investigation of the toxin profile of Greek mussels *Mytilus galloprovincialis* by liquid chromatography - Mass spectrometry*. *Toxicol*, 47(2), 174-181.
- Codd, G. A., Morrison, L. F., & Metcalf, J. S. (2005). *Cyanobacterial toxins: risk management for health protection*. *Toxicology and applied pharmacology*, 203(3), 264-272.
- Cong, L., Huang, B., Chen, Q., Lu, B., Zhang, J., & Ren, Y. (2006). *Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 569(1-2), 157-168.
- Dahlmann, J., Budakowski, W. R., & Luckas, B. (2003). *Liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine*

waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. Journal of Chromatography A, 994(1-2), 45-57.

Dawson, R. M. (1998). *The toxicology of microcystins.* Toxicon, 36(7), 953-962.

Decisión 2002/657/CE de la Comisión de 12 de Agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario oficial de la Unión Europea L221 (2002) pp 8-36.

Dell'Aversano, C., Hess, P., & Quilliam, M. A. (2005). *Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins.* Journal of Chromatography A, 1081(2), 190-201.

Diener, M., Erler, K., Christian, B., & Luckas, B. (2007). *Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins.* Journal of Separation Science, 30(12), 1821-1826.

EFSA, 2009. *Marine biotoxins in shellfish. Summary on regulated marine biotoxins. Scientific Opinion of the Panel on contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish.* The EFSA Journal, 1306 (2009), 1-23.

Funari, E., & Testai, E. (2008). *Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure.* Critical reviews in toxicology, 38(2), 97-125.

Fux, E., McMillan, D., Bire, R., & Hess, P. (2007). *Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins.* Journal of Chromatography A, 1157(1-2), 273-280.

- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., & Galceran, M. T. (2010). *On-line solid phase extraction fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples*. *Journal of Chromatography A*, 1217(21), 3511-3518.
- García-Altare, M., Diogène, J., & de la Iglesia, P. (2013). *The implementation of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the official control of lipophilic toxins in seafood: Single-laboratory validation under four chromatographic conditions*. *Journal of Chromatography A*, 1275, 48-60.
- Garthwaite, I. (2000). *Keeping shellfish safe to eat: a brief review of shellfish toxins, and methods for their detection*. *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 235-244.
- Gerssen, A., Van Olst, E. H. W., Mulder, P. P. J., & De Boer, J. (2010). *In-house validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of lipophilic marine toxins in shellfish using matrix-matched calibration*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(7), 3079-3088.
- Gosetti, F., Chiuminatto, U., Zampieri, D., Mazzucco, E., Robotti, E., Calabrese, G., Gennaro, M. C., & Marengo, E. (2010). *Determination of perfluorochemicals in biological, environmental and food samples by an automated on-line solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method*. *Journal of Chromatography A*, 1217(50), 7864-7872.
- Grimalt, S., Pozo, Ó. J., Marín, J. M., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2005). *Evaluation of different quantitative approaches for the determination of noneasily ionizable molecules by different atmospheric pressure interfaces used in liquid chromatography tandem mass spectrometry: Abamectin as case of study*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(10), 1619-1630.

- Hashimoto, T., Nishio, S., Nishibori, N., Yoshioka, S., & Noguchi, T. (2002). *A new analytical method for gonyautoxins based on postcolumn HPLC*. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 43(3), 144-147.
- Hennion, M. (1999). *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 856(1-2), 3-54.
- Hernández, F., Sancho, J. V., & Pozo, O. J. (2005). *Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382(4), 934-946.
- Hernández, F., Sancho, J. V., Pozo, Ó. J., Villaplana, C., Ibáñez, M., & Grimalt, S. (2003). *Rapid Determination of Fosetyl-Aluminum Residues in Lettuce by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry*. Journal of AOAC International, 86(4), 832-838.
- Hitzfeld, B. C., Höger, S. J., & Dietrich, D. R. (2000). *Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment, and human risk assessment*. Environmental health perspectives, 108(SUPPL. 1), 113-122.
- Ito, S., & Tsukada, K. (2002). *Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins*. Journal of Chromatography A, 943(1), 39-46.
- Jaime, E., Hummert, C., Hess, P., & Luckas, B. (2001). *Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography*. Journal of Chromatography A, 929(1-2), 43-49.
- Lawton, L. A., Edwards, C., & Codd, G. A. (1994). *Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters*. Analyst, 119(7), 1525-1530.

- MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P., & Codd, G. A. (1990). *Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants*. FEBS letters, 264(2), 187-192.
- Marín, J. M., Pozo, Ó. J., Beltrán, J., & Hernández, F. (2006). *An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20(3), 419-426.
- Marín, J. M., Sancho, J. V., Pozo, O. J., López, F. J., & Hernández, F. (2006). *Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1133(1-2), 204-214.
- Mbukwa, E. A., Msagati, T. A. M., & Mamba, B. B. (2013). *Preparation of guanidinium terminus-molecularly imprinted polymers for selective recognition and solid-phase extraction (SPE) of [arginine]-microcystins*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 1-15.
- McElhiney, J., & Lawton, L. A. (2005). *Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins*. Toxicology and applied pharmacology, 203(3 SPEC. ISS.), 219-230.
- McNabb, P., Selwood, A. I., & Holland, P. T. (2005). *Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish: Single-laboratory validation and interlaboratory study*. Journal of AOAC International, 88(3), 761-772.
- Mekebri, A., Blondina, G. J., & Crane, D. B. (2009). *Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1216(15), 3147-3155.

- Miraglia, M., Marvin, H. J. P., Kleter, G. A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R. W. A., Noordam, M. Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., van den Born, G. J., & Vespermann, A. (2009). *Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe*. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 1009-1021.
- Moreno, I., Repetto, G., Carballal, E., Gago, A., & Cameán, A. M. (2005). *Cyanobacteria and microcystins occurrence in the Guadiana River (SW Spain)*. *International journal of environmental analytical chemistry*, 85(7), 461-474.
- Msagati, T. A. M., Siame, B. A., & Shushu, D. D. (2006). *Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins*. *Aquatic Toxicology*, 78(4), 382-397.
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W. W., & Fujiki, H. (1992). *Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR*. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 118(6), 420-424.
- Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Martins, C. P. B., & Lucci, P. (2012). *New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis*. *Journal of Chromatography A*, 1228, 298-323.
- Oehrle, S. A., Southwell, B., & Westrick, J. (2010). *Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Toxicon*, 55(5), 965-972.
- Olsson, A. O., Baker, S. E., Nguyen, J. V., Romanoff, L. C., Udunka, S. O., Walker, R. D., Flemmen, K. L., & Barr, D. B. (2004). *A Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Multiresidue Method for Quantification of Specific Metabolites*

of Organophosphorus Pesticides, Synthetic Pyrethroids, Selected Herbicides, and DEET in Human Urine. Analytical Chemistry, 76(9), 2453-2461.

Paredes, I., Rietjens, I. M. C. M., Vieites, J. M., & Cabado, A. G. (2011). *Update of risk assessments of main marine biotoxins in the European Union.* Toxicon, 58(4), 336-354.

Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., & Neilan, B. (2010). *On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin.* Marine Drugs, 8(5), 1650-1680.

Peña-LLópis, S., Peña, J.B., Serrano, R. (2006). *Método para la detoxificación y depuración de contaminantes orgánicos en moluscos bivalvos y su aplicación.* Patent number:P200600493, Spain.

Peña-Llopis, S., Ferrando, M. D., & Peña, J. B. (2003). *Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine.* Aquatic Toxicology, 65(4), 337-360.

Pozo, O. J., Guerrero, C., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Pitarch, E., Hogendoorn, E., & Hernández, F. (2006). *Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 1103(1), 83-93.

Quilliam, M. A. (2003). *The role of chromatography in the hunt for red tide toxins.* Journal of Chromatography A, 1000(1-2), 527-548.

Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Boletín Oficial del Estado. Gobierno de España N°45 (2003) pp 7228-7245.

- Reglamento 2004/853/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal- Diario Oficial de la Unión Europea L139 (2004) pp 55-206.
- Reglamento 2005/2074/CE de la Comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L338 (2005) pp 27-59
- Reglamento 2011/15/CE de la Comisión de 10 de enero de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos. Diario Oficial de la Unión Europea L6 (2011) pp 3-6.
- Richardson, S. D., & Ternes, T. A. (2011). *Water analysis: Emerging contaminants and current issues*. Analytical Chemistry, 83(12), 4616-4648.
- Ripollés, C., Marín, J. M., Sancho, J. V., López, F. J., & Hernández, F. (2011). *Analytical study on ethephon residue determination in water by ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. International journal of environmental analytical chemistry, 91(14), 1380-1391.
- Romo, S., Fernández, F., Ouahid, Y., & Barón-Sola, Á. (2012). *Assessment of microcystins in lake water and fish (Mugilidae, Liza sp.) in the largest Spanish coastal lake*. Environmental monitoring and assessment, 184(2), 939-949.
- Sancho, J. V., Ibáñez, M., Grimalt, S., Pozo, Ó. J., & Hernández, F. (2005). *Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 530(2), 237-243.

- Sancho, J. V., Pozo, O. J., & Hernández, F. (2000). *Direct determination of chlorpyrifos and its main metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in human serum and urine by coupled-column liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14(16), 1485-1490.
- Sangolkar, L. N., Maske, S. S., & Chakrabarti, T. (2006). *Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria*. *Water research*, 40(19), 3485-3496.
- Sayfritz, S. J., Aasen, J. A. B., & Aune, T. (2008). *Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection*. *Toxicon*, 52(2), 330-340.
- Stoob, K., Singer, H. P., Goetz, C. W., Ruff, M., & Mueller, S. R. (2005). *Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters*. *Journal of Chromatography A*, 1097(1-2), 138-147.
- Triantis, T., Tsimeli, K., Kaloudis, T., Thanassoulas, N., Lytras, E., & Hiskia, A. (2010). *Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters*. *Toxicon*, 55(5), 979-989.
- Turrell, E., Stobo, L., Lacaze, J. -, Piletsky, S., & Piletska, E. (2008). *Optimization of hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry and development of solid-phase extraction for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins*. *Journal of AOAC International*, 91(6), 1372-1386.
- Van Apeldoorn, M. E., Van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A., & Bakker, G. J. I. (2007). *Toxins of cyanobacteria*. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(1), 7-60.

- Van Dolah, F. M. (2000). *Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence*. Environmental health perspectives, 108(SUPPL. 1), 133-141.
- Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2012). *Development and optimisation of an on-line solid phase extraction coupled to ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the simultaneous determination of endocrine disrupting compounds in wastewater samples*. Journal of Chromatography A, 1230, 66-76.
- Wang, J., Pang, X., Ge, F., & Ma, Z. (2007). *An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China*. Toxicon, 49(8), 1120-1128.
- WHO. *World Health Organization, Guidelines for Drinking-Water Quality*. Second edition, Addendum to Volume 2, Health Criteria and Other Supporting Information, Geneva, 1998.
- Xu, W., Chen, Q., Zhang, T., Cai, Z., Jia, X., Xie, Q., & Ren, Y. (2008). *Development and application of ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples*. Analytica Chimica Acta, 626(1), 28-36.
- Zhuo, L., Yin, Y., Fu, W., Qiu, B., Lin, Z., Yang, Y., Zheng, L., Li, J., & Chen, G. (2013). *Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC-MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction*. Food Chemistry, 137(1-4), 115-121.



CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

La *conclusión general* derivada de los trabajos realizados en la presente Tesis Doctoral es que la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con analizador de triple cuadrupolo (LC-MS/MS), y en especial la cromatografía de ultra resolución (UHPLC), es la técnica con mayor potencial en la actualidad para la determinación de toxinas naturales. La elevada robustez de los métodos desarrollados, unido a la elevada sensibilidad y selectividad, corrobora la actual tendencia en el empleo de esta técnica para obtener resultados rápidos y de elevada fiabilidad en el campo de la seguridad alimentaria.

De los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes *conclusiones específicas*:

1. La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) es una técnica poderosa para la determinación multianalito de tóxicos naturales debido a su elevada sensibilidad y selectividad, capaz de abordar análisis cuantitativos de manera rápida y fiable.
2. La cromatografía líquida de ultra resolución (UHPLC) es una técnica valiosa para el desarrollo de métodos de análisis rápidos. Proporciona una resolución de pico cromatográfico mejorada frente a la cromatografía de alta resolución (HPLC), aumentando la sensibilidad del método.
3. La elevada selectividad de los analizadores de triple cuadrupolo permiten la minimización del tratamiento de muestra, utilizando la aproximación “*dilute and shoot*”, eliminando etapas de purificación que podrían comprometer la determinación simultánea de analitos con propiedades físico-químicas diferentes.

4. El uso de calibrado en matriz ha resultado ser una herramienta eficaz para la corrección del efecto matriz asociado al proceso de ionización en la fuente electrospray (ESI) con el fin de asegurar una correcta cuantificación de los analitos. Adicionalmente, la elevada sensibilidad aportada por los instrumentos de nueva generación utilizados en los trabajos, ha permitido la dilución de los extractos previamente a su análisis, minimizando la introducción de compuestos presentes en la matriz que puedan influir en la eficiencia de ionización de los analitos.
5. La metodología desarrollada para el análisis de micotoxinas en esta Tesis ha permitido el análisis de muestras pertenecientes a un estudio de dieta total (EDT) de la Comunidad Valenciana para determinar la exposición a este tipo de tóxicos a través de la alimentación en la población de esta región.
6. La utilización de la extracción en fase sólida (SPE) ha permitido la pre-concentración de los analitos de manera efectiva con el objetivo de mejorar la sensibilidad del método en aquellos casos en los que resultaba insuficiente. En el caso de las micotoxinas, la utilización de rellenos basados en anticuerpos inmunes ha demostrado ser la alternativa más eficaz para la determinación de aflatoxinas y ocratoxina A de una manera altamente selectiva a concentraciones sub- $\mu\text{g/Kg}$.
7. El empleo de la interfase de ionización química a presión atmosférica (APCI) ha posibilitado resolver los problemas asociados al acusado efecto matriz observado en la interfase electrospray en el análisis de patulina en muestras de manzana y productos derivados. Esta alternativa ha permitido el análisis de muestras líquidas mediante inyección directa al sistema cromatográfico tras una simple etapa de dilución.

8. La utilización de la SPE en línea mediante el acoplamiento SPE-UHPLC-MS/MS ha demostrado ser de gran utilidad para la determinación rápida y reproducible de microcistinas y nodularina en muestras de aguas de una manera automatizada, minimizando la manipulación de muestra y el consumo de disolventes asociado al proceso fuera de línea. Gracias a la pre-concentración realizada se ha conseguido la determinación de este tipo de tóxicos a concentraciones inferiores al valor de 1 µg/Kg de microcistina-LR establecido en la legislación española.
9. El uso del ácido heptafluorobutírico (HFBA), (reactivo formador de par iónico), ha sido la solución para la determinación simultánea de toxinas marinas con amplios rangos de polaridad (desde compuestos iónicos a compuestos de elevada apolaridad) mediante cromatografía en columna de fase reversa.
10. El análisis de muestras de moluscos bivalvos naturalmente contaminados y expuestos a un proceso de depuración ha permitido establecer la cinética de depuración del ácido domoico en vieiras (*Pecten Maximus*), observándose un aumento de la velocidad de depuración ante el tratamiento de los moluscos con 250 mg/L de N-acetilcisteína.
11. La metodología analítica desarrollada y empleada en esta Tesis Doctoral se ha validado de acuerdo con las recomendaciones recogidas en las guías europeas (principalmente, Guías SANCO) considerando como parámetros esenciales: linealidad, especificidad, exactitud y precisión, límite de cuantificación y límite de detección.
12. La monitorización de varias transiciones SRM por compuesto, posible gracias a la elevada velocidad de adquisición de los instrumentos de triple cuadrupolo utilizados en esta Tesis, ha permitido la cuantificación y posterior confirmación mediante el cumplimiento de las relaciones de intensidad entre las transiciones

seleccionadas con tan solo una única inyección a niveles de concentración extremadamente bajos, del orden de ng/Kg.

The **general conclusion** of this Thesis is that liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with triple quadrupole analyzer (LC-MS/MS), and especially the ultra resolution liquid chromatography (UHPLC), at present has the best potential for for the determination of natural toxins. The high robustness of the methods developed, together with the high sensitivity and selectivity obtained, supports the current trend in the use of this technique for highly reliable and quick results in food safety.

As a result of the research performed in this work, several specific conclusions can be extracted:

1. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is a powerful technique for the determination of natural toxins due to its high sensitivity and selectivity, performing a quick and reliable quantitative analysis.
2. The ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) is a valuable technique for the development of rapid analytical methods, providing improved resolution of chromatographic peak in contrast to high performance liquid chromatography (HPLC), obtaining increased method sensitivity.
3. The high selectivity of triple quadrupole analyzers allows the minimization of sample treatment, using the approximation “dilute and shoot”, eliminating purification steps that could compromise the simultaneous determination of analytes with different physicochemical properties.
4. Matrix matched calibration has been demonstrated to be an effective tool to correct for matrix effects associated with the ionization process in the electrospray source (ESI). Additionally, the high sensitivity provided by the new generation instruments used in this work has allowed the dilution of the extracts prior its injection to the chromatographic system, minimizing the

introduction of compounds present in the matrix which may influence in the ionization efficiency of the analytes.

5. The development of multianalyte methodology has allowed the analysis of mycotoxins in samples of a Total Diet Study (TDS) from the Valencian Community, in order to determine the exposure to these toxic compounds through the food ingested.
6. The use of solid phase extraction (SPE) has allowed the effective pre-concentration of the analytes in order to improve the sensitivity of the method when it is required. In the case of mycotoxins, the use of immunoaffinity columns proved to be the most effective alternative for a highly selective determination of aflatoxins and ochratoxin A at concentrations sub- $\mu\text{g}/\text{Kg}$.
7. The use of the atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source has solved the problems associated with matrix effects observed in the electrospray (ESI) source in the analysis of patulin in apple and derivative products. This alternative has allowed analysis of liquid samples by direct injection to the chromatographic system after a simple dilution step.
8. The online coupling SPE-UHPLC-MS/MS has been proved very useful for a rapid, reproducible and automated determination of microcystins and nodularin in water samples, minimizing sample handling and solvent consumption when compared to the off-line process. The pre-concentration has allowed the determination of such toxins at concentrations below the $1 \mu\text{g}/\text{L}$ established for microcystin-LR in the Spanish legislation as maximum permitted level.
9. Heptafluorobutyric acid (HFBA) (ion-pairing reagent) has been employed for the simultaneous determination of marine toxins with a wide range of polarity

(from ionic compounds to compounds of high apolarity) by chromatography on reverse phase columns.

10. The analysis of naturally contaminated bivalves with domoic acid and exposed to a controlled depuration process has allowed to establish the depuration kinetics in Scallop (*Pecten Maximus*), observing a faster depuration after the treatment with 250 mg/L of N-Acetylcysteine.
11. The analytical methodologies developed and used in this Thesis have been validated according to the recommendations of European guidelines (mainly SANCO guides) considering as essential parameters: linearity, specificity, accuracy and precision, limit of quantification and detection.
12. The acquisition of several SRM transitions per compound, carried out thanks to the fast-acquisition triple quadrupole instruments used in this Thesis, has allowed the quantification and the confirmation by the accomplishment of the intensity ratios between selected transitions with a single injection even at extremely low concentration levels of ng/Kg.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS QUE COMPONEN LA TÉSIS DOCTORAL

Artículo científico 1

Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry

Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Hernández, F.

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 23 (2009) 1801-1809

Artículo científico 2

Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study

Beltrán, E., Ibáñez, M., Portolés, T., Ripollés, C., Sancho, J.V., Yusà, V., Marín, S., Hernández, F.

Analytical Chimica Acta, 783 (2013) 39-48

Artículo científico 3

UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk

Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Cortés, M.A., Yusà, V., Hernández, F.

Food Chemistry, 126 (2011) 737-744

Artículo científico 4

Determination of patulin in apple and derived products by UHPLC-MS/MS. Study of matrix effects with atmospheric pressure ionisation sources

Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Hernández, F.

Food Chemistry, 142 (2014) 400-407

Artículo científico 5

Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction-ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry

Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Hernández, F.

Journal of Chromatography A, 1266 (2012) 61-68

Artículo científico 6

N-Acetylcysteine boosts xenobiotic detoxification in shellfish

Peña-Llópiz, S., Serrano, R., Pitarch, E., Beltrán, E., Ibáñez, M., Hernández, F., Peña, J.B.

Enviado para su publicación (Aquatic Toxicology)

OTROS ARTÍCULOS RELACIONADOS

- *Faces of a changing climate: semi-quantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in Norway*
Uhlig, S., Eriksen, G.S., Hofgaard, I.S., Krska, R., Beltrán, E., Sulyok, M.
Toxins, 5(10) (2013) 1682-1697

- *Fungal and bacterial metabolite contamination of stored maize (Zea mays, L.) grains from five agro-ecological zones of Nigeria and potential health hazards*
Adetunji, M., Atanda, O., Ezekiel, C., Sulyok, M., Warth, B., Beltrán, E., Krska, R., Obadina, O., Bakare, A., Chilaka, C.
Enviado para su publicación (Chemosphere)

- *Updated analytical methodology based on ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the sensitive determination of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater*
Bijlsma, L., Beltrán, E., Boix, C., Sancho, J.V., Hernández, F.
Enviado para su publicación (Analytical and Bioanalytical Chemistry)

- *Application of liquid chromatography/mass spectrometry in assessment of potential use of azadirachtins (TreeazinTM) against Asian Longhorned Beetle*
Gracia-Lor, E., Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Hernández, F., Coppens, M., Scarr, T., Thompson, D.
Enviado para su publicación (Talanta)

- *Validation of an LC-MS/MS multi-toxin method covering 329 fungal and bacterial metabolites for four commodities from different matrix groups specified in the SANCO 12495/2011*

Malachova, A., Sulyok, M., Berthiller, F., Beltrán, E., Krska, R.

En preparación



UNIVERSITAT
JAUME·I