Universidad de Navarra

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Facultad de Farmacia y Nutrición

TESIS DOCTORAL

# ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN LECHE

STUDY REGARDING THE PRESENCE OF MYCOTOXINS IN MILK

Trabajo presentado por

**Myra Evelyn Flores Flores**

para obtener el Grado de Doctor

Pamplona, 2016

Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia y Nutrición

DÑA. ELENA GONZÁLEZ PEÑAS, Profesora Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra,

Certifica:

Que el presente trabajo, titulado “Estudio de la presencia de micotoxinas en leche”, presentado por Dña. MYRA EVELYN FLORES FLORES para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra. Considerando finalizado el trabajo, autoriza su presentación a fin de que pueda ser juzgado y calificado por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firma la presente:

Fdo. Dra. Elena González Peñas

(Directora)

Pamplona, 2016

# Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que me han ayudado en alguna medida en la realización de este trabajo:

A la Comisión de Investigación de la Universidad de Navarra y a la Asociación de Amigos por elegirme y concederme primero una beca de incentivación a la realización de la tesis doctoral y luego, una beca para la realización del doctorado durante estos 5 años.

Al Plan de Investigación de la Universidad de Navarra (PIUNA) por la financiación de este trabajo.

A la Dra. Elena González Peñas, mi directora de tesis, por su guía, por compartir su experiencia conmigo, por su constante apoyo y por la confianza depositada en mí para realizar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio. Ángel, por guiar mis primeros pasos en este laboratorio, enseñarme a lidiar con el LC-MS/MS, contestar con buen ánimo mis miles de dudas e interrogantes y estar siempre dispuesto a ayudarme. Amaya, por su preocupación y amistad, todas las buenas charlas, cafés, comidas, por ser una amiga y darme ánimos en todo momento y por ser un gran soporte con todo el material y el orden en el laboratorio. Ana, por el buen ánimo y sonrisa con la que me recibía cada mañana en el despacho y las buenas charlas tanto químicas como de la vida cotidiana. Alicia, por su amistad, ocurrencias y buen ánimo que alegra el laboratorio y despacho. Ariane y Amaya por su compañía en el despacho durante la primera etapa de esta tesis y por dejarme observar de cerca el trabajo de unas doctoras jóvenes llenas de energía que contagian su dedicación a la ciencia. A la Dra. Elena Lizarraga, por su apoyo en el inicio de esta tesis y todas las buenas charlas en el laboratorio. A Patricia, Carla, Lía, María y todos los alumnos de trabajos fin de máster y fin de grado que pasaron por el laboratorio por dejarme ayudarles un poquito y poner a prueba mis conocimientos.

A Aleix, Joaquín, Juanma, Anabel, Nora y todas las personas de Lacturale, de la Granja MasBes y del Instituto Lactológico de Lekumberri que me ayudaron en la recolección de las muestras de leche, una parte muy importante en este trabajo.

A todo el grupo BPPF por facilitarme tan rápidamente innumerables publicaciones a las que no tenía acceso. Es un grupo increíble, muchas gracias por dedicar su tiempo desinteresadamente.

A Celia, Laura, Adela, Elena, Maite, Isma y toda la gente del CIFA por todas las divertidas conversaciones en los cafés y comidas que me ayudaron a relajarme y a ponerme al día del acontecer y las costumbres de esta ciudad que me ha acogido estos 5 años.

A Ana Elsa, por insistirme y sacarme del laboratorio para irnos por un café o de pinchos y por toda su paciencia y amistad.

A Manu, Daisy y Diego, mis chicos REPU en UNAV, por dejarme ayudarles un poquito en el inicio de su carrera científica y traerme un poquito de Perú.

A Sonia, Teresa, Kuan-Lin, Fred, Nick, Elena, Rocío, Peter, Lewie, Daniel, Lisa, José María por preguntarme como me fue en el día, por las conversaciones y cenas, por ser mi familia en Pamplona.

A Miguel, por todas las locuras, por animarme y por su apoyo en estos últimos meses cuando más necesitaba de los viejos amigos.

A Mirko y Paty por acogerme y animarme a mí y a todos los que pasamos por su laboratorio a elegir el camino de la investigación científica a pesar de los pocos recursos.

A mis padres, Monica y Enrique, mi hermano Alonso, mis abuelos Miguel, Inés y María, mi tío César, no tengo palabras para describir la enorme gratitud que siento por todo el esfuerzo, el cariño y el soporte brindado que me ha permitido llegar a cumplir esta meta.

¡Gracias a todos!

**A mis padres Monica y Enrique**

**y mi hermano Alonso**

## Abbreviations / Abreviaturas

| | | |
|---|---|---|
| **15-ADON** | 15-acetyldeoxynivalenol | 15-acetildeoxinivalenol |
| **3-ADON** | 3-acetyldeoxynivalenol | 3-acetildeoxinivalenol |
| **ACE** | Acetone | Acetona |
| **ACN** | Acetonitrile | Acetonitrilo |
| **AFB1** | Aflatoxin B1 | Aflatoxina B1 |
| **AFB2** | Aflatoxin B2 | Aflatoxina B2 |
| **AFG1** | Aflatoxin G1 | Aflatoxina G1 |
| **AFG2** | Aflatoxin G2 | Aflatoxina G2 |
| **AFM1** | Aflatoxin M1 | Aflatoxina M1 |
| **AFM2** | Aflatoxin M2 | Aflatoxina M2 |
| **AFs** | Aflatoxins | Aflatoxinas |
| **CCα** | Decision limit | Límite de decisión |
| **CCβ** | Detection capability | Capacidad de detección |
| **CE** | Colision energy | Energía de colisión |
| **CPA** | Cyclopiazonic acid | Ácido ciclopiazónico |
| **DAS** | Diacetoxyscirpenol | Diacetoxiscirpenol |
| **DOM-1** | Deepoxy-deoxynivalenol | Deepoxi-deoxinivalenol |
| **DON** | Deoxynivalenol | Deoxinivalenol |
| **EC** | Electron capture detector | Detector de captura de electrones |
| **EFSA** | European Food Safety Authority | Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria |
| **ELISA** | Enzyme-linked immunosorbent assay | Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas |
| **EMA** | European Medicines Agency | Agencia Europea de Medicamentos |
| **ESI** | Electrospray ionization | Ionización por electrospray |
| **EtOH** | Ethanol | Etanol |
| **EU** | European Union | Unión Europea |
| **FAO** | Food and Agriculture Organization of the United Nations | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| **FB1** | Fumonisin B1 | Fumonisina B1 |
| **FB2** | Fumonisin B2 | Fumonisina B2 |
| **FB3** | Fumonisin B3 | Fumonisina B3 |
| **FDA** | Food and Drug Administration | Administración de Medicamentos y Alimentos |
| **FIA** | Flow injection analysis | Inyección directa en flujo |
| **FID** | Flame ionization detector | Detector de ionización de llama |
| **FLD** | Fluorescence detector | Detector de fluorescencia |

| | | |
|---|---|---|
| **Frag** | *Fragmentor* voltage | Voltaje *Fragmentor* |
| **FUS-X** | Fusarenon X | Fusarenona X |
| **GC** | Gas chromatography | Cromatografía de gases |
| **HFB** | Heptafluorobutyryl | Heptafluorobutiril |
| **HPLC** | High-performance liquid chromatography | Cromatografía líquida de alta resolución |
| **HT-2** | HT-2 toxin | Toxina HT-2 |
| **IAC** | Immunoaffinity columns | Columnas de immunoafinidad |
| **IARC** | International Agency for Research on Cancer | Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer |
| **IS** | Internal standard | Patrón interno |
| **JECFA** | Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives | Comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios |
| **LC** | Liquid chromatography | Cromatografía de líquidos |
| **LC-MS** | Liquid chromatography - mass spectrometry | Cromatografía de líquidos - espectrometría de masas |
| **LFIA** | Lateral flow immunoassay | Inmunoensayo de flujo lateral |
| **LLE** | Liquid-liquid extraction | Extracción líquido-líquido |
| **LOD** | Limit of detection | Límite de detección |
| **LOQ** | Limit of quantification | Límite de cuantificación |
| **MAS** | Monoacetoxyscirpenol | Monoacetoxiscirpenol |
| **ME** | Matrix effect | Efecto matriz |
| **MEKC** | Micellar electrokinetic chromatography | Cromatografía electrocinética micelar |
| **MeOH** | Methanol | Metanol |
| **MFC** | Multifunctional clean-up columns | Columnas de limpieza multifuncional |
| **MS** | Mass spectrometry | Espectrometría de masas |
| **NDA** | Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde | Naftalen-2,3-dicarboxaldehido |
| **NEO** | Neosolaniol | Neosolaniol |
| **NIV** | Nivalenol | Nivalenol |
| **OTA** | Ochratoxin A | Ocratoxina A |
| **OTB** | Ochratoxin B | Ocratoxina B |
| **PAT** | Patulin | Patulina |
| **PBS** | Phosphate buffer solution | Tampón fosfato salino |
| **PLE** | Pressurized liquid extraction | Extracción líquida presurizada |
| **PMTDI** | Provisional maximum tolerable daily intake | Ingesta diaria máxima tolerable provisional |
| **PSA** | Primary secondary amine | Amina primaria secundaria |
| **PTFE** | Polytetrafluoroethylene | Politetrafluoroetileno |
| **PVDF** | Polyvinylidene fluoride | Fluoruro de polivinilideno |
| **QuEChERS** | Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe | Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro |
| **RE** | Relative error | Error relativo |

| | | |
|---|---|---|
| **SLE** | Solid supported liquid extraction | Extracción líquida sobre soporte sólido |
| **SPE** | Solid-phase extraction | Extracción en fase sólida |
| **SRM** | Selected Reaction Monitoring | Monitorización de la reacción seleccionada |
| **STC** | Sterigmatocystin | Esterigmatocistina |
| **T-2** | T-2 Toxin | Toxina T-2 |
| **TDI** | Tolerable Daily Intake | Ingesta diaria tolerable |
| **TFC** | Turbulent flow chromatography | Cromatografía de flujo turbulento |
| **TLC** | Thin layer chromatography | Cromatografía en capa fina |
| **TMS** | Trimethylsilyl | Trimetilsilil |
| **TMSI** | Trimethylsilylimidazole | Trimetilsililimidazol |
| **$t_R$** | Retention time | Tiempo de retención |
| **UV** | Ultraviolet detector | Detector ultravioleta |
| **ZAN** | Zearalanone | Zearalanona |
| **ZEA** | Zearalenone | Zearalenona |
| **α-ZAL** | α-Zearalanol | α-Zearalanol |
| **α-ZEL** | α-Zearalenol | α-Zearalenol |
| **β-ZAL** | β-Zearalanol | β-Zearalanol |
| **β-ZEL** | β-Zearalenol | β-Zearalenol |

# CONTENIDO / CONTENTS


| | | |
|---|---|---|
| Capítulo 1/*Chapter 1* | Introducción, justificación, objetivos y esquema de trabajo/*Introduction, aim, objectives and outline*…. | 1 |
| Capítulo 2/*Chapter 2* | Presencia de micotoxinas en leche animal: una revisión/*Presence of mycotoxins in animal milk: A review*…… | 9 |
| Capítulo 3/*Chapter 3* | Métodos analíticos para el análisis de micotoxinas en leche/*Analytical methods for mycotoxin analysis in milk samples*…….. | 25 |
| Capítulo 4/*Chapter 4* | Optimización de los parámetros de detección por espectrometría de masas/*Optimization of mass spectrometry detection parameters*…….. | 65 |
| Capítulo 5/*Chapter 5* | Desarrollo y validación de un método por HPLC-MS/MS para la cuantificación simultánea de 10 tricotecenos en leche de vaca UHT/*Development and validation of a HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 10 trichothecenes in UHT cow milk*…….. | 75 |
| Capítulo 6/*Chapter 6* | Método LC-MS/MS para la cuantificación de múltiples micotoxinas en leche de vaca/*An LC-MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk.*…….. | 85 |
| Capítulo 7/*Chapter 7* | Análisis de micotoxinas en leche de vaca de origen español/*Survey of mycotoxins in Spanish cow milk*… | 95 |
| Capítulo 8/*Chapter 8* | Estudio preliminar sobre la presencia de micotoxinas en leche evaporada peruana/ *Preliminary survey as regards the presence of mycotoxins in Peruvian evaporated cow milk.*…….. | 109 |
| Capítulo 9/*Chapter 9* | Discusión general/*General discussion*…….. | 127 |
| Capítulo 10/*Chapter 10* | Conclusiones/*Conclusions*…….. | 145 |
| Apéndice/*Appendix* | Apéndice 1: Código de Registro General Sanitario de Empresas Alimentarias y Alimentos (RGSEAA) de | |

los centros de recogida de leche en España/ Appendix *1: General Sanitary Registration Code for Foods and Food Companies (RGSEAA) of the milk collection centers in Spain*..... 151

Apéndice 2: Extracción de micotoxinas con distintos solventes y proporciones/*Appendix 2: Mycotoxin extraction with different solvents and proportions*..... 153

Apéndice 3: Estructuras químicas de las micotoxinas analizadas/*Appendix 3: Chemical structures of the analyzed mycotoxins*..... 154

# CAPÍTULO 1 / CHAPTER 1

# Introducción, Justificación, Objetivos y Esquema de Trabajo

***Introduction, aim, objectives and outline***

# Introducción

La presencia en los alimentos de contaminantes naturales que supongan un riesgo para la salud humana es un problema de salud pública. Especialmente preocupante es la exposición humana a estos compuestos de forma crónica a través de los alimentos. Dentro de estos contaminantes naturales, las micotoxinas son uno de los problemas más importantes.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Las materias primas de origen vegetal pueden ser contaminadas por micotoxinas cuando se encuentran creciendo en los campos de cultivo o después de ser cosechadas, cuando son almacenadas en condiciones inadecuadas de temperatura y humedad (Binder 2007).

Las micotoxinas pueden llegar a la cadena alimenticia humana de forma directa cuando se ingieren productos agrícolas contaminados o alimentos que fueron producidos con materia prima contaminada; o de forma indirecta, cuando se ingieren productos derivados de animales (leche, huevos, etc) que fueron alimentados con material contaminado (Capriotti y col. 2012).

Además, la situación más probable es la presencia conjunta de varias micotoxinas en una misma materia prima o alimento, ya que un tipo de hongo puede producir diferentes micotoxinas (Zhang y col. 2014), una materia prima puede estar contaminada con diferentes tipos de hongos y además, tanto la dieta humana como la animal están constituidas por diferentes alimentos y materias primas.

Los estudios de exposición son uno de los pilares esenciales de la evaluación del riesgo en el campo de la seguridad alimentaria, y es necesario conocer las combinaciones de micotoxinas más frecuentes presentes en alimentos y los niveles a los que se encuentran.

# Justificación

El presente trabajo se enmarca dentro de la línea de investigación sobre el desarrollo de métodos analíticos para su aplicación en el estudio de la presencia de micotoxinas en distintas matrices que se desarrolla en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra.

La leche es un alimento de alta producción y consumo. En el 2014, la Unión Europea produjo aproximadamente 159,6 millones de toneladas de leche de vaca (96,8% de la

producción total de leche). En España, el 85,6% de la producción lechera de ese mismo año correspondió a leche de ganado vacuno (Eurostat 2015). Los informes anuales sobre alimentación en España señalan que la leche es un producto de gran consumo entre las familias españolas. En el 2015, el 3,46% del presupuesto familiar fue destinado a la compra de este alimento (MAGRAMA 2016). Debido a esta alta producción y consumo, la presencia de compuestos tóxicos en este alimento, aunque sea a bajos niveles, podría acarrear consecuencias en la salud de los consumidores, entre los que se encuentran personas de todas las edades, incluyendo los niños.

La presencia de micotoxinas se ha estudiado ampliamente en diversas matrices alimentarias y se han establecido límites máximos permisibles para algunas de ellas en alimentos. En el caso de la leche, la Unión Europea ha establecido un valor máximo permisible de 0,05 µg/kg solamente para la aflatoxina M1 (AFM1), el principal metabolito de la aflatoxina B1 (AFB1). Con respecto a otras micotoxinas, o a la presencia conjunta de micotoxinas en leche, es poco lo que se sabe a día de hoy.

Las micotoxinas llegan a los animales a través de la alimentación. Por ello, la recomendación 2006/576/CE (European Commission 2006) sugiere niveles máximos para deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA), fumonisina B1 (FB1) y fumonisina B2 (FB2) en productos destinados a la alimentación animal y recomienda recoger más información sobre la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 (T-2, HT-2). Se conoce que algunas micotoxinas como AFB1, DON, OTA, ZEA, entre otras, son metabolizadas en compuestos menos tóxicos por la flora del sistema digestivo de los rumiantes. Sin embargo, otras micotoxinas, como las fumonisinas, la patulina (PAT) o el ácido ciplopiazónico (CPA), atraviesan la barrera del rumen sin metabolizarse (Fink-Gremmels 2008). Por otro lado, un debilitamiento de la salud animal, cambios en la composición de la dieta o altos niveles de contaminación con micotoxinas en la alimentación animal, pueden ocasionar una alteración en el rumen que permita el paso inusual de micotoxinas (Pattono y col. 2011).

Como se ha comentado anteriormente, la dieta animal está compuesta por diversas materias primas. Por tanto, es probable la presencia simultánea de distintas micotoxinas en el alimento de los animales y que puedan aparecer de forma conjunta en la leche. Sin embargo, el límite máximo para AFM1 en leche ha sido establecido considerándola como la única micotoxina presente y sin tener en cuenta que algunos estudios señalan efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos cuando hay presencia conjunta de algunas micotoxinas (Alassane-Kpembi y col. 2016; Smith y col. 2016), incluso cuando cada una de ellas está a concentraciones consideradas no tóxicas (Wan y col. 2013).

La contaminación de la leche y la micotoxicosis animal no solo representan problemas de salud pública, sino que también causan pérdidas económicas a los productores debido a los efectos adversos que causan las micotoxinas en la salud animal, ocasionando muchas veces una baja productividad (Bryden 2012).

Por estas razones, es necesario realizar programas de monitorización de presencia de micotoxinas en este alimento, realizar estudios sobre la presencia simultánea de micotoxinas en leche y estudios de transmisión de estas micotoxinas desde el alimento animal hacia la leche. Todo ello ayudaría a realizar una mejor evaluación del riesgo que suponen estos compuestos tóxicos para la salud del consumidor.

Para realizar los estudios anteriores es necesario disponer de métodos analíticos adecuados. Se han publicado diversos métodos para analizar algunas micotoxinas, especialmente AFM1, en leche. Muchos de ellos se centran en el estudio de una sola micotoxina o en un grupo reducido de ellas, usualmente pertenecientes a la misma familia. A día de hoy, son pocos los métodos para la multidetección de micotoxinas que hayan sido desarrollados específicamente para trabajar con esta matriz.

## Objetivos

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo principal del presente trabajo es el estudio de la presencia simultánea de 22 micotoxinas en leche de vaca.

Los objetivos concretos de este trabajo son los siguientes:

1. Estudio del estado del arte sobre la presencia de micotoxinas en leche y de los métodos analíticos desarrollados a día de hoy para determinarla.
2. Puesta a punto y validación de métodos analíticos para la determinación, en leche de vaca, de 22 micotoxinas: DON, T-2, HT-2, nivalenol (NIV), deepoxi-deoxinivalenol (DOM-1), fusarenona X (FUS-X), 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON), diacetoxiscirpenol (DAS), neosolaniol (NEO), AFM1, AFB1, aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1), aflatoxina G2 (AFG2), OTA, ocratoxina B (OTB), FB1, FB2, fumonisina B3 (FB3), esterigmatocistina (STC) y ZEA.
3. Estudio de la presencia de 22 micotoxinas en leche de vaca de origen español y peruano.

# Esquema de trabajo

En este proyecto de investigación se ha seguido el siguiente esquema de trabajo:

En los capítulos 2 y 3 se hace una revisión de los estudios realizados acerca de la presencia de micotoxinas en leche. En el **capítulo 2** se hace una breve descripción de las principales familias de micotoxinas estudiadas, de los estudios de transmisión de micotoxinas hacia la leche animal encontrados y se indican los niveles de micotoxinas que han aparecido en muestras de leche a nivel mundial. En el **capítulo 3** se recogen los métodos analíticos que se han desarrollado a día de hoy para la detección y cuantificación de micotoxinas en leche.

Para el presente trabajo se han seleccionado las 22 micotoxinas por uno o varios de los siguientes motivos:

- Se han encontrado en estudios sobre su presencia en materias primas y productos destinados a la alimentación del ganado lechero y/o está regulada su presencia en estas matrices.
- Está regulada su presencia en leche.
- Los patrones se encuentran comercialmente disponibles.

Se han desarrollado y validado 2 métodos analíticos basados en LC-MS/MS para el estudio de su presencia en leche animal. En el **capítulo 4** se detalla la metodología empleada para la obtención y optimización de los parámetros de detección por espectrometría de masas de las 22 micotoxinas estudiadas. En el **capítulo 5** se describe la puesta a punto y validación del método 1 para el estudio simultáneo de 10 tricotecenos (NIV, DON, DOM-1, FUS-X, 3-ADON, 15-ADON, DAS, NEO, T-2 y HT-2) en leche de vaca. En el **capítulo 6** se describe la puesta a punto y validación del método 2 destinado al estudio simultáneo de 15 micotoxinas (AFM1, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, OTB, T-2, HT-2, DOM-1, FB1, FB2, FB3, ZEA y STC) en leche de vaca.

Una vez disponibles las herramientas analíticas, éstas se aplicaron al estudio de la presencia de las 22 micotoxinas en muestras de leche de origen español y peruano. En el **capítulo 7** se muestran los resultados del análisis de 107 muestras de leche de vaca comercial y 84 muestras de leche cruda de vaca, de origen español. A continuación se hizo un estudio acerca de la presencia de 22 micotoxinas en leche de vaca evaporada de origen peruano. También se llevó a cabo la revalidación del método 2 para su aplicación en esta matriz. Los resultados se muestran en el **capítulo 8**.

En el **capítulo 9** se hace una discusión general del trabajo y finalmente, en el **capítulo 10** se presentan las conclusiones del presente proyecto de investigación.

## Referencias


Alassane-Kpembi, I., G. Schatzmayr, I. Taranu, D. Marin, O. Puel, y I.P. Oswald. 2016. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Critical reviews in food science and nutrition*:00-00. DOI: 10.1080/10408398.2016.1140632.

Binder, E.M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology* 133:149-166. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2006.08.008.

Bryden, W.L. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology* 173:134-158. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014.

Capriotti, A.L., G. Caruso, C. Cavaliere, P. Foglia, R. Samperi, y A. Lagana. 2012. Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* 31:466-503. DOI: 10.1002/mas.20351.

European Commission. 2006. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochartoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC). 7-9. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006H0576&from=EN.

Eurostat. 2015. Milk and milk product statistics. (accessed June 16th, 2016). http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk_and_milk_product_statistics#Milk_production.

Fink-Gremmels, J. 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food additives & contaminants.Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 25:172-180. DOI: 10.1080/02652030701823142.

MAGRAMA. 2016. Informe del consumo de alimentación en España 2015. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España. 1-230. http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2015_tcm7-422694.pdf.

Pattono, D., P.F. Gallo, y T. Civera. 2011. Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chemistry* 127:374-377. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.051.

Smith, M.C., S. Madec, E. Coton, y N. Hymery. 2016. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins* 8:94. DOI: 10.3390/toxins8040094.

Wan, L.Y.M., P.C. Turner, y H. El-Nezami. 2013. Individual and combined cytotoxic effects of Fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology* 57:276-283. DOI: 10.1016/j.fct.2013.03.034.

Zhang, K., J.W. Wong, A.J. Krynitsky, y M.W. Trucksess. 2014. Determining Mycotoxins in Baby Foods and Animal Feeds Using Stable Isotope Dilution and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:8935-8943. DOI: 10.1021/jf503943r.

# CAPÍTULO 2 / CHAPTER 2

# Presencia de micotoxinas en leche animal: Una revisión

## Presence of mycotoxins in animal milk: A review

Publicado en Food Control 53 (2015) 163-176

Myra Evelyn Flores-Flores[a], Elena Lizarraga[a], Adela Lopez de Cerain[b], Elena González-Peñas[a]

[a]Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry, [b]Department of Pharmacology and Toxicology
Faculty of Pharmacy, University of Navarra

Journal Impact Factor: 3.388 / 5 Years Impact Factor: 3.458 (JCR 2015)

Quartile and Rank (JCR 2015): Q1 15/125 Food Science & Technology

Essential Science Indicators (JCR 2015): Q1 24/333 Agricultural Sciences

As of May/June 2016, this highly cited paper received enough citations to place it in the top 1% of the academic field of Agricultural Sciences based on a highly cited threshold for the field and publication year. Data from Essential Science Indicators℠.

## RESUMEN

Las micotoxinas pueden causar toxicidad cuando son ingeridas por los animales y el hombre. Se supone que el rumen es una barrera contra las micotoxinas, pero algunos estudios han demostrado que es posible el paso de las micotoxinas hacia la leche. Diferentes estudios han encontrado presencia de micotoxinas en leche animal, principalmente relacionada con el consumo de pienso de vaca contaminado. La aflatoxina M1 es la micotoxina más estudiada en leche, se han encontrado niveles de esta micotoxina en leche que sobrepasan el límite máximo permitido por la Unión Europea para esta matriz (0,05 µg/kg). No se han establecido niveles máximos permitidos para otras micotoxinas en leche; sin embargo, se ha encontrado presencia de ocratoxina A, aflatoxinas G1, G2, B1, B2 y M2, fumonisina B1, ácido ciclopiazónico, zearalenona y sus metabolitos y deepoxi-deoxinivalenol. Teniendo en cuenta que la exposición a múltiples micotoxinas en un escenario muy probable y que la co-ocurrencia de micotoxinas puede afectar a sus efectos tóxicos en el hombre y los animales, es necesario estudiar la co-ocurrencia de las micotoxinas en la leche.

Flores-Flores ME, Lizarraga E, López A, González-Peñas E. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. Food Control. 2015, 53:163-176.

# CAPÍTULO 3 / CHAPTER 3

# Métodos analíticos para el análisis de micotoxinas en leche

***Analytical methods for mycotoxin analysis in milk samples***

Aceptado para publicación como capítulo de libro en:
"Food Safety and Protection"
CRC Press/Taylor & Francis Group
Editors: V. Ravishankar Rai and A. Jamuna Bai
ISBN: 9781498762878
Fecha de publicación prevista: Julio 2017

Myra E. Flores-Flores, Elena González-Peñas
Organic and Pharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy and Nutrition, University of Navarra

# RESUMEN

Las micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos producidos por diferentes especies de hongos, pueden aparecer naturalmente en materias primas, como forrajes o cereales para la preparación de piensos. Si los animales son alimentados con estos productos contaminados, las micotoxinas no solo pueden producirles enfermedades, sino que pueden absorberse y contaminar también sus tejidos y fluidos, por ejemplo la leche.

Estos tejidos y fluidos pueden entrar en la cadena alimenticia del hombre y afectar a su salud, siendo algunas micotoxinas particularmente peligrosas. La agencia internacional para la investigación del cáncer ha clasificado a la aflatoxina B1 y la mezcla de aflatoxinas como carcinógenos humanos (grupo 1), y a la aflatoxina M1, ocratoxina A, fumonisina B1 y esterigmatocistina como posibles carcinógenos humanos (grupo 2B).

Con respecto a la presencia de micotoxinas en leche de rumiantes, se supone que el rumen actúa como una barrera de protección contra las micotoxinas; sin embargo, se ha encontrado presencia de ocratoxina A, aflatoxinas G1, G2, B1, B2 y M2, fumonisinas B1 y B2, ácido ciclopiazónico, zearalenona y sus metabolitos y deepoxi-deoxinivalenol en muestras de leche analizadas en el mundo. La aflatoxina M1 es la micotoxina más estudiada en esta matriz. Teniendo en cuenta la información disponible con respecto a su presencia y toxicidad, la Comisión Europea ha establecido como nivel máximo permitido 0,05 µg/kg de esta micotoxina en leche.

Se necesita el desarrollo y validación de métodos analíticos para la determinación de micotoxinas en leche. Estos métodos permitirían llevar a cabo la vigilancia de su presencia en esta matriz, estudios sobre su potencial transmisión hacia la leche y una mejor evaluación del riesgo que supone su presencia en este alimento para la salud humana. Sin embargo, la complejidad de esta matriz supone un desafío analítico.

La leche es una matriz difícil de trabajar debido a su compleja composición (azúcares, proteínas, grasas, etc.). Por otro lado, las micotoxinas son sustancias con características fisicoquímicas muy variadas. Además, debido a que se esperan a niveles de concentración muy bajos, se necesitan límites de detección bajos.

La mayoría de los métodos analíticos desarrollados se centran en el estudio de una micotoxina o una familia de ellas, pero el escenario más probable es una exposición a múltiples micotoxinas. Una especie de hongo puede producir más de un tipo de micotoxina; además, la dieta de los rumiantes puede ser contaminada por más de una especie de hongos. Por lo tanto, se necesitan métodos analíticos capaces de detectar y cuantificar simultáneamente, en leche, un amplio espectro de micotoxinas pertenecientes a distintas familias y con límites de detección y cuantificación bajos que reducirían el coste y facilitarían la creación de programas de monitorización de micotoxinas en leche.

El objetivo de este capítulo es hacer una revisión de los métodos analíticos publicados en la literatura orientados a la detección de micotoxinas en leche, con especial énfasis en aquellos que son capaces de detectar distintas micotoxinas simultáneamente.

## ABSTRACT

Mycotoxins, toxic secondary metabolites produced by different fungal species, can occur naturally in raw products such as feed or silage. If animals are fed with these contaminated products, mycotoxins can produce animal diseases and also contaminate different animal tissues or fluids, such as milk. These contaminated tissues or fluids can reach man through foods and affect his health. Some mycotoxins are particularly dangerous for humans. The International Agency for Research on Cancer has classified aflatoxin B1 and mixtures of aflatoxins as human carcinogens (group 1) and aflatoxin M1, ochratoxin A, fumonisin B1 and sterigmatocystin as possible human carcinogens (group 2B).

With regard to the presence of mycotoxins in ruminant milk, the rumen is supposed to be a barrier against mycotoxins; however, low levels of ochratoxin A, aflatoxins G1, G2, B1, B2 and M2, fumonisins B1 and B2, cyclopiazonic acid, zearalenone and its metabolites and deepoxy-deoxynivalenol have also been found in milk samples worldwide. Aflatoxin M1 is the most studied mycotoxin in this matrix, and taking into account the data regarding occurrence and toxicity, the European Commission has set a maximum permitted level of 0.05 μg/kg for this mycotoxin in milk.

Development and validation of analytical methods for mycotoxin determination in milk is needed as a tool for performing surveillance, carry-over studies, and for carrying out better human health risk assessment; however, it is an analytical challenge.

Milk is a difficult matrix to work with due to its complex composition (sugars, proteins, fat, etc.). On the other hand, a great number of mycotoxins with very different physicochemical characteristics are known. Moreover, due to the low levels that are expected, methods with low detection limits are needed. Most of the reported analytical methods have been devoted to the analysis of one mycotoxin or family of mycotoxins, but the multi-exposure to mycotoxins is the most likely scenario. One fungal species can produce more than one mycotoxin and the ruminant diet can be contaminated with more than one fungal species. Therefore, analytical methods that can simultaneously detect and quantify a broad number of mycotoxins, belonging to different families, in milk, with low limits of detection and quantification are needed in order to reduce analytical costs and to facilitate the creation of better and fast monitoring programs in milk.

Flores-Flores ME, González-Peñas E. Analytical methods for mycotoxin analysis in milk samples. In: Rai VR, Bai JA, editors. Food Safety and Protection [in press]. CRC Press; 2017.

# CAPÍTULO 4 / CHAPTER 4

# Optimización de los parámetros de detección por espectrometría de masas

***Optimization of mass spectrometry detection parameters***

## Introducción

La elección de los parámetros para la adquisición de datos por MS/MS es una etapa muy importante en el desarrollo del método analítico por LC-MS/MS, ya que una buena elección permitirá una buena selectividad y sensibilidad del método desarrollado.

En el análisis de las micotoxinas en las muestras se ha utilizado el modo SRM: monitorización de la reacción seleccionada (*Selected Reaction Monitoring*). De esta forma, y empleando la técnica de la espectrometría de masas en tándem, se realizan dos etapas para identificar y cuantificar selectivamente un analito en una mezcla de compuestos.

En la primera etapa se monitoriza un ion precursor formado a partir del compuesto de interés a un voltaje determinado denominado *Fragmentor* (Frag). A continuación, sobre este ion precursor se aplica una energía de colisión (CE) que permite obtener un ion producto que luego es monitorizado en la segunda etapa. Al par ion precursor-ion producto se le denomina transición.

En el presente capítulo se muestra el procedimiento empleado para definir, optimizar y elegir el ion precursor, el voltaje *Fragmentor* (Frag), las energías de colisión (CE) empleadas y los iones producto para cada una de las micotoxinas. De esta forma se han seleccionado unas transiciones para cada una de ellas y se ha definido las que se utilizarán como transición de cuantificación y de cualificación, en función de parámetros como intensidad del ion producto y reproducibilidad.

## Material

Los patrones de micotoxinas (grado analítico, pureza >98%) fueron comprados en Sigma-Aldrich (USA) y almacenados a -20ºC. La OTA fue comprada en polvo, las fumonisinas en solución acetonitrilo:agua (50:50) y las demás micotoxinas en solución en acetonitrilo. El metanol (grado LC-MS), ácido fórmico (grado MS, pureza >98%) y formiato de amonio (grado analítico) fueron comprados en Sigma Aldrich (USA). El acetonitrilo (grado HPLC) fue comprado en Merck (Alemania). El agua desionizada (resistividad > 18 MΩ/cm) fue purificada con el sistema de purificación de agua Ultramatic tipo I (Wasserlab, España).

La fase móvil estuvo compuesta por las soluciones A (agua) y B (metanol:agua, 95:5) ambas preparadas al 0,1% de ácido fórmico y 5 mM de formiato de amonio.

Se prepararon soluciones de trabajo de cada una de las micotoxinas por dilución de los patrones en fase móvil al 5% de la solución B. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: 10 µg/mL para NIV, DON, DAS, T-2, HT-2, NEO, FUS-X, 3-ADON, 15-ADON, DOM-1, OTA, ZEA, STC, FB1, FB2 y FB3, 2,26 µg/mL para OTB, 2 µg/mL para AFB1 y AFG1,

1 µg/mL para AFM1 y 0,5 µg/mL para AFB2 y AFG2. Las micotoxinas fueron manipuladas en condiciones de poca luz para evitar la fotodegradación de algunas de ellas y usando en todo momento equipo de protección (bata de laboratorio, guantes y pantalla protectora).

## Equipos

Para la ejecución de este trabajo se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1200 acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6410 como detector y con una interfase de ionización por electrospray, ambos de Agilent Technologies (Alemania).

## Optimización de los parámetros para la adquisición de datos por el modo de monitorización de la reacción seleccionada (SRM)

Los parámetros optimizados para la adquisición de datos fueron los iones precursores, el voltaje *Fragmentor*, los iones producto y sus correspondientes energías de colisión. Se trabajó en modo de inyección directa en flujo (FIA) con fase móvil al 5% de la solución B y a un flujo de 0,4 mL/min. Se usaron 5 µL de la solución de trabajo de la micotoxina deseada en cada experimento. Se aplicó el siguiente procedimiento en la optimización de estos 4 parámetros para cada una de las 22 micotoxinas:

a. Se realizó un barrido en modo SCAN para identificar el o los aductos formados de la micotoxina. Se buscaron los aductos $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ y $[M+Na]^+$ en modo de ionización positivo (ESI+) y $[M-H]^-$ en modo negativo (ESI-). Se seleccionó el de mayor intensidad.

b. Se realizaron una serie de barridos en el modo SIM variando el voltaje *Fragmentor* desde 20 V hasta 220 V. Se eligió aquel voltaje que produjo la señal más intensa del ion precursor previamente elegido.

c. Se realizaron diversas fragmentaciones aplicando energías de colisión desde 0 V hasta 120 V en el modo *Product Ion* (PI). Se eligieron aquellas transiciones más intensas, pero que a la vez fuesen reproducibles.

d. El paso c se repitió para elegir las segundas, terceras y cuartas transiciones más intensas para cada micotoxina.

A continuación y como ejemplo de lo realizado con cada una de las toxinas, se muestra la obtención de los parámetros para FUS-X:

a. Modo SCAN: se obtuvieron los espectros de masas de FUS-X aplicando 20, 50 y 80 V en el *Fragmentor* (Fig. 1). Se observó la presencia de los aductos $[M+H]^+$ (m/z 355,1), $[M+NH_4]^+$ (m/z 372,0) y un aducto adicional de m/z 377,1. Se eligió m/z 355,1 por su mayor intensidad.

b. Modo SIM: Se realizaron una serie de barridos de seguimiento de la masa 355,1 variando los voltajes *Fragmentor* desde 20 V hasta 120 V (Fig. 2). Se observa una señal más intensa cuando se aplicaron 80 V y 100 V. En repetidos experimentos se observó mejor reproducibilidad con 80 V y se eligió este valor.

c. Modo *Product Ion*: Se fijó el *Fragmentor* en 80 V y se aplicaron diferentes energías de colisión desde 5 hasta 70 V (Fig. 3 y 4).

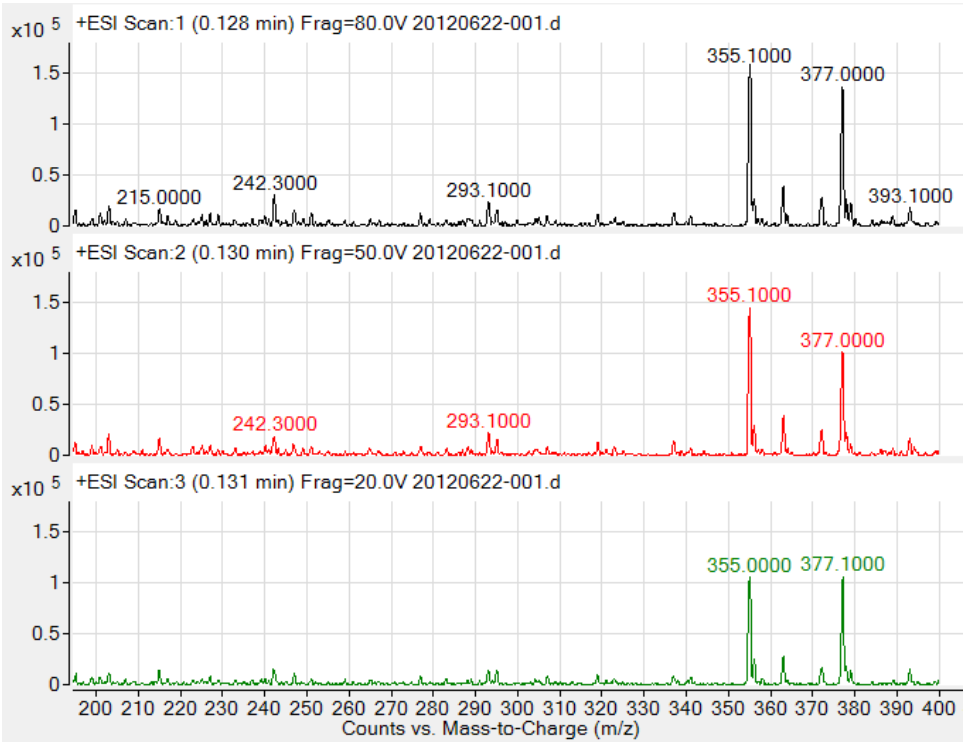



Fig. 1. Espectros de masas de FUS-X en modo SCAN con voltaje *Fragmentor* de 80, 50 y 20 V.

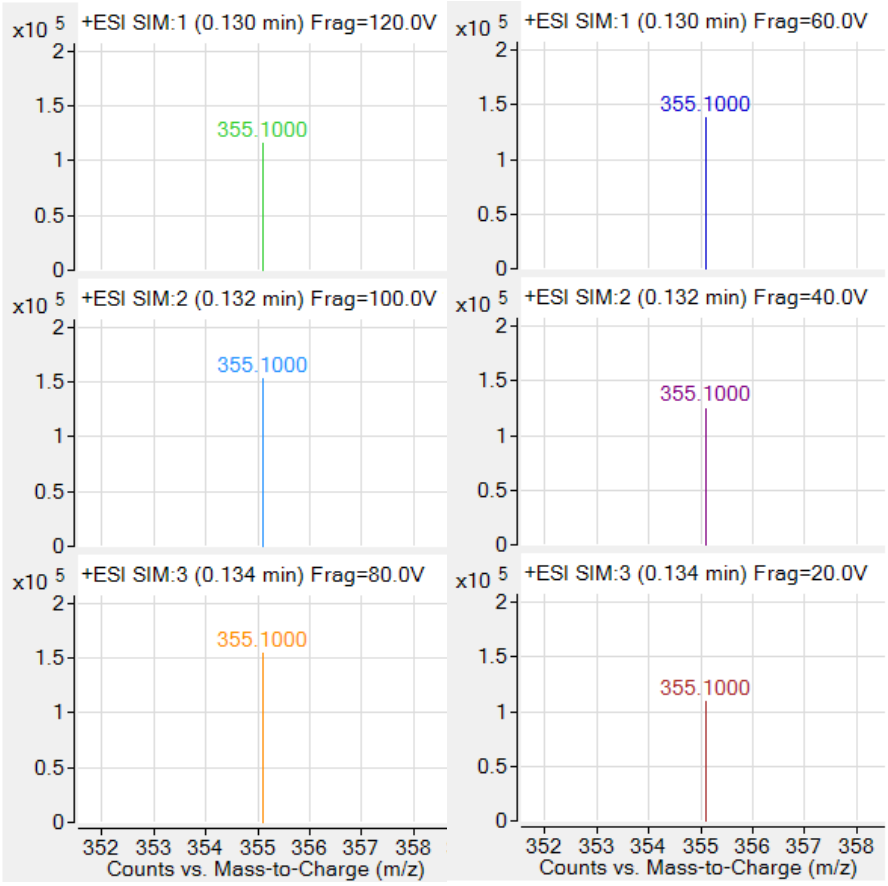



Fig. 2. Intensidad de la m/z 355,1 (en modo SIM) con voltajes *Fragmentor* de 120, 100, 80, 60, 40 y 20 V.

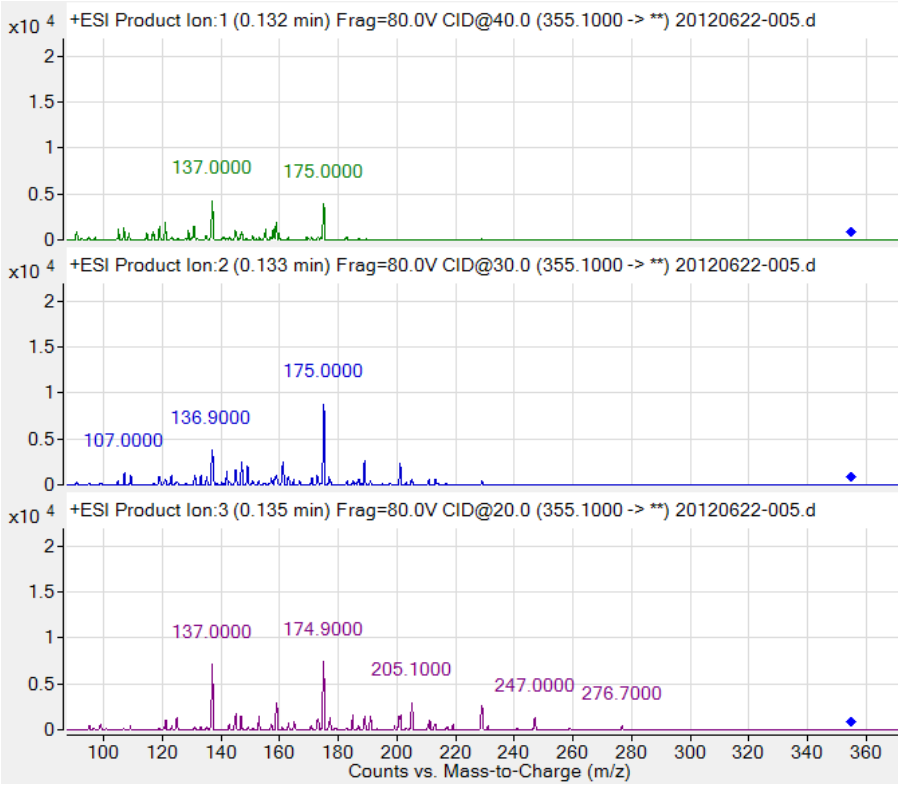



Fig. 3: Espectro de masas de m/z 355,1 de FUS-X en modo *Product Ion* (*Fragmentor* 80 V, energías de colisión aplicadas: 40, 30, 20 V)

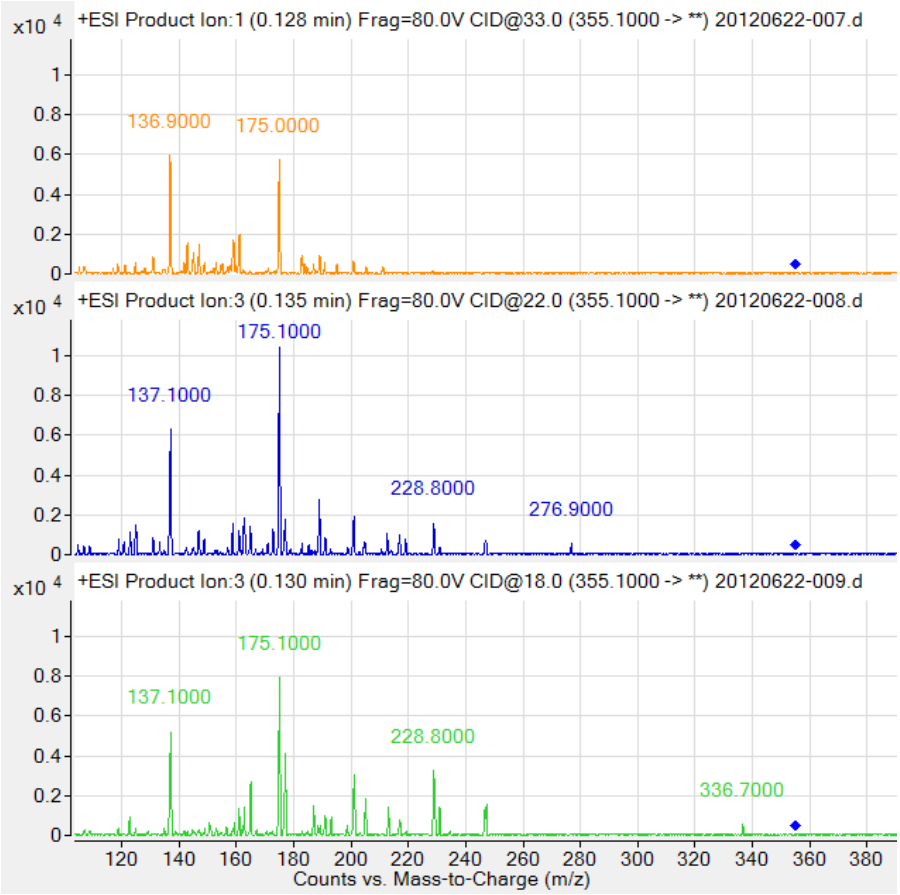



Fig. 4: Espectro de masas de m/z 355,1 de FUS-X en modo *Product Ion* (*Fragmentor* 80 V, energías de colisión aplicadas: 33, 22, 18 V)

La tabla 1 muestra un resumen de los parámetros del detector optimizados para las 22 micotoxinas estudiadas.

Tabla 1. Parámetros de espectrometría de masas para la identificación de las micotoxinas

| **Micotoxina** | **M** (g/mol) | **Ion Precursor** (m/z) | **Aducto** | **Ion Producto** (m/z) | ***Fragmentor*** (V) | **CE** (V) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AFM1 | 328,28 | 329,0 | $[M+H]^+$ | 273,0$^Q$ | 140 | 20 |
| | | | | 229,1$^q$ | 140 | 50 |
| | | | | 259,1 | 140 | 23 |
| | | | | 115,0 | 140 | 80 |
| | | | | 128,0 | 140 | 65 |
| AFB1 | 312,28 | 313,0 | $[M+H]^+$ | 128,1$^Q$ | 160 | 83 |
| | | | | 285,1$^q$ | 160 | 20 |
| | | | | 241,1 | 160 | 40 |
| | | | | 115,0 | 160 | 83 |
| AFB2 | 314,29 | 315,0 | $[M+H]^+$ | 259,0$^Q$ | 160 | 30 |
| | | | | 287,1$^q$ | 160 | 23 |
| | | | | 114,9 | 160 | 83 |
| | | | | 202,8 | 160 | 40 |
| AFG1 | 328,28 | 329,0 | $[M+H]^+$ | 243,1$^Q$ | 150 | 26 |
| | | | | 199,0$^q$ | 150 | 57 |
| | | | | 311,1 | 150 | 23 |
| | | | | 114,9 | 150 | 76 |
| AFG2 | 330,29 | 331,0 | $[M+H]^+$ | 313,1$^Q$ | 160 | 20 |
| | | | | 285,1$^q$ | 160 | 30 |
| | | | | 114,9 | 160 | 80 |
| | | | | 128,0 | 160 | 96 |
| DAS | 366,41 | 384,2 | $[M+NH_4]^+$ | 247,1$^Q$ | 90 | 7 |
| | | | | 307,1$^q$ | 90 | 5 |
| | | | | 229,1 | 90 | 10 |
| | | | | 199,1 | 90 | 13 |
| | | | | 105,0 | 90 | 35 |
| DON | 296,32 | 297,1 | $[M+H]^+$ | 249,1$^Q$ | 100 | 3 |
| | | | | 203,1$^q$ | 100 | 10 |
| | | | | 175,1 | 100 | 12 |
| | | | | 77,1 | 100 | 70 |
| | | | | 90,9 | 100 | 54 |
| DOM-1 | 280,32 | 281,2 | $[M+H]^+$ | 215,2$^Q$ | 90 | 5 |
| | | | | 233,1$^q$ | 90 | 5 |
| | | | | 109,1 | 90 | 10 |
| | | | | 137,2 | 90 | 8 |
| 3-ADON | 338,36 | 339,2 | $[M+H]^+$ | 231,1$^Q$ | 90 | 3 |
| | | | | 203,2$^q$ | 90 | 7 |
| | | | | 213,1 | 90 | 7 |
| | | | | 201,1 | 90 | 5 |
| | | | | 291,2 | 90 | 3 |

Tabla 1 (continuación). Parámetros de espectrometría de masas para la identificación de las micotoxinas

| **Micotoxina** | **M** (g/mol) | **Ion Precursor** (m/z) | **Aducto** | **Ion Producto** (m/z) | ***Fragmentor*** (V) | **CE** (V) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 15-ADON | 338,36 | 339,2 | $[M+H]^+$ | 137,1$^Q$ | 90 | 3 |
| | | | | 321,2$^q$ | 90 | 0 |
| | | | | 261,2 | 90 | 5 |
| | | | | 231,0 | 90 | 7 |
| NEO | 382,41 | 400,1 | $[M+NH_4]^+$ | 185,1$^Q$ | 100 | 15 |
| | | | | 305,2$^q$ | 100 | 5 |
| | | | | 215,1 | 100 | 12 |
| | | | | 245,1 | 100 | 5 |
| NIV | 312,32 | 313,1 | $[M+H]^+$ | 175,0$^Q$ | 90 | 8 |
| | | | | 177,1$^q$ | 90 | 10 |
| | | | | 77,0 | 90 | 70 |
| | | | | 125,0 | 90 | 6 |
| | | | | 91,2 | 90 | 46 |
| FUS-X | 354,35 | 355,1 | $[M+H]^+$ | 175,0$^Q$ | 80 | 22 |
| | | | | 247,1$^q$ | 80 | 8 |
| | | | | 337,2 | 80 | 0 |
| | | | | 137,0 | 80 | 20 |
| HT-2 | 424,49 | 442,2 | $[M+NH_4]^+$ | 215,1$^Q$ | 90 | 7 |
| | | | | 197,1$^q$ | 90 | 10 |
| | | | | 263,1 | 90 | 50 |
| | | | | 169,1 | 90 | 20 |
| | | | | 105,0 | 90 | 40 |
| T-2 | 466,53 | 484,2 | $[M+NH_4]^+$ | 215,1$^Q$ | 100 | 15 |
| | | | | 305,1$^q$ | 100 | 7 |
| | | | | 245,1 | 100 | 7 |
| | | | | 185,1 | 100 | 20 |
| | | | | 197,1 | 100 | 13 |
| FB1 | 721,84 | 722,4 | $[M+H]^+$ | 352,1$^Q$ | 180 | 50 |
| | | | | 334,0$^q$ | 180 | 50 |
| | | | | 187,1 | 180 | 40 |
| | | | | 135,0 | 180 | 40 |
| FB2 | 705,84 | 706,3 | $[M+H]^+$ | 336,2$^Q$ | 180 | 40 |
| | | | | 54,9$^q$ | 180 | 70 |
| | | | | 317,8 | 180 | 40 |
| | | | | 73,5 | 180 | 30 |
| FB3 | 705,84 | 706,4 | $[M+H]^+$ | 336,5$^Q$ | 190 | 37 |
| | | | | 95,1$^q$ | 190 | 50 |
| | | | | 44,1 | 190 | 50 |
| | | | | 57,1 | 190 | 60 |
| STC | 324,29 | 325,0 | $[M+H]^+$ | 310,1$^Q$ | 150 | 25 |
| | | | | 281,0$^q$ | 150 | 35 |
| | | | | 253,0 | 150 | 50 |
| OTA | 403,81 | 404,1 | $[M+H]^+$ | 239,0$^Q$ | 120 | 25 |
| | | | | 102,1$^q$ | 120 | 80 |
| | | | | 358,1 | 120 | 7 |
| | | | | 221,0 | 120 | 35 |

Tabla 1 (continuación). Parámetros de espectrometría de masas para la identificación de las micotoxinas

| **Micotoxina** | **M** (g/mol) | **Ion Precursor** (m/z) | **Aducto** | **Ion Producto** (m/z) | ***Fragmentor*** (V) | **CE** (V) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| OTB | 369,37 | 370,1 | $[M+H]^+$ | $205,2^Q$ | 100 | 20 |
| | | | | $187,1^q$ | 100 | 35 |
| | | | | 77,1 | 100 | 90 |
| | | | | 103,2 | 100 | 60 |
| ZEA | 318,37 | 319,2 | $[M+H]^+$ | $187,1^Q$ | 100 | 20 |
| | | | | $283,2^q$ | 100 | 5 |
| | | | | 301,2 | 100 | 2 |
| | | | | 185,2 | 100 | 25 |

$^Q$: cuantificación, $^q$: cualificación.

# CAPÍTULO 5 / CHAPTER 5

# Desarrollo y validación de un método por HPLC-MS/MS para la cuantificación simultánea de 10 tricotecenos en leche de vaca UHT

## *Development and validation of a HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 10 trichothecenes in UHT cow milk*

Publicado en Journal of Chromatography A, 1419 (2015) 37-44.

Myra E. Flores-Flores, Elena González-Peñas
Organic and Pharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy,
University of Navarra

Journal Impact Factor: 3.926 / 5 Years Impact Factor 4.150 (JCR 2015)

| | | | |
|---|---|---|---|
| Quartile and Rank (JCR 2015): | Q1 | 11/75 | Analytical Chemistry |
| | Q1 | 14/77 | Biochemical Research Methods |

Essential Science Indicators (JCR 2015): Q1 19/509 Chemistry

## RESUMEN

Se ha desarrollado y validado un método LC-MS/MS (QqQ) para la determinación simultánea de los siguientes tricotecenos en leche UHT: nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON), deepoxi-deoxinivalenol (DOM-1), 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON), neosolaniol (NEO), diacetoxiscirpenol (DAS), fusarenona X (FUS-X), toxinas T-2 y HT-2. El tratamiento de muestra es sencillo y se basa en la extracción con acetonitrilo (ACN) acidificado con ácido fórmico al 0,2%, seguido por un proceso de limpieza que consiste en la adición de acetato de sodio al extracto ACN/agua para separar la fase acuosa y, con ello, los componentes polares de la leche. La validación del método para las 10 micotoxinas fue satisfactoria. Los parámetros de validación que se han tenido en cuenta son los siguientes: Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), recuperación, efecto matriz y estabilidad. Los LODs fueron 10,1; 2,5; 1,5; 1,9; 0,1; 0,5; 1,0; 0,08; 0,4 y 0,05 ng/mL para NIV, DON, DOM-1, FUS-X, NEO, 3-ADON, 15-ADON, DAS, HT-2 y T-2, respectivamente. Los valores de recuperación promedio (obtenidos en condiciones de precisión intermedia) oscilaron entre 63,5 y 75,8 (RSD ≤15%) para todas las micotoxinas. Todas las micotoxinas sufrieron efecto matriz, especialmente DON.

Flores-Flores ME, González-Peñas E. Development and validation of a HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 10 trichothecenes in UHT cow milk. Journal of Chromatography A. 2015, 1419:37-44.

# CAPÍTULO 6 / CHAPTER 6

# Método LC-MS/MS para la cuantificación de múltiples micotoxinas en leche de vaca

## *An LC-MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk*

Publicado en Food Chemistry 218 (2017) 378-385

Myra E. Flores-Flores, Elena González-Peñas
Organic and Pharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy and Nutrition, University of Navarra

Journal Impact Factor: 4.052 / 5 Years Impact Factor: 4.232 (JCR 2015)

| | | | |
|---|---|---|---|
| Quartile and Rank (JCR 2015): | Q1 | 7/125 | Food Science & Technology |
| | Q1 | 7/72 | Applied Chemistry |
| | Q1 | 12/80 | Nutrition & Technology |

Essential Science Indicators (JCR 2015): Q1 2/333 Agricultural Sciences

## RESUMEN

En este trabajo se presenta la cuantificación simultánea de 15 micotoxinas en leche de vaca por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas. La extracción se realizó con acetonitrilo acidificado, seguida de un paso de limpieza con acetato de sodio. Durante la validación se estudiaron los límites de detección (LOD) y cuantificación, la linealidad, precisión, exactitud, recuperación, efecto matriz y la estabilidad. Los valores de LOD oscilaron entre 0,02 y 10,14 ng/mL para las aflatoxinas M1, B1, B2, G1, G2, ocratoxinas A y B, toxinas T-2 y HT-2, deepoxi-deoxinivalenol, zearalenona, esterigmatocistina y fumonisinas B1, B2 y B3. Los valores de recuperación oscilaron entre 82,6 y 94,4% para todas las micotoxinas; excepto para las fumonisinas, cuyos valores oscilaron entre 42,1 y 64,6%. Todas las micotoxinas sufrieron efecto matriz, especialmente deepoxi-deoxinivalenol, zearalenona y esterigmatocistina. El efecto matriz osciló entre 25,5 y 96,8%. El método validado permite la cuantificación de las micotoxinas de mayor interés y también aquellas que han sido poco estudiadas en leche, como las fumonisinas, esterigmatocistina y ocratoxina B.

# CAPÍTULO 7 / CHAPTER 7

# Análisis de micotoxinas en leche de vaca de origen español

***Survey of mycotoxins in Spanish cow milk***

Enviado a Food and Chemical Toxicology

Myra Evelyn Flores-Flores, Elena González-Peñas
University of Navarra, School of Pharmacy and Nutrition,
Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry

## RESUMEN

Las micotoxinas pueden pasar hacia la leche animal y alcanzar así la dieta humana, pudiendo ocasionar toxicidad en el hombre. La interacción de diferentes micotoxinas puede ser aditiva o sinérgica. Por ello, se recomienda una monitorización de la presencia de micotoxinas en leche. Se ha estudiado la presencia de 22 micotoxinas (aflatoxinas M1, B1, B2, G1, G2, ocratoxinas A y B, nivalenol, deoxinivalenol, deepoxi-deoxinivalenol, 3 y 15 acetildeoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, neosolaniol, fusarenona X, toxinas T-2 y HT-2, fumonisinas B1, B2 y B3, esterigmatocistina y zearalenona) en un total de 191 muestras de leche española. Las muestras fueron tratadas por extracción líquido-líquido con acetonitrilo acidificado seguido por una separación de las fases acetonitrilo-agua por el uso de $CH_3COONa$. El análisis fue llevado a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrometría de masas de triple cuadrupolo. No se detectaron micotoxinas por encima de sus límites de detección. La aflatoxina M1 no fue detectada en niveles que excedieran el límite establecido por la Unión Europea.

## ABSTRACT

Mycotoxins could be carried over into animal milk, reaching human diet and having toxic effects on human health. The interaction of different mycotoxins may be additive or synergetic. Therefore, surveillance of mycotoxin occurrence in milk is recommended. A total of 191 Spanish milk samples was analyzed for the presence of 22 mycotoxins: aflatoxins M1, B1, B2, G1 and G2, ochratoxins A and B, nivalenol, deoxynivalenol, deepoxy-deoxynivalenol, 3 and 15 acetyldeoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, neosolaniol, fusarenon X, T-2 and HT-2 toxins, fumonisins B1, B2 and B3, sterigmatocystin and zearalenone. Samples were treated by liquid-liquid extraction with acidified acetonitrile, followed by an acetonitrile-water phase separation using $CH_3COONa$. The analysis was carried out by high performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer. No mycotoxin levels exceeded their limits of detection. The Aflatoxin M1 in the samples never exceeded the level established by the European Union.

## Keywords

Cow milk, mycotoxin, HPLC-MS/MS, Spain.

## Introduction

Mycotoxins can appear in the human food chain due to the contamination of agricultural commodities by filamentous fungi, especially those belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium,* and *Fusarium*, either in the crops or during storage (Binder, 2007). Foods of animal origin may also be contaminated when they are based on or prepared with products derived from animals whose diet contained mycotoxins (Capriotti, Caruso, Cavaliere, Foglia, Samperi & Lagana, 2012). Several studies worldwide demonstrated mycotoxin contamination in the feed (Rodrigues & Naehrer, 2012) and as a result, the European Union has established limits for some of the mycotoxins in products for animal consumption (European Commission, 2006; European Commission, 2013). Although the ruminant metabolism usually degrades mycotoxins into less toxic compounds, some of them remain unaltered and can be absorbed from the animal diet and accumulated in animal tissues or biological fluids, including the carry-over into the milk (Flores-Flores, Lizarraga, López de Cerain & González-Peñas, 2015). In addition, mycotoxins usually remain moderately stable after undergoing most food manufacturing processes (Bullerman & Bianchini, 2007). Special attention has been paid to the case of aflatoxin M1 (AFM1) because it is formed as a degradation product in the hepatic metabolism of aflatoxin B1 (AFB1) in ruminants (Wu, Jezkova, Yuan, Pavlikova, Dohnal & Kuca, 2009) and is excreted into milk. AFM1 has been classified as probably carcinogenic (group 2) by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2002) and the European Community has set a maximum allowable limit of AFM1 in milk (0.05 μg/kg) (European Commission, 2010). The levels of other mycotoxins in milk are not regulated by European legislation. In a review of the scientific literature on the occurrence of mycotoxins in 22 189 milk samples worldwide, not only was it found that 9.8 % exceeded the maximum limit set for AFM1 but also, the presence of low levels of other mycotoxins in milk was reported in other studies (Flores-Flores et al., 2015). Moreover, in a study carried out by Huang et al. (2014), the simultaneous presence of up to 4 mycotoxins was reported as follow: 15% of milk samples were contaminated with 2 mycotoxins, 45% with 3 mycotoxins and 22% with 4 mycotoxins. In the case of Europe, the European diet has a weighted mean concentration of aflatoxin M1 in milk of 0.023 μg/kg that supposes an intake of 6.8 ng/person per day (Creppy, 2002).

The maximum permitted limit for AFM1 in milk has been established but considering it as the only mycotoxin present in the sample. However, the presence of different mycotoxins in a food material is the most probable case due to the following: possible co-contamination by different fungi species; the capability of fungi to produce several mycotoxins; and the fact that feed is prepared using a mixture of compounds. This multi-exposure can change the toxic effects of mycotoxins on human health due to additive, synergistic or even antagonistic phenomena (Alassane-Kpembi, Schatzmayr, Taranu, Marin, Puel & Oswald, 2016; Smith, Madec, Coton & Hymery, 2016). Moreover, multi-

exposure can produce toxic effects even when levels of individual mycotoxins considered to be nontoxic are present; this was observed in a study carried out by Wan et al. (2013), who reported the toxic effect of the combination of 2, 3 and 4 mycotoxins at these levels.

In addition, it should be taken into account that milk is a highly produced and consumed food. In the EU, approximately 159.6 million tons of cow milk (96.8% of the total milk production) were produced in 2014 and in Spain, 85.6% of the milk produced in 2014 were from cows (Eurostat, 2015). The Food Consumption Report, published every year by the Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment, notes that milk is a food of high consumption among Spanish families and that in 2015, 3.46% of their budgets were spent on purchasing liquid milk (MAGRAMA, 2016a), with the central and northern regions of the country having the highest consumption (in liters) per capita (MAGRAMA, 2016b).

All of the previously mentioned explains the need for continuous surveillance of mycotoxin occurrence, especially co-occurrence, in milk in order to obtain data for better risk assessment and to protect consumer health. This paper shows a survey on the presence of 22 mycotoxins in 191 Spanish cow milk samples and, to the best of our knowledge, we authors believe that this is the first time that a Spanish study on simultaneous presence of mycotoxins has dealt with this many mycotoxins at the same time and analyzed such a relatively large number of samples. In order to carry out this study, two previously developed methodologies based on LC-MS/MS technology were applied.

## Material and Methods

### Chemicals and reagents

Methanol (LC-MS grade), formic acid (mass spectrometry grade, purity > 98%), ammonium formate (analytical grade) and sodium acetate (anhydrous, HPLC grade > 99.0%) were purchased from Sigma-Aldrich (USA) and acetonitrile (HPLC grade) from Merck (Germany). Deionized water (> 18 MΩ/cm resistivity) was purified in an Ultramatic Type I system from Wasserlab (Spain). All mycotoxins (purity ≥ 98%) were obtained from Sigma-Aldrich (USA) in solution except for ochratoxin A which was purchased in powder form.

### Mycotoxin stock solutions

Three mixed stock solutions (1, 2 and 3) were prepared by dilution of appropriate volumes of each mycotoxin standard solution in 10 mL of acetonitrile as previously described (Flores-Flores & González-Peñas, 2015; 2017). Mixed stock solution 1 contained nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1), fusarenon X

(FUS-X), neosolaniol (NEO), 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON), diacetoxyscirpenol (DAS), HT-2 toxin (HT-2) and T-2 toxin (T-2). Mixed stock solution 2 contained aflatoxin B1 (AFB1), aflatoxin B2 (AFB2), aflatoxin G1 (AFG1), aflatoxin G2 (AFG2), aflatoxin M1 (AFM1), ochratoxin A (OTA), ochratoxin B (OTB), zearalenone (ZEA) and sterigmatocystin (STR). Mixed stock solution 3 contained fumonisin B1 (FB1), fumonisin B2 (FB2) and fumonisin B3 (FB3). Mixed stock solutions 1 and 2 were stored at -20 ºC. Mixed stock solution 3 was prepared and used daily due to the instability of fumonisins in acetonitrile. For a better understanding of this manuscript, the mycotoxins contained in mixed stock solution 1 will be referred to as mycotoxin group A and mycotoxins from mixed stock solutions 2 and 3 will be referred to as mycotoxin group B. Due to the toxicity of these compounds, all of them were handled in solution using gloves and a face shield. In addition, low-light conditions were established during handling so as to prevent photo-instability.

**Sample collection**

One hundred and seven full cream milk samples were purchased from supermarkets in Spain between September 2013 and April 2016. Samples proceeded from 26 collection centers distributed throughout the country, and most of the samples were obtained from collection centers located in the major production areas (figures 1 and 2). Data regarding milk sample origin are unknown because the only available information on the package was the code of the collection center.

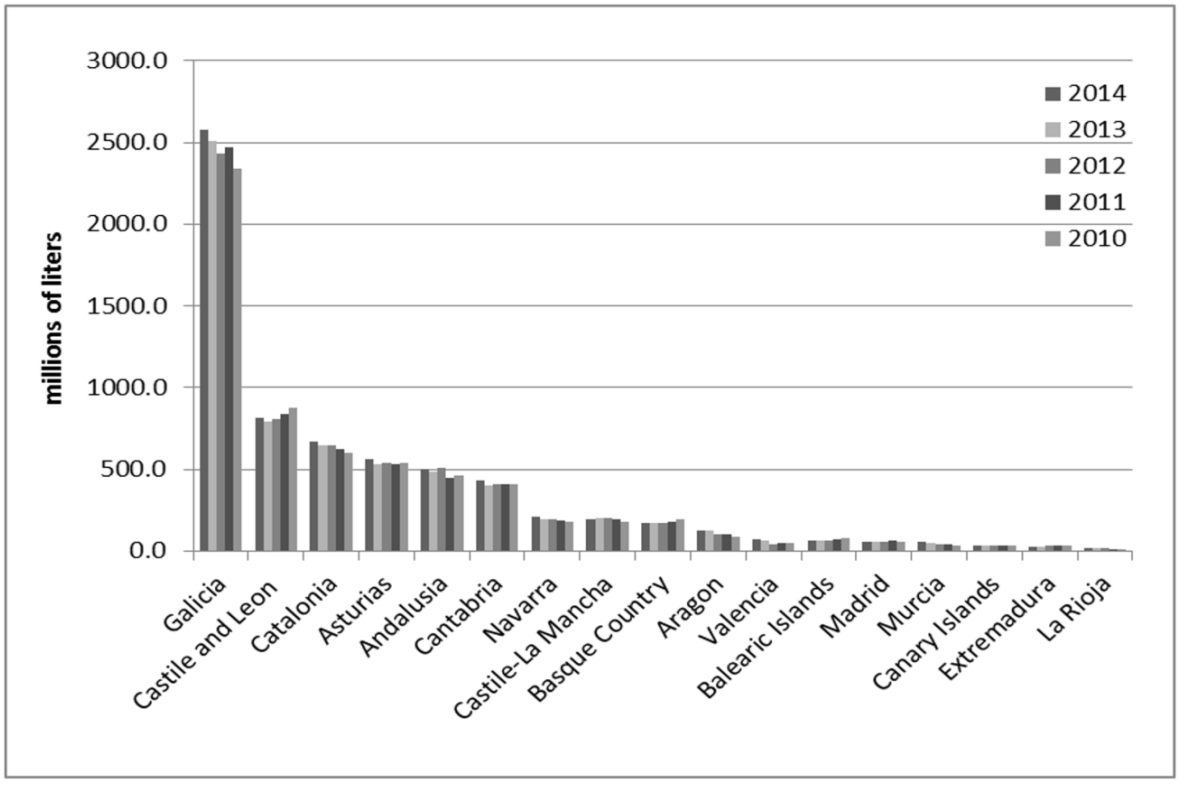



Figure 1. Milk Production in Spain between 2010 and 2014 in millions of liters. Information was taken from the last 5 Statistical Yearbook of Spain (INE, 2016)

Also, eighty-four raw milk samples were collected in March 2016, either directly from farms or in collaboration with a local dairy institute. All of them were from dairy farms located either in Navarra, La Rioja, Basque Country or Catalonia. One of the raw samples was taken from a cow with signs of disease of unknown origin. None of these samples suffered any treatment procedure after collection, with the exception of the addition of azidiol as a preservative.

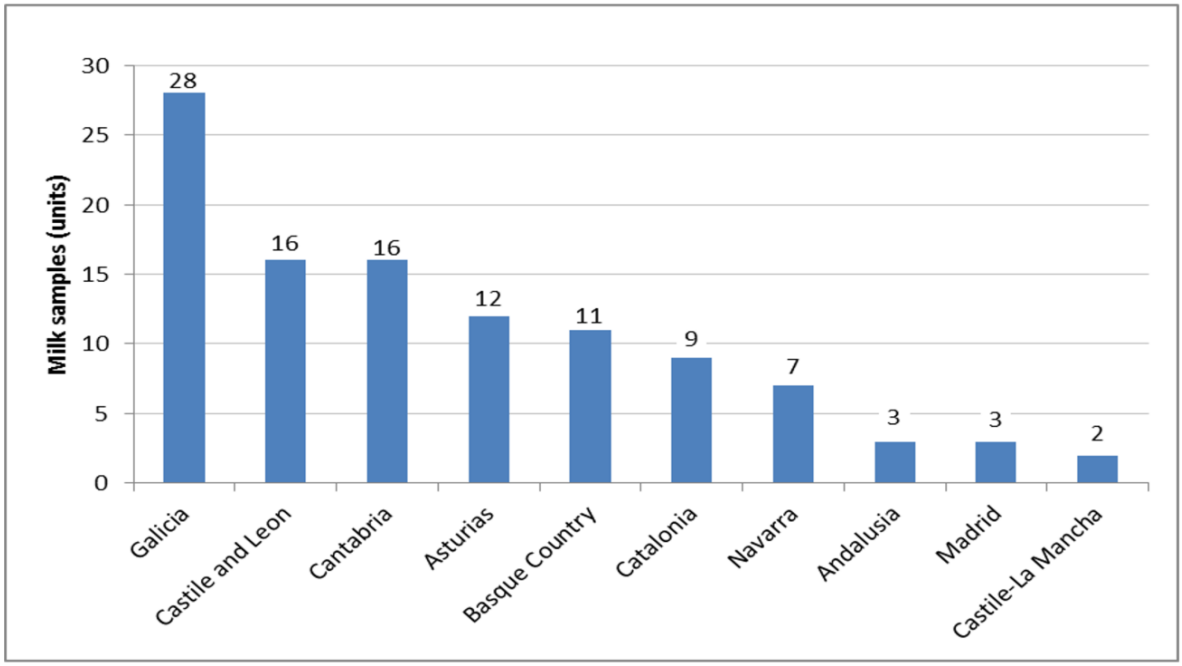



Figure 2. Distribution of analyzed commercial milk samples classified by collection center code

**Sample preparation**

In the case of commercial milk samples, they were opened and analyzed during 1-2 days. In the case of raw milk samples, they were analyzed within the week that they were collected. All the samples were maintained at 4ºC until analysis. Prior to chromatographic analysis, milk samples were treated following the procedures previously developed by our group (Flores-Flores & González-Peñas, 2015; Flores-Flores & González-Peñas, 2017). Briefly, from each sample, 1 mL of milk was poured into a tube for the analysis of mycotoxin group A and another 1 mL was poured into a second tube for the analysis of mycotoxin group B. Each tube was extracted with acidified acetonitrile. After centrifugation, the upper phase of each tube was transferred to another clean tube and water-acetonitrile phases separation was induced by the addition of $CH_3COONa$. Next, each acetonitrile phase was dried and the residue from each one of the tubes was reconstituted with LC mobile phase. Therefore, a similar methodology was applied for the study of both mycotoxin groups with the exception that the mobile phase composition used in the residue reconstitution was different. In addition, the two groups of mycotoxins were analyzed in separate runs with different separation conditions, as explained below.

**Instrumentation and analytical conditions**

An Agilent Technologies (Germany) 1200 LC system was used. The chromatographic column was an Ascentis Express C18, 2.7 µm particle size, 150 mm x 2.1 mm from Supelco Analytical (USA) maintained at 45 ºC. Mobile phase consisted of solution A (5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid in water) and solution B (5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid in MeOH:$H_2O$ 95:5). Two different runs were needed, one for each one of the groups of mycotoxins. For mycotoxin group A, 15 µL were injected and a previously published elution program was selected (Flores-Flores & González-Peñas, 2015). For mycotoxin group B, 20 µL were injected and a previously developed elution program was chosen (Flores-Flores & González-Peñas, 2017). One of the differences between both runs was the initial content of the organic component (B) in the mobile phase (5% for mycotoxin group A and 40% for mycotoxin group B). Flow rate was 0.4 mL/min in both cases. Detection was carried out using a 6410 Triple Quad LC-MS/MS System from Agilent Technologies (Germany) equipped with an electrospray ionization interface. MS operation conditions were: capillary voltage at 4000 V, drying gas was high purity nitrogen at 350 ºC, 9 L/min and 40 psi. In addition, ultra-high purity nitrogen (99.999%, Praxair, Spain) was used inside the collision cell. Selected reaction monitoring was used for data collection. MS parameters for identifying each one of the mycotoxins were those previously reported by our group (Flores-Flores & González-Peñas, 2015; Flores-Flores & González-Peñas, 2017).

**Method validation**

Validation of the two developed methodologies has been previously described (Flores-Flores & González-Peñas, 2015; Flores-Flores & González-Peñas, 2017). Limits of detection (LOD) and quantification, linearity, precision, accuracy, recovery, matrix effect, and stability were studied for both methods. Recovery values were between 53.8 and 94.4% for all the mycotoxins, except for fumonisin B1 which was 42.1%. With the exception of FB1, all the mycotoxins that are indicated in Commission Regulation (EC) Nº 401/2006 (European Commission, 2014), which establishes the methods for sampling and analysis for the official control of mycotoxin levels in foodstuffs, met the performance criteria indicated in this guideline. RSD (%) values (in intermediate precision conditions) were lower than 15% for all the mycotoxins. Matrix effect appeared for all of the mycotoxins; therefore, matrix-calibration curves were constructed for all of them. Detection limits were between 0.02 and 10.14 ng/mL for all the mycotoxins (table 1). For AFM1, the only mycotoxin for which a maximum limit of 0.05 µg/kg has been established in the UE, a LOD of 0.025 ng/mL was achieved.

**Sample analysis**

All the samples were analyzed as analytical sequences, including quality control samples which were prepared by spiking milk. The levels of fortification of the quality control samples were the LOQ and the highest levels in the quantification range of each one of

the mycotoxins. With regard to these quality control samples, two in every ten were analyzed. In the case of mycotoxin presence in the sample, the sample would be re-analyzed along with calibration samples prepared by spiking milk samples, using the same procedure as when validation studies were performed; a summary is provided below.

One mL of milk was fortified with one of the mycotoxin groups. In the case of mycotoxin group B, the appropriate volume of the mixed stock solution 1 was dried in a tube (vacuum, 65 ºC) and then the mycotoxin residue was dissolved in 1 mL of milk by vortexing. For mycotoxin group B, appropriate volumes of mixed stock solutions 2 and 3 were reduced (vacuum, 65 ºC) to approximately 25 µL and then diluted with 1 mL of milk. The spiking procedure was different for both groups because some mycotoxins of the group B in the dried residue were not completely redissolved in the milk.

**Study of the influence of azidiol on mycotoxin detection**

The presence of sample components can alter the response of mycotoxins in the mass detector. Raw milk samples, collected from a local dairy institute, contained azidiol, a preservative compound frequently used by milk testing laboratories in Spain (Llopis, Marugón, Althaus & Pons, 2013) and therefore, the effect of the presence of this compound in the response of mycotoxins in the detector was evaluated. Milk containing this product was fortified at LOQ and the highest level in the quantification range of each mycotoxin. The responses (peak areas) obtained were compared with those obtained for mycotoxins in fortified commercial milk samples at the same concentration levels. The experiment was carried out on three consecutive days.

## Results and Discussion

**Sample Collection**

Among the different distribution channels for milk, supermarkets were chosen due to the fact that Spanish families purchase more than 50% of the liquid milk consumed in this type of establishment (MAGRAMA, 2015; MAGRAMA, 2016b). According to the last 5 Statistical Yearbook of Spain that reports milk production in Spain between 2010-2014 (INE, 2016), added together, Galicia, Castile and Leon, Andalusia, Catalonia, Asturias, Cantabria, Navarre, Castile-La Mancha and Basque Country make up 93% of the total production of cow milk in the country in 2014 (Figure 1). Nowadays, it is not possible to know the geographical origin of the milk just from the package information because only the collection center code is provided. Therefore, this last piece of information was used to classify the commercial samples. The code on the package of the 107 full cream milk samples indicated that the collection centers from where the samples were obtained were from the high milk production regions (figure 2).

**Study of the influence of azidiol on mycotoxin detection**

The relationship between the mean areas in both types of samples at each one of the concentration levels (LOQ and the highest level in each range) was less than 15% for all the mycotoxins. Thus, no additional matrix effects due to the azidiol were considered. However, when analyzing raw milk samples, quality control samples were made by spiking raw milk containing azidiol.

**Sample analysis**

The first attempt for developing the analytical method for quantifying the 22 mycotoxins in milk tried to achieve their quantification in one analytical run. Adequate chromatographic separation and detection were obtained for all of them by applying a gradient separation starting with a 5% B in the mobile phase. However, the carry-over of ochratoxin A was observed as a little peak in blank samples after analysis of the spiked milk samples. Different conditions were tested in order to prevent this carry-over and from the results of these assays it was concluded that OTA was not cleaned well in the injector until a 40% B was used as the initial mobile phase. In this condition, the more polar mycotoxins were not well separated and, as the detector had to check several transitions in a small time period, sensitivity for these mycotoxins decreased. Therefore, the mycotoxins were divided into two groups (A and B) as previously explained. Group A included 10 trichothecenes: NIV, DON, DOM-1, FUS-X, NEO, 3-ADON, 15-ADON, DAS, HT-2, and T-2. Group B included AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, OTA, OTB, ZEA, STR, FB1, FB2 and FB3. Each group was analyzed in separate runs with different gradient conditions, especially in terms of the initial composition of the mobile phase. This procedure achieved adequate sensitivity for all the mycotoxins and no carry-over for OTA was detected. Figures 3 and 4 show examples of the chromatograms obtained for both groups of mycotoxins in raw milk samples.

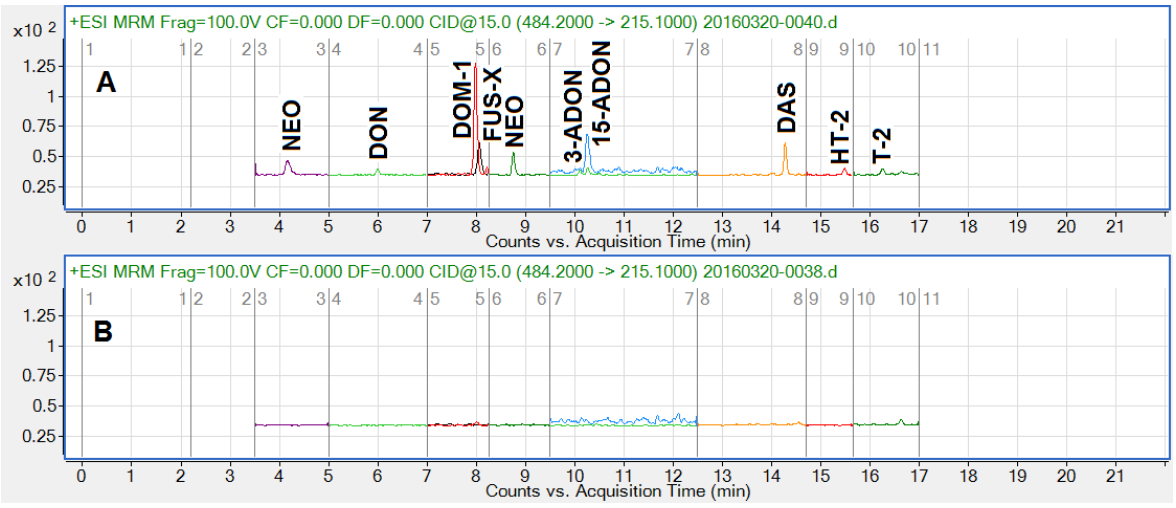



Figure 3. Superposed quantification products ions obtained after analysis of mycotoxin group A. (A) fortified raw milk sample at LOQ level containing azidiol and (B) non-fortified raw milk sample containing azidiol.

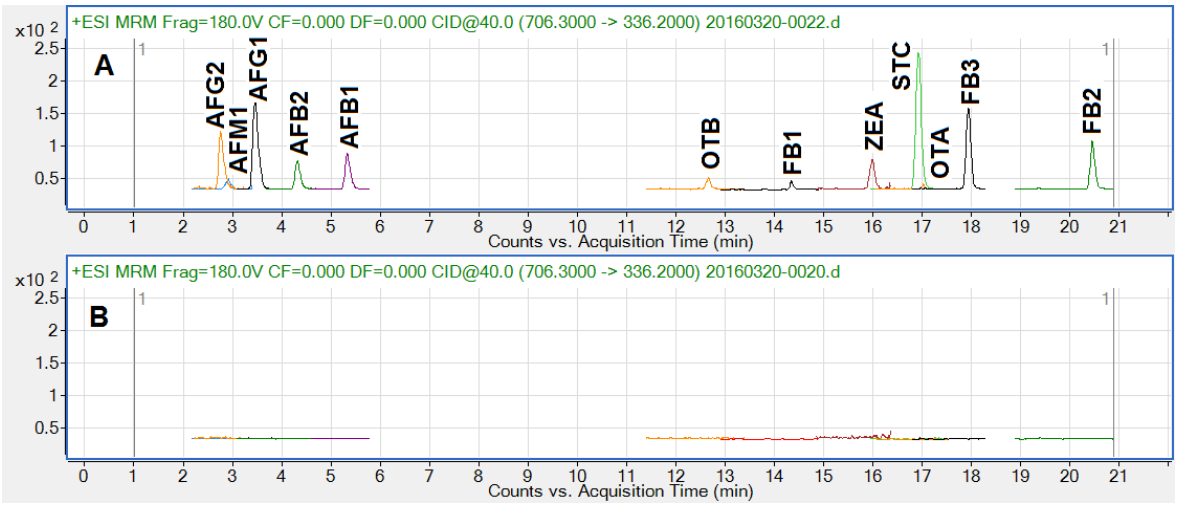



Figure 4. Superposed quantification product ions obtained after analysis of mycotoxin group B. (A) fortified raw milk sample at LOQ level containing azidiol and (B) non-fortified raw milk sample containing azidiol.

No levels have been found to be higher than the respective LOD values in any of the analyzed samples. Therefore, and with respect to AFM1, the only mycotoxin for which a permissible maximum limit has been established in milk within the European Union, all tested samples complied with legislation in terms of this mycotoxin.

In Spain, some authors have studied the presence of different mycotoxins in milk, especially aflatoxins. Cano-Sancho et al. (2010) detected AFM1 in 94.4% of 72 milk samples purchased from 12 Catalonian cities (northeast of Spain), although in levels below the regulated limit. Aguilera-Ruiz et al. (2011) did not find any levels of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and T-2 toxin in 15 samples of milk purchased from the province of Almeria (located in the southeastern area of Spain).

In addition, Beltran et al. (2011) did not find aflatoxins B1, B2, G1, G2 and M1 in two raw milk samples obtained from the province of Castellon (eastern coast of Spain). González-Osnaya et al. (2008) analyzed OTA in 16 samples of whole milk purchased from the province of Valencia (eastern coast of Spain); none of them contained OTA above the detection level of the method.

Rodríguez et al. (2003) analyzed 92 raw cow milk samples that were collected across the province of Leon (northwestern area of Spain) between the autumn of 2000 and the spring of 2001. AFM1 was detected in 3 of them, but at levels that were below the maximum permitted limit by EU.

## Conclusions

A total of one hundred and ninety-one milk samples from Spain were analyzed for 22 mycotoxins: NIV, DON, DOM-1, FUS-X, NEO, 3-ADON, 15-ADON, DAS, HT-2, T-2, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, OTA, OTB, ZEA, STR, FB1, FB2 and FB3; and none of them were detected above their respective LODs. These results are encouraging and, together with those obtained from other studies carried out in Spain, demonstrate a low risk of mycotoxin contamination in Spanish milk. However, due to the importance of milk due to its economic impact as well as its elevated consumption, especially by a vulnerable group such as children, the carry-over of periodic surveillance programs is recommended.

**Acknowledgements**

We wish to thank the "Programa de Investigación Universidad de Navarra" (PIUNA) for financial support. M. Flores Flores wishes to express her gratitude to the "Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra" (ADA) for the grant funding. The authors are grateful to all persons and institutions that helped in the collection of the samples. We wish to extend our gratitude to Ms. Laura Stokes for reviewing the English version of this manuscript.

**References**

Aguilera-Luiz, M., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Martínez Vidal, J. L. & Frenich, A. G. (2011). Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 399*(8), 2863-2875. DOI:10.1007/s00216-011-4670-7

Alassane-Kpembi, I., Schatzmayr, G., Taranu, I., Marin, D., Puel, O. & Oswald, I. P. (2016). Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 00-00. DOI:10.1080/10408398.2016.1140632

Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V., Cortés, M. Á, Yusà, V. & Hernández, F. (2011). UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chemistry, 126*(2), 737-744. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.11.056

Binder, E. M. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology, 133*(1–2), 149-166. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2006.08.008

Bullerman, L. B. & Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology, 119*(1–2), 140-146. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035

Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A. J., Peris-Vicente, J. & Sanchis, V. (2010). Incidencia de aflatoxina $M_1$ y evaluación de la exposición en Cataluña (España). *Revista Iberoamericana De Micología, 27*(03), 130-135; 135. DOI:10.1016/j.riam.2010.05.003

Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R. & Lagana, A. (2012). Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews, 31*(4), 466-503. DOI:10.1002/mas.20351

Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters, 127*(1-3), 19-28. DOI:10.1016/S0378-4274(01)00479-9

European Commission. (2014). Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Amended by Commission Regulations Nº 178/2010 and 519/2014.*2016*, 1-44. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1457455676474&uri=CELEX:02006R0401-20140701

European Commission. (2013). Commission Recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products (2013/165/EU). *Official Journal of the European Union, 91*, 12-14. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013H0165&from=EN

European Commission. (2010). Commission Regulation (EU) Nº 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union, 50*, 8-12. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0165&from=EN

European Commission. (2006). Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochartoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC). *Official Journal of the European Union, 229*, 7-9. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006H0576&from=EN

Eurostat. (2015). Milk and milk product statistics. Accessed June 16th 2016. http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk_and_milk_product_statistics#Milk_production

Flores-Flores, M. E. & González-Peñas, E. (2017). An LC–MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. *Food Chemistry, 218*, 378-385. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.09.101

Flores-Flores, M. E. & González-Peñas, E. (2015). Development and validation of a high performance liquid chromatographic–mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 10 trichothecenes in ultra-high temperature processed cow milk. *Journal of Chromatography A, 1419*, 37-44. DOI:10.1016/j.chroma.2015.09.069

Flores-Flores, M. E., Lizarraga, E., López de Cerain, A. & González-Peñas, E. (2015). Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control, 53*(0), 163-176. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.01.020

González-Osnaya, L., Soriano, J. M., Moltó, J. C. & Mañes, J. (2008). Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin A in bovine milk. *Food Chemistry, 108*(1), 272-276. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.10.013

Huang, L. C., Zheng, N., Zheng, B. Q., Wen, F., Cheng, J. B., Han, R. W., Xu, X. M., Li, S. L. & Wang, J. Q. (2014). Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and α-zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry, 146*(0), 242-249. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.09.047

IARC. (2002). Aflatoxins. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. International Agency for Research on Cancer.* (pp. 171-300). http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/index.php

INE. (2016). Anuario Estadístico de España, Instituto Nacional de Estadística (INE). Accessed Jun 10th 2016. http://www.ine.es/prodyser/pubweb/anuarios_mnu.htm

Llopis, M. B., Marugón, M. R., Althaus, R. L. & Pons, M. P. M. (2013). Effect of storage and preservation of milk samples on the response of microbial inhibitor tests. *Journal of Dairy Research, 80*(04), 475-484. DOI:10.1017/S0022029913000423

MAGRAMA. (2016a). Últimos datos de consumo alimentario, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Accessed Jun 9th 2016. http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/#

MAGRAMA. (2016b). Informe del consumo de alimentación en España 2015. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España.*2016*, 1-230. http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2015_tcm7-422694.pdf

MAGRAMA. (2015). Informe del consumo de alimentación en España 2014. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España.*2016*, 1-139. http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2014_tcm7-382148.pdf

Rodrigues, I. & Naehrer, K. (2012). A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed. *Toxins, 4*(9)DOI:10.3390/toxins4090663

Rodriguez Velasco, M. L., Calonge Delso, M. M. & Ordonez Escudero, D. (2003). ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M(1) in raw cow's milk. *Food Additives and Contaminants, 20*(3), 276-280. DOI:10.1080/0265203021000045208

Smith, M. C., Madec, S., Coton, E. & Hymery, N. (2016). Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins, 8*(4), 94. DOI:10.3390/toxins8040094

Wan, L. Y. M., Turner, P. C. & El-Nezami, H. (2013). Individual and combined cytotoxic effects of Fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology, 57*(0), 276-283. DOI:10.1016/j.fct.2013.03.034

Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V. & Kuca, K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews, 41*(1), 1-7. DOI:10.1080/03602530802563850

# CAPÍTULO 8 / CHAPTER 8

# Estudio preliminar sobre la presencia de micotoxinas en leche evaporada peruana

***Preliminary survey as regards the presence of mycotoxins in Peruvian evaporated cow milk***

Enviado a Food and Chemical Toxicology

Myra E. Flores-Flores, Elena González-Peñas
University of Navarra, School of Pharmacy and Nutrition,
Organic and Pharmaceutical Chemistry Department

## RESUMEN

Se presenta, por primera vez, un estudio sobre la presencia de 22 micotoxinas (aflatoxinas M1, B1, B2, G1, G2, ocratoxinas A y B, fumonisinas B1, B2 y B3, toxinas HT-2 y T-2, nivalenol, deoxinivalenol, deepoxi-deoxinivalenol, 3 y 15 acetil-deoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, fusarenona X, neosolaniol, esterigmatocistina y zearalenona) en 30 muestras de leche evaporada de origen peruano. El análisis se ha llevado a cabo por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem. El análisis se basó en 2 métodos previamente validados para la cuantificación de estos compuestos tóxicos en leche líquida. Se revalidó el método para la nueva matriz. La única micotoxina detectada fue ocratoxina A en 4 muestras, pero a niveles por debajo del límite de cuantificación (0,2 ng/mL).

## ABSTRACT

A survey of the presence of 22 mycotoxins (aflatoxins M1, B1, B2, G1, G2, ochratoxins A and B, fumonisins B1, B2 and B3, HT-2 and T-2 toxins, nivalenol, deoxynivalenol, deepoxy-deoxynivalenol, 3 and 15 acetyl-deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, fusarenon X, neosolaniol, sterigmatocystin and zearalenone) in 30 Peruvian evaporated cow milk is presented for the first time. The analysis has been carried out by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The analysis was based on two previously validated methods for quantification of these toxic compounds in liquid milk, revalidated for the new matrix. The only detected mycotoxin was ochratoxin A in 4 samples, although at levels below its limit of quantification (0.2 ng/mL).

## Keywords

Mycotoxin, ochratoxin, evaporated milk, Peru, LC-MS/MS

## Introduction

Mycotoxins are toxic secondary fungi metabolites produced mainly by *Aspergillus, Penicillium and Fusarium* genera that contaminate crops and foodstuff worldwide. Contamination can occur before and/or during harvest. It can also occur when the storing conditions for foodstuff are inadequate in terms of temperature and humidity (Binder, 2007).

Aflatoxins are mainly produced by *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus*, primarily found in hot, humid climates. *Fusarium* species, which produce fumonisins, trichothecenes and zearalenone grow in a wide range of temperatures but only where there is relatively high water activity (aw>0.9); they can be found in temperate climates, where trichothecenes are mainly produced, and in moist cool conditions, where zearalenone is primarily found (EFSA, 2004; Marin, Ramos, Cano-Sancho & Sanchis, 2013). Several *Aspergillus* and *Penicillium* species can produce ochratoxin A (OTA) in foodstuffs in different ecological niches (Malir, Ostry, Pfohl-Leszkowicz, Malir & Toman, 2016). The most likely scenario is co-contamination in foodstuffs due to the simultaneous contamination by different fungi species in a same raw material and because one type of fungi can produce different toxins.

Mycotoxins reach human and animals through food and feed, producing several effects on their health. These health problems, along with the resulting economic losses, have been widely reported (Capriotti, Caruso, Cavaliere, Foglia, Samperi & Lagana, 2012; Fink-Gremmels, 2008; Hussein & Brasel, 2001; Wu, Groopman & Pestka, 2014).

Peru has a great diversity of climates (28 out of the 32 existing in the world), largely due to its tropical latitude and the presence of the Andes and two ocean currents (Humboldt and El Niño). The north coast is warm, dry in winter, and hot and rainy in summer. The Andean region has a varied climate and in counter season to the coast (i.e. when it is summer on the coast, it is “winter” in the mountains). In addition, the different heights and topography exert their influence on the generation of microclimates and precipitation variations, depending on the area. The temperature variation between night and day is pronounced and there are areas with a perpetual presence of snow and glaciers. Heavy rainfall and high temperatures characterize the Peruvian Amazon, with the exception of its southern region that has cold winters and seasonal rainfall (INIA, 2009). The great Peruvian climatic diversity is conducive to a variety of fauna and flora, and consequently, to the development and growth of a broad spectrum of fungi.

Some problems with mycotoxin contamination in feed and cereals have been described in some South American countries, including Peru (Resnik, Costarrica & Pacin, 1995; Rodrigues & Naehrer, 2012). In the case in which animals are fed contaminated foodstuff, mycotoxins can reach animal tissues or fluids that are used as a raw material in the

production of food for human consumption. One example is milk; although the ruminal metabolism protects ruminants against mycotoxins, some of them can pass through this barrier unchanged. In addition, in the case of high mycotoxin contamination in feed or alterations in the ruminal metabolism, this barrier can be surpassed (Fink-Gremmels, 2008).

In milk, aflatoxin M1 (AFM1) is the unique mycotoxin for which there is a regulated maximum level. In our review regarding milk contamination due to mycotoxins (Flores-Flores, Lizarraga, López de Cerain & González-Peñas, 2015), at least 8.65% of the analyzed samples from the American continent failed to comply with the US regulations for this mycotoxin in milk (0.5 μg/kg) (FDA, 2005). This percentage will be higher if the European regulation is used as reference (0.05 μg/kg) (European Commission, 2010). In addition, the occurrence of OTA, zearalenone (ZEA) and its metabolites, fumonisin B1 and B2 (FB1, FB2), deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1), cyclopiazonic acid, and aflatoxins G1, G2, B1, B2 and M2 (AFG1, AFG2, AFB1, AFB2, AFM2) have also been detected in animal milk samples worldwide (Flores-Flores et al., 2015). In the case of Peru, and to the best of our knowledge, the presence of mycotoxins in milk has not been studied. Only milk samples from the Arequipa region have been analyzed for AFM1 contamination (Ortiz, 2009). This region accounts for 17.7% of the total Peruvian milk production (MINAGRI, 2015).

With regard to milk intake in Peru, per capita consumption of cow milk has almost doubled over the last 24 years, from 45.8 kg/inhabitant/year registered in 1990 to 83.0 kg/inhabitant/year in 2013 (MINAGRI, 2014). Thus, milk production is an increasing industry in this country. Cow milk production in 2014 was 1840.2 thousands of tons, corresponding to 5% of the total Peruvian agricultural and livestock production (MINAGRI, 2015). Three types of milk are the most consumed: raw, evaporated and powder. While per capita consumption of powdered milk has remained almost the same and raw milk has almost doubled, evaporated milk has become the preferred type by consumers, having tripled its per capita consumption over the last 24 years (MINAGRI, 2014).

Some methods have been developed for multi-mycotoxin quantification in milk (Aguilera-Luiz, Plaza-Bolaños, Romero-González, Martínez Vidal & Frenich, 2011; Flores-Flores & González-Peñas, 2015; Flores-Flores & González-Peñas, 2017; Huang et al., 2014; Sørensen & Elbæk, 2005; Wang & Li, 2015; Winkler, Kersten, Valenta, Meyer, Engelhardt & Dänicke, 2015; Zhan et al., 2012), but none of them have been specifically validated for evaporated cow milk.

Since the Peruvian climate diversity is ideal for a wide spectrum of fungi growth, the almost inexistent studies on mycotoxins in Peruvian products, the increasing value of milk in the agricultural production in Peru and the need for assuring food safety make it important to study the presence of toxic contaminants in milk samples. This paper

presents the results obtained from screening 22 mycotoxins in 30 Peruvian evaporated cow milk samples. The analysis has been carried out using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry methods based on previously developed methods for the analysis of mycotoxins in cow liquid milk and revalidated for the new matrix.

## Experimental section

### Reagents

Acetonitrile (ACN, HPLC grade) was provided by Merck (Germany). Methanol (MeOH, LC-MS grade), formic acid (mass spectrometry grade, purity > 98%), ammonium formate (analytical grade), sodium acetate (anhydrous, HPLC grade > 99.0%) and mycotoxins (purity ≥ 98%) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). OTA was purchased in powder form; FB1, FB2 and fumonisin B3 (FB3) were in ACN:$H_2O$ (50:50) solution and all other mycotoxins were in ACN solutions. Water (>18MΩ/cm resistivity) was obtained from an Ultramatic Type I system (Wasserlab, Spain).

### Mycotoxin stock solutions

All mycotoxins were handled in solution with gloves and face shield. To prevent photo-instability, low-light conditions were established when working with the mycotoxin solutions and samples. A solution of 1 mg OTA/mL MeOH was prepared and the exact concentration was determined by UV spectrophotometry at 333nm (UVIKON 922, Kontron Instruments). All other mycotoxins were used directly from standard solutions. Three stock solutions were prepared by dilution of selected volumes of each one of the mycotoxin standard solutions in 10 mL of acetonitrile. Seven trichothecenes were included in the stock solution 1 (nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), fusarenon X (FUS-X), neosolaniol (NEO), 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON) and diacetoxyscirpenol (DAS)). AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, OTA, ochratoxin B (OTB), ZEA, sterigmatocystin (STC), DOM-1, HT-2 toxin (HT-2) and T-2 toxin (T-2) were included in the stock solution 2; and finally, a third stock solution was prepared with FB1, FB2, and FB3. Two stock solutions 1 were prepared independently and injected the same day; the peak areas obtained for each mycotoxin in both solutions were compared to assure that they were prepared correctly. The same procedure was carried out in order to assure the adequate preparation of stock solutions 2 and 3. Stock solutions 1 and 2 were stored at -20 ºC. Mycotoxin stability in this condition was previously determined (Flores-Flores & González-Peñas, 2015; Flores-Flores & González-Peñas, 2017). Fumonisins were unstable in acetonitrile and therefore stock solution 3 was prepared before use. From here on in, mycotoxins in stock solution 1 will be named as mycotoxin group A, and those from stock solutions 2 and 3 as mycotoxin group B. Table 1 shows the concentration of each mycotoxin in each stock solution.

Table 1: Concentration of each mycotoxin in the mixed stock solutions 1, 2 and 3

| Mixed stock solution 1 | | Mixed stock solution 2 | | Mixed stock solution 3 | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Mycotoxin** | **ng/mL** | **Mycotoxin** | **ng/mL** | **Mycotoxin** | **ng/mL** |
| NIV | 1011.4 | DOM-1 | 151.5 | FB1 | 507.0 |
| DON | 251.3 | AFG2 | 7.5 | FB3 | 125.0 |
| FUS-X | 185.0 | AFM1 | 2.5 | FB2 | 125.0 |
| NEO | 10.0 | AFG1 | 5.1 | | |
| 3-ADON | 50.2 | AFB2 | 2.0 | | |
| 15-ADON | 101.1 | AFB1 | 2.0 | | |
| DAS | 8.0 | HT-2 | 20.1 | | |
| | | OTB | 2.5 | | |
| | | T-2 | 2.5 | | |
| | | ZEA | 25.5 | | |
| | | STC | 25.1 | | |
| | | OTA | 10.0 | | |

**Sample collection**

Thirty evaporated cow milk samples were purchased from supermarkets in Lima, Peru, between 2013 and 2015. At least 1 sample was obtained from each one of the 8 most popular brands available in Peru. Fifteen were whole cream milk, 14 were semi-skimmed milk and 1 was skimmed milk. They were kept at room temperature and protected from sunlight.

**Instrumentation and analytical conditions**

An Agilent Technologies (Germany) 1200 LC coupled to a 6410 Triple Quad (QqQ) LC-MS/MS System equipped with an electrospray ionization interface was used. LC system consisted of degasser (G1379B), binary pump (G1312B), autosampler (G1367C) with thermostat (G1330B) and thermostatic column compartment (G1316B). An Ascentis Express C18 column (2.7 µm particle size, 150 x 2.1 mm) from Supelco Analytical (USA), maintained at 45 ºC was used for separation purposes. Mobile phase consisted of 5mM ammonium formate and 0.1% formic acid in water (solution A) and 5mM ammonium formate and 0.1% formic acid in MeOH:$H_2O$ 95:5 (solution B) at 0.4 mL/min. Mycotoxins group A was eluted using a gradient program starting with 5% of B solution in accordance with Flores-Flores & González-Peñas (2015), and the injection volume was 15 µL. Mycotoxins group B was analyzed in a different run, using a gradient program starting at 40% B solution in accordance with Flores-Flores & González-Peñas (2017), and the injection volume was 20 µL. The chromatographic separation was carried out in gradient conditions in both cases, although with differences in the rate for increasing the organic

phase (B) percentage. MS conditions were: capillary voltage at 4000V, nitrogen (high purity, 350 ºC, 9 L/min, 40 psi) as drying gas, and inside the collision cell (ultrahigh purity nitrogen 99.999%, Praxair, Spain). Data was collected by means of selected reaction monitoring (SRM). MS parameters for identifying each mycotoxin were those previously used by our group (Flores-Flores & González-Peñas, 2015; Flores-Flores & González-Peñas, 2017).

**Sample preparation**

Evaporated cow milk was diluted following manufacturer recommendations for human consumption: (1:1). Five mL of evaporated cow milk were diluted with five mL of water. This solution was shaken for 15 min. Next, two aliquots of one mL of diluted milk were separated. Each aliquot was used for the analysis of a group of mycotoxins (A or B). The extraction procedures were those previously described in Flores-Flores & González-Peñas (2015) and Flores-Flores & González-Peñas (2017). In both cases, the extraction was performed with ACN acidified with HCOOH. After agitation and centrifugation, the supernatant was transferred to another tube containing sodium acetate. After stirring and centrifuging, the upper phase was evaporated at 65 ºC to dryness. Finally, 200 µL of mobile phase were added: 5% B for mycotoxins group A and 40% B for mycotoxins group B; the residues were dissolved using vortex. Before LC-MS/MS analysis, samples were filtered through PVDF filters (0.45 µm) (Millipore Corporation, USA).

**Calibration and control samples preparation**

Semi-skimmed evaporated cow milk (diluted with $H_2O$ 1:1), in which mycotoxins were not detected, was spiked with mycotoxins and used as calibration or control samples. Appropriate volumes of the corresponding stock solutions were poured into polypropylene centrifuge tubes and dried (in the case of mycotoxin group A) or reduced until approximately 25 µL (in the case of mycotoxin group B). The solvent was evaporated under vacuum, at 65 ºC (GeneVac evaporator, SP Scientific, England). Next, 1 mL of reconstituted milk was added to each residue, mixed, and set aside for 10 min before continuing with the procedure for sample preparation.

**Method validation for mycotoxin group B**

Selectivity, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ), linearity, precision, accuracy, recovery and matrix effect were studied for method validation.

For selectivity, the intensity ratio in percentage (q/Q %), where q and Q correspond to the qualification and quantification product ions respectively, was calculated in standard samples (mycotoxins in mobile phase) and in calibration samples (mycotoxins in milk). In addition, the retention time of each mycotoxin was compared in both (standard and calibration) sample types. The presence of these two products ions, with a difference of less than 15% in their intensity ratio and a difference of less than 0.5% in

chromatographic retention times in standards and in calibration samples, were chosen as criteria for selectivity.

LOD and LOQ for each mycotoxin of group B were determined by spiking reconstituted milk at different low concentration levels. LOQ was defined as the lowest concentration level with precision (as RSD %) and accuracy (as relative error) values ≤ 20%; and LOD as the lowest concentration level for which both product ions gave peaks with a signal-to-noise (S/N) ratio of at least 3.

To determine linearity, a matrix-matched calibration curve (with 6 calibration points) was prepared for each one of the mycotoxins on 3 different days. A slope value statistically different from 0 (p = 95%), a determination coefficient ($R^2$) > 0.99 and a relative error <15% (20% for the LOQ) for all the calibrators were the evaluation criteria. The range of concentration in the determination of linearity for each mycotoxin was from LOQ to 10 x LOQ concentration levels.

Precision was calculated as RSD (%); accuracy was calculated as the percentage of relative error (%RE) between the nominal concentration value in the control sample and the concentration obtained using the calibration curve. Both parameters were studied in within-run and between-run conditions. Control milk samples at LOQ, 5xLOQ and 10xLOQ levels per triplicate were prepared on one day (within-run conditions) and on three days (between-run conditions).

Recovery and matrix effect for mycotoxins group B were studied at LOQ, 5xLOQ and 10xLOQ concentration levels (per triplicate) in one day (within-run) following the methodology described in our previous work (Flores-Flores & González-Peñas, 2017).

For assessing recovery, the ratio mycotoxin mean peak area obtained from milk samples spiked with mycotoxins/mycotoxin mean peak area obtained in the spiked final acetonitrile extract (both at the same concentration) was calculated (in %). The acceptance criteria were those established in the Commission Regulation (EC) Nº 401/2006 that established the methods of analysis for the official control of mycotoxin levels in foodstuffs (European Commission, 2014).

Matrix effect (ME) was defined as the ratio (in percentage) between the mean mycotoxin peak area obtained when milk was spiked at the end of the sample treatment (final acetonitrile extract) and that obtained from mycotoxin diluted in mobile phase at 40% B (gradient initial composition), both at the same concentration. No matrix effect was considered if ME (%) was 100%; a signal was considered to be enhanced or suppressed if the values were higher or lower than 100%, respectively.

Mycotoxin stability was previously assessed in the injector tray and in freezing conditions. In the revalidation process for this new matrix, the stability of the mycotoxins in the injector tray during 48h was confirmed by comparing the mycotoxin concentration obtained at three levels (LOQ, 5xLOQ, and 10xLOQ) in control samples injected at 0 and 48 h. A relative error (%RE) <15% between the initial concentration value and the concentration value after 48 h in the injector tray in control samples was considered indicative of stability.

**Statistical analysis**

For the comparison of matrix effect and recovery values when employing different matrixes, Levene's test was used to study the equality of variances; the Student's t test was used for independent samples in order to study the equality of means. A statistically significant difference was considered when the p-value was lower than 0.05.

## Results and discussion

Initially, a qualitative screening of the 22 mycotoxins was performed on the 30 samples. Control samples for mycotoxin group A and group B were prepared in diluted evaporated milk at levels corresponding to LOQ and 10xLOQ for each one of the mycotoxins. All the samples were analyzed along with the corresponding control samples that were analyzed every ten samples. No mycotoxins from group A were detected. With regard to mycotoxin group B, only OTA was detected in 4 semi-skimmed milk samples. To confirm the presence and quantify OTA in evaporated cow milk, a revalidation of our previously validated method capable of quantifying mycotoxin group B in liquid milk was carried out in the new matrix. This was done because a different composition of the matrix can cause different detector responses, and the semi-skimmed evaporated cow milk composition could differ from that of whole UHT milk.

Table 2 shows the obtained LOD and LOQ (the lowest value in the range), the validated range, the determination coefficient, the slope and intercept values corresponding to one of the three prepared matrix-matched calibration curves for each mycotoxin in group B. In each case, the validated ranges were from LOQ to 10xLOQ, $R^2 > 0.99$ and the slopes were significantly different from 0. In addition, all the calibrators presented an RE<15% (20% LOQ). Moreover, the RE (%) between q/Q ratio in both types of samples (calibration and standard) are < 8% for all the mycotoxins.

Mycotoxins are expected in milk at low levels. Peruvian regulation regarding mycotoxins follows Codex Alimentarius guideline limits (FAO, 2004) which state a maximum AFM1 content of 0.5 µg/kg in milk. No maximum permitted levels have been established for other mycotoxins in this matrix. A more demanding legislation for AFM1 content in milk is

that which is stated by the European Union; it has fixed a maximum permitted level of 0.05 µg/kg for AFM1 in milk. The revalidated method is capable of detecting AFM1 at this level, other mycotoxins that have been found in milk worldwide, such as aflatoxins G1, G2, B1, B2 (Herzallah, 2009), ZEA (El-Hoshy, 1999; Huang et al., 2014; SCOOP, 2003), DOM-1 (Sørensen & Elbæk, 2005), FB1 (Gazzotti, Lugoboni, Zironi, Barbarossa, Serraino & Pagliuca, 2009; Maragos & Richard, 1994) and OTA (Boudra, Barnouin, Dragacci & Morgavi, 2007; Elzupir, Makawi & Elhussein, 2009; Huang et al., 2014; Pattono, Gallo & Civera, 2011); and others that have not been previously studied in milk such as OTB.

Table 2: Retention times, linear range, LOD, regression data for a typical calibration curve and relative intensities of mycotoxin product ions

| $t_R$ min | Mycot. | Range ng/mL | LOD ng/mL | $R^2$ | Slope (confidence interval 95%) | | Inter-cept | q/Q Sample% | q/Q Standard % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.52 | DOM-1 | 3.03-30.30 | 0.758 | 0.9994 | 79.6 | (77.5, 81.8) | 63.8 | 89 | 93 |
| 2.71 | AFG2 | 0.15-1.50 | 0.038 | 0.9975 | 2229.9 | (2146.6, 2313.3) | -50.7 | 75 | 74 |
| 2.84 | AFM1 | 0.05-0.50 | 0.025 | 0.9963 | 1659.8 | (1587.4, 1732.2) | 24.5 | 95 | 98 |
| 3.39 | AFG1 | 0.10- 1.02 | 0.025 | 0.9979 | 4428.9 | (4261.5, 4596.4) | -93.3 | 70 | 71 |
| 4.21 | AFB2 | 0.04-0.40 | 0.010 | 0.9937 | 4852.5 | (4596.8, 5108.2) | -62.4 | 97 | 96 |
| 5.21 | AFB1 | 0.04-0.40 | 0.020 | 0.9947 | 7582.5 | (7190.8, 7974.2) | -44.7 | 62 | 61 |
| 10.19 | HT-2 | 0.40-4.02 | 0.200 | 0.9948 | 197.3 | (186.5, 208) | -20.9 | 53 | 55 |
| 12.48 | OTB | 0.05-0.50 | 0.013 | 0.9996 | 3853.2 | (3775.3, 3931) | -19.8 | 44 | 41 |
| 14.17 | T-2 | 0.05-0.50 | 0.025 | 0.9988 | 1743.3 | (1689.8, 1796.9) | -12.2 | 60 | 66 |
| 13.77 | FB1 | 10.14-101.4 | 5.07 | 0.9935 | 8.2 | (7.5, 8.8) | -24.5 | 72 | 72 |
| 15.79 | ZEA | 0.51-5.09 | 0.510 | 0.9996 | 254.2 | (249.9, 258.6) | 0.9 | 101 | 98 |
| 16.74 | STC | 0.50-5.02 | 0.125 | 0.9939 | 361.2 | (332.9, 389.6) | 40.9 | 90 | 91 |
| 16.8 | OTA | 0.20-2.00 | 0.050 | 0.9997 | 701.3 | (686.6, 715.9) | -53.5 | 75 | 72 |
| 17.72 | FB3 | 2.50-25.00 | 0.625 | 0.9992 | 132.5 | (128.8, 136.2) | -39.6 | 66 | 66 |
| 20.08 | FB2 | 2.50-25.00 | 1.25 | 0.9989 | 100.9 | (97.6, 104.2) | 7.9 | 44 | 44 |

$t_R$: retention time, relative intensity calculated as q/Q*100, mean of values obtained at three concentrations. Q and q correspond to the areas of quantification and qualification product ions.

Precision and accuracy were lower than 15%, except for LOQ which was lower than 20%. With respect to recovery, the RSD(%) between levels were less than 12% for all mycotoxins. Recovery values for aflatoxins M1, G1, G2, B1 and B2, OTA, ZEA, T-2, HT-2, FB1 and FB2 coincided with the performance criteria stated by the Commission Regulation (EC) Nº 401/2006, which established the methods of analysis for the official control of mycotoxin levels in foodstuffs (European Commission, 2014). No regulation has been established for the other mycotoxins (DOM-1, OTB, FB3 and STC); however, all recovery values were between 61.2 and 83.9% (RSD <12%) similar to the recovery values stated for the regulated mycotoxins.

With regard to matrix effect, a signal suppression was observed for all mycotoxins, with DOM-1, STC, and FB1 being the most affected. Matrix effect for each mycotoxin at different levels was very reproducible (%RSD was lower than 9%) (Table 3).

After analytical method validation for mycotoxin group B in semi-skimmed evaporated cow milk, a comparison can be made when applying the same sample preparation and analytical methodology to two types of milk, semi skimmed evaporated cow milk (this study) or whole UHT milk (Flores-Flores & González-Peñas, 2017), in order to study the effect of the matrix composition in validation results. Different behaviors of the mycotoxins in terms of their recoveries and matrix effects have been observed. While recovery values for almost all studied mycotoxins were significantly lower when they were extracted from semi-skimmed evaporated milk, the recovery values for fumonisins were significantly higher in this type of milk (Fig. 1).

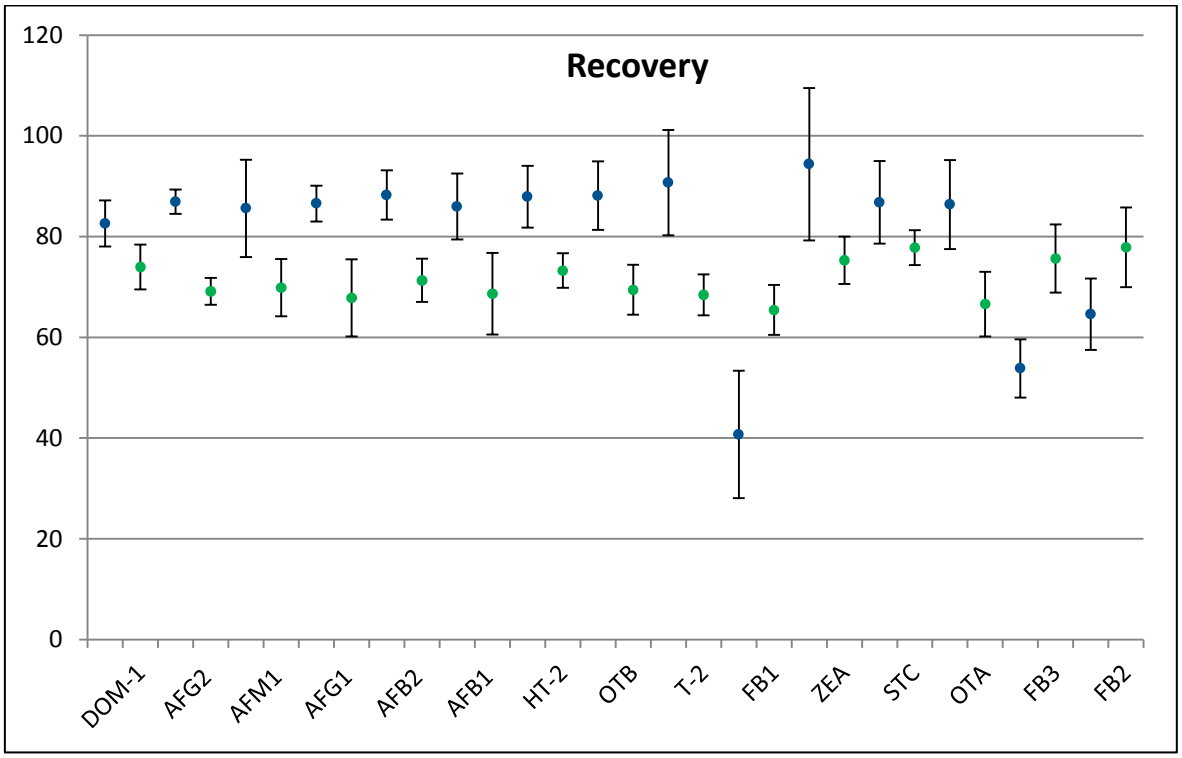



Figure 1. Comparison of mean recovery values (with standard deviation) for mycotoxins when extracted from whole UHT cow milk (blue) and semi-skimmed evaporated cow milk (green).

In terms of the matrix effects, AFG2, T-2, ZEA, STC, and OTA did not show significant differences when the mycotoxins were extracted from semi-skimmed evaporated cow milk compared to when they were extracted from whole UHT cow milk. However, for the remaining 10 mycotoxins, the matrix effect values were significantly lower (Fig. 2) (Flores-Flores & González-Peñas, 2017).

Based on these results, it is clear that both the fat content and the composition of each type of milk generate important differences in mycotoxin recoveries and matrix effect for each studied matrix, even if they are very similar to each other.

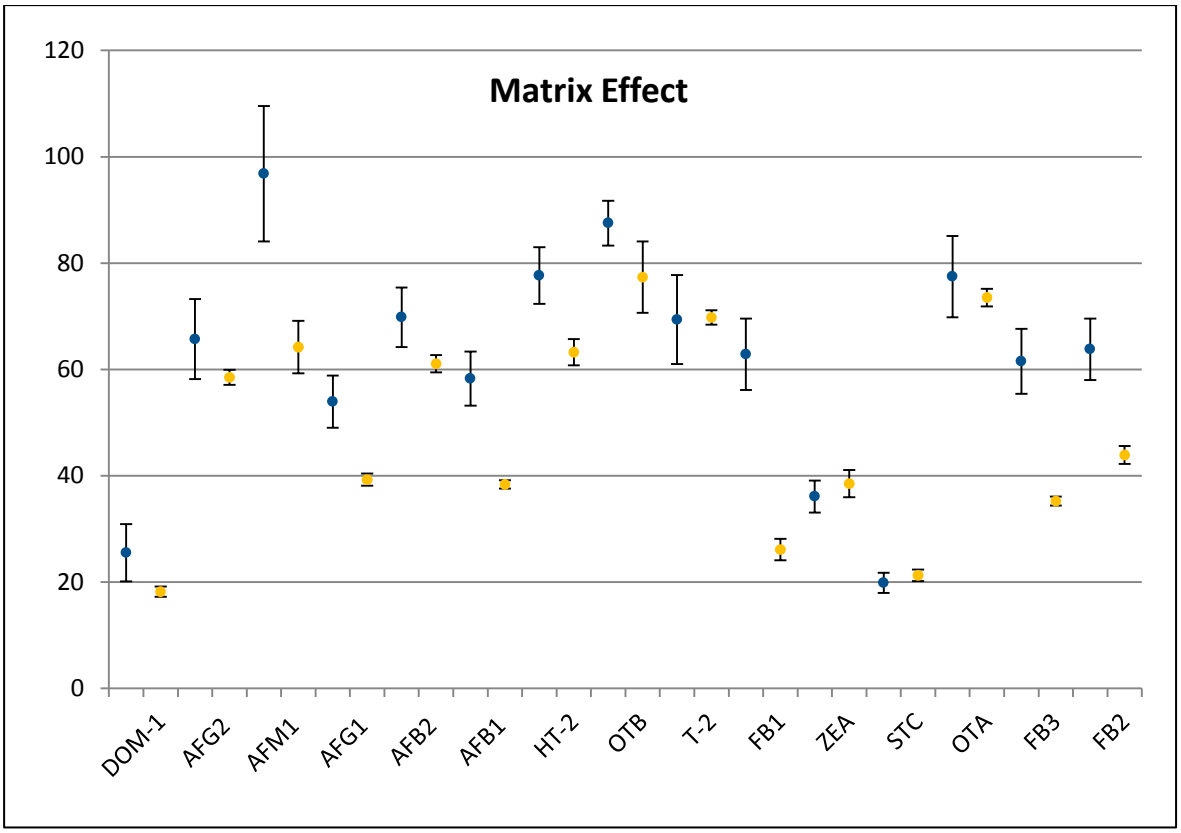



Figure 2. Comparison of mean matrix effect values (with standard deviation) for mycotoxins when extracted from whole UHT cow milk (blue) and semi-skimmed evaporated cow milk (yellow).

OTA presence was confirmed in 4 samples applying the revalidated method. Qualification and quantification product ions were present in both real and control samples and the retention times of mycotoxin peaks did not differ in more than 0.5%. OTA was present at levels between the LOD (0.05 ng/mL) and LOQ (0.2 ng/mL). Three of the positive samples corresponded to the same brand. An example of the chromatograms obtained for OTA in a naturally contaminated sample, a milk sample spiked at LOQ level, and a non-contaminated milk sample are shown in Fig. 3.

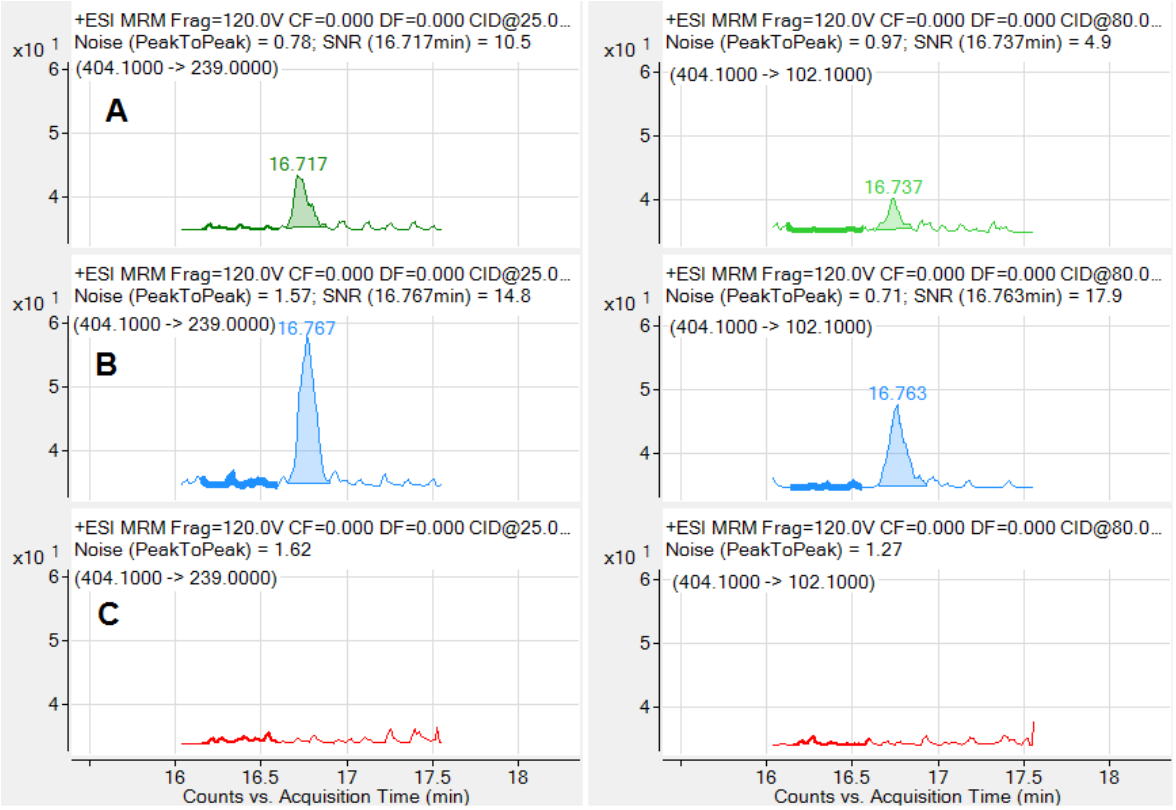



Figure 3: Extracted chromatograms of OTA (quantification and qualification transitions) in naturally contaminated milk sample (A), fortified milk sample at LOQ (B) and non-contaminated milk sample (C).

Table 3: Precision (%RSD), accuracy (%RE), matrix effect (%ME) and recovery (%R). Within-run precision and accuracy have been studied in triplicate at each concentration level, whereas between-run have been studied in triplicate on three different days. ME and recovery have been studied in within-run conditions on one day.

| Mycotoxin | Precision (%RSD) | | | | | | Accuracy (%RE) | | | | | | Matrix effect | | | | Recovery | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Within-run (n=3) | | | Between-run (n=9) | | | Within-run (n=3) | | | Between-run (n=9) | | | Within-run | | | | Within-run | | | |
| | L* | M | H | L | M | H | L | M | H | L | M | H | L | M | H | (%RSD) | L | M | H | (%RSD) |
| DOM-1 | 10.5 | 4.1 | 10.6 | 10.5 | 4.1 | 10.6 | 4.8 | 1.1 | 1.1 | 4.8 | 1.1 | 1.1 | 19.3 | 17.9 | 17.4 | (5.3) | 79.1 | 71.8 | 71.0 | (6.1) |
| AFG2 | 6.3 | 2.3 | 2.0 | 6.3 | 2.3 | 2.0 | 0.4 | 2.8 | 1.2 | 0.4 | 2.8 | 1.2 | 59.9 | 58.5 | 57.1 | (2.3) | 67.2 | 68.0 | 72.2 | (3.8) |
| AFM1 | 5.3 | 5.0 | 5.1 | 5.3 | 5.0 | 5.1 | 10.0 | 1.5 | 0.8 | 10.0 | 1.5 | 0.8 | 69.7 | 62.7 | 60.2 | (7.6) | 63.5 | 71.7 | 74.4 | (8.1) |
| AFG1 | 8.9 | 1.2 | 11.5 | 9.5 | 1.1 | 5.1 | 0.7 | 2.0 | 2.4 | 3.6 | 1.7 | 5.7 | 39.5 | 38.0 | 40.3 | (3.0) | 61.2 | 76.2 | 66.1 | (11.3) |
| AFB2 | 2.4 | 6.6 | 1.3 | 2.4 | 6.6 | 1.3 | 12.2 | 4.3 | 2.2 | 12.2 | 4.3 | 2.2 | 59.9 | 62.9 | 60.4 | (2.6) | 70.3 | 67.6 | 76.0 | (6.0) |
| AFB1 | 9.7 | 2.1 | 2.7 | 9.7 | 2.1 | 8.0 | 6.1 | 0.9 | 1.0 | 6.1 | 0.9 | 0.3 | 38.5 | 37.5 | 39.1 | (2.1) | 60.3 | 76.5 | 69.2 | (11.8) |
| HT-2 | 2.2 | 2.1 | 9.5 | 15.4 | 2.1 | 9.5 | 15.7 | 1.1 | 0.2 | 7.9 | 1.1 | 0.2 | 61.7 | 66.1 | 61.9 | (3.9) | 76.9 | 70.1 | 72.7 | (4.7) |
| OTB | 0.2 | 7.6 | 6.7 | 0.2 | 7.6 | 6.7 | 2.0 | 8.1 | 0.2 | 2.0 | 8.1 | 0.2 | 84.7 | 71.5 | 75.9 | (8.7) | 64.4 | 69.6 | 74.3 | (7.1) |
| T-2 | 10.1 | 8.5 | 4.2 | 10.1 | 8.5 | 4.2 | 1.1 | 4.2 | 2.5 | 1.1 | 4.2 | 2.5 | 70.5 | 70.6 | 68.2 | (1.9) | 64.8 | 67.7 | 72.8 | (5.9) |
| FB1 | 6.4 | 3.2 | 11.5 | 11.2 | 3.2 | 11.5 | 12.2 | 0.8 | 0.9 | 9.8 | 0.8 | 0.9 | 27.6 | 26.9 | 23.8 | (7.8) | 70.9 | 61.3 | 64.1 | (7.6) |
| ZEA | 5.5 | 2.2 | 5.5 | 5.5 | 2.2 | 5.5 | 2.3 | 1.0 | 3.2 | 2.3 | 1.0 | 3.2 | 35.7 | 40.7 | 39.1 | (6.6) | 79.7 | 70.3 | 75.9 | (6.3) |
| STC | 12.5 | 10.1 | 10.3 | 11.8 | 9.3 | 10.3 | 1.1 | 3.7 | 1.3 | 8.7 | 4.9 | 2.1 | 20.0 | 22.0 | 21.8 | (5.3) | 81.8 | 75.8 | 75.8 | (4.4) |
| OTA | 4.0 | 6.2 | 2.6 | 14.1 | 7.6 | 5.9 | 6.5 | 8.3 | 0.7 | 6.2 | 2.4 | 3.2 | 71.8 | 73.7 | 75.1 | (2.2) | 60.3 | 66.4 | 73.1 | (9.5) |
| FB3 | 1.4 | 4.9 | 6.3 | 13.4 | 8.0 | 6.9 | 17.0 | 2.1 | 9.0 | 4.3 | 2.0 | 3.9 | 34.8 | 36.2 | 34.7 | (2.5) | 73.1 | 70.5 | 83.3 | (9.0) |
| FB2 | 7.4 | 4.7 | 9.1 | 10.6 | 7.3 | 8.0 | 19.4 | 2.5 | 7.3 | 13.1 | 0.7 | 1.3 | 43.9 | 45.6 | 42.2 | (3.9) | 80.8 | 68.9 | 83.9 | (11.2) |

## Conclusions

Due to the increasing milk consumption among the Peruvian population, milk production has become an increasing industry in Peru. Therefore, the presence of toxic compounds in milk should be studied in order to protect human health and to prevent economic losses.

In this paper, the presence of 22 mycotoxins was studied in 30 Peruvian evaporated cow milk samples. The applied method, validated for the studied matrix, is capable of quantifying AFM1 at levels established by the FDA and the European Union. Among all the analyzed mycotoxins (aflatoxins M1, B1, B2, G1, G2, ochratoxins A and B, fumonisins B1, B2 and B3, HT-2 and T-2 toxins, nivalenol, deoxynivalenol, deepoxy-deoxynivalenol, 3 and 15 acetyl-deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, fusarenon X, neosolaniol, sterigmatocystin and zearalenone), OTA was detected in four milk samples but at low levels. No other mycotoxins were found at levels above their LOD value.

This initial study indicates that the presence of mycotoxins in evaporated milk is low in Peru; however, the analysis of more samples is recommended in order to obtain more data that will allow carrying out a further risk assessment.

In addition, the need for validated analytical methodologies for each one of the studied matrixes has been demonstrated because recovery and matrix effect have been affected by composition changes depending on the type of milk.

**Acknowledgements**

We thank the “Programa de Investigación Universidad de Navarra” (PIUNA) for financial support. M. Flores-Flores wishes to express her gratitude to the “Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra” (ADA) for the grant funding.

**References**

Aguilera-Luiz, M., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Martínez Vidal, J. L. & Frenich, A. G. (2011). Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 399*(8), 2863-2875. DOI:10.1007/s00216-011-4670-7

Binder, E. M. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology, 133*(1–2), 149-166. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2006.08.008

Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S. & Morgavi, D. P. (2007). Aflatoxin M1 and Ochratoxin A in Raw Bulk Milk from French Dairy Herds. *Journal of Dairy Science, 90*(7), 3197-3201. DOI:10.3168/jds.2006-565

Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R. & Lagana, A. (2012). Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews, 31*(4), 466-503. DOI:10.1002/mas.20351

EFSA. (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *Efsa J, 39*, 1-27. DOI:10.2903/j.efsa.2004.39

El-Hoshy, S. M. (1999). Occurrence of zearalenone in milk, meat and their products with emphasis on influence of heat treatments on its level. *Archiv Für Lebensmittelhygiene, 50*, 140-143.

Elzupir, A. O., Makawi, S. Z. A. & Elhussein, A. M. (2009). Determination of Aflatoxins and Ochratoxin A in Dairy Cattle Feed and Milk in Wad Medani, Sudan. *J Anim Vet Adv, 8*(12), 2508-2511.

European Commission. (2014). Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Amended by Commission Regulations Nº 178/2010 and 519/2014.*2016*, 1-44. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1457455676474&uri=CELEX:02006R0401-20140701

European Commission. (2010). Commission Regulation (EU) Nº 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union, 50*, 8-12. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0165&from=EN

FAO. (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Agriculture Organization of The United Nations. *FAO Food and Nutrition Paper, 81* http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm

FDA. (2005). Compliance Policy Guide, CPG Sec. 527.400 Whole Milk, Lowfat Milk, Skim Milk - Aflatoxin M1, U.S. Food and Drug Administration. Accessed May 20 2014. http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074482.htm

Fink-Gremmels, J. (2008). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Additives & Contaminants.Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 25*(2), 172-180. DOI:10.1080/02652030701823142

Flores-Flores, M. E. & González-Peñas, E. (2017). An LC–MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. *Food Chemistry, 218*, 378-385. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.09.101

Flores-Flores, M. E. & González-Peñas, E. (2015). Development and validation of a high performance liquid chromatographic–mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 10 trichothecenes in ultra-high temperature processed cow milk. *Journal of Chromatography A, 1419*, 37-44. DOI:10.1016/j.chroma.2015.09.069

Flores-Flores, M. E., Lizarraga, E., López de Cerain, A. & González-Peñas, E. (2015). Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control, 53*(0), 163-176. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.01.020

Gazzotti, T., Lugoboni, B., Zironi, E., Barbarossa, A., Serraino, A. & Pagliuca, G. (2009). Determination of fumonisin B1 in bovine milk by LC–MS/MS. *Food Control, 20*(12), 1171-1174. DOI:10.1016/j.foodcont.2009.02.009

Herzallah, S. M. (2009). Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry, 114*(3), 1141-1146. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.10.077

Huang, L. C., Zheng, N., Zheng, B. Q., Wen, F., Cheng, J. B., Han, R. W., Xu, X. M., Li, S. L. & Wang, J. Q. (2014). Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and α-zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry, 146*(0), 242-249. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.09.047

Hussein, H. S. & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology, 167*(2), 101-134. DOI:10.1016/S0300-483X(01)00471-1

INIA. (2009). Informe nacional sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación. Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA. Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología - SUDIRGEB. http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/peru.pdf

Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016) *Ochratoxin A: 50 Years of Research* DOI:10.3390/toxins8070191

Maragos, C. M. & Richard, J. L. (1994). Quantitation and stability of fumonisins B1 and B2 in milk. *Journal of AOAC International, 77*(5), 1162-1167.

Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G. & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology, 60*, 218-237. DOI:10.1016/j.fct.2013.07.047

MINAGRI. (2015). Producción Pecuaria y Avícola 2014. Dirección General de Seguimiento y Evaluación de políticas. Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). http://siea.minag.gob.pe/siea/sites/default/files/Anuario%20Produccion%20Pecuaria%20y%20Avicola%202014%20(Versi%C3%B3n%20PDF%20y%20cuadros%20Excel).zip

MINAGRI. (2014). Producción Pecuaria e Industrial Avícola 2013. Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos. Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). http://siea.minag.gob.pe/siea/sites/default/files/anuario-produccion-agricola2013-pdf-xls_0.zip

Ortiz, C. (2009). Análisis de aflatoxina M1 en leche fresca de establos lecheros de Arequipa. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 20*, 139-141. http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v20n1/a21v20n1.pdf

Pattono, D., Gallo, P. F. & Civera, T. (2011). Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chemistry, 127*(1), 374-377. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.12.051

Resnik, S., Costarrica, M. L. & Pacin, A. (1995). Mycotoxins in Latin America and the Caribbean. *Food Control, 6*(1), 19-28. DOI:10.1016/0956-7135(95)91450-Y

Rodrigues, I. & Naehrer, K. (2012). A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed. *Toxins, 4*(9). DOI:10.3390/toxins4090663

SCOOP. (2003). Task 3.2.10 Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Subtask II: zearalenone. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection. Scientific Cooperation on Questions Relating to Food. 239-482. http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf

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. DOI:10.1016/j.jchromb.2005.03.020

Wang, X. & Li, P. (2015). Rapid screening of mycotoxins in liquid milk and milk powder by automated size-exclusion SPE-UPLC–MS/MS and quantification of matrix effects over the whole chromatographic run. *Food Chemistry, 173*(0), 897-904. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.10.056

Winkler, J., Kersten, S., Valenta, H., Meyer, U., Engelhardt, U. H. & Dänicke, S. (2015). Development of a multi-toxin method for investigating the carryover of zearalenone, deoxynivalenol and their metabolites into milk of dairy cows. *Food Additives & Contaminants: Part A, 32*(3), 371-380. DOI:10.1080/19440049.2015.1011714

Wu, F., Groopman, J. D. & Pestka, J. J. (2014). Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology, 5*, 351-372. DOI:10.1146/annurev-food-030713-092431

Zhan, J., Yu, X., Zhong, Y., Zhang, Z., Cui, X., Peng, J., Feng, R., Liu, X. & Zhu, Y. (2012). Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, 906*(0), 48-57. DOI:10.1016/j.jchromb.2012.08.018

# CAPÍTULO 9 / CHAPTER 9

## Discusión general

***General discussion***

## Estudios acerca de la presencia de micotoxinas en leche animal

En el capítulo 2 se ha hecho una revisión de la literatura sobre la presencia de micotoxinas en muestras de leche a nivel mundial. Se observó que de 22.189 muestras de leche de vaca analizadas en todo el mundo para detectar presencia de AFM1, el 9,9 % contenía niveles de esta micotoxina por encima del límite establecido en la Unión Europea (0,05 µg/kg). El porcentaje podría ser mayor ya que algunos estudios sólo indican el número de muestras que exceden los límites máximos permitidos por la FDA (0,5 µg/kg). Al hacer un análisis por continente, se observa que la menor incidencia de AFM1 en leche se ha encontrado en Europa (0,9 %), seguida de América (8,6 %); mientras que África (25,8 %) y Asia (26,8 %) presentaron las mayores incidencias de AFM1 en leche. Asia presentó también los niveles de AFM1 más altos (48 µg/kg en India).

En relación al número de muestras analizadas, Europa es el continente en donde se han analizado el mayor porcentaje de muestras, mientras que África es en el que menos muestras se han estudiado.

Con respecto a otras micotoxinas y metabolitos, también se ha detectado presencia de FB1, CPA, ZEA, ZAN, α-ZAL, α-ZEL, DOM-1, OTA, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y AFM2 en muestras de leche en diversos países.

Con respecto a la transmisión de micotoxinas hacia la leche, algunos estudios han mostrado que cuando la transmisión se da, ésta se realiza a bajos niveles; aunque estos trabajos son escasos y algunos de ellos incluso contradictorios. Un dato interesante es que algunos estudios mostraron que pudo encontrarse AFM1 en leche a niveles por encima del límite establecido, incluso cuando los niveles de aflatoxinas en el alimento del ganado cumplían con la normativa europea actual.

## Métodos analíticos para el análisis de micotoxinas en muestras de leche

En el capítulo 3 se muestra un resumen de los métodos analíticos desarrollados hasta la fecha para el estudio de micotoxinas en leche animal. Se han aplicado diferentes metodologías para este propósito, pudiendo ser clasificadas en dos grupos: métodos cromatográficos y no cromatográficos.

Entre los métodos cromatográficos, la cromatografía de líquidos con distintos tipos de detectores es la más empleada, seguida por la cromatografía de gases. El uso de un espectrómetro de masas acoplado a los equipos cromatográficos ha permitido, no solamente la detección simultánea de micotoxinas de muy distintas características fisicoquímicas en un solo análisis, sino también, la identificación de las mismas. Los procedimientos de preparación de muestra son muy variados y en ocasiones complejos,

con múltiples pasos de extracción y limpieza, especialmente en el caso de métodos de multidetección.

Entre los métodos no cromatográficos, los métodos basados en ensayos inmunológicos se utilizan ampliamente para las primeras etapas de cribado, ya que son rápidos, de menor coste y permiten el análisis de una gran cantidad de muestras. Sin embargo, los resultados positivos deben ser confirmados por técnicas que permitan la identificación de la micotoxina, siendo las cromatográficas las indicadas para ello. El test de ELISA es el formato de mayor uso en esta categoría. En años recientes los ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral están teniendo una gran aceptación por su simplicidad de diseño y facilidad de uso, prescindiendo de personal experto o de cadena de frío. Este tipo de ensayos son ampliamente utilizados en el área de diagnóstico médico, pero son relativamente nuevos en el área de seguridad alimentaria.

## Desarrollo del método analítico

### Optimización de los parámetros para la adquisición de datos por el modo SRM (*Selected Reaction Monitoring*)

Los parámetros mínimos necesarios que se han de optimizar para cada una de las micotoxinas son: un ion precursor, el voltaje *Fragmentor* (Frag.), la energía de colisión (CE) necesaria para la obtención del ion producto y el ion producto. Inicialmente se usó el software Agilent MassHunter Optimizer (versión 06.00) para la adquisición rápida de estos 4 parámetros y se compararon con aquellos obtenidos de forma manual. Sin embargo, el procedimiento manual permitió un mejor control y la obtención de más datos que el procedimiento automático. Por tanto, se procedió a realizar la optimización en forma manual de estos parámetros para cada una de las 22 micotoxinas siguiendo la metodología señalada en el capítulo 4. Como iones precursores se buscaron los aductos $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ y $[M+Na]^+$ en modo de ionización positivo (ESI+) y $[M-H]^-$ en modo de ionización negativo (ESI-) para cada una de las micotoxinas. Finalmente se obtuvo, para cada una de ellas: 1 ion precursor, 1 voltaje *Fragmentor*, 4 energías de colisión y 4 iones producto, correspondientes a las 4 transiciones más intensas. Las transiciones se pusieron a prueba durante los primeros ensayos de validación y se eligieron 2 de ellas en función de la intensidad y de su reproducibilidad. Por ejemplo, en el caso de AFM1, se obtuvo un aducto con sodio $[M+Na]^+$ de mayor intensidad que el $[M+H]^+$ pero los iones producto obtenidos no fueron reproducibles; por esta razón se eligió como ion precursor para esta micotoxina el aducto $[M+H]^+$. De los dos iones producto seleccionados para cada micotoxina se eligió el de mayor intensidad para la cuantificación del compuesto y el otro se empleó para su cualificación.

**Optimización de las condiciones de separación cromatográfica**

Las primeras pruebas se realizaron con unas soluciones A y B de la fase móvil constituidas por agua y metanol, respectivamente, ambas con ácido fórmico (0,1%) y formiato de amonio (5 mM). El formiato de amonio tiene baja solubilidad en metanol y en ocasiones se observó una precipitación en la solución B al cabo de 24 horas. Por ello, se decidió añadir un 5% de agua a la solución B para facilitar la solubilidad de la sal. De esta forma la composición de la solución B quedó definida como metanol:agua (95:5) con ácido fórmico (0,1%) y formiato de amonio (5 mM). Debido a la gran diferencia en las características fisicoquímicas de estos compuestos, desde el inicio se pensó en una separación en gradiente. Para la optimización de las condiciones de separación cromatográfica de las 22 micotoxinas se probaron diversos gradientes de fase móvil, se puso especial cuidado en conseguir la separación de los isómeros de posición FB2 y FB3 y 3 y 15-ADON. En el caso de FB2 y FB3, conseguir su separación cromatográfica es importante para poder discriminarlos, ya que ambos comparten la misma transición de cuantificación. Los isómeros de posición 3 y 15-ADON presentaron el mismo ion precursor, pero distintos iones producto, lo que facilitó su identificación.

Se obtuvo un gradiente que en 19,5 min conseguía separar las 22 micotoxinas, incluidos los isómeros de posición.

Mientras se realizaban estas pruebas y al analizar los cromatogramas obtenidos, se observó una contaminación de ocratoxina A en el inyector del equipo, de tal forma que al inyectar fase móvil tras una muestra que contuviera OTA, se observó un pequeño pico de esta micotoxina. Tras diversos cambios en el volumen de inyección, composición de la fase móvil, temperatura en el inyector, etc., se detectó que éste compuesto quedaba retenido en el inyector cuando la fase móvil en el momento de la inyección contenía menos de un 40% de la solución orgánica (B). Sin embargo, con esta composición de fase móvil, no se consiguió la separación de micotoxinas más polares como nivalenol o deoxinivalenol. Por esta razón se decidió dividir las 22 micotoxinas en 2 grupos y realizar su análisis cromatográfico por separado con un gradiente de fase móvil adecuado a cada grupo. Para los tricotecenos se desarrolló el método 1 descrito en el capítulo 5, en el que el gradiente se inicia con un 5% de fase orgánica. Para el resto de micotoxinas se desarrolló un gradiente con un contenido inicial de 40% B en la fase móvil (método 2 descrito en el capítulo 6). Las micotoxinas DOM-1, HT-2 y T-2 estaban incluidas en los dos grupos, ya que dieron resultados satisfactorios por ambos métodos.

Se hicieron también pruebas para elegir las condiciones de temperatura de la columna (35 y 45 ºC), longitud de columna (50 y 150 mm) y longitud del capilar que une el cromatógrafo con el espectrómetro de masas, hasta que se fijaron los que se indican en la descripción de los métodos, con los que se consiguió una selectividad adecuada en el menor tiempo de análisis.

**Extracción con solventes y limpieza de la muestra**

Se iniciaron las pruebas de extracción de micotoxinas desde la leche comparando las áreas de pico obtenidas al extraer leche fortificada con diferentes disolventes. El procedimiento empleado en la comparación de los resultados se indica en la descripción del método 1.

Durante los primeros ensayos se obtuvo, en general, una buena precisión y linealidad, pero muy mala exactitud. El procedimiento inicialmente propuesto para el tratamiento de muestras contemplaba solamente una extracción líquido-líquido y una limpieza del extracto con hexano, pero no se consiguió una limpieza adecuada y, al evaporar el extracto antes de la resuspensión en fase móvil, apareció un residuo viscoso de color amarillento. Además, la fuente de ionización quedaba manchada con algún compuesto de la matriz. El primer intento por disminuir el efecto matriz consistió en diluir la muestra antes de su análisis, pero los límites de cuantificación se vieron afectados. Se analizó por infusión directa en el detector de masas una muestra de leche sin fortificar pero sometida al proceso de extracción y se observó la presencia de 3 picos intensos provenientes de la matriz. Se decidió estudiar los iones productos de los iones moleculares de m/z 381, 365 y 343 con intención de identificarlos y proceder a desarrollar un paso de limpieza adicional. Se logró identificar la transición 343 → 163 en ESI (+) posiblemente correspondiente a presencia de lactosa cuya transición en ESI (-) ha sido descrita como 341 → 161 (Fusch y col. 2011).

Como la lactosa y otros azúcares son solubles en agua, se pensó que podían quedar en el extracto obtenido de la leche, ya que el agua de la misma es soluble en el disolvente empleado en la extracción (acetonitrilo). Para eliminarlas se intentó conseguir la separación de la fase acuosa desde el extracto. Para ello se ensayaron diversas sales (acetato de sodio, cloruro de sodio y sulfato de magnesio) y combinaciones de ellas. El sulfato de magnesio producía una gran variabilidad en las áreas de los picos de las micotoxinas. Por tanto su uso fue descartado. Entre las sales de sodio, el acetato dio mejores resultados en comparación con el cloruro y consiguió la separación desde el extracto de las fases acuosa (junto con los componentes hidrosolubles arrastrados desde la matriz) y de acetonitrilo. La fase de acetonitrilo fue evaporada, el residuo fue resuspendido en fase móvil y después analizado, observándose la desaparición de las transiciones observadas 381→39, 365→347 y 365→203 y, una disminución de la transición 343→163. Además, desapareció el residuo amarillo al evaporar los extractos y en la fuente de ionización, mejorando los valores de precisión, exactitud y linealidad. Se estudió también la posibilidad de hacer la extracción y limpieza en un solo paso o en 2 pasos consecutivos. Se obtuvieron mejores resultados cuando se aplicaron 2 pasos consecutivos: primero una extracción líquido-líquido con acetonitrilo y, a continuación, una limpieza con acetato de sodio. El procedimiento final se describe en detalle en el capítulo 5.

### Pruebas de fortificación

Antes de iniciar el proceso de validación fue necesario preparar muestras de leche que contuvieran todas las micotoxinas a determinadas concentraciones. Para ello fue necesario proceder a la fortificación de leche en la que no se hubiesen detectado micotoxinas. El proceso de fortificación de las muestras se estudió detenidamente para no alterar las características físico-químicas de la leche.

Para el método 1 (análisis de tricotecenos), se estudiaron 2 procedimientos de fortificación. El primero de ellos consistía en evaporar un volumen de la solución madre de micotoxinas en acetonitrilo (vacío, 65 ºC) y redisolverlas en 1 mL de leche por agitación con vórtex. El segundo procedimiento consistía en añadir, sobre la leche, el volumen necesario de la solución de micotoxinas en acetonitrilo. Al aplicar este segundo procedimiento y a pesar de utilizar volúmenes pequeños, se observaba una turbidez que se achacó a la precipitación de proteínas de la leche, alterando así la muestra. Este fenómeno se observó especialmente a la hora de preparar las concentraciones altas, para las que era necesario añadir mayor cantidad de solución de micotoxinas. Además, se compararon las áreas obtenidas de experimentos por triplicado y se obtuvieron mayores áreas y menores valores de RSD% con el primer procedimiento, que fue el finalmente empleado.

Para el método 2, inicialmente se aplicó el procedimiento desarrollado en el método 1, pero los valores de RSD% entre las áreas de los picos obtenidos superaban el 15%. Probablemente debido a una menor solubilidad de las micotoxinas de este grupo en la leche. Se desarrolló entonces un tercer procedimiento que consistía en reducir los volúmenes necesarios de la solución de micotoxinas hasta un volumen que fuese despreciable (aproximadamente 25 µL) y no afectase la integridad de la muestra. En ese momento se añadía el mililitro de leche y, tras agitación, se obtenía la muestra fortificada. De esta forma no se observó alteración aparente de la leche y se obtuvieron valores de RSD% adecuados.

## Validación

### Selectividad

Para asegurar la identidad del pico de micotoxina y con ello la selectividad, se estudió la intensidad relativa de los iones producto para las dos transiciones seleccionadas y la variabilidad del tiempo de retención entre las micotoxinas disueltas en fase móvil y la matriz. Se seleccionaron 2 transiciones para cada una de las micotoxinas y se determinó la intensidad relativa en porcentaje (q/Q %) de los iones producto de las transiciones de cuantificación (Q) y cualificación (q) tanto en patrones (micotoxinas disueltas en fase móvil), como en leche fortificada a las mismas concentraciones. Para los 2 métodos

desarrollados se obtuvieron intensidades relativas con un RE% máximo entre los dos tipos de muestra de 13,6%. La directiva 2002/657/CE (European Commission 2004) establece una tolerancia del 20% para cromatografía de líquidos acoplada con detector de masas. En cuanto al tiempo de retención, la diferencia de los tiempos obtenidos en matriz respecto a los obtenidos en patrones fue menor del 0,5%, bastante menor a la tolerancia establecida en la directiva 2002/657/CE (European Commission 2004) para cromatografía de líquidos (2,5%).

**Linealidad**

LA EMA y la FDA están de acuerdo en que las rectas de calibrado deben ser construidas con al menos 6 puntos (FDA 2013; EMA 2011). Para el estudio de linealidad se fortificaron 10 tubos con 1 mL de leche a distintos niveles de concentración. Se analizaron y eligieron los 8 puntos que mejor se ajustaban a una recta. El punto más bajo de cada recta corresponde, en todos los casos, con el límite de cuantificación para esa micotoxina. Se obtuvieron coeficientes de determinación ($R^2$) superiores a 0,99 para todas las rectas.

Las pruebas t de Student realizadas mostraron que las pendientes eran estadísticamente distintas de cero, y los intervalos de confianza al 95% del valor de la pendiente excluyeron al cero. Los intervalos de confianza al 95% de las ordenadas en el origen incluyeron al cero. Se verificó que los valores de concentración de las micotoxinas obtenidos para cada nivel de calibración a partir de la correspondiente recta de calibrado no superaron el 15% de error relativo (20% para el LOQ) en comparación con su valor nominal. Por lo tanto, se demostró que existía una relación lineal entre concentración y respuesta del equipo y las ecuaciones obtenidas relacionaban adecuadamente estas dos variables.

**Precisión**

No existe uniformidad de criterios entre la mayoría de las guías (EMA 2011; FDA 2013; AEFI 2001) en la definición y forma de evaluación de los componentes de la precisión (repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad). A pesar de ello, la idea aceptada es que la precisión de un método analítico describe la dispersión de los resultados alrededor de su valor promedio. La precisión se define entonces como RSD en porcentaje. Además, sí hay un acuerdo general respecto al valor del RSD%, que no debe exceder el 15%, permitiéndose un 20% solamente en el LOQ. Para estudiar este parámetro se ha considerado como repetibilidad (*within-run precision*) la evaluación de la precisión por un mismo analista, mismos instrumentos y mismos reactivos en un mismo análisis; y como precisión intermedia (*between-run precision*), se ha considerado la evaluación de la precisión por un mismo analista, mismos instrumentos y mismos reactivos en distintos días de análisis. Se fortificó por triplicado leche a 3 niveles de concentración (bajo, medio y alto) para evaluar la precisión en todo el intervalo de concentración y se analizaron en

condiciones de repetibilidad y precisión intermedia (al menos 3 días distintos). Se obtuvieron valores de RSD% ≤ 13,6 para todas las micotoxinas, excepto para la T-2 cuando es analizada por el método 1 (RSD% 15,5), pero cumple con los criterios establecidos cuando es analizada por el método 2 (RSD% ≤ 12,1).

**Exactitud**

Dentro de los criterios de validación, la exactitud es probablemente el parámetro que genera más desacuerdos entre las principales guías de validación. En general podemos decir que la exactitud describe el grado de concordancia entre el valor obtenido por aplicación del método validado y el valor nominal del analito en la muestra. Para estudiar la exactitud, se usaron las mismas muestras empleadas en el cálculo de la precisión: leche fortificada por triplicado a 3 niveles (bajo, medio y alto) durante un día de análisis (*within-run accuracy*) y durante 3 días de análisis (*between-run accuracy*). Se estableció como criterio de aceptación un error relativo (RE%) menor al 15%, excepto para el LOQ (RE% ≤20%). Se obtuvieron RE% ≤ 10,4% en todos los niveles de concentración estudiados para todas las micotoxinas.

**Límites de detección y cuantificación (LOQ)**

Algunos estudios han mostrado que la transmisión de micotoxinas hacia la leche, cuando se da, es a concentraciones bajas. Por ello interesa obtener los límites de detección y cuantificación más bajos posibles.

El límite de detección se define como la concentración más baja que es distinguible del ruido (FDA, 2013). Para cada micotoxina se obtuvo como la concentración a la que la relación señal/ruido para la que el ión producto de la transición menos intensa (la de cualificación) fuera de al menos 3. El valor del LOD obtenido para la AFM1 (0,025 ng/mL) es suficiente para detectar la micotoxina al nivel máximo regulado en leche (0,05 ng/mL) (European Commission 2010).

El límite de cuantificación se define como la concentración más baja de analito en una muestra que se puede cuantificar de forma fiable con una precisión y exactitud aceptable. A pesar de que existe un consenso en la definición entre los diferentes organismos y guías de validación (FDA 2013; EMA 2011; AEFI 2001), no existe un acuerdo generalizado de la forma en la que este parámetro debe ser calculado, existiendo en la actualidad diversas metodologías de cálculo (González y col. 2014). La metodología empleada para buscar los valores LOQ fue la del análisis de leche fortificada a diferentes concentraciones próximas a estos límites y por triplicado, exigiendo una precisión (como RSD%) y exactitud (como error relativo) ≤20% (FDA 2013).

Los valores obtenidos han sido similares y en algunos casos mejores que los alcanzados por otros autores. Al comparar con los LOQ obtenidos para estas micotoxinas en leche por otros autores se ha tenido cuidado de compararlos con aquellos obtenidos con los mismos criterios o metodologías de cálculo. Esto es, valores LOQ con una precisión y exactitud adecuada (≤20%) y que hayan sido incluidos en el rango lineal validado. Algunos autores calculan el límite de decisión (CCα) y la capacidad de detección (CCβ) en lugar del LOQ, como recomienda la directiva 2002/657/CE (European Commission 2004). Aunque algunos años después la Comisión Europea emitió un documento guía para la implementación de dicha directiva (European Commission 2008) en la que explícitamente se recomienda verificar experimentalmente los valores CCα y CCβ calculados, en la práctica no siempre se realiza, haciendo difícil la comparación. Además, algunos trabajos han señalado un desacuerdo entre los valores CCα y CCβ calculados mediante la metodología recomendada y aquellos valores obtenidos experimentalmente a través de la fortificación de la matriz en estudio (Van Loco y col. 2007).

**Recuperación**

El Reglamento (CE) Nº 401/2006 por el que se establecen los métodos de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios (European Commission 2014) ha establecido valores de recuperación recomendados para los métodos destinados a la cuantificación de aflatoxinas M1, B1, B2, G1 y G2, OTA, DON, ZEA, FB1, FB2, T-2 y HT-2, entre otras. En el presente trabajo se ha evaluado este parámetro en la forma que se indica en la descripción de los métodos. Se ha tenido cuidado de comprobarlo en todo el intervalo de cuantificación, para lo que se ha ensayado en los niveles bajo, medio y alto del mismo. A la hora de la evaluación de este parámetro se ha tenido en cuenta no solo su valor sino también su precisión, calculándola siempre en condiciones de precisión intermedia.

La recuperación obtenida para las micotoxinas con valores establecidos en el citado reglamento cumple con el mismo para los 2 tipos de leche analizadas, a excepción de la FB1, para la que se obtiene un valor menor cuando se analiza leche entera UHT.

Cuando se aplica el método 2 en muestras de leche entera UHT y semidesnatada evaporada, las fumonisinas presentan mayores valores de recuperación en la leche semidesnatada evaporada, mientras que las demás micotoxinas disminuyen su recuperación en este tipo de leche. Por tanto, es interesante notar que el tipo de leche influye en la recuperación de la micotoxinas.

Se observa también mejores valores de recuperación para DOM-1, HT-2 y T-2 cuando son analizadas por el método 2 (en comparación con la aplicación del método 1 en el mismo tipo de leche). Este comportamiento podría ser explicado por una mejor resuspensión de las micotoxinas (paso previo a la inyección) en fase móvil con mayor porcentaje de componente orgánico (40% B).

**Efecto matriz**

El efecto matriz (ME) es un parámetro relacionado directamente con la espectrometría de masas y es probablemente el mayor inconveniente de las técnicas basadas en LC-MS. Hace referencia al cambio que se produce en la ionización de un analito por la presencia en la solución de análisis de componentes de la matriz que no han sido totalmente eliminados en el proceso de tratamiento de la muestra. No se han establecido valores admisibles para el efecto matriz y no es necesario su total eliminación, siempre que sea reproducible; sin embargo, sí es necesario identificarlo y cuantificarlo (González y col. 2014). Se han descrito diferentes procedimientos para su cálculo y en este trabajo se ha realizado comparando la señal de los analitos cuando están disueltos en fase móvil y cuando se disuelven en el extracto final (acetonitrilo) obtenido al aplicar el procedimiento de extracción a leche en la que no se habían detectado micotoxinas.

En los métodos desarrollados se observa disminución o incremento de señal para todas las micotoxinas; es decir, la ionización de todas las micotoxinas estudiadas se ve afectada por los componentes de la matriz que quedan en la solución de análisis. En ambos métodos este efecto matriz es reproducible para los tres niveles de concentración ensayados en condiciones de precisión intermedia, obteniéndose valores de RSD % para casi todas las micotoxinas ≤ 15%.

En el caso de DOM-1, se observa una gran supresión de la señal con un valor medio de 25,5% cuando es analizado por el método 2, con un RSD% elevado (21,8-24,9%), a pesar de que en condiciones de repetibilidad, los valores son menores de 13% para cada uno de los 3 días evaluados. Cuando esta misma micotoxina es analizada por el método 1, la supresión de la señal es mucho menor, con un valor medio de 72,8% y con valores de RSD ≤8,3% en condiciones de precisión intermedia. Este hecho podría explicarse porque el DOM-1 es poco retenido en la columna cromatográfica cuando se emplean las condiciones del método 2 ($t_R$ 1,55 min) y estaría coeluyendo con mayor cantidad de componentes de la matriz. En el caso de la HT-2, se observa un incremento de la señal cuando se analiza por el método 1, mientras que al ser analizada por el método 2, se observa una supresión de señal. En el caso de T-2, no se observaron diferencias significativas en los valores de efecto matriz cuando esta micotoxina es analizada por ambos métodos. Por tanto, ligeros cambios en la composición de la fase móvil en el momento de la ionización de estas micotoxinas, tienen impacto en el efecto matriz.

En el caso de la revalidación del método 2 para aplicarlo a la leche evaporada semidesnatada reconstituida, los valores de ME obtenidos para AFG2, T-2, ZEA, STC y OTA no muestran diferencias significativas con aquellos obtenidos en el caso de leche entera UHT. Para las restantes 10 micotoxinas, se observa una mayor supresión de la señal, es decir los valores de ME son menores a los obtenidos con la leche entera UHT. Los valores RSD% en condiciones de repetibilidad comparando los 3 niveles son menores de 9%, indicando una baja variabilidad a diferentes niveles de concentración. A la luz de

los resultados se puede hacer notar que los ligeros cambios en la composición de los 2 tipos de leche, debido al contenido de grasa y posiblemente también, a los procesos de manufactura distintos para cada tipo de leche, tienen una influencia en el comportamiento de algunas micotoxinas. Por tanto, las muestras de calibrado y de control, deberán prepararse con el mismo tipo de leche que se esté analizando.

**Estabilidad**

Para poder asegurar unos resultados fiables, es necesario conocer la estabilidad de los analitos en las condiciones en las que se pueden encontrar durante el almacenamiento o el análisis de las muestras. En la actualidad no existe un procedimiento único entre las distintas guías (FDA 2013; EMA 2011; AEFI 2001; European Commission 2004) para su determinación, pero lo que sí piden todas ellas es el estudio de este parámetro intentando cubrir todas las posibles situaciones por las que los analitos pueden pasar durante el proceso analítico.

Se estudió en primer lugar la estabilidad de las micotoxinas en las soluciones madre en acetonitrilo que se almacenaron a -20 ºC. En el caso de las soluciones de micotoxinas 1 y 2 (esta última disolución contenía inicialmente las fumonisinas) se analizaron, por triplicado, alícuotas de una solución almacenada durante 21 días y de una solución preparada el mismo día del ensayo. Para todas las micotoxinas, excepto para las fumonisinas, el promedio de las áreas de los picos de cada micotoxina de la solución almacenada tuvo una diferencia menor del 15% con respecto a las áreas obtenidas en la solución fresca, por lo que se consideró que eran estables en estas condiciones.

En el caso de las fumonisinas, en la primera semana ya se observó una disminución en los niveles de estas micotoxinas en la solución 2. Por esta razón se separaron en la solución 3. Estas micotoxinas se venden en una solución de acetonitrilo:agua (50:50) y se pensó en preparar una disolución madre de las mismas en estas condiciones; sin embargo, y ya que en el proceso de fortificación ha de evaporarse el volumen de la disolución madre, la presencia de agua hizo que se incrementara considerablemente el tiempo empleado en la fortificación de la muestra. Por esta razón se preparó la disolución madre 3 solo para las fumonisinas y en acetonitrilo, donde se comprobó que eran estables al menos 24 horas, y esta disolución se preparaba fresca antes de cada ensayo.

Por si se diera el caso de que fuera necesario conservar los extractos de las muestras antes de su análisis, se estudió la estabilidad de las micotoxinas en el extracto final una vez llevado a sequedad y mantenido a -20 ºC durante varias semanas, después de las cuales se resuspendieron los residuos en fase móvil y se analizaron. Se hizo un análisis de regresión de las áreas obtenidas frente al tiempo de almacenamiento y las micotoxinas se consideraron estables en estas condiciones si el valor de la pendiente de la recta encontrada no difería significativamente de cero (p=95%). Todos los tricotecenos, excepto FUS-X, fueron estables al menos 4 semanas. FUS-X presentó una estabilidad de 2 semanas

en las muestras tratadas y congeladas. Las aflatoxinas, ocratoxinas, ZEA, STC, HT-2, T-2 y DOM-1 fueron estables por lo menos 2 semanas. Las fumonisinas presentaron una estabilidad de solo una semana.

También se estudió la estabilidad de las micotoxinas en las soluciones de inyección en el inyector del equipo programado a 4 ºC. Se hizo el estudio a 3 niveles de concentración por triplicado. Cada día se preparó una recta de calibrado nueva que se usó para hallar la concentración de las muestras que permanecieron en el inyector. Los tricotecenos fueron estables al menos 49 h, mientras que el resto de las micotoxinas fueron estables al menos 41 h.

## Aplicación de los métodos

### Muestreo de leche española

Leche comercial: Se ha intentado conseguir muestras de leche de vaca de la mayor parte del territorio español. A día de hoy, la información que aparece en los envases no contempla información sobre el origen geográfico de la leche, pero sí sobre el centro de recogida de la misma, como lo indica el Reglamento 852/2004 del Parlamento Europeo (2004). Por tanto, el código del Registro General Sanitario de Empresas Alimentarias y Alimentos (RGSEAA) del envase se introdujo en la web de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN 2016), desde donde se obtuvo el lugar de ubicación del centro de recogida de la leche de cada muestra. Se identificó una correlación entre las letras finales del código y la provincia en donde se ubica el centro de recogida de la leche (Apéndice 1). Esta información fue el dato empleado en la clasificación de las muestras por su origen.

De acuerdo a los Anuarios Estadísticos de España de los últimos 5 años (INE 2016), Galicia, Castilla y León, Andalucía, Cataluña, Asturias, Cantabria, Navarra, Castilla-La Mancha y el País Vasco constituyen el 93% de la producción lechera española. Por tanto, se ha intentado recoger mayor número de muestras de estas comunidades autónomas. Se recogieron 107 muestras de leche entera procedentes de centros de recogida de leche ubicados en: Galicia, Castilla y León, Cantabria, Asturias, País Vasco, Cataluña, Navarra, Andalucía, Madrid y Castilla-La Mancha.

Cada muestra fue recogida en envases de al menos 1 L, como recomienda el Reglamento (CE) 401/2006 mediante el cual se establecen los métodos de muestreo de la leche (European Commission 2014), durante marzo y abril 2016.

Leche cruda: Se contactó con Lacturale (Etxeberri, Navarra), la Granja MasBes (Salitja, Cataluña) y el Instituto Lactológico de Lekumberri (Lekumberri, Navarra) para la recogida de muestras de leche cruda. Lacturale nos proporcionó, además, una muestra de leche de

una vaca con síntomas de enfermedad, aunque sin diagnóstico. Se recogieron 84 muestras de leche cruda procedentes de granjas en Navarra, La Rioja, País Vasco y Cataluña durante el mes de marzo 2016.

**Muestreo de leche peruana**

La Dirección General de Salud Ambiental e Inocuidad Alimentaria (DIGESA) del Perú no ha establecido normas de envasado de los alimentos que exija a las empresas incluir en el envase el origen geográfico de la materia prima o producto alimenticio, por lo que se desconoce el origen geográfico en el país de las 30 muestras adquiridas. Todas las muestras fueron compradas en diversos comercios locales de la ciudad de Lima y se tomaron al menos 1 muestra de cada una de las 8 principales marcas de leche disponibles.

De entre los tres tipos de leche más consumida en Perú: líquida, en polvo y evaporada, el consumo *per cápita* de la última se ha triplicado en los últimos 24 años (MINAGRI 2014). Además, no necesita refrigeración y tiene una larga duración. Por estas dos razones se eligió este tipo de leche para el estudio.

**Estudio de la presencia de micotoxinas en leche española**

Se recogieron 191 muestras de leche provenientes de distintos lugares de España como se ha indicado anteriormente. Todas ellas se analizaron por los dos métodos desarrollados. Junto con las muestras se intercalaron muestras fortificadas a los niveles del límite de cuantificación y 10xLOQ y se aceptó el análisis si para estas muestras control se cumplía con los requisitos exigidos al método en cuanto a precisión. No se detectó ninguna micotoxina con niveles por encima de su límite de detección.

Las muestras de leche cruda contenían azidiol, un preservante frecuentemente usado en los laboratorios de análisis de la leche en España (Llopis y col. 2013). Ya que la presencia de este compuesto en la matriz no se había estudiado durante la validación de los métodos, se comprobó si podía afectar a la cuantificación de las micotoxinas. Se fortificó leche que contenía azidiol a 2 niveles de concentración (LOQ y el nivel más alto del intervalo validado para cada micotoxina). Las áreas de los picos obtenidos fueron comparadas con las áreas de los picos producidos por las micotoxinas en leche comercial fortificada. Este ensayo se hizo por triplicado y durante 3 días distintos. La diferencia de los promedios de las áreas de cada micotoxina contenida en los 2 tipos de leche fue menor del 15%. Por tanto, se determinó que el azidiol no producía un efecto matriz adicional. De todas formas, cuando se analizaron las muestras de leche que contenían azidiol, las muestras de control fueron preparadas con leche que contenía este compuesto.

Tampoco en las muestras de leche cruda se encontraron niveles de micotoxinas por encima de su respectivo límite de detección, incluida la muestra proveniente de una vaca con síntomas de enfermedad.

Esta es la primera vez que se hace un estudio de la presencia simultánea de 22 micotoxinas en leche de vaca con una cantidad considerable de muestras provenientes de distintas partes de España. En la literatura solo se pueden encontrar dos estudios previos de multidetección de micotoxinas en leche comercializada en España. Beltrán y col. (2013) analizaron 18 micotoxinas en distintas matrices alimentarias, incluyendo la leche, de la cual solo se analizaron 10 muestras. Aguilera-Luiz y col. (2011) analizaron la presencia simultánea de 8 micotoxinas en 15 muestras de leche. Los LOQs alcanzados en ambas metodologías fueron más altos que los encontrados en este trabajo.

Al analizar las 191 muestras de leche recogidas en España no se ha detectado en ninguna de ellas la presencia de AFM1. En la tabla 3 del capítulo 2 se resumieron los estudios realizados en Europa acerca de la presencia de esta micotoxina en leche. Se puede observar que de las 13.566 muestras analizadas solo 119, es decir, el 0,9% contenían niveles de esta micotoxina por encima del límite máximo establecido en la UE. Un análisis geográfico indica que 117 de las 119 muestras europeas positivas frente a AFM1 corresponden a países de la región del Mar Adriático. En España, Rodríguez Velasco y col. (2003) y Cano-Sancho y col. (2010) no detectaron muestras de leche que incumpliesen la normativa europea para AFM1 en su análisis de muestras de leche recogidas en León y Cataluña, respectivamente. Por lo tanto los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los encontrados en España y países cercanos.

**Estudio de la presencia de micotoxinas en leche peruana**

Se compraron 30 muestras de leche evaporada en la ciudad de Lima. Antes de su análisis se trataron como indica el fabricante que debe hacerse antes de su utilización: se diluyeron con agua en una proporción 1:1. De la misma forma que en el caso de las leches españolas, se hizo un cribado de la presencia de 22 micotoxinas usando los métodos 1 y 2 previamente desarrollados para leche entera UHT. En este caso, las muestras control se prepararon con una leche evaporada en la que no se había detectado micotoxinas. Cuatro muestras de leche semidesnatada presentaron sospecha de presencia de OTA. Por esta razón se decidió revalidar el método 2 (con el que se podía cuantificar la ocratoxina A) para esta matriz. La revalidación se hizo con los mismos criterios usados para el método 2 y que ya fueron discutidos en las secciones correspondientes. La presencia de OTA fue confirmada en 4 muestras en niveles superiores al límite de detección (0,05 ng/mL) pero inferiores al límite de cuantificación (0,2 ng/mL). A la fecha de la escritura de esta memoria de tesis doctoral, solo se ha encontrado en la literatura un estudio sobre la presencia de micotoxinas en leche peruana, enfocado solamente en el análisis de AFM1. Por tanto, y hasta lo que se ha

podido conocer, esta es la primera vez que se hace un estudio de la presencia simultánea de 22 micotoxinas en leche evaporada peruana.

## Referencias


AECOSAN. 2016. Empresas Alimentarias Inscritas en España (RGSEAA). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. (accessed Jun, 2016). http://rgsa-web-aesan.msssi.es/rgsa/formulario_principal_js.jsp.

AEFI. *Validación de Métodos Analíticos*. España. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001.

Aguilera-Luiz, M., P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, J.L. Martínez Vidal, y A.G. Frenich. 2011. Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399:2863-2875. DOI: 10.1007/s00216-011-4670-7.

Beltrán, E., M. Ibáñez, T. Portolés, y col. 2013. Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study. *Analytica Chimica Acta* 783:39-48. DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.043.

Cano-Sancho, G., S. Marin, A.J. Ramos, J. Peris-Vicente, y V. Sanchis. 2010. Incidencia de aflatoxina $M_1$ y evaluación de la exposición en Cataluña (España). *Revista Iberoamericana de Micología* 27:130-135; 135. DOI: 10.1016/j.riam.2010.05.003.

EMA. 2011. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.

European Commission. 2004. Commission Decision of 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). Amended by Commission Decisions 2003/181/EC and 2004/25/EC. (accessed 03/10, 2016). http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02002D0657-20040110&from=EN.

European Commission. 2014. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Amended by Commission Regulations Nº 178/2010 and 519/2014. 1-44. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1457455676474&uri=CELEX:02006R0401-20140701.

European Commission. 2010. Commission Regulation (EU) Nº 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. 8-12. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0165&from=EN.

European Commission. 2008. SANCO/2004/2726-rev 4-December 2008. Guidelines for the implementation of decision 2002/657/EC. http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs_vet-med-residues_cons_2004-2726rev4_en.pdf.

FDA. 2013. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugs-gen/documents/document/ucm368107.pdf.

Fusch, G., A. Choi, N. Rochow, y C. Fusch. 2011. Quantification of lactose content in human and cow's milk using UPLC–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 879:3759-3762. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.09.053.

González, O., M.E. Blanco, G. Iriarte, L. Bartolomé, M.I. Maguregui, y R.M. Alonso. 2014. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *Journal of Chromatography A* 1353:10-27. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.03.077.

INE. 2016. Anuario Estadístico de España, Instituto Nacional de Estadística (INE). (accessed Jun 10th, 2016). http://www.ine.es/prodyser/pubweb/anuarios_mnu.htm.

Llopis, M.B., M.R. Marugón, R.L. Althaus, y M.P.M. Pons. 2013. Effect of storage and preservation of milk samples on the response of microbial inhibitor tests. *Journal of Dairy Research* 80:475-484. DOI: 10.1017/S0022029913000423.

MINAGRI. 2014. Producción Pecuaria e Industrial Avícola 2013. Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos. Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). http://siea.minag.gob.pe/siea/sites/default/files/anuario-produccion-agricola2013-pdf-xls_0.zip.

Parlamento Europeo. 2004. Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del consejo del 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:ES:PDF.

Rodriguez Velasco, M.L., M.M. Calonge Delso, y D. Ordonez Escudero. 2003. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M(1) in raw cow's milk. *Food additives and contaminants* 20:276-280. DOI: 10.1080/0265203021000045208.

Van Loco, J., A. Jànosi, S. Impens, S. Fraselle, V. Cornet, y J.M. Degroodt. 2007. Calculation of the decision limit (CCα) and the detection capability (CCβ) for banned substances: The imperfect marriage between the quantitative and the qualitative criteria. *Analytica Chimica Acta;* 586:8-12. DOI: 10.1016/j.aca.2006.11.058.

# CAPÍTULO 10 / CHAPTER 10

# Conclusiones

***Conclusions***

# Conclusiones

Con respecto al objetivo 1:

1. Algunos estudios de transmisión en distintas especies animales han demostrado que es posible que las micotoxinas pasen a la leche, aunque a niveles bajos. Además, se ha encontrado presencia de algunas micotoxinas distintas a AFM1 en muestras de leche en diversos países.

2. La aflatoxina M1 es la micotoxina más estudiada en leche y al menos el 10% de las muestras estudiadas a nivel mundial sobrepasan los límites máximos establecidos por la Unión Europea. La mayor contaminación por AFM1 en esta matriz se encuentra en Asia.

3. A día de hoy la cromatografía, especialmente la cromatografía de líquidos con detectores de UV, florescencia o espectrometría de masas es la técnica de uso más frecuente para la cuantificación de micotoxinas en leche. Los tratamientos de muestra propuestos son complejos e incluyen, en general, pasos de extracción y limpieza de la muestra usando diferentes disolventes y técnicas.

Con respecto al objetivo 2:

4. Se han desarrollado métodos analíticos por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas que, en conjunto, permiten identificar y cuantificar la presencia de 22 micotoxinas en leche de vaca. Uno de ellos, además, ha sido revalidado para leche evaporada.

5. Las micotoxinas seleccionadas incluyen aquellas de mayor preocupación por su presencia en alimentos animales, como el deoxynivalenol, aflatoxinas, ocratoxina A y T-2, sus metabolitos y otras que no han sido previamente estudiadas en esta matriz, como las fumonisinas, ocratoxina B o esterigmatocistina.

6. Los métodos analíticos se han validado satisfactoriamente atendiendo a los criterios de: linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud, recuperación, efecto matriz y estabilidad.

7. Se han detectados cambios en el efecto matriz y la recuperación de las micotoxinas en función de la matriz y las condiciones analíticas, por lo que se recomienda la revalidación de los métodos analíticos para cada matriz y

metodología, incluso para matrices que pueden parecer similares, como por ejemplo diferentes tipos de leche.

Con respecto al objetivo 3:

8. Se han analizado 107 muestras de leche de vaca comercialmente disponible en el mercado español y 84 de granjas españolas. No se ha encontrado ninguna de las 22 micotoxinas estudiadas en niveles mayores a los de los límites de detección de los métodos desarrollados. Este estudio es el primero en analizar la presencia de 22 micotoxinas en leche de vaca en una cantidad considerable de muestras provenientes de distintas partes de España.

9. Se han analizado 30 muestras de leche de vaca evaporada de origen peruano y se ha detectado presencia de ocratoxina A en el 13% de las muestras analizadas, aunque a bajos niveles. Este estudio es el primero en analizar la presencia simultánea de 22 micotoxinas en leche peruana.

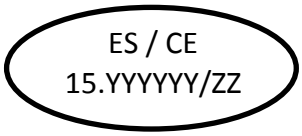
# APÉNDICE / APPENDIX

## APÉNDICE 1: Código de Registro General Sanitario de Empresas Alimentarias y Alimentos (RGSEAA) de los centros de recogida de leche en España

*Appendix 1: General Sanitary Registration Code for Foods and Food Companies (RGSEAA) of the milk collection centers in Spain*

### 1. Características

El código RGSEAA tiene el siguiente formato (Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, 2012; Parlamento Europeo, 2004):




En donde:

- **ES:** Código de letras que identifica a España
- **CE:** Siglas que identifican que la industria se encuentra ubicada en la Comunidad Europea
- **15:** Clave que identifica a las industrias de la leche y derivados en España
- **YYYYYY:** Número de identificación asignado por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)
- **ZZ:** Siglas que representa a la ciudad en donde se localiza el centro de recogida de la leche

Tabla 1: Siglas de ubicación de los centros de recogida de leche

| ZZ | Provincia | Comunidad Autónoma |
|---|---|---|
| AV | Ávila | Castilla y León |
| B | Barcelona | Cataluña |
| BI | Bizkaia | País Vasco |
| BU | Burgos | Castilla y León |
| C | A Coruña | Galicia |
| CO | Córdoba | Andalucía |
| GE | Girona | Cataluña |
| GR | Granada | Andalucía |
| GU | Guadalajara | Castilla La Mancha |
| L | Lleida | Cataluña |
| LU | Lugo | Galicia |
| M | Madrid | Madrid |
| NA | Navarra | Navarra |
| O | Asturias | Asturias |
| S | Cantabria | Cantabria |
| SO | Soria | Castilla y León |
| SS | Gipúzkoa | País Vasco |
| VA | Valladolid | Castilla y León |

## 2. Ubicación

El código puede aparecer en distintos lugares del envase. Los lugares más usuales son las caras superiores o las caras laterales, pero también puede aparecer en la cara inferior.

Fig. 1. Ubicación del código RGSEAA en envases de leche. Cara lateral, cara superior y cara inferior.

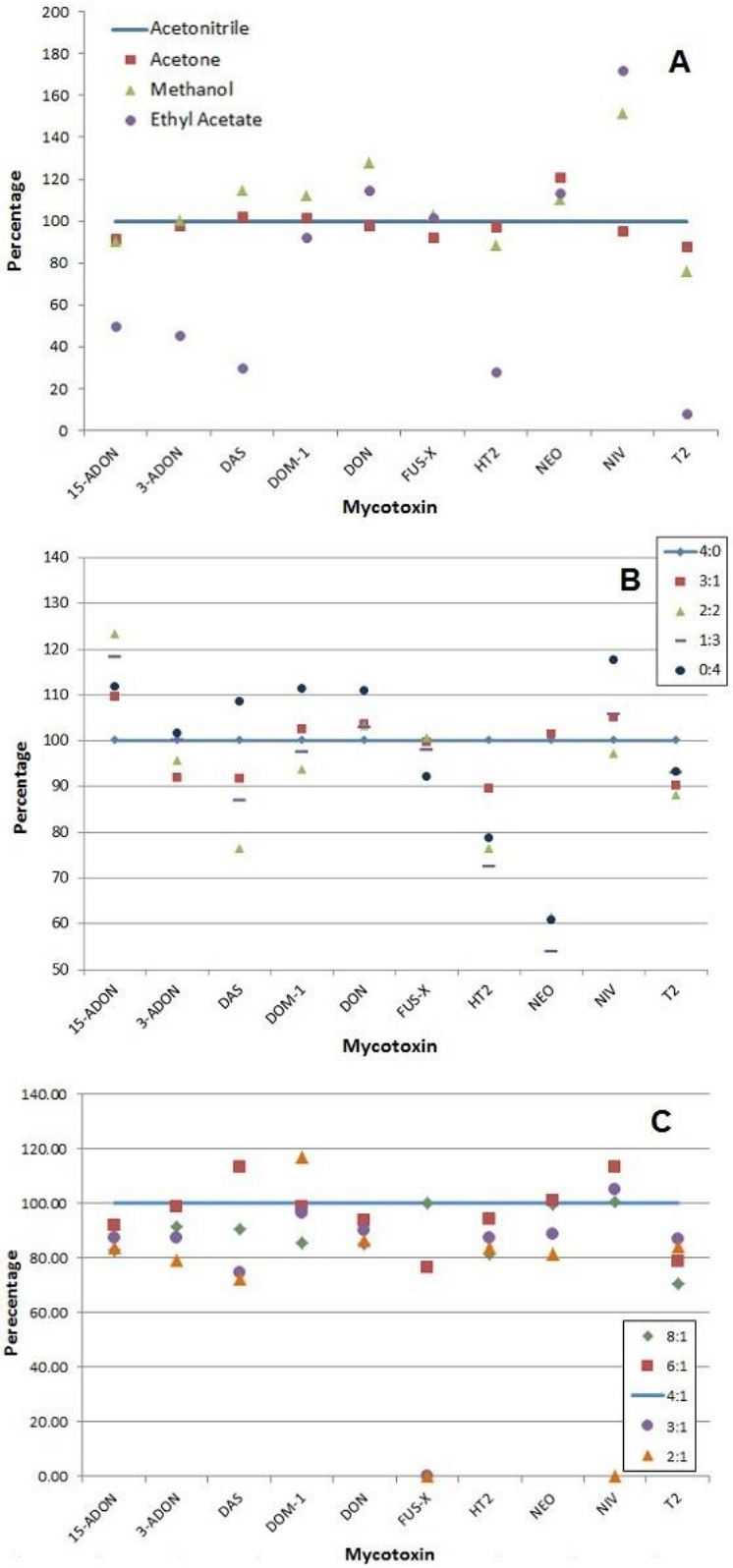
## Referencias

Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. (2012, Nov.). Guía informativa sobre el Registro General Sanitario de Empresas Alimentarias y Alimentos. Séptima edición. Dirección General de Ordenación e Inspección. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.

Parlamento Europeo. (2004, Reglamento (CE) Nº 853/2004 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 L 139/55.*

## APÉNDICE 2: Extracción de micotoxinas con distintos solventes y proporciones

*Appendix 2: Mycotoxin extraction with different solvents and proportions*

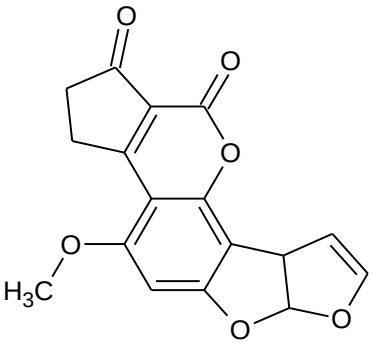



Mycotoxin extraction with different solvents (data normalized versus ACN) (A), with different acetonitrile:acetone proportions (data normalized versus ACN:acetone (4:0)) (B) and different proportions of extraction mixture (ACN):milk (data normalized versus (4:1)) (C).

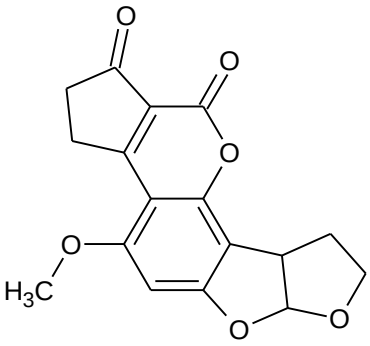
## **APÉNDICE 3: Estructuras químicas de las micotoxinas analizadas**

*Appendix 3: Chemical structures of the analyzed mycotoxins*

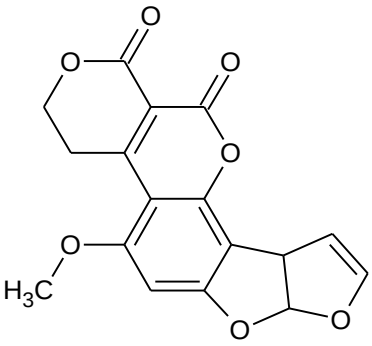
**AFLATOXINAS**



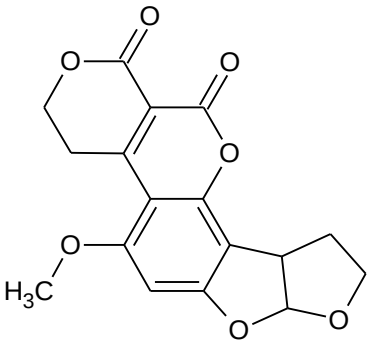

AFB1



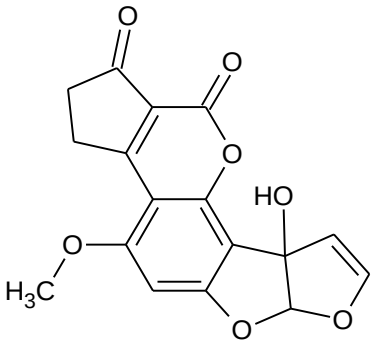

AFB2




AFG1

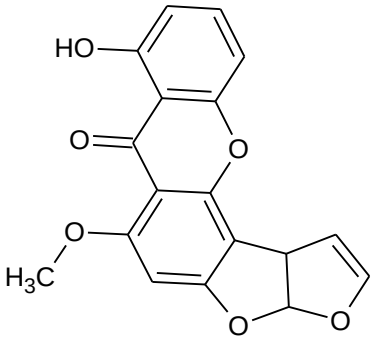



AFG2

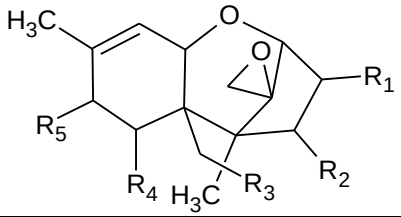



AFM1

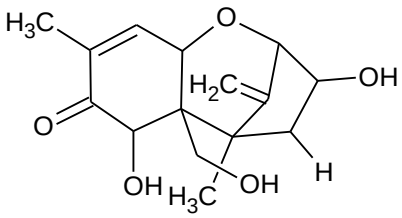
**ESTERIGMATOCISTINA**



## TRICOTECENOS

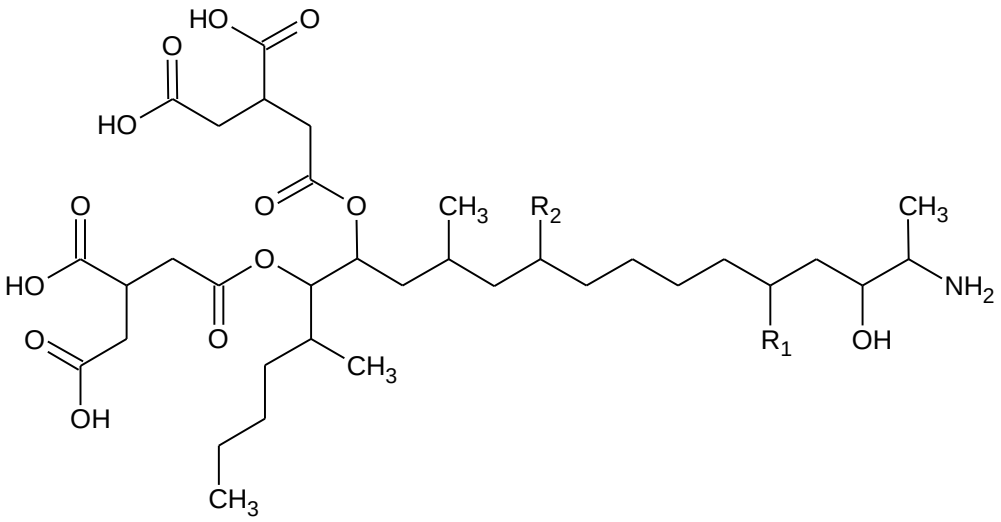



| | | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tipo A** | DAS | OH | OAc | OAc | H | H |
| | NEO | OH | OAc | OAc | H | OH |
| | T-2 | OH | OAc | OAc | H | $OCOCH_2CH(CH_3)_2$ |
| | HT-2 | OH | OH | OAc | H | $OCOCH_2CH(CH_3)_2$ |
| **Tipo B** | NIV | OH | OH | OH | OH | =O |
| | FUS-X | OH | OAc | OH | OH | =O |
| | DON | OH | H | OH | OH | =O |
| | 3-ADON | OAc | H | OH | OH | =O |
| | 15-ADON | OH | H | OAc | OH | =O |



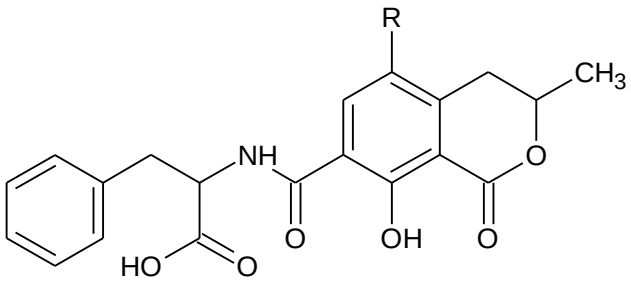

DOM-1

## FUMONISINAS




| | $R_1$ | $R_2$ |
|---|---|---|
| FB1 | OH | OH |
| FB2 | OH | H |
| FB3 | H | OH |

**OCRATOXINAS**




| | R |
|---|---|
| OTA | Cl |
| OTB | H |

**ZEARALENONA**

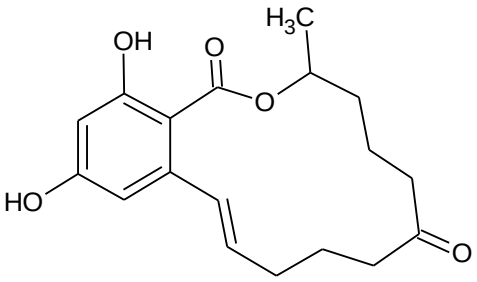



Tabla 2: Información de las micotoxinas analizadas

| Micotoxina | M (g/mol) | Fórmula | Número CAS |
|---|---|---|---|
| 15-ADON | 338,36 | $C_{17}H_{22}O_7$ | 88337-96-6 |
| 3-ADON | 338,36 | $C_{17}H_{22}O_7$ | 50722-38-8 |
| AFB1 | 312,28 | $C_{17}H_{12}O_6$ | 1162-65-8 |
| AFB2 | 314,29 | $C_{17}H_{14}O_6$ | 7220-81-7 |
| AFG1 | 328,28 | $C_{17}H_{12}O_7$ | 1165-39-5 |
| AFG2 | 330,29 | $C_{17}H_{14}O_7$ | 7241-98-7 |
| AFM1 | 328,28 | $C_{17}H_{12}O_7$ | 6795-23-9 |
| DAS | 366,41 | $C_{19}H_{26}O_7$ | 2270-40-8 |
| DOM-1 | 280,32 | $C_{15}H_{20}O_5$ | 88054-24-4 |
| DON | 296,32 | $C_{15}H_{20}O_6$ | 51481-10-8 |
| FB1 | 721,84 | $C_{34}H_{59}NO_{15}$ | 116355-83-0 |
| FB2 | 705,84 | $C_{34}H_{59}NO_{14}$ | 116355-84-1 |
| FB3 | 705,84 | $C_{34}H_{59}NO_{14}$ | 136379-59-4 |
| FUS-X | 354,35 | $C_{17}H_{22}O_8$ | 23255-69-8 |
| HT-2 | 424,49 | $C_{22}H_{32}O_8$ | 26934-87-2 |
| NEO | 382,41 | $C_{19}H_{26}O_8$ | 36519-25-2 |
| NIV | 312,32 | $C_{15}H_{20}O_7$ | 23282-20-4 |
| OTA | 403,81 | $C_{20}H_{18}ClNO_6$ | 303-47-9 |
| OTB | 369,37 | $C_{20}H_{19}NO_6$ | 4825-86-9 |
| STC | 324,29 | $C_{18}H_{12}O_6$ | 10048-13-2 |
| T-2 | 466,53 | $C_{24}H_{34}O_9$ | 21259-20-1 |
| ZEA | 318,37 | $C_{18}H_{22}O_5$ | 17924-92-4 |