

## **Pre-validación de un método de Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas para el análisis simultáneo de toxinas lipofílicas.**

Adriano Villar-González, María L. Rodríguez-Velasco, Luis M. Botana.  
*Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (LCRBM),  
Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN),  
Estación Marítima s/n, 36200 Vigo.*

### **Resumen**

Las biotoxinas marinas de origen fitoplanctónico y de carácter lipofílico pueden acumularse en diferentes tipos de moluscos bivalvos, presentando un importante riesgo para la salud pública. La legislación de la UE, a través del Reglamento (CE) nº 2074/2005, establece los métodos de ensayos reconocidos para la detección de toxinas lipofílicas, señalando como método de referencia los ensayos biológicos e indicando posibles métodos alternativos al método de referencia, entre los que se encuentra la Cromatografía de líquidos acoplada a la Espectrometría de masas (LC-MS). Este Reglamento también indica la necesidad de sustituir lo antes posible los métodos biológicos por métodos de detección alternativos que hayan sido validados conforme a un protocolo acordado a nivel internacional. De acuerdo con esto, el Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (LCRBM) está actualmente coordinando, a nivel europeo, diversos estudios enfocados a la validación de un método de LC-MS para la determinación de toxinas lipofílicas. En el presente trabajo se describen los diferentes estudios realizados en la etapa de pre-validación del método, cuyo objetivo se centra en la optimización y estandarización de un protocolo para el análisis simultáneo de ácido ocaído (AO) y dinofysistoxinas (DTXs), pectenotoxinas (PTXs), azaspirácidos (AZAs), yesotoxinas (YTXs) y espirólidos. A partir de los resultados obtenidos en esta etapa se elaboró un "Procedimiento Normalizado de Trabajo", candidato a ser validado a través de un estudio colaborativo. Actualmente dicho procedimiento está en fase de evaluación y perfeccionamiento.

### **Introducción**

De acuerdo con el Reglamento (CE) nº 2074/2005 [1], uno de los requisitos para que un método de LC-MS pueda llegar a sustituir al método de referencia actual para la detección de toxinas lipofílicas es que sea validado conforme a un protocolo acordado a nivel internacional. Por este motivo y con el objetivo de validar un método de LC-MS para el análisis de las citadas toxinas, el Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (LCRBM) en colaboración con distintos Laboratorios Nacionales de Referencia diseñó un plan de trabajo a partir de las recomendaciones indicadas por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM). De acuerdo con estas indicaciones y en base a la experiencia

aportada por los distintos laboratorios en el análisis de toxinas lipofílicas mediante LC-MS, se diseñó un protocolo preliminar para su posterior evaluación y perfeccionamiento. Como etapa previa a la validación, se realizó un estudio de prevalidación del método, el cual se estructuró en tres fases: optimización del protocolo (fase I), evaluación de la transferencia del protocolo (fase II) y estudio de precisión (fase III). El objetivo de la fase I se centró en la optimización y estandarización del protocolo. En esta fase participaron cuatro laboratorios, LCRBM y los laboratorios nacionales de referencia (LNR) de Alemania, Irlanda y Noruega, y se estructuró en los siguientes estudios: 1) estudios preliminares (evaluación parámetros cromatográficos y detección mediante MS); 2) purificación mediante extracción líquido-líquido; 3) efectos de la matriz; 4) hidrólisis; 5) necesidad de la etapa de purificación; 6) estudios sobre la etapa de evaporación; 7) efectos de la supresión/aumento de la señal y 8) precisión inicial.

Cada participante llevó a cabo los estudios propuestos para las toxinas del grupo del AO y de otro grupo de toxinas lipofílicas: LCRBM (espirólidos), Alemania (YTXs), Noruega (PTXs, AZAs y YTXs) e Irlanda (AZAs).

A partir de los resultados obtenidos en la fase I se diseñó un "Procedimiento Normalizado de Trabajo" preliminar, que fue evaluado en la fase II por el Laboratorio Nacional de Referencia de Francia, como laboratorio externo e independiente al estudio. El presente trabajo muestra las conclusiones obtenidas en las fases I y II de la prevalidación. El método se evaluó para la determinación de AO, DTX-2, PTX-2, YTX, AZA-1 y 13-desmetil-espirólido C (SPX-1) en diferentes matrices como mejillones, vieiras, almejas y ostras.

### **Materiales y métodos**

*Reactivos y materiales de referencia.* Todos los disolventes y reactivos utilizados en este estudio fueron de grado HPLC o analítico. Los patrones utilizados fueron soluciones de referencia certificadas para AO, PTX-2, YTX y SPX-1 de Canadá (National Research Council) y material de referencia de AZA-1 facilitado amablemente por el Pr. Yasumoto.

*Protocolo inicial.* Como se comentó anteriormente, el protocolo inicial se diseñó en base a la experiencia en el análisis de toxinas lipofílicas mediante LC-MS aportada por los distintos participantes. Este protocolo consistía en la extracción por duplicado de 2 g de cuerpo entero de molusco con metanol 100%. En la primera extracción se añade 9 mL del disolvente y se agita en vortex durante 3 minutos a la máxima velocidad. A continuación, se centrifuga a 4.500 rpm a 20°C durante 8 minutos y el sobrenadante se transfiere a un matraz aforado de 20 mL. En la segunda extracción se vuelve a añadir 9 mL de MeOH 100% y se homogeniza en ultraturrax durante 1

minuto ( $\geq 9.500$  rpm). Tras centrifugar, se combinan los dos extractos en el matraz aforado y se enrasa a 20 mL con metanol.

En la etapa de purificación de la muestra se toman 2,5 mL del extracto y se realiza una primera extracción líquido-líquido con 2,5 mL n-hexano, agitando en vortex durante 1 min. Una vez descartada la fase de hexano, se repite el proceso con otros 2,5 mL de n-hexano. A continuación, se añade 1 mL de agua y se realiza la extracción de las toxinas lipofílicas utilizando 2,5 mL del disolvente orgánico óptimo seleccionado entre acetato de etilo, acetato de isopropilo y diclorometano. Nuevamente, la extracción se realiza por duplicado agitando en vortex a la máxima velocidad durante 1 minuto.

*Determinación de AO, DTXs, AZAs, PTXs, YTXs y espirólidos.* Después de combinar las fases orgánicas, el extracto resultante se evapora a sequedad (vacío o  $N_2$ ) y el residuo se re-disuelve en 1 mL de metanol. Este extracto se filtra a través de  $0,45 \mu m$  y se procede al análisis mediante LC-MS mediante la inyección de 5-20  $\mu L$ , en función de la sensibilidad de que se disponga.

*Determinación de ésteres del grupo del AO.* Para el análisis de los ésteres del grupo de AO, es necesario una etapa previa de hidrólisis alcalina para transformar este tipo de compuestos en las toxinas de las que derivan (AO, DTX-2 o DTX-1). Para ello, a partir de los 20 mL del extracto crudo se toman 2,5 mL y se añaden 313  $\mu L$  de NaOH 2,5 N (100% acuoso). La mezcla se mantiene a  $76^\circ C$  durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo, la muestra se enfría hasta temperatura ambiente y se neutraliza con 313  $\mu L$  de HCl 2,5 N. Finalmente, se realizan las etapas de purificación mediante extracción líquido-líquido y evaporación descritas anteriormente.

*Condiciones cromatográficas.* Para la separación de las toxinas se utiliza una columna C8 (50 mm x 2 mm,  $3 \mu m$ ) con una precolumna (10 mm x 2 mm,  $3 \mu m$ ). Las fases móviles consistían en 100% de agua con 2 mM de formiato de amonio y 50 mM de ácido fórmico en el canal A y acetonitrilo:agua (95:5) con 2 mM de formiato de amonio y 50 mM de ácido fórmico en el canal B. Los análisis se realizaron mediante elución en gradiente, comenzando con 30% a 90% de B durante 8 minutos. A continuación, se mantiene durante 3 minutos con 90% de B y finalmente se disminuye el porcentaje de B hasta el 30% en 0.5 minutos. El 30% de B se mantiene durante 2.5 minutos hasta la siguiente inyección.

*Detección.* Los parámetros de MS fueron optimizados individualmente por cada participante, con el objetivo de alcanzar el máximo nivel de sensibilidad. Estos parámetros dependen del tipo de instrumento utilizado.

## Resultados y discusión

### *Fase I: Optimización del protocolo*

*Estudios preliminares.* El objetivo de este estudio se centró en la evaluación y caracterización de los parámetros cromatográficos descritos anteriormente. Las condiciones recomendadas proporcionaron una buena separación para toda la toxinas lipofílicas excepto para la YTX. Para esta toxina, algunos participantes indicaron que los picos eran demasiado anchos y obtuvieron una pobre reproducibilidad en los tiempos de retención.

Respecto a la detección mediante MS, inicialmente no se fijaron las transiciones para llevar a cabo la detección, sino que cada participante utilizó aquellas que le proporcionaban mayor sensibilidad.

*Purificación mediante extracción líquido-líquido.* En este estudio se evaluó la eficacia de tres disolventes para la extracción de las toxinas lipofílicas, que fueron el acetato de etilo, el diclorometano (DCM) y el acetato de isopropilo. El DCM fue el disolvente más adecuado para la extracción de las toxinas lipofílicas, obteniéndose unos valores de recuperación entre 75% y 120% para todas las toxinas evaluadas, excepto para la YTX con la que se obtuvo una pobre recuperación.

De acuerdo con estos resultados se decidió utilizar el DCM para los siguientes estudios.

*Efectos de la matriz.* Para evaluar los efectos producidos por los componentes presentes en la matriz se utilizaron muestras no contaminadas de mejillón, viera y almeja a las que se le adicionaron estándar de las toxinas de interés (a niveles del límite legal), determinándose los porcentajes de recuperación en los extractos tras la purificación con hexano y tras la purificación de hexano+DCM.

En este estudio no se encontraron diferencias entre las matrices estudiadas, obteniéndose recuperaciones superiores al 70%. También se observó que la etapa de purificación hexano+DCM no mejoraba los resultados obtenidos.

*Hidrólisis.* En este estudio se evaluó la influencia del pH después del proceso de hidrólisis. Para ello, se utilizaron diferentes volúmenes de HCl 2,5 N para realizar la neutralización del extracto una vez hidrolizado. De los resultados obtenidos en este estudio, se concluyó que si el valor del pH del extracto después de la hidrólisis es inferior a 7, éste no va a influir en la determinación de los ésteres del grupo de las toxinas del AO.

*Necesidad de la etapa de purificación.* En este estudio se realizó el análisis de diferentes muestras contaminadas natural o artificialmente con toxinas lipofílicas. Los análisis se llevaron a cabo directamente después de la extracción con 100% de MeOH y después de realizar la extracción y purificación con hexano y DCM. A la vista de los resultados obtenidos en este estudio se decidió eliminar la etapa de purificación del protocolo

propuesto inicialmente. Gracias a la eliminación de esta etapa, el método propuesto es aplicable también para el análisis de YTXs.

*Estudios sobre la etapa de evaporación.* Este estudio se centró en la evaluación de la existencia de posibles pérdidas de toxinas durante el proceso de evaporación. Se observó que la utilización de rotavapor a 40°C no provocaba pérdidas de toxinas debido a la evaporación a sequedad del extracto.

*Efectos en la supresión/aumento de la señal.* Debido a la posible existencia de supresión o aumento de la señal de MS provocada por los componentes de la matriz que pueden afectar al proceso de ionización de las toxinas en la fuente de ESI, se evaluaron los factores respuesta de cada toxina ( $\text{Area}_{\text{toxina}}/\text{Concentración}_{\text{toxina}}$ ) en MeOH 100% y en diferentes extractos de muestra blanco (mejillón y almeja) preparados según el protocolo acordado.

A pesar de observarse supresión o aumento de la señal, la exactitud de los análisis al comparar la concentración calculada de cada toxina con la concentración real siempre estuvo entre 80% y 120%.

*Estudios de precisión.* Finalmente, se estudió la precisión intermedia del método en dos laboratorios (LCRBM y el LNR alemán). La repetibilidad se estudio a través del análisis repetido (seis veces) de la misma muestra por el mismo operador durante tres días diferentes. Los valores de desviación estándar relativa ( $\text{DER}_r$  %) para todas las toxinas evaluadas por los dos laboratorios variaron entre 3% y 12%. Para estudiar la reproducibilidad, dos operadores distintos de cada laboratorio realizaron los análisis seis veces por día en días diferentes. En este caso los valores de  $\text{DER}_R$  (%) variaron entre el 5% y 11%. Estos resultados muestran una aceptable precisión intermedia del método para el análisis de todas las toxinas estudiadas.

*Procedimiento Normalizado de Trabajo.* La Tabla 1 muestra el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) preliminar elaborado a partir de los resultados obtenidos en todos los estudios descritos anteriormente (fase I).

#### *Fase II: Evaluación de la transferencia del protocolo a un tercer laboratorio*

La transferencia del PNT preliminar a un tercer laboratorio fue evaluada en la fase II del estudio por el LNR de Francia, como laboratorio externo e independiente al estudio. Para ello, el LCRBM envió a dicho laboratorio el PNT y nueve muestras de homogeneizado de cuerpo entero de distintas especies de moluscos naturalmente contaminadas con toxinas lipofílicas.

Al comparar los resultados obtenidos por el LNR-Francia y el LCRBM se observó la misma identificación de las toxinas presentes en

todas las muestras analizadas. En la determinación de los equivalentes totales de AO se obtuvo una DER (%) entre el 12% y 30%. En el caso de la cuantificación de espirólidos, ambos laboratorios coincidieron en sus resultados detectando SPX-1 a niveles inferiores a 31 µg/kg. Sin embargo se obtuvieron valores muy distintos en la cuantificación de los AZAs, mostrando una DER del 80%. La DER para la cuantificación de PTXs varió entre el 40% y 60%.

Muestra (cuerpo entero)	2 g		
Extracción	9 mL MeOH 100%, Vortex 3 min (máxima velocidad) 9 mL 100% MeOH, Ultraturax 1 min ( $\geq$ 9500 rpm) Llevar a 20 mL		
Análisis de AO, DTXs, AZAs, PTXs, YTXs y espirólidos	Evaporar a sequedad 2,5 mL del extracto metanólico Re-disolver el residuo seco en 1 mL de MeOH 100% Filtrar 0,45µm y LC-MS análisis		
Análisis de ésteres de las toxinas DSP	<u>Hidrólisis</u> : 2,5 mL extracto metanólico + 313µL NaOH 2,5N Calentar a 76°C durante 40 min y enfriar hasta tª ambiente Neutralizar con 313µL HCl 2,5N Evaporar a sequedad el extracto hidrolizado Re-disolver el residuo seco en 1 mL de MeOH 100% Filtrar 0,45µm y LC-MS análisis		
<b>Condiciones cromatográficas</b>			
Flujo	0.2 mL/min		
Pre-columna	10 mm x 2 mm, 3 µm		
Columna	BDS-Hypersil C8, 50 mm x 2 mm, 3 µm		
Fase móvil	A: 100% H2O with 2 mM ammonium formate + 50 mM formic acid B: 95% ACN: 5% H2O with 2 mM ammonium formate + 50 mM formic acid		
Gradiente	Time (min)	% A	% B
	0	70	30
	8	10	90
	11	10	90
	11.5	70	30
	14	70	30

Tabla 1. Procedimiento Normalizado de Trabajo preliminar para el análisis simultáneo de AO, DTXs, AZAs, YTXs, PTXs y espirólidos mediante LC-MS.

### Conclusiones

El presente estudio permitió diseñar un método para el análisis simultáneo de toxinas lipofílicas mediante LC-MS. La evaluación de este método por un laboratorio externo e independiente al estudio puso de manifiesto la necesidad de realizar nuevas investigaciones con el objetivo de minimizar aquellos aspectos que puedan provocar variaciones entre los

resultados de los laboratorios. Por este motivo, y en base a los resultados descritos en este trabajo, actualmente se están realizando una serie de experimentos para determinar el grado de influencia de la matriz en el análisis de estas toxinas cuando se utilizan diferentes tipos de espectrómetros de masas. Debido a que algunos expertos consideran importante fijar tanto el modo de ionización como las transiciones utilizadas para la cuantificación, también se están realizando una serie de investigaciones en este tema, con el objetivo de determinar si los cambios en el modo de ionización y las transiciones utilizadas afectan a los resultados de los análisis.

### **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por DG SANCO (Comisión Europea, Bruselas), la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y por el proyecto STREP FOOD-CT-2004-514055 (DETECTOX).

Agradecer a INTECMAR (Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño de Galicia) por facilitarnos muestras de moluscos naturalmente contaminados con toxinas lipofílicas.

### **Referencias**

- [1] Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la comisión, de 5 de Diciembre de 2005. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338, 27-59.