



Universitat de Lleida

Departament de Química

**Aplicació de l'espectrometria de masses
a l'anàlisi cromatogràfica de patulina en
suc de poma**

Memòria presentada per Montserrat Llovera i Arcas per optar al
grau de Doctora per la Universitat de Lleida

Treball realitzat al Departament de Química de la Universitat de
Lleida sota la direcció del Dr. Ramon Canela i Garayoa

Lleida, juny de 2006

SUMMARY

In the present work we develop a strategy to improve the analysis of patulin in apple juice using chromatographic hyphenated techniques such as GC-MS and HPLC-MS. One aspect of the strategy deals with the synthesis of compounds structurally related to patulin to be used as internal standards in the quantification step.

Three synthetic series of compounds have been prepared:

- In the first one we have synthesized 6 compounds by reaction of *tert*-butyl[(5-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-3-furyl)methoxy]dimethylsilane with different aldehydes.
- In the second one, we have synthesized 6 aldols from the reaction of (2-furyloxy)(trimethyl)silane with different aldehydes.
- In the third series we have prepared 21 esters using a parallel synthesis strategy in a polymer-assisted reaction of 4-(hydroxymethyl)furan-2(5H)-one with 21 different carboxylic acids

Four of the esters have been successfully used as internal standards for the quantification of underivatized patulin in apple juice using gas chromatography-mass spectrometry in SIM mode. Two different capillary chromatographic columns were assayed, a 5% phenylmethylpolysiloxane stationary phase and a trifluoropropylmethylpolysiloxane one.

When using trifluoropropylmethylpolysiloxane as stationary phase and (5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)-methyl acetate as IS a precise and accurate quantification of patulin can be obtained down to 6 µg/L. A detection limit of 1 µg/L was established.

RESUMEN

En el siguiente trabajo se presentan diferentes estrategias encaminadas a mejorar el análisis de la micotoxina patulina en zumo de manzana, empleando técnicas cromatográficas de acoplamiento con la espectrometría de masas, tales como la CG-EM y la HPLC-EM.

Un aspecto importante del trabajo se basa en la síntesis de compuestos estructuralmente relacionados con la patulina, para ser utilizados como patrones internos en el análisis cuantitativo.

Se han sintetizado tres series de compuestos:

- Seis de ellos a partir de la reacción entre el *tert*-butil[(5-{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-3-furil)metoxi]dimetilsilano, compuesto también sintetizado en este trabajo, con 6 aldehídos distintos.
- Una segunda serie de 6 compuestos preparados a partir del reactivo comercial, el (2-furiloxi)(trimetil)silano con 6 aldehídos.
- Una tercera serie de compuestos obtenidos por síntesis paralela en una reacción de esterificación en fase sólida a partir del compuesto 4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona, obtenido también en este trabajo y 21 ácidos diferentes.

Cuatro de los ésteres sintetizados han sido probados con éxito, como patrones internos, en el análisis cuantitativo mediante CG-EM-SIM de patulina en zumo de manzana, sin necesidad de proceder a la preparación de un derivado de esta micotoxina. Se han probado dos tipos de columnas capilares, con fases estacionarias de 5% fenilmetilpolisiloxano y de trifluoropropilmetilpolisiloxano. Los mejores resultados en cuanto a precisión y exactitud se refiere, se han obtenido con la utilización del patrón interno acetato de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)-metilo y la fase estacionaria de trifluoropropilmetilpolisiloxano. El límite de detección calculado es de 1 µg/L y el límite de cuantificación es inferior a 6 µg/L.

RESUM

En aquest treball es presenten diferents estratègies encaminades a millorar l'anàlisi qualitativa i quantitativa de patulina en suc de poma mitjançant la utilització de tècniques cromatogràfiques d'acoblament, CG-EM i HPLC-EM. Un aspecte rellevant d'aquesta estratègia es basa en l'obtenció mitjançant síntesi química de compostos estructuralment relacionats a la patulina per a ser utilitzats com a patrons interns en l'anàlisi quantitativa.

S'han preparat tres sèries de compostos:

- Una sèrie de sis compostos preparats per condensació entre el *tert*-butil[(5-{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-3-furil)metoxi]dimetilsilà, sintetitzat en aquest treball, i 6 aldèhids diferents.
- Una segona sèrie de sis compostos utilitzant en aquest cas el reactiu comercial el (2-furiloxi)(trimetil)silà i els mateixos 6 aldehids.
- I una tercera sèrie de compostos obtinguts per esterificació entre la 4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona, un alcohol sintetitzat també en aquest treball i 21 àcids diferents. En aquest cas s'ha seguit una estratègia de síntesi en paral·lel, fent totes les reaccions en fase sòlida.

Els èsters obtinguts es van analitzar utilitzant dos columnes capillars de diferent fase estacionària, una de 5% fenilmetilpolisiloxà i una de trifluorometilpropilpolisiloxà. Un total de 4 èsters van reportar resultats satisfactoris com a patrons interns, en l'anàlisi quantitativa de patulina sense derivatitzar per CG-ES-SIM. Si bé els resultats més òptims des del punt de vista de precisió i exactitud es van obtenir utilitzant l'èster (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)-metilacetat i la columna cromatogràfica de trifluorometilpropilpolisiloxà. En aquestes condicions es va assolir un límit de detecció de 1 µg/L i un límit de quantificació inferior a 6 µg/L de patulina en suc de poma.

Taula de continguts

AGRAÏMENTS	iERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
SUMMARY	II
RESUMEN	V
RESUM	VII
TAULA DE CONTINGUTS	IX
RELACIÓ D'ABREVIATURES.....	XV
PRÒLEG.....	XIX
1. <i>Motivació</i>	xxi
2. <i>Estructura</i>	xxii
CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.2. Les micotoxines	4
1.2.1. Definició i origen	4
1.2.2. Estructura química.....	6
1.2.2.1. Aflatoxines	7
1.2.2.2. Ocratoxina A.....	9
1.2.2.3. Fumonisines.....	10
1.2.2.6. Tricotecens	14
1.2.3. Factors ecotoxicològics	16
1.3. Micotoxicosi	16
1.3.1. Anàlisi del risc.....	19
1.3.1.1. Avaluació del risc.....	20
1.3.1.2. Gestió del risc	21
1.3.1.3. Comunicació del Risc.....	22
1.4. Reglamentació sobre micotoxines	23
1.4.1. Reglamentació mundial	24
1.4.3. Reglamentació a Europa	25
1.4.4. Reglamentació a Espanya	28
1.5. Avenços en l'anàlisi de micotoxines	29

1.6. Patulina	31
1.6.1. Factors ambientals que afecten la producció de patulina per <i>P. expansum</i>	33
1.6.2. Estructura química i propietats fisicoquímiques	34
1.6.3. Reaccions amb nucleòfils	36
1.6.4. Fermentació alcohòlica	38
1.6.5. Toxicologia	39
1.6.6. Patulina en suc de poma.....	40
1.6.6.1. Tractaments per controlar la presència de patulina en suc i derivats.....	42
1.6.7. Tècniques cromatogràfiques d'anàlisi de patulina	45
1.6.7.1. Cromatografia de capa prima	45
1.6.7.2. Cromatografia de gasos (CG)	47
1.6.7.3. Cromatografia líquida	48
1.6.7.4. Tècniques cromatogràfiques amb acoblament amb l'espectrometria de masses (EM).....	51
1.6.7.4.1. Acoblament HPLC-EM.....	53
1.6.7.4.2. Acoblament CG-EM.....	56
1.6.7.5. Utilització de patrons interns en l'anàlisi quantitativa	61
OBJECTIUS	63
CAPÍTOL 2. MATERIAL I MÈTODES	67
2.1. Instrumentació	69
2.2. Síntesi	71
2.2.1. Preparació de l'heptafluorobutirat de patulina	71
2.2.2. Síntesi de patulina	74
2.2.2.1. Síntesi de l'acetat de 3-(acetiloxi)-2-oxopropil (II).....	74
2.2.2.2. Síntesi de 4-(acetiloxi)-3-[(acetiloxi)metil]-2-butenoiat d'etil (III)	77
2.2.2.3. Síntesi de 4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (IV)	80
2.2.2.3.b. Síntesi de 4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (IV).....	82
2.2.2.4. Síntesi de <i>tert</i> -butil[(5-{[<i>tert</i> -butil(dimetil)silil]oxi}-3-furil)metoxi]dimetilsilà (V)	84
2.2.2.5. Síntesi de 5-[2-(benziloxi)-1-hidroxietil]-4-([1-(<i>tert</i> -butil)-1,1-dimetilsilil]oximetil)-2,5-dihidro-2-furanona (VI)	87
2.2.2.6. Intent de síntesi de l'etilpivalat de 2-(benziloxi)-1-[3-([1-(<i>tert</i> -butil)-1,1-dimetilsilil]oximetil)-5-oxo-2,5-dihidro-2-furanil] (VII)	91
2.2.2.7. Intent de síntesi de l'etilpivalat de 2-(benziloxi)-1-[3-(hidroximetil)-5-oxo-2,5-dihidro-2-furanil] (VIII)	94

2.2.3. Síntesi de 5-(1-hidroxiàlquil)furanones a partir del <i>tert</i> -butil[(5-{ <i>tert</i> -butil(dimetil)silil]oxi}-3-furil)metoxi] dimetilsilà (V)	96
2.2.3.1. Hidròlisi del grup <i>tert</i> -butildimetilsililoxi	99
2.2.4. Síntesi de 5-(1-hidroxiàlquil)furanones a partir de (2-furiloxi)(trimetil)silà.....	101
2.2.5. Síntesi en paral·lel d'èsters a partir de la 4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (IV)	103
2.2.5.1. Reacció d'esterificació en dissolució	106
2.2.6. Purificació per cromatografia "Dry flash"	111
2.2.7. Mètodes d'extracció i purificació del suc de poma	112
2.2.7.1. Mètode de Rovira.....	112
2.2.7.2. Mètode de Brause	113
2.2.8. Preparació de patrons de patulina	114
2.2.8.1. Determinació espectrofotomètrica de la riquesa d'una solució de patulina.....	114
2.2.8.2. Preparació de patrons de patulina per a l'anàlisi de patulina en suc de poma per HPLC-EM	115
2.2.8.3. Preparació de patrons de patulina per a l'anàlisi de patulina en suc de poma per GC-EM	116
2.2.9. Anàlisi quantitativa de patulina per HPLC-EM	117
2.2.10. Anàlisi quantitativa de patulina per GC-EM	118

CAPÍTOL 3. RESULTATS I DISCUSSIÓ 121

3.1. Anàlisi de patulina derivatitzada per CG-EM 123

3.2. Anàlisi per CG-EM de patulina sense derivatitzar utilitzant hexaclorobenzè com a patró intern 132

3.3. Síntesi de possibles patrons interns 140

3.3.1. Intent de síntesi de patulina marcada	141
3.3.2. Estratègia de síntesi de patrons interns no marcats	146
3.3.2.1. Síntesi de 5-(1-hidroxiàlquil)furanones a partir del <i>tert</i> -butil[(5-{ <i>tert</i> -butil(dimetil)silil]oxi}-3-furil)metoxi] dimetilsilà (V).....	148
3.3.2.2. Síntesi de 5-(1-hidroxiàlquil)furanones a partir de (2-furiloxi)(trimetil)silà	154
3.3.2.3. Anàlisis de les 5-(1-hidroxiàlquil)furanones seleccionades per HPLC-EM	156
3.3.2.4. Síntesi d'èsters a partir de la 4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (IV)	159

3.4. Anàlisi de patulina per HPLC-EM.....	166
3.4.1. Anàlisi de patulina per HPLC i ionització per electropulverització (ESI)	166
3.4.1.1. Anàlisi quantitativa de patulina per HPLC i ionització per electropulverització (ESI) utilitzant el compost XIV-c com a patró intern	170
3.4.2. Anàlisi de patulina per HPLC i ionització química a pressió atmosfèrica (APCI)	176
3.4.2.1. Anàlisi quantitativa de patulina per HPLC i ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) utilitzant el compost XIV-c com a patró intern	177
3.5. Anàlisi de patulina sense derivatitzar per CG-EM, utilitzant anàlegs estructurals com a patrons interns.....	186
3.5.1. Anàlisi qualitativa de patulina per CG-EM	188
3.5.2. Anàlisi quantitativa de patulina per CG-EM utilitzant una fase estacionària de 5% fenilmetilpolisiloxà	190
3.5.3. Anàlisi quantitativa de patulina per CG-EM utilitzant una fase estacionària de trifluoropropilmetilpolisiloxà	197
CAPÍTOL 4. CONCLUSIONS	203
BIBLIOGRAFIA.....	207
LLISTA DE TAULES	231
LLISTA DE FIGURES	239
ANNEX-A. LLISTA DE COMPOSTOS	245
ANNEX-B.PUBLICACIONS RELACIONADES AMB LA TESI	253

Relació d'abreviatures

Relació d'abreviatures

¹³ C ₃ -PAT	Patulina marcada isotòpicament amb ¹³ C
ACN	Acetonitril
AcOEt	Acetat d'etil
ACSE	Agència Catalana de Seguretat Alimentària
AESA	Agència Espanyola de Seguretat Alimentària
AOAC	Associació Oficial de Químics Analítics
APCI	Ionització Química a Pressió Atmosfèrica.
APPCC	Anàlisi de Perills i Punts Crítics de Control
APPI	Ionització per Fotoionització a Pressió Atmosfèrica
ASTM	Societat Americana d'Avaluació i Materials
ATA	Aleucia tòxica alimentària
a _w	Activitat de l'aigua
BSA	N,O-bis(trimetilsil) acetamida.
BSTFA	N,O-bis (trimetilsil)trifluoroacetamida.
CAC	Comissió del Codex Alimentarius
CAS	"Chemical Abstracts Service"
CEN	Comitè Europeu de Normalització
CG	Cromatografia de Gasos
CG-EM	Cromatografia de Gasos-Espectrometria de Masses
CI/IQ	Ionització Química
CL	Cromatografia Líquida
CL-EM	Acoblament cromatografia líquida espectrometria de masses
CTMS	Clorotrimetilsilà
DBU	1,8 diazabicycle[5.4.0]undecen-7
DCC	N,N'-Diciclohexilcabodiimida
DE	Desviació Estàndard
DER	Desviació Estàndard Relativa
DTGS	Sulfat de triglicina deuterada
DIP	Sonda d'Introducció Directa
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida

DOCE	Diari Oficial de les Comunitats Europees
DON	Deoxinivalenol
ECD	Detector de captura d'electrons
EFSA	Autoritat Europea de Seguretat Alimentària
EI/IE	Ionització per Impacte electrònic
EM	Espectrometria de Masses
EM-EM	Acoblament Masses-Masses
EPC	Control Electrònic de Pressió
ESI	Ionització per Electropulverització
FAO	Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació
FID	Detector d'ionització de flama
FM	Fragmentometria de Masses
GOGC	Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya
GSH	5-L-glutamil-L-cisteinilglicina, (glutathion)
HCB	Hexaclorobenzè
HEX	Hexà
HFBI	Heptafluorobutilimidazole
HMDS	Hexametildisilazà.
HPLC	Cromatografia de Líquids d'Alta Resolució
HPLC/EM	Cromatografia de Líquids d'Alta Resolució/Espectrometria de Masses
IAC	Columnes d'Immuno Afinitat
IARC	Agència Internacional de Recerca sobre el Càncer
IDPT	Ingesta Diària Provisional Tolerable
IDT	Ingesta Diària Tolerable
IR	Infraroig
IRMM	Institut per als materials i les mesures de referencia
JECFA	Comitè d'Experts FAO/OMS en additius alimentaris
JRC	Centre de Recerca Comú
kGy	Kilo "Grey"
LD	Límit de Detecció
L-L	Extracció Líquida-Líquida

LMR	Límit Màxim de Residus
MBTH	3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona
MET	Metanol
MIP	Polímers d'Impressió Molecular
MM	Massa molecular
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
NAC	N-acetilcisteïna
NCI	Ionització Química d'ions Negatius
NIV	Nivalenol
NMR	Ressonància Magnètica Nuclear
NOAEL	Cap (No) Nivell d'Efectes Adversos Observats
OMS	Organització Mundial de la Salut
OTA	Ocratoxina
PCI	Ionització Química d'ions Positius
PDA	Detector de Xarxa de Fotodiodes
PI	Patró Intern
Pir	Piridina
PMTDI	Ingesta Diària Màxima Provisional Tolerable
S/SL	Injector "Split/Splitless"
SCF	Comitè Científic sobre Aliments
SIM	Monitorització Selectiva d'Ions
SPE	Extracció en Fase Sòlida
SPR	Ressonància de Plasmons Superficials
T-2	Toxina T-2
TBDMS	Radical <i>tert</i> -butildimetilsilil
TEFA	Trietilfosfonoacetat
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oxil
THF	Tetrahidrofuran
TIC	Cromatograma Iònic Total
TLC	Cromatografia de Capa Prima
TMCS	Trimetilclorosilà.
TMS	Tetrametilsilà
TMSI	Trimetilsiliimidazole

TOL	Toluè
Tr	Temps de Retenció
uma	Unitat de massa atòmica
UV-VIS	Ultraviolat-Visible
ZEN	Zearalenona

Pròleg

1. Motivació

La principal motivació que em va empènyer a iniciar el present treball va néixer a finals de l'any 1992 quan vaig entrar al Departament de Química, com a tècnica encarregada de l'ús i manteniment d'un espectròmetre de masses acoblat a un cromatògraf de gasos. L'equip era un "MS Engine" de l'empresa Hewlett Packard, una plataforma analítica que incorporava els avanços tècnics dels anys 90 en tema d'analitzadors tipus quadripol i que es va estrenar a Espanya amb motiu de la celebració dels Jocs Olímpics de Barcelona-92 en els laboratoris de control anti-dopatge dels jocs.

Vaig creure convenient, per a la meva formació com a tècnica, que seria interessant iniciar un treball de recerca que involucrés la utilització d'aquesta tècnica i tingués una aplicació pràctica en l'àmbit de l'ETSEA i del Departament de Química. En aquella època, una de les línies d'investigació activa en que estava involucrat el meu director de tesi era l'anàlisi de micotoxines, en col·laboració amb el Grup de Microbiologia del Departament de Tecnologia dels Aliments, i va ser aquest el motiu pel qual ens plantejarem posar a punt un mètode d'anàlisi de patulina en suc de poma utilitzant tècniques cromatogràfiques acoblades a l'espectrometria de masses com a sistema detector de gran potencial.

2. Estructura

L'estructura de la present tesi s'articula en 4 capítols.

El Capítol 1 conté la introducció general del treball. Proporciona el marc conceptual del tema, la patulina com a micotoxina. En tant que la patulina és una micotoxina que pot estar present en determinants productes destinats a la alimentació humana i animal, s'ha de contextualitzar dins el marc de la seguretat alimentària, parlar del risc, de la seva avaluació i gestió i dels mecanismes per a l'assegurament de la mateixa. També hem considerat oportú indicar l'estructura química de les micotoxines més estudiades ja que l'estructura química determina les propietats físiques i químiques i en condiona la tècnica analítica a utilitzar per al seu control. En la descripció dels mètodes d'anàlisi hem considerat interessant, per tal d'entendre l'evolució d'aquestes tècniques, de no deslligar-les de la referència temporal i dels avanços tecnològics que han propiciat el seu desenvolupament. Per aquest motiu les taules resum dels mètodes d'anàlisi de patulina es presenten en ordre cronològic acompanyats d'una breu ressenya històrica.

A continuació de la Introducció es presenten els objectius del present treball.

En el Capítol 2, el corresponent a Material i Mètodes, s'enumera el conjunt de l'equipament instrumental utilitzat. Seguidament es presenta una descripció detallada dels protocols experimentals que s'han utilitzat en la realització del treball de laboratori per a l'obtenció de nous compostos, acompanyats d'un esquema de la reacció i del disseny experimental utilitzat. També s'hi inclouen els protocols de preparació de mostres, de patrons i la relació dels paràmetres instrumental de cada tècnica analítica emprada.

En el Capítol 3 es presenten els resultats obtinguts acompanyats d'una breu discussió dels mateixos. Els resultats es presenten seguint l'ordre cronològic

en que es van fer els diferents estudis, de forma que això ajuda a entendre l'evolució temporal del treball realitzat.

El Capítol 4 és el de les conclusions del treball.

Per finalitzar seguit de la bibliografia, i de la llista de Taules i Figures, s'adjunta a l'Annex-A una relació dels compostos descrits en el treball, es presenta l'estructura, el nom i la referència que se li ha donat dins el treball. A l'Annex-B s'adjunten les publicacions pròpies relacionades amb la tesi.

CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ

Episodis com els de les "vaques boges," la contaminació per dioxines i per metalls pesats, l'abús en la utilització de plaguicides i altres contaminants, són percebuts cada cop més com una amenaça per a la salut dels consumidors. Tot plegat ha fet augmentar l'interès sobre el control de residus químics i contaminants naturals en els aliments (CAC 1999; FAO 1999). Aquesta conscienciació sobre la seguretat alimentària ha posat en marxa la creació, tant en l'àmbit nacional com internacional, d'organismes que vetllen per la qualitat dels aliments i la seguretat dels consumidors i que també han contribuït a l'establiment d'una legislació cada cop més rigorosa per part dels organismes amb competències legislatives.

La Comissió de les Comunitats de la Unió Europea, amb la presentació del "Llibre Blanc sobre seguretat alimentària" l'any 2000 (CE 2000), va establir el marc legal i va definir la legislació de tota la política sobre protecció de la salut en l'àmbit de la seguretat alimentària tant en l'alimentació humana com animal. El resultat va ser la creació de l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (European Food Safety Authority, (EFSA), que va néixer legalment amb el [Reglament \(CE\) núm. 178/2002](#) del Consell del Parlament Europeu (DOCE 2002b).

A Espanya es va crear la "Agencia Española de Seguridad Alimentaria" (AESA), organització autònoma adscrita al Ministeri de Sanitat i Consum, amb l'objectiu de promoure la seguretat alimentària com a aspecte fonamental de la salut pública (BOE 2001a). Posteriorment es va publicar el Reial decret 709/2002, de 19 de juliol, pel qual s'aprova l'Estatut de l'AESA (BOE 2002).

Amb l'entrada en vigor de la Llei 20/2002 de 5 de juliol sobre seguretat alimentària a Catalunya, comunitat autònoma amb competències transferides en matèria de sanitat, es va crear l'Agència Catalana de Seguretat Alimentària (ACSE) i es va aprovar l'elaboració i el desenvolupament del Pla de seguretat alimentària de Catalunya (DOGC 2002; DOGC 2003).

Un objectiu comú d'aquestes agències és treballar en col·laboració i coordinació en l'àmbit de les seves competències, fonamentalment en l'avaluació i la comunicació de riscos en situacions de crisi o emergències.

1.2. Les micotoxines

Les micotoxines són compostos naturals derivats del metabolisme secundari de fongs filamentosos (floridures), que poden induir una resposta tòxica en humans i animals. Representa un grup de compostos químicament diversos i de diferent origen biosintètic. Fins ara, són unes 400 les que s'han caracteritzat estructuralment (Dekker 1998; Miller and Trenholm 1994).

Les micotoxines poden estar presents en productes destinats tant a la alimentació humana com animal i dins dels mecanismes de regulació i control encaminats a aconseguir aliments cada cop més segurs des del punt de vista de la salut són específicament considerats com a contaminants (Lopez-Garcia et al. 1999). Les micotoxines estan considerades unes de les toxines naturals més importants des del punt de vista del seu impacte negatiu sobre la salut pública, la seguretat alimentària i l'economia de molts països (FAO 1996; FAO 1999).

La seva presència, com a factor de risc té una clara incidència sobre l'activitat econòmica, tant en la agricultura com en la ramaderia. El seu impacte negatiu sobre l'economia ramadera només a Amèrica del Nord, es pot xifrar en pèrdues de l'ordre de bilions de dòlars per any (Dekker 1998; FAO 2003).

1.2.1. Definició i origen

El terme micotoxina es va utilitzar per primer cop l'any 1962 com a conseqüència d'una crisi veterinària que va tenir lloc prop de Londres. En aquest incident, aproximadament 100.000 galls dindi, ànecs i altres animals

domèstics van morir com a conseqüència d'una afecció desconeguda, que es va anomenar inicialment malaltia X (Bennett and Klich 2003). Un seguit d'estudis la van relacionar amb la presència d'un metabòlit secundari produït per una floridura (*Aspergillus flavus*) en la farina de cacauet importada d'Amèrica del Sud. Aquest metabòlit va rebre el nom d'aflatoxina. Entre els anys 60 al 80 hi va haver un gran avenç en el camp de la recerca d'agents toxigènics d'origen fúngic i es van caracteritzar la majoria de les micotoxines que coneixem (Bennett and Klich 2003; Peraica et al. 2000).

Tot i que se n'ha identificat de l'ordre d'unes 400, la gran majoria són produïdes per floridures que pertanyen a 5 gèneres de fongs, concretament: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Claviceps* (Miller and Trenholm 1994). Ara bé, no totes les espècies d'aquests cinc gèneres són productores de micotoxines, en realitat només es coneixen aproximadament unes 350 espècies fúngiques productores de micotoxines. La gran majoria d'aquestes espècies es concentren en 3 dels 5 gèneres mencionats: *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* (Betina 1989a; Pfohl 1999).

Les floridures toxigèniques poden créixer i produir micotoxines sobre un ampli ventall de substrats tant d'origen animal com vegetal (Dekker 1998; Pfohl 1999). Així en podem trobar en cultius de cereals, en oleaginoses, en fruits i llegums, en carns i productes de xarcuteria, i en la llet i productes làctics. Les micotoxines poden ser produïdes per fongs de camp, que creixen en plantes (ex. *Fusarium roseum*, productor de tricotecens), sobre material en descomposició (ex. *Aspergillus ochraceus*, productor d'ocratoxina A) o sobre material emmagatzemat (Magan 2004; Pfohl 1999). La producció de micotoxines té lloc principalment al final del període de creixement exponencial o al principi de la fase estacionaria del desenvolupament de la floridura (Weidenborner 2001).

A pesar que hi ha un gran nombre de micotoxines identificades, solament unes quantes es troben regularment en aliments (Drusch and Ragab 2003).

Taula 1.1. Exemples de floridures i les micotoxines presents en diferents aliments.

GÈNERE DE LES FLORIDURES	MICOTOXINES	ALIMENTS
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines Ocratoxina A (OTA)	Panís, cereals, cacauets, fruits secs, arròs, mongetes, teixits animals (pernil, salsitxes), llet i derivats, cafè
<i>Fusarium</i>	Tricotecens (DON, NIV, T-2) Zearalenona (ZEA) Fumonisines	Blat, panís, ordi, arròs, sègol, civada, nous
<i>Penicillium</i>	Patulina Ocratoxina (OTA)	Fruits i sucs blat, arròs, formatge, nous

Extret de Pfohl-Leszkowicz 1994 (Pfohl 1999)

1.2.2. Estructura química

En general les micotoxines són molècules de baix pes molecular, per sota de 1000 uma. La immensa majoria són termostables en mitjà no aquós, és a dir, difícilment degradables, el que fa que puguin romandre en el producte contaminat molt temps després de la desaparició de la floridura (Betina 1989a; Dekker 1998; Pfohl 1999).

Des del punt de vista de l'estructura química es poden classificar en diferents grups com, per exemple: pirones (èsters cíclics de 6 baldes), antraquinones, cumarines (1,2 benzopirones), macròlids, esteroides i polipèptids cíclics (Bennett and Klich 2003; Miller and Trenholm 1994; Weidenborner 2001).

Tot seguit es presenten les estructures químiques dels grups de micotoxines més estudiats per tal de visualitzar les diferències estructurals entre ells. L'estructura química en condiciona les seves propietats físicoquímiques, propietats que a la vegada condicionaran les tècniques analítiques a utilitzar per fer el seu seguiment i control. El coneixement de l'estructura química també permet fer hipòtesis sobre els seus mecanismes d'acció a nivell molecular. Per exemple, s'han fet estudis de correlació entre l'estructura química d'algunes micotoxines i la seva genotoxicitat (Betina 1989b; Bhatnagar 1992; Weidenborner 2001).

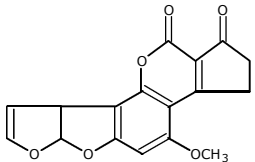
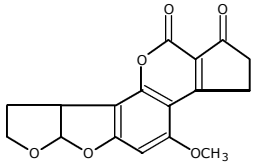
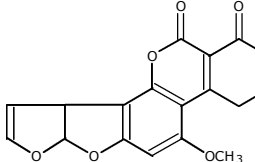
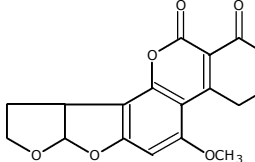
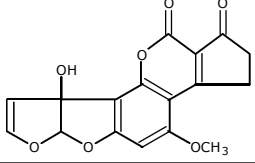
1.2.2.1. Aflatoxines

Les aflatoxines són cumarines policícliques que tenen diferents graus d'insaturació i diversos substituents (Taula 1.2). El nucli cumarínic està fusionat a un sistema dihidrofuran per un costat i per l'altre a una pentanona (aflatoxines B) o a una lactona de 6 baldes (aflatoxines G). Es reconeixen dos punts reactius (tòxic/carcinogènic), el costat insaturat de la meitat dihidrofurànica (el doble enllaç en posició 2,3) i l'anell lactònic de la part cumarínica (Weidenborner 2001). De fet si en la posició 2,3 de la part dihidrofurànica el doble enllaç no hi és present, com per exemple passa en les aflatoxines B2 i G2, l'activitat mutagènica és inexistent o molt petita (Bhatnagar 1992).

Les aflatoxines presenten fluorescència intensa a la llum ultraviolada. El color diferent d'aquesta fluorescència ha donat nom als grups "B" (blue) i "G" (green) d'aflatoxines. L'aflatoxina M1 és un metabòlit de l'aflatoxina B1 que s'excreta per la llet, la lletra "M" li ve del mot anglès "milk". Les aflatoxines són poc solubles en aigua però són solubles en dissolvents orgànics polars i semipolars (metanol, dimetilsulfòxid, cloroform) (Pohland et al. 1982). Són altament estables al calor en absència d'aigua. Són inestables sota llum UV en presència d'oxigen, a pH extrems i en presència d'oxidants. La lactona cíclica és sensible a la hidròlisi alcalina. Es degraden

amb amoníac i amb hipoclorit sòdic. Aquest últim tractament origina la 2,3-dicloroafatoxina, que és genotòxica (EFSA 2004a; IARC 1993a; Magan 2004; Pfohl 1999; WHO 2002).

Taula 1.2. Estructura química, fórmula molecular, massa molecular (MM) de les aflatoxines més importants i les seves espècies productores.

AFLATOXINA	ESTRUCTURA QUÍMICA	FÓRMULA	ESPÈCIES PRODUCTORES
B1		$C_{17}H_{12}O_6$ MM.: 312,3	<i>A. flavus</i> <i>A. nomius</i> <i>A. parasiticus</i>
B2		$C_{17}H_{14}O_6$ MM.: 314,3	
G1		$C_{17}H_{12}O_7$ MM.: 328,3	
G2		$C_{17}H_{14}O_7$ MM.: 330,3	
M1		$C_{17}H_{12}O_7$ MM.: 328,3	

Noms d'acord a la nomenclatura del Chemical Abstracts:

B1: (6aR-cis)-2,3,6a,9a-Tetrahidro-4-metoxiciclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][1]benzopiran-1,11-diona.

B2: (6aR-cis)-2,3,6a,8,9,9a-Hexahidro-4-metoxiciclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][1]benzopiran-1,11-diona.

G1: (7aR,10aS)-3,4,7a,10a-Tetrahidro-5-metoxi-1H,12H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]piran[3,4-c][1]benzopiran-1,12-diona.

G2: (7aR,10aS)-3,4,7a,9,10,10a-Hexahidro-5-metoxi-1H,12H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]piran[3,4-c] [1]benzopiran-1,12-diona.

M1: (6a*R*,9a*R*)-2,3,6a,9a-Tetrahidro-9a-hidroxi-4-metoxi ciclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*][1]benzopiran-1,11-diona.

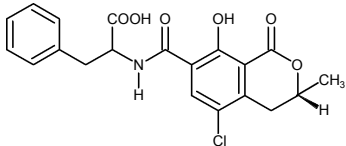
1.2.2.2. Ocratoxina A

L'ocratoxina A (OTA), és la més important i abundant del grup de les ocratoxines. Químicament pertany al grup de les dihidroisocumarines (Taula 1.3). La part 7-carboxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina està unida a través del grup àcid amb un enllaç amida amb la L-fenilalanina. Conté un grup lactònic, però la presència d'un àtom de clor en la seva molècula és un fet no massa comú en un compost d'origen natural (Weidenborner 2001).

L'OTA és un compost cristal·lí, soluble en dissolvents polars. En medi alcalí és parcialment soluble en aigua per formació de la sal sòdica. És un compost que pot donar diferents reaccions químiques: formació d'èsters (en la funció àcid, -COOH), formació d'amides (en la part amina -NH₂) etc (Pohland et al. 1982). Presenta fluorescència blava sota la llum ultraviolada i és tèrmicament estable, una temperatura de 250°C no és suficient per a assegurar-ne la completa eliminació.

La presència d'un aminoàcid essencial en la seva estructura, la fenilalanina, condiona de forma important el seu efecte a nivell bioquímic (EFSA 2004d; Magan 2004). El seu principal efecte sembla ser la inhibició de la síntesi proteica així com la inhibició de la síntesi de RNA i DNA. La part de la fenilalanina de la seva estructura li permet unir-se al centre actiu de l'enzim "Phe-tRNA sintetasa" y inhibir de forma competitiva la síntesi de proteïnes (Magan 2004).

Taula 1.3. Estructura química, fórmula molecular, massa molecular (MM) de l'OTA i les seves espècies productores.

	ESTRUCTURA QUÍMICA	FÓRMULA	ESPÈCIES PRODUCTORES
OTA		$C_{20}H_{18}ClNO_6$ MM.: 403,8	<i>A. ochraceus</i> <i>A. niger</i> <i>A. carbonarius</i> <i>P. viridicatum</i> <i>P. verrucosum</i>

Nom d'acord a la nomenclatura del Chemical Abstracts:

OTA: (*R*)-N-[(5-Cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirán-7-il)carbonil]-L-fenilalanina.

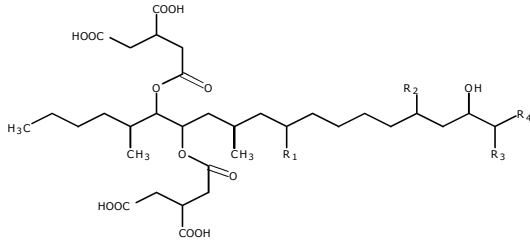
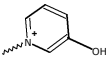
1.2.2.3. Fumonisines

Les fumonisines (Taula 1.4) són èsters de polihidroxi alquilamines. Estan formades per una cadena hidrocarbonada lineal de 19 o 20 unitats substituïda en diferents posicions per grups hidroxil i metil. La majoria dels

seus hidroxils estan esterificats amb àcids tricarboxílics (l'àcid propan-1,2,3-tricarboxílic) (Dutton 1996; SCF 2000b; SCF 2003; Weidenborner 2001). Les fumonisines s'agrupen en 4 sèries (Abrunhosa et al. 2001; Bahçeci et al. 2003; Cabras et al. 1997). La sèrie A es diferencia per la presència del grup N-acetilamida en el grup R₃, la sèrie B conté un grup amino en aquest punt. La sèrie C és similar a la B amb l'excepció que la sèrie C perd el grup metil terminal de la posició R₄. L'últim grup, la sèrie P, conté un grup 3-hidroxi piridoni en R₃. Només les fumonisines de la sèrie B han estat confirmades com productes naturals (Miller and Trenholm 1994).

Degut a la seva semblança estructural amb l'esfingosina, base dels esfingolípid components actius de les membranes, les fumonisines actuen inhibint la síntesi d'esfingosina (Weidenborner 2001). La seva estructura química és inusual en el sentit que la majoria no contenen cap anell o cicle. Són compostos polars, relativament solubles en aigua, més solubles en acetonitril i metanol i insolubles en dissolvents orgànics menys polars. Són més estables al calor que la resta de micotoxines. No absorbeixen la llum ultraviolada ni són fluorescents (Pfohl 1999).

Taula 1.4. Estructura química general, fórmula molecular, massa molecular (MM) de les fumonisines més importants i les seves espècies productores.

ESTRUCTURA GENERAL					ESPÈCIES PRODUCTORES	
					<p><i>F. moniliforme</i></p> <p><i>F. proliferatum</i></p> <p><i>F. verticillioides</i></p>	
	R1	R2	R3	R4	FÓRMULA	MM
A1	-OH	-OH	-NHCOCH ₃	-CH ₃	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₆	763,8
A2	-H	-OH	-NHCOCH ₃	-CH ₃	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₅	747,8
A3	-OH	-H	-NHCOCH ₃	-CH ₃	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₅	747,8
B1	-OH	-OH	-NH ₂	-CH ₃	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721,8
B2	-H	-OH	-NH ₂	-CH ₃	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705,8
B3	-OH	-H	-NH ₂	-CH ₃	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705,8
B4	-H	-H	-NH ₂	-CH ₃	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721,8
C1	-OH	-OH	-NH ₂	H	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₅	707,8
C2	-H	-OH	-NH ₂	H	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₄	691,8
C3	-OH	-H	-NH ₂	H	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₄	691,8
C4	-H	-H	NH ₂	H	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₅	675,8
P1	-OH	-OH	-3HP*	-CH ₃	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₆ ⁺	800,9
P2	-H	-OH	-3HP*	-CH ₃	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₅ ⁺	784,9
P3	-OH	-H	-3HP*	-CH ₃	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₅ ⁺	784,9
*3-hidroxi piridoni 						

Com a exemple es dona el nom de les fumonisines més importants, nom d'acord a la nomenclatura del Chemical Abstracts:

Fumonisina B1: 1,2,3-Propantricarboxilat de 1,1'-[1-(12-amino-4,9,11-trihidroxi-2-metiltridecil)-2-(1-metilpentil)-1,2-etandiil].

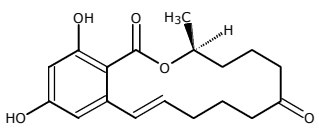
Fumonisina B2: 1,2,3-Propantricarboxilat de 1,1'-[1-(12-amino-9,11-dihidroxi-2-metiltridecil)-2-(1-metilpentil)-1,2-etandiil].

1.2.2.5. Zearalenona

La zearalenona (ZEA), és una β -lactona cíclica de l'àcid resorcínic (Taula 1.5). És un compost cristallí de color blanc (Pohland et al. 1982; Weidenborner 2001). Presenta un carboni asimètric, per la qual cosa és òpticament activa. És soluble en hexà, benzè, acetonitril, etanol i acetona. La seva solubilitat augmenta amb la polaritat del dissolvent. És fluorescent (color blau-verd), essent l'emissió màxima a 450 nm en etanol. Absorbeix radiació UV amb màxims a 236 nm i un coeficient d'extinció molar $E=29.700$, a 274 nm ($E=13.909$) i 316 nm ($E=6.020$). Té una alta estabilitat tèrmica i és sensible a la hidròlisi (Pfohl 1999; Pohland et al. 1982).

Els compostos lactònics estructuralment relacionats amb la ZEA, presenten activitat anabòlica i estrogènica (EFSA 2004c; SCF 2000a). La ZEA reacciona amb els receptors estrogènics del citoplasma celular i actua com a agonista. Hi ha autors que no consideren la ZEA i els seus derivats micotoxines, donat que, malgrat la seva propietat estrogènica, no presenten pràcticament toxicitat per via oral, i prefereixen anomenar-los estrògens fúngics enlloc de micotoxines (Dekker 1998).

Taula 1.5. Estructura química, fórmula molecular, massa molecular (MM) de la zearalenona i les seves principals espècies productores.

	ESTRUCTURA	FÓRMULA	ESPÈCIES PRODUCTORES
Zearalenona (ZEA)		$C_{18}H_{22}O_5$ MM.:318,4	<i>F. avenaceum</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. moniliforme</i>

Nom d'acord a la nomenclatura del Chemical Abstracts:

ZEA: (3S,11E)-3,4,5,6,9,10-Hexahidro-14,16-dihidroxi-3-metil-1H-2-benzoxacicotetradecin-1,7(8H)-diona (WHO 2002).

Cal dir que per aquesta micotoxina no hi ha uniformitat a l'hora de citar-la en forma abreujada, així la podem trobar citada a la literatura com ZEA, ZON o ZEN.

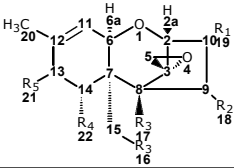
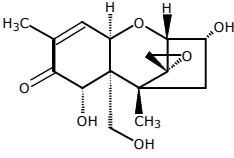
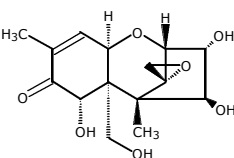
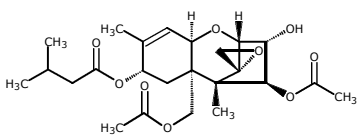
1.2.2.6. Tricotecens

Els tricotecens són un grup de micotoxines estructuralment divers, se n'ha descrit de l'ordre de 180 compostos, però solament uns pocs són contaminants importants en els conreus (Taula 1.6). Els hi dona el nom el gènere *Trichothecium* (Weidenborner 2001). Els tricotecens pertanyen al grup químic dels sesquiterpenoides, són sesquiterpens tricíclics. Es caracteritzen per la presència d'un enllaç olefínic en la posició 11,12 i un grup epoxi en la posició 3,5. Es caracteritzen en funció del tipus i grau d'oxidació dels substituents en les posicions 8, 9, 10, 13, 14 i 15. Són compostos químicament estables.

Es classifiquen en macrocíclics i no macrocíclics. Seguidament només es comentarà un seguit de característiques dels no macrocíclics donat la seva importància tòxica i la seva major presència en els cultius. La presència d'un grup carbonil en la posició 13 permet diferenciar 2 grups, el grup A i el B (Logrieco et al. 2003). El B té una funció cetona en aquesta posició i el grup A no. Els tricotecens del grup A són molt solubles en acetat d'etil, acetona, cloroform, diclorometà i èter dietílic. Els del grup A són 10 vegades més tòxics que els del grup B. La intoxicació aguda en animals d'experimentació origina problemes gastrointestinals com ara vòmits i diarrea (Miller and Trenholm 1994). Els tricotecens del grup B són també citotòxics i immunosupressors. En humans l'afecció més coneguda deguda als tricotecens és l'aleucia tòxica alimentària (Peraica et al. 2000). A nivell

molecular es coneix la seva potent capacitat inhibidora de la síntesi proteica en eucariotes (Apsimon et al. 1990; EFSA 2004b; Larsen 2004; WHO 2002).

Taula 1.6. Estructura química, fórmula molecular, massa molecular (MM) de 3 exemples de tricotecens i les seves principals espècies productores.

	ESTRUCTURA GENERAL	FÓRMULA	ESPÈCIES
			
Deoxinivalenol (DON) Grup B		$C_{15}H_{20}O_6$ MM.: 296,3	<i>F. avenaceum</i> <i>F. graminearum</i>
Nivalenol (NIV) Grup B		$C_{15}H_{20}O_7$ MM.: 312,3	<i>F. sporotrichioides</i> <i>F. moniliforme</i>
T-2 Grup A		$C_{24}H_{34}O_9$ MM.: 466,5	

Noms d'acord a la nomenclatura del Chemical Abstracts:

DON: (3, 7)-12,13-Epoxi-3,7,15-trihidroxi-tricotec-9-en-8-ona.

NIV: (3, 4, 7)-12,13-Epoxi-3,4,7,15-tetrahidroxi-tricotec-9-en-8-ona.

Toxina T-2: (3, 4, 8)-Tricotec-9-en-3,4,8,15-tetraol,12,13-epoxi-,4,15-diacetat 8-(3-metilbutanoat).

1.2.3. Factors ecotoxicològics

La presència de micotoxines no va directament associada al creixement fúngic, dit d'una altra forma, la presència de floridures en un determinat substrat no implica necessàriament presència de micotoxines. El potencial micotoxigènic entre espècies depèn amplament de la soca del fong i de factors mediambientals (Drusch and Ragab 2003). Així com en el desenvolupament de les floridures són factors primordials la temperatura i el grau d'humitat, els factors que influencien la producció de micotoxines inclouen a més: el temps, la integritat del substrat, la seva composició, l'oxigen, el CO₂, la taxa de contaminació, la prevalença d'espècies toxigèniques, les interaccions microbianes, els insectes i la dispersió de les espores. Aquests diferents factors d'ordre biològic, físic i químic que condicionen la producció de micotoxines per unes determinades floridures són el que s'anomena factors ecotoxicològics. La contaminació fúngica i la producció de micotoxines pot tenir lloc al camp, durant la recollecció o durant l'emmagatzemament (Betina 1989a; Miller and Trenholm 1994).

La gran estabilitat química i tèrmica de les micotoxines fa que puguin estar presents en un determinant substrat sense que s'apreciï desenvolupament fúngic. Cada floridura, cada micotoxina, cada substrat tenen el seu perfil particular de característiques ecotoxicològiques (Pfohl 1999). El coneixement dels factors ecofisiològics claus per al creixement dels fongs responsables de la producció de micotoxines, és essencial per tal de dissenyar programes i mesures de control en cada punt de la cadena (Magan 2004).

1.3. Micotoxicosi

Les micotoxines com a qualsevol altre agent tòxic poden ocasionar brots de toxicitat aguda, subaguda i crònica tant en animals com en humans. Algunes són carcinogèniques, mutagèniques i teratogèniques (IARC 1993a). Els efectes de toxicitat crònica ocasionats per nivells d'exposició petits a

llarg termini són els de més rellevància en l'àmbit de les micotoxicosis, donat que els brots aguts per intoxicació massiva, són poc probables. La toxicitat de la micotoxina més perillosa és aproximadament un milió de vegades menys tòxica que, per exemple la toxina botulínica (Moss 1998). Les micotoxines considerades objecte de vigilància especial són les aflatoxines, l'ocratoxina A, la patulina, les fumonisines, la zearalenona i els tricotecens DON, NIV i T-2, (FAO-WHO 1996; Pfohl 1999).

Els problemes sobre la salut relacionats amb l'exposició humana o animal a les micotoxines, s'anomenen micotoxicosis. La majoria de les micotoxicosis es produeixen per la ingestió d'aliments contaminats, ara bé el contacte amb la pell o la inhalació de material contaminat poden ser altres vies d'exposició (Bennett and Klich 2003).

Probablement les micotoxines han ocasionat problemes de salut des que l'home va començar a cultivar plantes de forma organitzada. De fet l'afecció més coneguda i des de més antic és l'ergotisme. Hi ha referències d'una epidèmia que va afectar els habitants d'Esparta cap a l'any 430 D.C. També es coneixen episodis d'ergotisme a l'Europa Central cap a l'Edat Mitjana, on va rebre el nom inicial de foc de Sant Antoni. Aquest nom li va estar donat perquè es feien peregrinacions al Santuari de Sant Antoni per tal que els alleugerís la sensació de cremor que tenien com a conseqüència de l'afecció (Peraica et al. 2000). Però no va ser fins al 1673 en que es va relacionar amb l'escleroci del *Claviceps purpurea*, el sègol banyut. Un altre exemple és la hipòtesi que assenyala a les micotoxines de *Fusarium* com les responsables de la reducció demogràfica experimentada a Europa occidental durant el segle XIII, com a conseqüència de la substitució del cultiu de sègol pel de blat (Miller 1991). Altres exemples més recents són la malaltia del fong vermell al Japó, ocasionada per la contaminació de cereals per fongs del gènere *Fusarium* productors de tricotecens; episodis com el càncer de fetge degut a l'aflatoxina B1; l'aleucia tòxica alimentària (ATA) originada per micotoxines de *Fusarium*, en concret la toxina T-2 (IARC 1993b); la nefropatia endèmica dels Balcans per ocratoxina A, entre

d'altres. En animals es pot citar com a exemples, la malaltia X del gall dindi per aflatoxines, la nefropatia porcina per ocratoxina A, la vulvovaginitis porcina per zearalenona, la leucoencefalopatia equina i l'edema pulmonar porcí, causades per fumonisines (FAO-OMS-UNEP 1999; Miller and Trenholm 1994). Els símptomes i la gravetat de les mateixes depenen fonamentalment del tipus de micotoxina, dels nivells de micotoxines presents en l'aliment consumit, de la quantitat d'aliment consumit, del pes i de l'estat fisiològic (edat, sexe, estat de salut...) de l'individu afectat, així com de la biodisponibilitat i la toxicitat del compost.

Les aflatoxines són compostos amb efectes tòxics immediats. Estan considerades substàncies mutàgeniques, cancerígenes, teratogèniques i immunosupressores (Lucas 2001). Són capaces d'induir càncer de fetge en la majoria d'espècies animals estudiades. L'aflatoxina B1 és la més potent. La majoria dels estudis epidemiològics demostren l'existència d'una correlació entre l'exposició a l'aflatoxina B1 i l'augment en la incidència del càncer de fetge. Si bé estudis recents indiquen que el seu potencial hepatotòxic és menys evident en persones ben alimentades que en els animals d'experimentació (EFSA 2004a; IARC 1993a; Peraica et al. 2000; WHO 2002).

L'ocratoxina A presenta activitat nefrotòxica immunosupressora, carcinogènica i teratogènica en els animals d'experimentació estudiats. El grup de treball del Centre Internacional de Recerca contra el Càncer (IARC) l'ha classificat com una substància possiblement carcinogènica per a l'ésser humà, Grup 2B (EFSA 2004d; IARC 1987; IARC 1993a; Pfohl 1999; WHO 2002). Dins del grup de les fumonisines, tenen importància toxicològica les fumonisines B1 i B2. La fumonisina B1 és la responsable de la leucoencefalomalacia equina, de l'edema pulmonar en els porcs i de fenòmens de carcinogènesi hepàtica en rates. L'agència de recerca sobre el càncer (IARC) les va classificar com a possiblement carcinogèniques per a l'ésser humà (IARC 1987; IARC 1993a; SCF 2000b; SCF 2003; Weidenborner 2001; WHO 2002).

La zearalenona i els derivats d'aquest grup tenen efectes estrogènics en algunes espècies animals, així com infertilitat, edema vulvar, prolapse vaginal, hipertròfia mamària en femelles i feminització en mascles (IARC 1993a; SCF 2000a).

Les manifestacions més comunes de la intoxicació per tricotecens són la immunodepressió, nàusees i vòmits. La seva toxicitat es deu en gran mesura a la seva capacitat per a inhibir la síntesi de proteïnes. Altres efectes són diarrees, hemorràgies i lesions cutànies (Dragacci 1991; IARC 1993a; IARC 1993b; Lucas 2001).

1.3.1. Anàlisi del risc

L'aplicació de l'anàlisi de risc en l'àmbit de la micotoxicosi s'ha començat a desenvolupar ens els últims 10 anys. Organitzacions internacionals com ara la Organització Mundial de la Salut (OMS) i la FAO, (FAO-OMS 1995) a través de la Comissió del "Codex Alimentarius" (CAC 1998) i de la Comissió Conjunta d'Experts sobre Additius Alimentaris (JECFA), (Herrman and Walker 1999), juntament amb altres agències nacionals, han orientat els seus esforços en aquesta direcció. Així, doncs, el marc de treball establert per a l'anàlisi del risc ha de ser un procés iteratiu entre tres components: l'avaluació del risc, la seva gestió i la comunicació (Kuiper-Goodman 1999). A través de l'anàlisi del risc s'han de trobar solucions pràctiques que tinguin en compte la necessitat de protegir la salut conjuntament amb els problemes econòmics.

Així, doncs, l'esquema del marc per a l'anàlisi del risc en la seguretat alimentària es pot resumir en la Figura 1.1.



Figura 1.1. Esquema del marc per a l'anàlisi del risc en la seguretat alimentària (Kuiper-Goodman 1999).

1.3.1.1. Avaluació del risc

L'avaluació del risc proporciona el fonament i els conceptes científics necessaris per tal d'adoptar decisions normatives adequades de cara a protegir la salut. Ha de ser un procés estructurat, objectiu i transparent per tal d'afavorir l'aplicació de les diferents estratègies i els procediments encaminats a establir la regulació dels nivells de contaminació en els aliments. Aquesta avaluació implica fer estudis toxicològics, epidemiològics, d'exposició i establir la caracterització del risc (IARC 1986; IARC 1993a).

Moltes vegades es fa confusa la diferència de significat entre perill i risc. A tall d'aclariment, direm que es defineix el perill com a aquella propietat intrínseca que té un agent biològic, químic o físic de produir un efecte advers per la salut sota unes determinades condicions. En tant que la paraula risc, implica una estimació de la probabilitat de què un efecte advers per a la salut es produeixi (FAO-WHO 1996; WHO 2002).

De cara a caracteritzar el perill, es fa una predicció del risc en humans per extrapolació a partir dels estudis realitzats en animals. Això porta a definir una "dosi segura" com a una estimació de la ingesta diària provisional tolerable (IDPT). Aquí es fa una distinció important entre substàncies carcinogèniques i no carcinogèniques. Per a les carcinogèniques, donat que no es pot definir un llindar a partir del qual no hi ha un nivell d'efectes adversos observables (NOAEL), no s'estableix cap valor d'ingesta diària tolerable (IDT) (Magan 2004).

1.3.1.2. Gestió del risc

La gestió del risc engloba els mecanismes encaminats a proporcionar aliments segurs per al consum, i per tant a minimitzar la presència de micotoxines en els productes alimentaris. Els sistemes de gestió han de ser sistemes integrats que han de considerar tots els punts possibles de control, des del camp fins al consumidor (Lopez-Garcia et al. 1999; Pfohl 1999).

Part de la gestió del risc ha d'assegurar mecanismes de reducció i control. Així, les estratègies de prevenció i control referents a micotoxines han de considerar la prevenció del creixement fúngic en tots els estadis de la producció (Magan 2004) introduint, si cal, modificacions d'algunes pautes en les pràctiques agrícoles. La prevenció a nivell de pre-collita és el millor mètode per tal de controlar la contaminació per micotoxines. Un cop feta la collita, el control de la humitat durant l'emmagatzemament és essencial (Drusch and Ragab 2003). El control i la descontaminació a nivell de postcollita representa una eina important per tal d'evitar l'exposició al

consumidor (Taeymans 2000). Algunes estratègies de descontaminació assajades passen per l'aplicació de mètodes físics d'eliminació, per exemple en el processat dels cacaus es poden separar els grans amb un cert grau de contaminació a partir d'un filtrat o una classificació per mitjans electrònics (detecció de la fluorescència en els grans contaminats per aflatoxines), que aconsegueix reduir els nivells de cacaus contaminats per aflatoxines de forma considerable. Altres impliquen l'aplicació de calor, de radiació etc (Aziz and Moussa 2002). Altres estudis consideren l'aplicació de mètodes químics de descontaminació, com ara tractar amb solucions d'amoníac. Per exemple, aquesta tècnica ha resultat bastant eficaç per tal de reduir els nivells d'aflatoxines en panís (Lopez-Garcia et al. 1999).

Un altre aspecte important del procés de gestió del risc és l'establiment d'una regulació de cara a definir i harmonitzar els límits màxims de residus permesos (LMR) entre tota la comunitat internacional.

També existeix un programa d'anàlisi de Perills i Punts Crítics de Control (APPCC) que s'està aplicant d'un temps ençà de forma satisfactòria per la indústria alimentària i les autoritats oficials de control dels aliments. Aquest programa permet prevenir i controlar els riscos associats a la contaminació dels aliments per microorganismes patògens i productes químics tòxics. Aquest és un sistema de gestió de la innocuïtat dels aliments basat en la identificació i avaluació sistemàtica dels perills que afecten els aliments i en la definició dels mitjans per a controlar-los (Park et al. 1999; Van Schothorst 2004). De fet aquest és un pla que s'ha de dissenyar de forma específica per a cada producte i cada procés. La FAO/OMS n'ha publicat un manual aplicat a la prevenció i control de les micotoxines (FAO 2003).

1.3.1.3. Comunicació del Risc

La comunicació dels risc és el procés mitjançant el qual s'incorpora a la decisió la informació i les opinions essencials per fer més eficaç la gestió. No implica exclusivament la divulgació de la informació. En aquest sentit els

experts, que actuen com a assessors en aquesta matèria, han de ser capaços d'explicar els resultats amb dades científiques entenedores i creïbles per a la resta (públic en general, la indústria, els mitjans informatius etc) (Magan 2004). La comunicació juga un paper important al llarg de tot el procés d'anàlisi ja que ha d'assegurar que les estratègies de gestió minimitzin el risc relacionat amb el consum alimentari.

Les agències legals dels governs tant a nivell nacional, regional com local tenen una responsabilitat important en el procés de comunicació (BOE 2001a; CE 2000; DOCE 2002b; DOGC 2002).

1.4. Reglamentació sobre micotoxines

L'adopció de mesures legislatives sobre micotoxines és un procés recent. Cal recordar que fa aproximadament 45 anys del descobriment de les aflatoxines i els seus potencials efectes nocius sobre la salut humana (FAO 1995; Van Egmond 1989).

La legislació sobre els aliments té com a finalitat la protecció de la salut dels consumidors i els interessos econòmics dels productors i comerciants (Egmond 1999). En els països amb economies de mercat ben desenvolupades existeixen reglamentacions específiques sobre el contingut de micotoxines en aliments i pinsos

A través d'enquestes nacionals i internacionals s'han establert les normes sobre toleràncies, bases legals, autoritats responsables, protocols de presa de mostres i d'anàlisi.

L'establiment d'una reglamentació sobre micotoxines depèn de factors tant socioeconòmics com científics. Aquests inclouen:

- la disponibilitat de dades toxicològiques.

- la disponibilitat de dades sobre la presència de micotoxines en mercaderies, de la distribució del contingut d'aquestes entre lots, la disponibilitat de metodologies d'anàlisi.
- la legislació dels països entre els que hi ha un contacte comercial.
- la necessitat d'importar determinats aliments (Magan 2004; Pfohl 1999).

No és fàcil trobar el punt de consens en tots aquests aspectes enumerats, que intervenen en el procés d'establiment de les toleràncies per les micotoxines. Moltes vegades es fa difícil que totes les parts es posin d'acord en l'establiment d'uns nivells de seguretat pel que fa a la presència de micotoxines. Molt sovint, els conflictes d'interessos entre els països posen entrebancs a l'harmonització de reglaments. D'altres, els interessos del països productors no coincideixen necessàriament amb els interessos dels països receptors, de tal manera que la presència de micotoxines en els aliments es pot fer servir com un obstacle en el comerç. De fet les normes sobre continguts màxims de micotoxines s'haurien d'establir atenent les consideracions dels productors, la indústria, els consumidors, el sector científic i els organismes oficials (Lucas 2001).

1.4.1. Reglamentació mundial

A partir dels anys 80 s'han estat realitzant enquestes internacionals sobre les legislacions existents per a les micotoxines en aliments i pinsos, (FAO 1995; FAO 1997). L'última revisió completa sobre els reglaments vigents a nivell mundial es va publicar l'any 1997 en un estudi de la FAO: "Alimentacion y nutricion 64" (FAO 1997). A l'actualitat la reglamentació mundial més recent està recollida en l'última enquesta realitzada per la FAO durant el període 2002-2003 i que es va publicar l'any 2004 (FAO 2004). Aquesta última enquesta va recollir la informació de 89 països que, juntament amb les dades d'anteriors enquestes, va completar fins a 119 el nombre de països enquestats. A nivell mundial, al menys 100 països

disposaven en el moment de finalitzar l'estudi de reglamentació per micotoxines, el que va representar un augment d'un 3% respecte l'any 1995 (FAO 2004).

De fet tots els països amb reglamentació per micotoxines, tenien establerts límits en els aliments i pinsos per a aflatoxina B1, o pel total de les aflatoxines i també per d'altres com els tricotecens (DON, NIV, T-2), les fumonisines del grup B, l'ocratoxina A, la patulina i la zearalenona. La nova reglamentació, respecte a l'últim estudi del 1995, està més detallada amb nous requisits pel que fa als procediments oficials de mostreig i per a les metodologies analítiques.

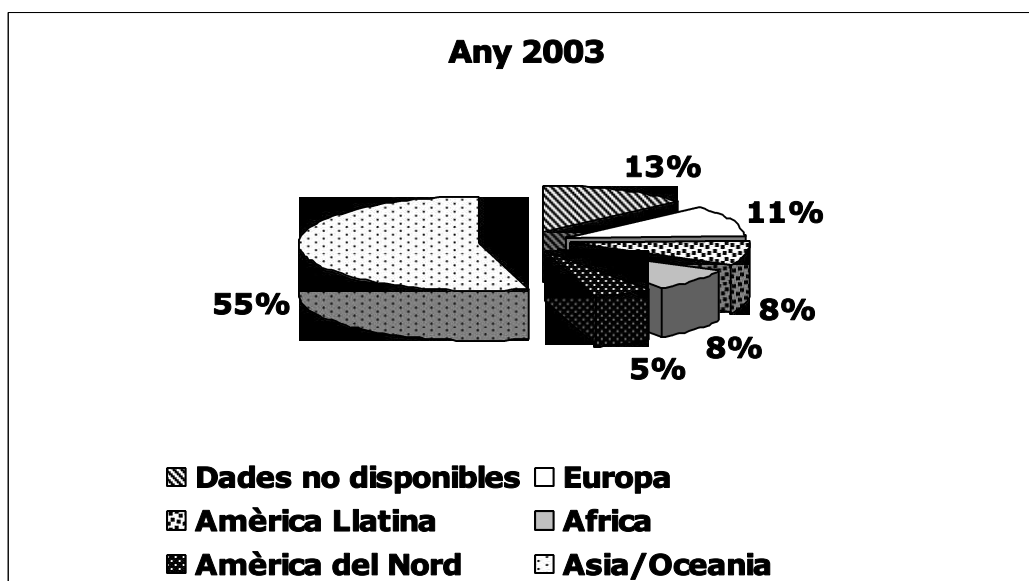


Figura 1.2. Esquema del percentatge de la població mundial amb reglamentació sobre micotoxines (FAO 2004).

1.4.3. Reglamentació a Europa

Com ja s'ha mencionat a la introducció, La Comissió de la Comunitat Europea amb la publicació l'any 2000 del Llibre Blanc sobre Seguretat Alimentària, va establir el marc legislatiu de la seguretat alimentària dins la Comunitat (CE 2000). La Comissió de la Comunitat Europea és responsable

de l'establiment de la regulació dels límits de micotoxines entre els membres de la comunitat. Els estudis d'avaluació toxicològica són responsabilitat del SCF, Comitè Científic sobre Aliments. Diferents grups de treball i experts integren diferents comitès amb delegats de tots els estats membres, els quals, després de debatre els detalls presenten una proposta al SCF per a l'avaluació final. Seguidament la Comissió Europea inicia les sessions del Comitè de Direcció sobre aliments amb representants de tots els estats que porta a la adopció d'una directiva, una regulació o una decisió.

Europa és el continent que té la reglamentació de micotoxines més detallada. A Europa 39 països tenen regulacions específiques per micotoxines i a més hi ha una harmonització en la regulació per part dels països membres de la Comunitat. S'han harmonitzat els límits per aflatoxines totals i aflatoxina B1 en determinats productes i aliments infantils, per aflatoxina M1 a la llet i aliments infantils, per l'ocratoxina A i patulina en derivats de fruita i alimentació infantil.

La legislació comunitària ha establert uns límits màxims per algunes micotoxines en determinats aliments. Els estats membres estan obligats a controlar la contaminació per micotoxines i a comunicar els seus resultats a la Comissió. Amb el Reglament (CE 2000) núm. 466/2001 de la Comissió s'inicia la regulació en l'establiment de continguts màxims de determinats contaminants en productes alimentaris (DOCE 2001), i en la secció 2, la corresponent a les micotoxines, s'estableixen per primer cop, els continguts màxims d'aflatoxines en determinats productes.

➤ Així per a les aflatoxines la normativa europea publicada fins ara es recull a la següent documentació:

Reglament de la Comissió (EC) N° 466/2001 (DOCE 2001)

N° 257/2002 (DOCE 2002c)

N° 472/2002 (DOCE 2002d)

N° 2174/2003 (DOCE 2003c)

Nº 683/2004 (DOCE 2004c)

Nº 401/2006 (DOCE 2006)

➤ Per a l'ocratoxina A, els reglaments que regulen el seu contingut màxim en diferents aliments són:

Reglament de la Comissió (EC) Nº 466/2001 (DOCE 2001)

Nº 472/2002 (DOCE 2002d)

Nº 683/2004 (DOCE 2004c)

Nº 123/2005 (DOCE 2005b)

Nº 401/2006 (DOCE 2006)

➤ Per a la patulina normativa europea publicada fins ara es recull a la següent documentació:

Reglament de la Comissió (EC) Nº 466/2001 (DOCE 2001)

Recomanació 2003/598/CE (DOCE 2003b)

Directiva 2003/78/CE (DOCE 2003a)

Reglament Nº 1425/2003 (DOCE 2003d)

Reglament Nº 455/2004 (DOCE 2004b).

Reglament Nº 401/2006 (DOCE 2006)

➤ Per a la resta, (toxines de *Fusarium*), s'ha actualitzat la normativa amb el Reglament (CE 2000) núm. 856/2005 de la Comissió de 6 de juny de 2005 (DOCE 2005c). I recentement el Reglament Nº 401/2006 (DOCE 2006).

També s'han publicat Recomanacions pel que fa a l'àmbit de l'alimentació animal que fan referència a l'establiment d'un programa coordinat de control en el que es pretén verificar la concentració d'aflatoxina B1, ocratoxina A, zearalenona, deoxinivalenol i fumonisines en matèries primeres per a pinsos (DOCE 2002a; DOCE 2004a; DOCE 2005a).

Tota la legislació comunitària és accessible a: <http://europa.eu.int/eur-lex/es/index.html>.

Cal remarcar que existeixen reglamentacions a nivell nacional entre els estats membres, que cobreixen els aliments no regulats per la Comissió Europea i també per altres micotoxines diferents a les que s'han mencionat.

A la figura 1.4. es presenta de forma gràfica l'estat de la reglamentació a Europa d'un estudi publicat l'any 2004. Estan representades les micotoxines per a les que existeix normativa vers el nombre de països que tenen reglamentació per a cada micotoxina.

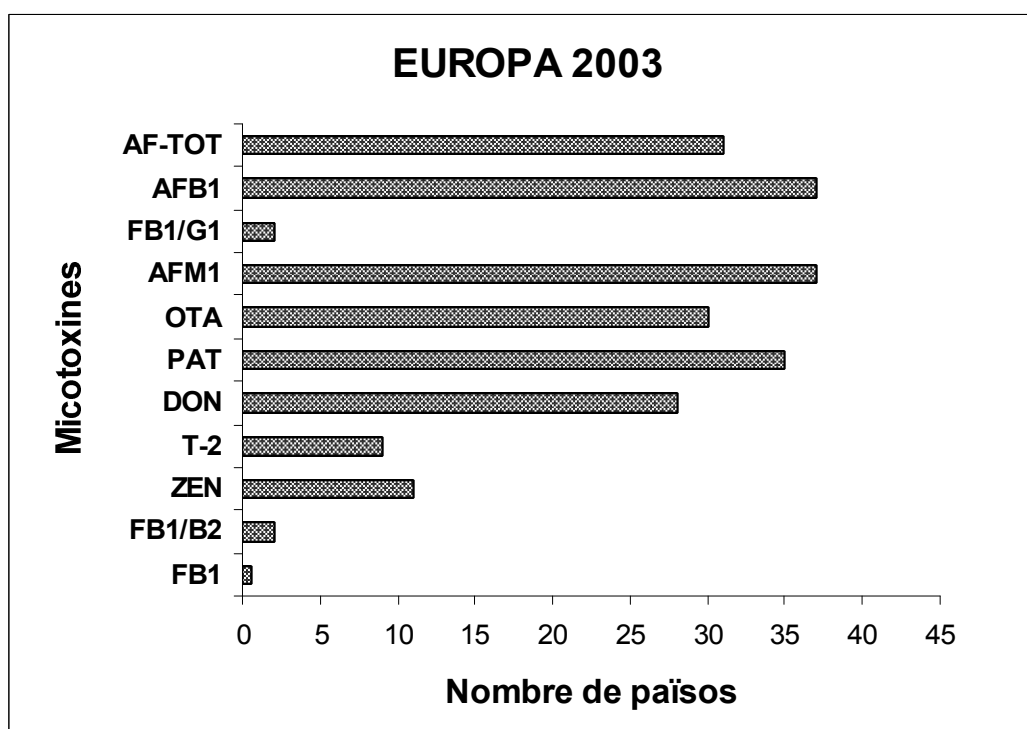


Figura 1.3. Micotoxines en els aliments reglamentades a Europa (FAO 2004).

1.4.4. Reglamentació a Espanya

La reglamentació espanyola sobre micotoxines es pot considerar iniciada l'any 1983 amb la publicació del Reial Decret 308/1983 de 25 de gener i del Reial Decret 1354/1983 de 27 d'abril de 1983, amb els que es va aprovar la Reglamentació Tècnico-Sanitària per a l'elaboració, circulació i comerç de te

i derivats i d'olis vegetals comestibles, exclusivament en el que fa referència a micotoxines.

Posteriorment es van anar regulant els continguts màxims permesos per a determinades micotoxines i en determinants aliments en consonància al que anaven adoptant altres països europeus. Així amb el Reial Decret 475/1988 es van establir els límits màxims permesos d'aflatoxines B1, B2, G1, i G2 en aliments destinats al consum humà (BOE 1988). També hi ha normativa relativa als mètodes d'anàlisis per al control oficial d'aflatoxines (BOE 2001b), amb les posteriors modificacions (BOE 2003a; BOE 2004a; BOE 2004c), per a l'Ocratoxina A (BOE 2003b) i les posteriors modificacions publicades (BOE 2004b) i per la patulina (BOE 2004d).

1.5. Avenços en l'anàlisi de micotoxines

La preparació i l'extracció de la mostra és l'etapa que requereix més temps i és, en general, l'etapa on és més fàcil cometre errors. És principalment en aquesta etapa on s'estan optimitzant contínuament les tècniques.

Actualment l'extracció en fase líquida, on s'utilitzen importants quantitats de dissolvent i temps, s'està substituint per la utilització de columnes d'extracció en fase sòlida SPE, (solid phase extraction). Aquest procediment permet optimitzar l'eficiència d'extracció reduint el temps i la despesa de dissolvent. Hi ha una gran varietat de fases estacionaries a l'abast, tant per extractes aquosos com orgànics (Magan 2004). Una altra varietat de columnes desenvolupades per a la purificació d'extractes en l'anàlisi de micotoxines són les columnes MycoSep® (http://www.romerlabs.com/pdts_columns.html). Aquestes difereixen de les columnes d'extracció SPE en que l'extracte es disposa en un tub d'assaig on s'hi introdueix la columna. La solució de l'extracte passa a través de la columna on es queden retinguts els interferents i la solució purificada es recupera a la part superior de la columna. També estan disponibles en una

gran varietat d'absorbents específics per a algunes micotoxines, com per exemple DON, OTA i patulina (Krska et al. 2005).

Altres tipus de columnes són les columnes d'immunoafinitat, IAC (Immuno Affinity Columns), basades en l'obtenció d'anticossos específics monoclonals o policlonals contra una micotoxina en concret que es fixen a un adsorbent dins d'un tub o columna. Es troben kits comercials de IAC per a aflatoxines, ocratoxina A, DON, toxina T-2 i zearalenona (Magan 2004).

Basats també en tècniques d'immunoafinitat, en aquest cas en la tècnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), es troben kits comercials d'ELISA per a diferents micotoxines. S'utilitza aquesta tècnica en l'anàlisi qualitatiu per a determinar la presència o no d'una determinada micotoxina en un aliment o bé semi-quantitativa. Estan disponibles en diferents formats comercials, membrana, microplat i tub (Krska et al. 2005; Magan 2004).

Una alternativa als sistemes d'immunoafinitat són els polímers d'impressió molecular (MIP molecular imprinted polymers). Estan considerats "anticossos artificials" donat que no són biomolècules. Es preparen de formes diferents, però en essència consisteix en lligar a un suport una sèrie de grups funcionals capaços de reaccionar amb una determinada molècula. Els suports funcionalitzats s'utilitzen per a farcir columnes cromatogràfiques. Aquest són sistemes més estables i es poden regenerar fàcilment. Són de preparació més econòmica i es poden preparar en grans quantitats. S'han assajat amb DON i ZEA (Magan 2004; Weiss et al. 2005), (Krska et al. 2005).

Altres avenços a nivell de tècniques d'anàlisis alternatives poden ser la utilització de biosensors. Estan basats en la tècnica d'immunoassaig, però utilitzen un sistema de detecció diferent a l'etiquetatge enzimàtica.

Aquests comprenen 3 parts: un anticòs específic per a una determinada micotoxina, un transductor capaç de convertir el reconeixement antígen-anticòs en un senyal acústic, elèctric, mecànic u òptic i un sistema de detecció. Els sensors emprats poden ser amperomètrics, potenciomètrics,

fluorimètrics d'ona evanescent o de ressonància de plasmons superficials (SPR), aquests últims són els que s'utilitzen més comunament. En una breu descripció de la tècnica es pot dir que la micotoxina es fixa a l'anticòs immobilitzat sobre una pel·lícula d'or. La interacció antígen-anticòs produeix un canvi en l'índex de refracció el qual es pot mesurar. S'ha assajat per a la detecció d'aflatoxines i DON (Krska et al. 2005; Tudos et al. 2003).

1.6. Patulina

La patulina és una micotoxina produïda per algunes soques de micromicets. S'ha aïllat d'algunes espècies dels gèneres: *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Gymnoascus*, *Stemphylium*, *Eupenicillium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Phialophora* (Laidou et al. 2001; Magan 2004; Okeke et al. 1993). Només del gènere *Penicillium* subgènere *Penicillium* se n'han descrit 13 espècies productores (Frisvad et al. 2004). Si bé la producció de patulina no depèn del gènere, les soques productores de patulina més actives pertanyen als gèneres *Aspergillus* i *Penicillium* (Steiman et al. 1989). Fins ara s'han descrit unes 60 espècies productores de patulina, que pertanyen a més de 30 gèneres (Drusch and Ragab 2003).

Els fongs productors de patulina poden créixer de forma natural o en cultius, sobre una gran varietat d'aliments: albercocs, raïm (Scott et al. 1977), préssecs, peres, pomes, (Aziz and Moussa 2002), olives, formatge, curats (Bailly et al. 2005), cereals (Abrunhosa et al. 2001; LopezDiaz and Flannigan 1997a; LopezDiaz and Flannigan 1997b), però és en pomes i productes derivats on es troba quasi exclusivament (Andersen et al. 2004). En general la principal espècie productora és *Penicillium expansum*, fong responsable de la podridura de determinats fruits: pomes (Prieta et al. 1994b), peres (Laidou et al. 2001), cireres, etc. En cereals (blat, ordi germinat) l'espècie productora més important és *Aspergillus clavatus* (LopezDiaz and Flannigan 1997b; Moss 1998).

Malgrat que les espècies productores de patulina poden créixer en diferents substrats, en alguns la patulina no és estable . Així en taronges, suc de taronja, cebes, farina, pa, formatge (LopezDiaz et al. 1996) un cop formada desapareix ràpidament. Tampoc es troba en sidra i vi, doncs, no és resistent a la fermentació alcohòlica (Ascar 1999) ja que la patulina és metabolitzada per *Sacharomyces cerevisiae* en condicions anaeròbies (Moss 1998; Stinson et al. 1978). La presència de patulina en sidres franceses i algunes del Regne Unit és deguda a que en aquest casos s'addiciona suc sense fermentar per tal d'ajustar el nivell de sucres i l'aroma de la sidra al producte final (Leggott and Shephard 2001).

La presència de patulina en els productes derivats de la poma és un indicador de la qualitat del material emprat en el procés de fabricació (Jackson et al. 2003; Prieta et al. 1994a; Rovira et al. 1993).

El seu aïllament i purificació ha estat descrita per diversos grups d'investigadors quasi simultàniament. En un principi es va anomenar claviformina ja que es va aïllar del fong *P. claviforme* per en Chain et al. l'any 1942 (Chain et al. 1942), Wiesner la va anomenar clavicina (Wiesner 1942). Un any més tard va rebre el nom de patulina, al ser aïllada del *P. patulum*, més tard anomenat *P. urticae* i ara *P. griseofulvum* per Birkinshaw et al. l'any 1943 (Birkinshaw et al. 1943). Hi ha altres cites bibliogràfiques que atribueixen l'aïllament a Raistrick, (Raistrick 1943) professor de Bioquímica a la Universitat de Londres. Aquest li va enviar una mostra a WE Gye, director dels laboratoris de la Fundació Imperial de Recerca del Càncer per a que en fes una avaluació com a agent anticancerígen (CurrentScience 2004; Katzman et al. 1944). El professor Gye, que estava molt refredat en aquell moment, va provar aquella mostra sobre si mateix en forma d'esprai nasal. El refredat va remetre en dos dies i es va atribuir la millora a l'autotractament (Gye 1943). D'aleshores, es va assajar en forma d'esprai nasal i per la gola per a tractar el refredat (Ciegler et al. 1977; Stansfeld et al. 1944).

Aquest mateix metabòlit va ser aïllat d'altres espècies, rebent diferents noms com claviformina, clavitina, leucopina, penicidina, expansina, micoïna, micoïna c, micoïna c₃ etc. (Ciegler et al. 1971).

Com ja s'ha mencionat, l'interès per la patulina es va centrar en l'estudi de les seves propietats antibiòtiques (Raistrick 1943; Stuart-Harris et al. 1943). Presentava activitat antibacteriana tant en bacteris Gram positius com Gram negatius. Els estudis realitzats durant els anys 50 i 60 van posar de manifest que, conjuntament a les seves propietats antibiòtiques, la patulina resultava ser tòxica per a plantes i animals. Va ser durant l'any 1960 que es va classificar com a micotoxina (Bennett and Klich 2003).

1.6.1. Factors ambientals que afecten la producció de patulina per *P. expansum*

Ja s'ha comentat a l'apartat 1.2.3 que el creixement d'una floridura no comporta la presència de la micotoxina que és potencialment capaç de produir. La producció d'una determinada micotoxina depèn principalment de la soca de la floridura (Paster et al. 1995) i dels factors mediambientals. El coneixement d'aquests factors, que influencien la formació de patulina, és important per tal de prevenir-ne la seva formació durant el període d'emmagatzematge previ a la fabricació del suc.

La síntesi de patulina s'inicia un cop assolida la fase de creixement miceliar del fong (Drusch and Ragab 2003) i el seu òptim es troba a 15°C després de 15 dies i a 20°C després de 10 dies (Hasan 2000). Altres estudis parlen de temperatures òptimes de 20 i 30°C durant 2-3 setmanes (Paster et al. 1995; Sommer et al. 1974). Però cal destacar que *P. expansum* és capaç també de desenvolupar-se a 0°C, dada que cal tenir present per tal de controlar el creixement fúngic i la possible formació de patulina en les pomes emmagatzemades en refrigeració (Sommer et al. 1974).

Un altre factor que cal considerar diferent a la temperatura és la presència d'oxigen. S'ha constatat que amb un contingut d'oxigen del 4%, la floridura pot créixer be, però es pot inhibir la producció de patulina amb una composició del 3% CO₂/2% O₂ (Paster et al. 1995). El coneixement d'aquests paràmetres també és important per tal d'aplicar atmosferes modificades com a tècnica de control en l'emmagatzematge (Moodley et al. 2002).

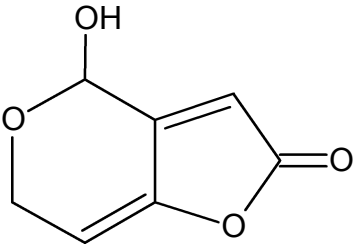
Per la seva part, l'activitat de l'aigua (a_w), juntament amb la temperatura, és el paràmetre més important que condiciona el creixement fúngic en un determinat substrat. Els valors òptims estudiats per a la majoria de fongs responsables de podridures es troba entre 0,96 i 0,98 en estudis realitzats in vitro. Pel que fa a *P. expansum* s'ha trobat que el creixement del fong es òptim a activitats d'aigua entre 0,96 i 0,98 i temperatures entre 15 i 25°C (Lahlali et al. 2005).

1.6.2. Estructura química i propietats fisicoquímiques

La patulina, 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona, és una lactona heterocíclica insaturada. L'estructura química va estar proposada per *Raistrick et al.* (Birkinshaw et al. 1943) i finalment confirmada per síntesi química per Woodward (Woodward and Singh 1949; Woodward and Singh 1950).

És un compost cristallí incolor. No presenta activitat òptica, doncs, els cristalls estan formats per parelles d'enantiomers D i L en una proporció 1:1 unides per ponts d'hidrogen (Hubbard et al. 1977).

Taula 1.7. Estructura química i principals dades que caracteritzen la patulina i la seva reactivitat química.

 <p style="text-align: center;">PATULINA</p>	Número CAS: 149-29-1
	Fórmula empírica: C ₇ H ₆ O ₂
	Massa molecular: 154,12
	Punt de fusió: <ul style="list-style-type: none"> • 105-108°C (Pohland et al. 1982) • 111°C (Budavari 1996)
	Absorció UV: λ_{\max} 276 nm Coeficient d'absorció molar (MET): $\epsilon = 1436 \pm 4$ (Pohland et al. 1982)
	Absorció IR: 3.580, 3340, 1782, 1755 cm ⁻¹ en CHCl ₃ (Pohland et al. 1982)
Reactivitat Química	1.- Alcohol secundari del hemiacetal: <ul style="list-style-type: none"> • Formació d'acetats (Katzman et al. 1944) cinnamats, benzoats. • Èters de trimetilsilil derivats (Kellert et al. 1983; Tabata et al. 2004) • Heptafluorobutil derivats (Tarter and Scott 1991) • Hemisuccinats (Sheu et al. 1999)
	2.- Carbonil de la lactona cíclica: Formació hidrazones, semicarbazones, oximes (Katzman et al. 1944; Stinson et al. 1977)
	3.- Reacció amb grups tiol (-SH) (Ciegler 1976; Fliege and Metzler 2000b; Geiger and Conn 1945)
	4.- Reacció amb SO ₂ (Pohland and Allen 1970)
	5.- Reducció: Amb borohidruir sòdic → ascladiol (Moss and Long 2002; Sekiguchi et al. 1983)

SOLUBILITAT: És soluble en aigua, etanol, acetat d'etil, acetona, èter dietílic i cloroform (Budavari 1996; Miller and Trenholm 1994).

ESTABILITAT: Els primers estudis sobre la seva estabilitat daten de l'època del seu aïllament com a antibiòtic. El treball de Wiesner va ser el primer en estudiar l'estabilitat tèrmica de la patulina en solució aquosa (Wiesner 1942). Estudis posteriors sobre l'estabilitat en suc de poma i raïm avalen aquest fet. És, doncs, estable a pH àcid a temperatura ambient i això fa que sigui relativament estable en suc de poma i raïm (Scott and Somers 1968) (Miller and Trenholm 1994), suc que no contenen compostos amb grups tiol en la seva composició. En dissolució en dissolvents orgànics és estable en cloroform i diclorometà (Pohland and Allen 1970)

L'efecte del pH en la cinètica de desaparició de la patulina en solució aquosa va ser tractat per *Lovett i Peeler* l'any 1973. En el seu estudi van trobar que la patulina era resistent a la destrucció tèrmica en l'interval de pH's estudiat, de 3,5 a 5,5 però l'estabilitat era major a pH's més àcids (Lovett and Peeler 1973). En el treball de *Brackett i Elmer* l'any 1979 s'estudià l'estabilitat de la patulina a 25°C però a pH's més alts, de 6-8. En el treball es confirmà la poca estabilitat de la patulina a pH's bàsics (Birkinshaw et al. 1943; Brackett and Marth 1979b)

1.6.3. Reaccions amb nucleòfils

Una gran part dels treballs de recerca encaminats a estudiar els efectes antibiòtics de la patulina i a explicar-ne el seu mecanisme d'acció, fan referència a la seva electrofília o capacitat d'aquest compost bioactiu per a reaccionar amb grups (Shah et al. 2000) tiol o altres grups nucleòfils (Geiger and Conn 1945; Katzman et al. 1944). Així, doncs, es va interpretar que molts enzims, vitals per al desenvolupament de bacteris, llevats i fongs, amb grups tiol en el seu centre actiu es veien inhibits per l'acció de la patulina. Tot i ser cert, no és una regla general, doncs, altres enzims que no tenen grups tiol també són inhibits (Sumbu et al. 1983). Aquest mateix

mecanisme permet explicar la sinergia de la patulina amb d'altres antibiòtics (Dulaney and Jacobsen 1987). Malgrat no es pot parlar d'un coneixement clar del mecanisme d'acció, és clar que la reactivitat de la patulina envers els grups tiol és cabdal en el mecanisme d'acció global (Fliege and Metzler 1999; Fliege and Metzler 2000a).

Al llarg de diferents estudis s'han anat proposant diferents mecanismes d'acció. L'addició del grup SH sobre el carboni insaturat explicava el mecanisme en els primers assaigs realitzats poc després del seu aïllament (Geiger and Conn 1945). Un mecanisme similar va estar proposat amb posterioritat, aquest implicava una addició de Michael del grup tiol sobre el doble enllaç del sistema lactònic insaturat (Friedman et al. 1965; Jones and Young 1968).

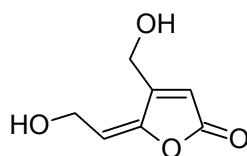
Altres autors han descrit la formació d'adductes de patulina amb compostos amb grups tiol com ara cisteïna (Ciegler 1976; Krivobok et al. 1994; Lindroth and Vonwright 1978). En realitat els autors citats, anomenen adductes a una barreja de compostos generats a partir d'una solució de patulina i cisteïna a un determinat pH i que no s'han pogut aïllar ni caracteritzar estructuralment. La formació d'aquests adductes ha servit per explicar l'activitat citotòxica d'aquesta molècula envers els compostos amb grups tiols que integren determinats sistemes biològics estudiats com ara pèptids, proteïnes i determinats enzims (Fliege and Metzler 2000b). *Fliege i Metzler (2000)* van aconseguir caracteritzar alguns d'aquests compostos formats per reacció de la patulina amb NAC (N-acetilcisteïna), cisteïna, i GSH (5-L-glutamil-L-cisteinilglicina) (Fliege and Metzler 2000b). El treball és força interessant, doncs, fins a les hores no s'havia trobat cap evidència estructural que validés la formació d'aquests compostos. El mateix autor va repetir l'experiència utilitzant 4-bromotiofenol, 2-mercaptoetanol i 4-bromoanilina com a agents nucleòfils. El mecanisme descrit en aquest últim cas és el d'una addició 1,6 del tiolat sobre el sistema insaturat del carbonil de la lactona de la patulina, o una addició 1,4 del tiol sobre el sistema

insaturat del sistema hemiacetàlic. Que la addició sigui 1,6 o 1,4 depèn del tipus de nucleòfil (Fliege and Metzler 2000a).

Aquest mateix mecanisme permetria explicar el perquè de la disminució o desaparició del contingut de patulina en determinats medis (rics amb compostos amb grups -SH) durant el període d'emmagatzematge (Harwig et al. 1977; Scott and Somers 1968).

1.6.4. Fermentació alcohòlica

Molts treballs avalen la reducció quasi total de la patulina durant el procés de fermentació (Stinson et al. 1978), però pocs estudis s'han realitzat de cara a caracteritzar-ne els productes resultants. Un treball de *Stinson et al.* afirma que la patulina és degradada a CO₂ durant el procés de fermentació (Stinson et al. 1979). Un treball més recent de *Moss i Long* de l'any 2002 aconsegueix caracteritzar l'ascladiol com a producte resultant (Moss and Long 2002).



E-Ascladiol

Figura 1.4. Estructura química de l'Ascladiol

Un treball de *Sumbu et al.* (Sumbu et al. 1983), si bé no pot demostrar el mecanisme d'acció pel qual es produeix la degradació de la patulina durant la fermentació, demostra que aquesta és deguda al metabolisme del llevat, i que si s'inhibeix la síntesi proteica del llevat, la degradació de la patulina no té lloc (Sumbu et al. 1983).

1.6.5. Toxicologia

Com ja s'ha mencionat, l'interès inicial per la patulina es va centrar en les seves propietats antibiòtiques. Es va provar la seva capacitat bacteriostàtica i bactericida tant en bacteris Gram positius com Gram negatius, també es va provar com a antifúngic (Geiger and Conn 1945; Katzman et al. 1944) (Moulé and Hatey 1977; [Anon] 1945).

Estudis posteriors van posar de manifest altres activitats així com la seva toxicitat en animals, rates i ratolins.

La toxicitat de la patulina està revisada en detall en el volum 56 de la "IARC Monographs on the evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans" de l'any 1993 (IARC 1993a). Altres estudis sobre genotoxicitat, citotoxicitat, immunotoxicitat i neurotoxicitat estan amplament detallats en el document "Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants" de la Sèrie 35 de la FAO de l'any 1996 (FAO-WHO 1996).

Respecte a l'activitat carcinogènica de la patulina, els estudis de *Dickens i Jones, 1961* (Dickens and Jones 1961) i *Mayer i Legator, 1969* (Mayer and Legator 1969) la van catalogar com a carcinogènica, però estudis posteriors han constatat que la patulina no és carcinogènica i que els estudis inicials eren inadequats (FAO-WHO 1996; IARC 1993a; Magan 2004).

D'acord amb la classificació de l'Agència per la Recerca contra el Càncer, la patulina està catalogada en el grup 3. Pertanyen a aquest grup aquells compostos per als que els estudis d'avaluació han resultat tenir una evidència inadequada sobre animals d'experimentació i també en humans (IARC 1987). Estudis d'avaluació de la activitat carcinogènica de la patulina en humans no se n'han realitzat fins el moment actual.

Actualment no hi ha noves evidències sobre la toxicitat de la patulina en humans per la qual cosa no és necessari realitzar una nova avaluació sobre seguretat, i el valor de la ingesta màxima tolerable provisional diària

(PMTDI) establerta per la JECFA l'any 1996 i per SCF l'any 2000 de 0,4 µg/Kg resulta encara vàlida (Magan 2004).

L'any 2001 la Comissió Europea va promoure l'organització d'un treball de cooperació per tal de fer una estimació de la ingesta de patulina entre la població dels estats membres (EU 2002). En aquest treball es va concloure que l'exposició al consum de patulina és inferior a 0,4 µg/Kg. Dins d'aquest estudi, es fa una consideració especial pel que fa al grup de població més susceptible, com poden ser els nens i els nadons, que pel seu major consum i menor pes corporal podrien resultar més vulnerables. De fet en el 2003 la normativa europea va establir uns límits permesos més rigorosos per aquesta població. Es va establir un contingut màxim de patulina en suc i productes elaborats a base de poma de 10,0 µg/Kg (DOCE 2003d).

A Espanya, es va fer un estudi prospectiu de presència de patulina en aliments infantils destinats al consum infantil, realitzat pel Centre Nacional d'Alimentació dependent de l'Agència Espanyola de Seguretat Alimentària, que es va publicar el 2005 (Legarda and Burdaspal 2006). En aquest estudi tampoc es va trobar cap mostra amb un contingut de patulina superior al que estableix la normativa europea i en cap cas es pot superar el valor de la PMTDI establerta en 0,4 µg/Kg.

1.6.6. Patulina en suc de poma

En un 66% aproximadament dels casos de pomes florides de forma natural s'han trobat espècies de *Penicillium* productores de patulina. La gran majoria d'aquest casos estaven causats per *Penicillium expansum*, que és un fong que creix sobre fruits prèviament lesionats (Delage et al. 2003) i que és considera un fong sapròfit (Ciegler et al. 1977; Logrieco et al. 2003; Wilson and Nuovo 1973) i el terra és el seu substrat hoste (Sydenham et al. 1995).

Penicillium expansum, també conegut com el fong blau de la podridura de les pomes, (Ryu and Holt 1993) pot afectar a la poma ja en l'arbre, durant la collita i principalment durant el període de postcollita, sota determinades condicions mediambientals favorables. La invasió s'inicia a través de petites ferides en la superfície del fruit produïdes per insectes, algunes plagues etc. (Errampalli et al. 2005; Lahlali et al. 2005).

En la fabricació de suc de poma s'utilitzen pomes madures, en general les pomes passen un període de temps emmagatzemades (enmagatzemament de coberta), previ a la fabricació del suc. És en aquest període on és crític el control per a prevenir el desenvolupament fúngic i la formació de micotoxines. La temperatura i la humitat són factors determinants en la contaminació inicial, mentre que un cop iniciat el creixement la soca del fong, el tipus de poma i els factors ambientals són els determinats per al creixement i la producció de patulina (McCallum et al. 2002; Sydenham et al. 1995; Sydenham et al. 1997).

Quan s'utilitzen pomes en mal estat amb un cert grau de floridura per a la fabricació de suc o bé de concentrat de suc de poma, la patulina pot passar a contaminar el suc degut a la seva solubilitat en aigua (Ascar 1999) (Gokmen et al. 2001), i romandre-hi, donat la seva estabilitat en aquest mitjà àcid (Damoglou and Campbell 1986).

Estudis realitzats sobre el grau de difusió de la patulina en la poma florida parlen d'una penetració d'un a 2 cm a partir de la superfície afectada. Això explica que els tractament de rentat de les pomes, previs a la fabricació del suc, no siguin del tot efectius (Rychlik and Schieberle 2001; Taniwaki et al. 1992). Estudis similars s'han fet en pera (Laidou et al. 2001) i tomàquet on s'ha demostrat que la patulina en aquest cas penetra la totalitat del fruit (Rychlik and Schieberle 2001).

Donat que no hi cap mètode realment eficaç per tal d'eliminar la patulina present en els aliments, la millor estratègia és la prevenció. Cal actuar des

de dos fronts, assegurant una bones pràctiques agrícoles i també unes bones pràctiques de fabricació (CAC/RCP50 2003).

1.6.6.1. Tractaments per controlar la presència de patulina en suc i derivats

S'han emprat diversos tractaments per tal d'eliminar la presència de patulina en suc i derivats, com per exemple triar les pomes, rentar-les (Chen et al. 2004; Jackson et al. 2003), aplicar processos de clarificació amb enzims, tractar amb carbó actiu (Kadagal and Nas 2002; Leggott et al. 2001; Mutlu and Gokmen 1998; Sands et al. 1976), tractar amb SO₂, addicionar vitamina C (Canas and Aranda 1996), o cisteïna (Ascar 1999) i el control de l'atmosfera en l'emmagatzematge entre d'altres (Errampalli et al. 2005; Moodley et al. 2002).

Un dels tractaments que s'ha demostrat realment eficaç ha estat l'eliminació de la zona podrida de les pomes a l'inici del procés de fabricació del suc. D'aquesta manera es pot reduir fins un 95% el contingut de patulina en el suc (Acar et al. 1998; Guerre 2000; Lovett et al. 1975; Sydenham et al. 1995).

Tractaments químics:

Els tractaments químics són encara la principal via de control del creixement de *P. patulum* en pomes emmagatzemades. Aquests impliquen l'aplicació entre d'altres de fungicides de síntesi tal com tiabendazol i fluodixolnil (Errampalli et al. 2005). L'aplicació de fungicides sintètics abans o després de l'etapa de recol·lecció, implica una disminució del contingut de patulina en suc quan es compara amb suc preparats amb pomes sense tractar (Tsao and Zhou 2000).

Un altra mesura de control consisteix en submergir les pomes en una solució al 3% d'hipoclorit sòdic durant 3 min com a mesura fungistàtica (Hasan 2000; Jackson et al. 2000). Altres estudis realitzats en aquesta

direcció van demostrar que l'aplicació d'una solució d'àcid acètic del 2-5% va resultar altament eficaç per tal d'inhibir el creixement de *P. expansum* en pomes per a la producció de sidra (Chen et al. 2004).

Els olis de determinats fruits com ara plàtan, poma, llimona, mango, taronja i maduixa es van assajar com a possibles agents de control. El resultat va ser que es va aconseguir la inhibició de la producció de patulina totalment, aplicant un 0,2% d'oli de llimona en cultius de *P. expansum* (Hasan 2000). Altres compostos que s'han provat de cara a inhibir el creixement de *P. expansum* i alhora la producció de patulina són: l'oli de canyella, l'aldehid cinnàmic, l'oli de clau, l'eugenol i el sorbat potàssic, que són aplicats sobre els fruits com a tractament antifúngic en postcollita. Així, l'aplicació de 0,1% d'oli de canyella i/o 0,2% de sorbat potàssic van resultar ser inhibidors efectius de la formació de patulina en suc de poma (Lennox and McElroy 1984; Ryu and Holt 1993). Aquest tipus de productes volen ser una alternativa a la utilització de fungicides convencionals obtinguts per síntesi química, sobre els que cada cop hi ha més restriccions. Ara bé, la seva efectivitat depèn de la varietat de la poma, com posen de manifest *Ryu i Holt* en l'estudi realitzat (Ryu and Holt 1993), la resposta al tractament amb oli de canyella al 0,1% varia d'un cultiu de poma a un altre, essent poc efectiu en cultius fets sobre la varietat "Imperial Gala" i demostrant un efecte inhibidor del creixement del fong més clar sobre la varietat "Gala" o la "Tydemans Red".

L'addició d'àcid ascòrbic també s'ha assajat com a mètode de reducció de patulina en suc de poma (Brackett and Marth 1979a).

Un altre exemple de mètode químic assajat en aquest cas per a la destrucció de mostres de laboratori és l'aplicació d'amoníac en solució del 5-10% (Freymy and Gleizes 1991).

Altres mètodes impliquen l'ús d'enzims i l'addició de gelatines, bentonites o bé carbó actiu. Tots presenten certa efectivitat en la reducció de patulina, però tenen l'inconvenient de retenir compostos fenòlics, aromes etc. del suc

i el resultat és un producte de menys qualitat des del punt de vista nutritiu (Bissessur et al. 2001; Gokmen et al. 2001; Huebner et al. 2000).

Tractaments físics:

En el procés de fabricació de suc de poma a escala industrial s'utilitzen diferents mètodes de clarificació del suc. Aquests tenen com a finalitat l'eliminació de les partícules de material sòlid que donen terbolesa al suc. Entre aquests es pot mencionar la decantació, la centrifugació, la filtració per membrana (ultrafiltració) i la filtració al buit. En tots aquest processos es produeix una reducció del contingut inicial de patulina del suc degut a la retenció de la patulina en la fracció sòlida (Bissessur et al. 2001; Gokmen et al. 2001; Huebner et al. 2000). Estudis realitzats a escala de laboratori per tal de quantificar la magnitud de la reducció confirmen la reducció però donen xifres bastant diferents (Acar et al. 1998; Bissessur et al. 2001; Gokmen et al. 2001).

També s'han realitzat estudis de tractament tèrmic del suc, per tal d'avaluar la seva efectivitat en la reducció del contingut de patulina (Kadikal and Nas 2003). Si bé l'aplicació de temperatura comporta una reducció del contingut de patulina, també va acompanyat d'un augment del contingut d'hidroxiacetilfurfural (HMF) i provoca que el suc esdevingui més fosc.

Altres mètodes, com l'aplicació de radiacions i el seu efecte sobre les micotoxines són poc coneguts. S'han fet estudis d'aplicació de radiació gamma com a mètode de reducció de la microflora en aliments (Aziz and Moussa 2002). L'aplicació de radiació ionitzant inferior a 2,5 kGy, per a controlar el nivell de patulina en sucs i concentrats, va comportar una disminució del contingut de patulina proporcional a la dosi de radiació subministrada. Aquesta reducció es va donar sense canvis importants en el contingut de sucres, acidesa o aminoàcids (Zegota et al. 1988). Ara bé, estudis posteriors han posat de manifest que l'aplicació de radiació comporta canvis en la composició química del suc com per exemple un augment de formaldehid i tetrahidrofuran. S'ha observat que l'aplicació de

radiació ha d'anar acompanyada de l'addició d'antioxidants i combinar-se amb altres tècniques per tal d'evitar canvis en la composició del suc (Fan et al. 2004).

1.6.7. Tècniques cromatogràfiques d'anàlisi de patulina

Els mètodes d'anàlisi per a la detecció i/o quantificació de patulina en suc de poma i altres substrats inclouen pràcticament tota la gamma de tècniques cromatogràfiques, des de la cromatografia sobre paper, la cromatografia de capa prima, (Scott 1974; Vero et al. 1999), la cromatografia líquida (Priest and Light 2001; Prieta et al. 1994b; Rovira et al. 1993), la cromatografia de gasos, (Chaytor and Saxby 1981; Pohland and Allen 1970; Suzuki et al. 1975), i també la electroforesi capillar (Tsao and Zhou 2000).

La cromatografia de capa prima primer (Scott and Somers 1968) i la de gasos, quasi simultàniament (Pohland and Allen 1970) van ser les primeres tècniques cromatogràfiques utilitzades en l'anàlisi de patulina (Shephard and Leggott 2000). La cromatografia en fase líquida va anar cobrant importància dins del camp de la química analítica un cop es van desenvolupar noves fases estacionàries i es va perfeccionar el disseny per a un sistema injector eficaç, l'injector tipus Rheodyne®.

1.6.7.1. Cromatografia de capa prima

La primera tècnica utilitzada inicialment per a la determinació semiquantitativa de patulina en suc de poma va ser la cromatografia de capa prima (Scott et al. 1972). Aquesta tècnica, es va adoptar com a mètode oficial per l'AOAC (AOAC 1974) després d'un estudi de col·laboració interlaboratori realitzat l'any 1974 (Scott 1974). Bàsicament el mètode consisteix en fer una extracció amb acetat d'etil seguit d'una fase de purificació per cromatografia en columna de gel de sílice. La detecció es fa

per TLC amb solució reveladora de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) que reacciona amb la patulina originant un compost fluorescent.

Taula 1.8. Resum dels mètodes més representatius d'anàlisis de patulina per cromatografia de capa prima (TLC).

Matriu	TLC	Fase mòbil	Revelat	LD^a	Ref.
Suc poma comercial	TLC	Èter/Tol/Fòrmic (30:15:6)	Fenilhidrazina. HCl 4%	1 µg/L	(Scott et al. 1972)
Suc poma i raïm	TLC	Tol/AcOEt/Fòrmic (5+4+1)	MBTH ^b 0,5%	20 µg/L	(Scott 1974)
Suc poma	Diàlisi difàsica TLC	Tol/ AcOEt /CHCl ₃ /Fòrmic (70+50+50+20)	MBTH ^b 0,5%	50 µg/L	(Prieta et al. 1992)
Pomes, concentrat de poma i suc de poma	TLC/ Densitometria directa	Tol/ AcOEt /Fòrmic (6:3:1)	MBTH ^b 0,5%	12-20 µg/L	(Vero et al. 1999)

a.- Límit de detecció

b.- 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona.HCl

La cromatografia de capa prima es va utilitzar inicialment per ser la tècnica de separació més assequible i generalitzada a l'època dels 60-70. Els principals inconvenients d'aquesta tècnica són la poca resolució i sensibilitat i la impossibilitat de minimitzar les interferències de la matriu (Scott and Kennedy 1973; Ware et al. 1974). De fet a partir de l'any 1974 (Ware et al. 1974) els laboratoris o grups de treball que disposaven de cromatògrafs de gasos utilitzaven aquesta tècnica per a confirmar i quantificar nivells de patulina en les matrius d'interès (Scott et al. 1972).

1.6.7.2. Cromatografia de gasos (CG)

La cromatografia de gasos va ser la tècnica de separació que es va desenvolupar amb més rapidesa senzillament perquè no presentava tants problemes tècnics a resoldre com la cromatografia de líquids. Així, doncs, la CG esdevingué la tècnica analítica alternativa a la TLC en l'anàlisi de patulina (Scott et al. 1972; Ware et al. 1974).

La cromatografia de gasos presenta avantatges respecte a la TLC com poden ser: major resolució, precisió en l'anàlisi qualitatiu , quantitatiu i una major sensibilitat (Poole and Poole 1991).

Degut a la polaritat de la molècula de patulina, aquesta es va haver de derivatitzar per tal d'afavorir-ne la seva anàlisi per CG (Betina 1989b). També s'utilitza per augmentar el límit de detecció d'un determinat compost vers un detector més específic (Poole and Poole 1991).

En el primer mètode descrit per a l'anàlisi de patulina en suc de poma per CG es preparen derivats de patulina tal com un trimetilsilil èter, l'acetat i el cloroacetat sobre el grup hidroxil (Pohland and Allen 1970).

A continuació es presenta un quadre resum de l'anàlisi de patulina per CG amb els derivats que es preparen i els detectors emprats.

Taula 1.9. Resum dels mètodes d'anàlisi de patulina derivatitzada, per CG amb detectors convencionals.

Matriu	Determinació	Derivat	LD^a	Ref.
Suc de poma	CG-FID	Acetat Cloroacetat Sililèter (BSA)	60 ng 40 ng 100 ng	(Pohland and Allen 1970)
Panís	CG-FID	Sililèter (BSA i TMCS)	25 ng	(Pero et al. 1972)
Gra d'arros	CG-ECD	Sililèter (BSA i TMCS)	20 µg/L	(Fujimoto et al. 1975)
Estandards de patulina	CG-ECD	a) BSA b) BSA-TMCS c) HMDS-TMCS d) BSTFA e) TMSI	-	(Suzuki et al. 1975)
Suc de poma	Columna capillar CG-ECD	HFBI	< 10 µg/L	(Tarter and Scott 1991)

a.- Límit de detecció
(BSA).- N,O-bis(trimetilsilil)acetamida.
(BSTFA).- N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida.
(MSTFA).- N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida.
(TMCS).- Trimetilclorosilà.
(HMDS).- Hexametildisilazà.
(HFBI).- Heptafluorobutilimidazole.
(TMSI).-N-trimetilsililimidazole

En resum, la CG amb detectors convencionals tal com el FID i el ECD és una alternativa a la TLC, doncs, es guanya amb resolució i sensibilitat, però les tècniques de derivatització introdueixen un element de variabilitat més en la determinació, com pot ser la poca estabilitat del derivat format (Pohland and Allen 1970; Suzuki et al. 1975) la formació parcial del derivat preparat (Suzuki et al. 1975) i tampoc estan exemptes de l'aparició d'interferències (IARC 1986; Scott and Kennedy 1973; Ware et al. 1974).

1.6.7.3. Cromatografia líquida

La cromatografia líquida va ser la primera tècnica cromatogràfica desenvolupada durant la primera dècada del 1900 (Lesney 1998), però en

canvi va ser la que es va consolidar més tard. Un cop es van anar resolent tots els problemes tècnics en la cromatografia líquida, durant la dècada dels 70 hi va haver un ressorgiment d'aquesta tècnica. A meitat dels 70, amb el desenvolupament de nous materials utilitzats com a suport de la fase estacionària i l'adequació de nous detectors en línia és va desenvolupar enormement la cromatografia d'alta resolució, l'HPLC. Un altre factor també de considerable importància, que va consolidar l'HPLC com a tècnica analítica amb una instrumentació a l'abast va ser la comercialització de l'injector Rheodyne l'any 1976. L'injector Rheodyne manual primer i automatitzat després (l'any 1995) va permetre la fàcil introducció de la mostra a analitzar en un sistema pressuritzat sense haver de tallar el flux de la fase mòbil (Lesney 1998; Scott 2005).

La primera referència bibliogràfica sobre l'anàlisi de patulina en suc de poma sorgeix a l'època on es comença a desenvolupar la cromatografia líquida ràpida, l'any 1974 (Ware et al. 1974). *Ware et al.* posen a punt un mètode de determinació de patulina per cromatografia líquida amb detector UV que els permet quantificar fins a 11 µg/L. Cal ressaltar el fet que utilitzen la CG-EM com a tècnica alternativa per a confirmar els resultats. No és fins l'any 1995 en que l'AOAC estableix un mètode oficial de d'anàlisi de patulina per HPLC (AOAC 1995) basat en un treball de col·laboració previ realitzat per *Brause et al.* i publicat l'any 1996 (Brause et al. 1996). El mètode, aplicable a la determinació de patulina en suc de poma, inclou una etapa d'extracció líquid-líquid amb acetat d'etil seguida d'una etapa de purificació amb solució de carbonat sòdic per tal d'eliminar al màxim els interferents tipus polifenols i una determinació per HPLC-UV. Aquest és un mètode ràpid, assequible i fàcilment estandaritzable en qualsevol laboratori.

El fet que la patulina sigui un compost polar i que presenti un màxim d'absorció a la regió UV, han convertit a l'HPLC en la tècnica universalment emprada per a l'anàlisi de patulina en suc de poma i altres matrius utilitzant columnes cromatogràfiques de fase inversa i detectors tipus UV d'una única longitud d'ona o el més recomanat de xarxa de fotodíodes (PDA, photodiode

array) (Dekker 1998; Kubacki and Goszcz 1988). Aquests últims són els més recomanats de cara a confirmar l'espectre UV de la patulina en front d'altres interferents. De tota manera interferents com ara l'hidroximetilfurfural (HMF) que presenta un espectre molt similar al de la patulina amb un màxim a λ_{\max} 284 nm, molt proper al de la patulina λ_{\max} 276nm, han portat en alguns casos a falses identificacions amb el consegüent error quantitatiu (Gokmen and Acar 1999; Mortimer et al. 1985; Sewram et al. 2000).

A la Taula 1.10 es presenta un resum amb els mètodes més representatius per a l'anàlisi de patulina per HPLC per ordre cronològic, per tal de poder observar l'evolució d'aquesta tècnica que ha implicat bàsicament la millora dels mètodes d'extracció i purificació (Boonzaaijer et al. 2005; Eisele and Gibson 2003; Gokmen et al. 2005).

Taula 1.10. Resum dels mètodes d'anàlisi de patulina en suc de poma i derivats per HPLC-UV

Matriu	Extracció	Purificació	Fase mòbil	Det.^b	LD^a	Ref.
Suc de poma	Extracció L-L (AcOEt)	Columna de gel de sílice	Isooctà/CH ₂ Cl ₂ /MET (84+15+1)	UV	<11 µg/L	(Ware et al. 1974)
Suc de poma	Extracció L-L (AcOEt)	Sep-Pack Sílice-C ₁₈	H ₂ O/THF (99+1)	UV	2 µg/L	(Rovira et al. 1993)
Suc de poma i aliments infantils amb poma	Diàlisi difàsica amb (AcOEt)	Sep-Pack Sílice-C ₁₈	H ₂ O/THF (99+1)	UV	0,5-1 µg/L	(Prieta et al. 1994b)
Suc poma	Extracció L-L (AcOEt)	Extracció L-L 1,5 % Na ₂ CO ₃	H ₂ O/THF Max (95:5) ó H ₂ O/ACN Max (90+10)	UV	25 µg/L	(AOAC 1995)
Suc de poma	Extracció en fase sòlida (SPE) Buit	----	H ₂ O-TFA (0.05%) /ACN 98:2	PDA	5 µg/L	(AOAC 1995)
Suc de poma i aliments infantils amb poma	Extracció L-L (AcOEt) +Na ₂ CO ₃ + NaHCO ₃	Columna de SPE de gel de sílice	H ₂ O 100%	UV	10 µg/L	(Arranz et al. 2005)

a.- Límit de detecció.

b.- Detector.

(AcOEt).- Acetat d'etil.

(THF).- Tetrahidrofur.

(TFA).- Àcid trifluoroacètic.

(L-L).- Líquid-líquid.

(UV).- Detector de llum d'ultraviolat.

(PDA).- Detector de xarxa de fotodiodes

1.6.7.4. Tècniques cromatogràfiques amb acoblament amb l'espectrometria de masses (EM)

En els últims anys els avenços en la instrumentació, les tècniques de separació en línia i el processament de dades han contribuït de forma espectacular el desenvolupament de la EM en el camp de l'anàlisi i del control de qualitat en l'àmbit de la alimentació (Gilbert 1987).

El disseny d'espectròmetres de masses compactes que actuen com a sensors químics (detectors) ha propiciat el desenvolupament de les tècniques d'acoblament que destaquen principalment per la selectivitat i sensibilitat (Workman et al. 2003).

Tècniques de separació tal com la CG, la HPLC i l'electroforesi capil·lar són tècniques imprescindibles en l'estudi de composició dels aliments i de l'anàlisi de compostos xenobiòtics en els mateixos. La determinació d'anàlits en aquestes complexes matrius requereix la utilització de tècniques altament selectives que permetin caracteritzar i determinar tant els compostos que es coneixen com els desconeguts. L'acoblament de les tècniques cromatogràfiques amb la EM ha superat enormement aquestes dificultats (Careri et al. 2002). Així troben aplicacions d'acoblements en l'anàlisi de pesticides, de residus de drogues, de toxines i altres xenobiòtics en els aliments (Rundberget and Wilkins 2002).

En l'anàlisi i caracterització de micotoxines l'aplicació de la HPLC-EM i de la CG-EM han estat i estan amplament utilitzades. La disponibilitat d'equips instrumentals de sobretaula assequibles i que no requereixen una especial preparació dels usuaris els han convertit en les tècniques d'elecció per anàlisis de residus en matrius complexes degut a la seva alta selectivitat (Dekker 1998). A partir dels anys 80 la CG-EM va esdevenir la tècnica analítica de detecció i identificació d'elecció per a l'anàlisi de residus en l'àmbit de la petroquímica, l'anàlisi mediambiental, agrari i de control de qualitat de la indústria alimentària (Niessen 1999).

Si bé es parla de l'espectrometria de masses com una eina analítica que permet fer determinacions estructurals de molècules, aquesta és indirecta. De fet l'EM mesura la producció de fragments iònics a partir de molècules neutres i aquesta mesura depèn de molts factors (Johnstone and Rose 1996). El resultat d'una anàlisi per EM és un espectre de masses, que és una representació cartesiana de l'abundància dels fragments iònics enfront de la massa del fragment o més concretament la seva relació massa càrrega m/z . Alguns autors creuen més acurat parlar de fragmentograma

de masses en tant que la FM (fragmentometria de masses) no és una tècnica espectroscòpica (Coldwell et al. 1995; Lai et al. 1998; Pareles and Rosen 1974). L'assignació d'una determinada estructura a partir d'un espectre de masses es fa en base als estudis empírics sobre els mecanismes de la fragmentació dels ions generats (Johnstone and Rose 1996). El llibre "Interpretation of Mass Spectra" de MacLafferty representa amb gran extensió el marc conceptual per a la interpretació dels espectres de masses i l'assignació d'estructures (McLafferty 1980).

1.6.7.4.1. Acoblament HPLC-EM

Si com hem mencionat abans, l'HPLC és la tècnica més utilitzada per a l'anàlisi de patulina en suc de poma i derivats, l'acoblament HPLC-EM continua liderant aquesta opció però amb el benefici addicional que suposa la utilització d'un detector més selectiu i amb el potencial de ser una eina d'elucidació estructural (Workman et al. 2003).

El desenvolupament d'aquesta tècnica d'acoblament no va resultar eficaç fins que no es va resoldre el disseny d'una interfase que possibilités la ionització de les molècules d'anàlit en fase líquida de forma eficient i reproducible. Així amb el desenvolupament de les interfases d'electropulverització (ESI) i la d'APCI (ionització química a pressió atmosfèrica) la utilització de l'HPLC-EM va esdevenir una realitat (Careri et al. 2002; Krska et al. 2005). Actualment es considera l'acoblament HPLC-EM com l'esdeveniment més rellevant, des del punt de vista de la química analítica, del segle XX (Niessen 2000).

Pel que fa a l'aplicació d'aquesta tècnica a l'anàlisi de patulina en suc de poma i derivats s'han realitzat alguns treballs dels quals en destaquem les següents característiques:

Taula 1.11. Resum dels mètodes d'anàlisis de patulina en suc de poma i derivats per HPLC-EM

Matriu	Extracció	Purificació	Fase mòbil	Det.^b	LD^a	Ref.
Suc de poma, puré i pa	Extracció L-L (AcOEt)	Extracció L-L Na ₂ CO ₃ 1,5%	H ₂ O:ACN (95:5)	ESI ⁻ Quantificació per dilució isotòpica ¹³ C ₂ -PAT	20 µg/L	(Rychlik and Schieberle 1999)
Suc de poma	Mètode d'en Brause et al. (Brause et al. 1996)	Extracció L-L Na ₂ CO ₃ 1,5%	H ₂ O:ACN (90:10)	APCI ⁺ , APCI ⁻ (Trampa iònica)	4 µg/L	(Sewram et al. 2000)
Suc de poma	CL- Extracció en línia	-	H ₂ O+acetat amònic 10 mM/MET (98:2)	APCI/ APPI*	0,2 µg/L	(Takino et al. 2003)
Suc poma	SPE	-	H ₂ O:ACN gradient	ESI ⁻ Quantificació per estàndard intern ¹³ C ₃ -PAT	2,5 pg	(Ito et al. 2004)

a.- Límit de detecció.

b.- Detector.

(L-L).- Líquid-líquid.

(CL).- Cromatografia líquida.

(SPE).- Extracció en fase sòlida.

(ACN).- Acetonitril.

(MET).- Metanol

(ESI).- Ionització per electropulverització.

(APCI).- Ionització química a pressió atmosfèrica.

(APPI) Atmospheric Pressure Photoionization

De les tècniques d'ionització dissenyades per als acoblaments HPLC-EM són bàsicament dues les més utilitzades, la ionització per electropulverització (ESI) i la ionització química a pressió atmosfèrica (APCI), i més recentment s'ha assajat la fotoionització a pressió atmosfèrica (APPI) (Cai et al. 2005; Hanold et al. 2004). Són tècniques d'ionització més complexes que les que es donen en fase gas com pot ser l'impacte electrònic. Malgrat el seu perfeccionament instrumental presenten alguns inconvenients derivats del fet que la ionització té lloc en fase líquida i a pressió atmosfèrica. Això vol

dir que hi ha altres fenòmens que tenen lloc com són reaccions ió-molècula, reaccions de transferència de càrrega, reaccions de transferència de protons, formació d'adductes etc.

Els inconvenients més importants associats a aquest tipus d'ionització són la supressió de la ionització dels compostos d'interès per la presència de molècules en la matriu o en la fase mòbil amb una eficiència d'ionització superior. També la formació d'adductes amb fragments iònics de la fase mòbil pot dificultar la posterior quantificació, doncs, en general són poc reproduïbles. Aquest fenomen és més freqüent en la ESI (Cai et al. 2005; Keski-Hynnilla et al. 2002). En general els compostos poc polars o neutres són difícilment ionitzables mitjançant aquestes tècniques (Cai et al. 2005).

De tots els mètodes exposats en la taula resum aplicats a l'anàlisi de patulina en suc de poma en ressaltarem el de *Takino et al.* (Takino et al. 2003). Aquest treball resulta força interessant des de diferents punts de vista. En primer lloc cal destacar la utilització d'un sistema extracció cromatogràfica en línia, amb la qual cosa no hi ha necessitat de tractar la mostra prèviament. Aquest sistema consisteix en fer passar la mostra a través d'una columna cromatogràfica que reté la patulina, aquí es reconcentra i es neteja d'altres components de la matriu. Mitjançant un sistema de vàlvules es fa passar fase mòbil per tal de dirigir el flux cap a la columna analítica i cap al detector. Un altre aspecte a destacar és la utilització d'un sistema d'ionització més eficient que l'APCI, la APPI. Aquesta té lloc per una descàrrega d'una làmpada de gas que genera fotons d'alta energia, aquests interaccionen amb les molècules de la mostra M que absorbeixen el fotó amb la consegüent pèrdua d'un electró i la formació del radical catió $[M]^{\bullet+}$. Aquest radical evoluciona cap a la formació de l'espècie protonada per la presència de dissolvents pròtics de la fase mòbil, $[M+H]^+$.

En resum, amb una mida de mostra de 10 μ L assoleix un límit de detecció de 0,2 μ g/L amb un temps total d'anàlisi de 10 min.

L'APPI presenta bàsicament dues avantatges respecte les altres dues tècniques d'ionització mencionades: resulta més eficaç per tal d'ionitzar compostos neutres i per compostos polars és similar a les altres tècniques encara que la seva sensibilitat és major (Cai et al. 2005).

1.6.7.4.2. Acoblament CG-EM

La facilitat tècnica amb que es poden acoblar els CG amb detectors de masses juntament amb la disminució del cost dels equips i la facilitat de maneig, han fet de la tècnica dual CG-EM, una tècnica universalment utilitzada en els laboratoris d'anàlisi i de recerca (Eiceman et al. 1996; Gohlke and McLafferty 1993) .

El primer acoblament que es va realitzar va ser precisament amb un cromatògraf de gasos a meitat dels anys 50 i un EM amb analitzador de temps de vol (Gohlke 1959; Gohlke 1962). Però no va ser fins l'any 1953, amb el disseny de l'analitzador de tipus quadripol per en Wolfgang Paul de la Universitat de Bonn (Paul and Steinwedel 1953), que va ser guardonat amb el premi Nobel de física l'any 1989 per la seva recerca en aquest àmbit, que els sistemes CG-EM es van popularitzar.

Les tècniques d'ionització emprades principalment en els acoblaments CG-EM són tècniques que ionitzen en fase gas o vapor. Les més freqüents són l'impacte electrònic IE/EI i la ionització química IQ/CI. En aquests tipus de font es treballa a buit elevat per tal d'evitar les reaccions ió-molècula que dificultarien enormement la interpretació posterior dels espectres de masses generats.

En la ionització per EI les molècules són ionitzades mitjançant un feix d'electrons d'una energia variable (10-90 eV) emesos per un filament incandescent. S'ha demostrat que una energia de 70 eV és suficient per a assolir un màxim rendiment en la ionització i per aquest motiu es treballa a 70 eV. Els espectres de masses generats en aquestes condicions són

altament reproduïbles i s'han pogut construir llibreries d'espectres de moltes famílies de compostos.

La ionització per IE és una tècnica que genera en primera instància l'ió molecular ($M^{+\bullet}$) per pèrdua d'un electró i posteriorment en funció de l'estabilitat d'aquest, evoluciona per trencament d'enllaços, generant fragments més petits. Els espectres amb molts fragments i baixa o nulla abundància del fragment molecular són poc informatius a nivell d'identificació i per aquests casos, és més adequat utilitzar tècniques d'ionització menys agressives, com la mencionada ionització química.

En la IQ/CI, és un gas reactiu present a la font d'impacte electrònic el que s'ionitza prèviament, i els ions reactius generats (menys energètics), són els que reaccionen amb les molècules a analitzar. D'aquesta forma s'obtenen espectres de masses amb menys fragments i amb la característica que és més fàcil observar l'ió molecular. Aquesta és una tècnica complementària a l'IE, doncs, els espectres generats per IQ no són tan reproduïbles i per tant no hi ha llibreries disponibles que en facilitin la identificació dels compostos per comparació dels espectres. En aquesta tècnica, tenen lloc reaccions ions-molècula entre el gas reactiu ionitzat i les molècules a analitzar. Donat que la interacció ió-molècula és de baixa energia, l'abundància de l'ió molecular és alta i la fragmentació baixa. Un dels principals mecanismes de reacció que té lloc és una reacció àcid base entre l'ió reactiu del gas i la molècula d'anàlit, així el principal fragment que s'observa en l'espectre és $[M+1]^+$, l'ió molecular amb l'addició d'un protó. L'altra diferència important respecte l'IE és que en la ionització química es pot fer anàlisi d'ions negatius, el que es coneix com ionització química negativa, NCI. En aquesta tècnica, el principal mecanisme de formació d'ions amb càrrega negativa és la captura electrònic. Malgrat sigui una tècnica amb una aplicació restringida a aquells compostos amb una alta afinitat electrònica és més sensible i selectiva que la ionització química positiva, PCI (Chapman 1993; Johnstone and Rose 1996; Karasek and Clement 1988).

A continuació es presenta en forma de taula resum un detall cronològic de l'aplicació de la CG-EM a l'anàlisi de patulina.

Taula 1.12. Resum dels mètodes d'anàlisis de patulina en suc de poma i derivats per CG-EM.

Matriu	Extracció	Purificació	Derivat	Det^b.	LD^a	Ref.
Suc de poma	Extracció L-L (AcOEt)	-	Sililèter (BSA)	EM SIM	1 µg/L	(Rosen and Pareles 1974)
Suc de poma i pa	Extracció L-L (AcOEt)	Columna de gel de sílice	Sililèter (BSTFA)*	HPLC-UV Confirmació EM-IQ SIM		(Mortimer et al. 1985)
Suc de poma	1.- Brause et al. (Brause et al. 1996)	Extracció L-L Na ₂ CO ₃ 1,5%	-	CG-EM-SIM	10 µg/L	(Llovera et al. 1999)
	2.- Rovira et al. (Rovira et al. 1993)	Sep-Pack Sílice-C ₁₈			4 µg/L	
Suc de poma i pa	Extracció L-L (AcOEt)	Extracció L-L Na ₂ CO ₃ 1,5%	Sililèter (BSTFA)	GC-EM-SIM Alta resolució.	12 ng/L	(Rychlik and Schieberle 1999)
Suc de poma	Extracció L-L (AcOEt)	Extracció L-L Na ₂ CO ₃ 1,5%	-	GC-EM	-	(Roach et al. 2000)
Suc de poma	Columna Extrelut [®] -3	-	Sililèter (MSTFA) *2	CG-EM-IQ-SIM	50 ng/L	(Melchert and Pabel 2004)
Suc de poma	1.- Brause et al. (Brause et al. 1996)	Extracció L-L Na ₂ CO ₃ 1,5%	-	CG-EM-SIM	1 µg/L	(Llovera et al. 2005)

a.- Límit de detecció.

b.- Detector.

(L-L).- Líquid-líquid.

(AcOEt).- Acetat d'etil

(BSA).- N,O-bis(trimetilsilil)acetamida.

(BSTFA).- N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida.

(MSTFA).- N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida.

(IQ).- Ionització química.

(SIM).- Select Ion Monitoring.

La primera referència d'anàlisi de patulina en un suc de poma comercial es remunta a l'any 1972 en que apareix publicat el treball de Scott (Scott et al. 1972). Aquest treball és rellevant en 3 aspectes. És el primer treball d'anàlisi de patulina en suc de poma comercial, utilitza la CG com a tècnica confirmativa sense preparar cap derivat de la patulina i tercer, un cop aïllada la patulina del suc comercial per TLC, enregistra l'espectre de masses i el compara amb l'espectre obtingut a partir de patulina patró. El primer espectre de masses que es va publicar va ser el del derivat deuterat de la patulina en un estudi sobre la seva ruta biosintètica publicat per en *Scott i Yalpani* l'any 1967 (Scott and Yalpani 1967).

Del treball de *Rosen i Pareles* de l'any 1974 (Rosen and Pareles 1974), s'en pot destacar el límit de detecció realment baix, 1µg/L. Sobre aquest punt manifestaria la meua reserva en quant que fa una estimació d'aquest valor a partir de la comparació del fragmentograma corresponent a 12 µg/L i modificant el valor de la atenuació dedueix que es pot arribar a detectar fins 1 µg/L. Un altre aspecte és el perfeccionament de la detecció per EM, incorporant un circuit elèctric que modula les fluctuacions del multiplicador electrònic degudes a variacions en la intensitat del camp elèctric millorant així la reproduïbilitat del senyal (Pareles and Rosen 1974).

Mortimer et al. (Mortimer et al. 1985) utilitzen la CG-EM-IQ com a tècnica confirmativa dels casos positius obtinguts per l'HPLC-UV. Preparen el sililèter de patulina amb N,O-bis (trimetilsil)trifluoroacetamida i l'analitzen mitjançant ionització química positiva amb isobutà com a gas reactiu, però no fan anàlisi quantitativa.

Al 1999 (Llovera et al. 1999) es va presentar una primera aproximació a l'anàlisi de patulina no derivatitzada en suc de poma per CG-EM-SIM. El perfeccionament de la tècnica d'injecció sobre columna "on-column" amb el control electrònic de la pneumàtica va permetre la determinació de patulina sense derivatitzar. Es va utilitzar la quantificació per estàndard intern utilitzant l'hexaclorobenzè. L'estudi va posar de manifest la necessitat de disposar d'estàndards interns més similars estructuralment a la patulina per

tal d'evitar els canvis de sensibilitat en el mètode, dit d'una altra forma per a millorar la reproduïbilitat entre dies.

El treball de *Rychlik i Schieberle* (Rychlik and Schieberle 1999) és pioner en la utilització d'un derivat isotòpic de la patulina com a estàndard intern en un mètode de quantificació per dilució isotòpica. En el mètode de CG-EM s'assoleix un límit de detecció de 0,012 µg/L, mai assolit fins a les hores per cap tècnica analítica. L'anàlisi de la patulina per CG es fa preparant el derivat de trimetilsilil, injecció on-column i l'anàlisi per EM es va fer amb alta resolució, amb un sector magnètic. L'aplicabilitat d'aquest protocol per a l'anàlisi rutinari de patulina en suc de poma resulta poc més que impossible. Ara, considerem que pot resultar especialment interessant, tal com els autors mencionen, per a l'anàlisi de patulina en fluids biològics.

Un interessant treball de *Roach et al.* (Roach et al. 2000) fa referència a la comparació de diferents fases estacionàries en la CG i l'assaig de diferents analitzadors, de quadripol, de trampa iònica, o sector magnètic per la determinació per EM. De fet no posa a punt cap mètrica nova per a l'anàlisi de patulina en suc per CG-EM sinó que estudia les possibilitats d'aquesta tècnica com a alternativa a l'HPLC-UV per a la confirmació de casos dubtosos. A destacar la detecció per ionització química positiva i negativa amb metà com a gas reactiu.

Melcher i Pabel (Melchert and Pabel 2004) posen a punt un mètode de determinació de 5 micotoxines, entre elles la patulina mitjançant CG-EM amb analitzador de trampa iònica. Pel que fa referència a l'anàlisi de patulina, en destacaria la utilització de columnes de vidre Extrelut®-3, com a mètode d'extracció. La utilització d'aquest sistema d'extracció estalvia mostra i dissolvent. La utilització d'un analitzador tipus trampa iònica aporta com avantatge la possibilitat de fer EM-EM per a aquells casos en que es necessiti més selectivitat.

En resum, en la majoria d'aplicacions la CG-EM s'utilitza com una alternativa a la HPLC-UV, per tal (en els casos en que els grups de treball

no disposin de HPLC-EM) de confirmar resultats dubtosos. En la majoria dels treballs publicats es prepara un derivat de patulina, un sililèter i es quantifica sense la utilització d'un estàndard intern.

1.6.7.5. Utilització de patrons interns en l'anàlisi quantitativa

La utilització de patrons interns en l'anàlisi quantitativa per espectrometria de masses és quasi un requisit indispensable. La resposta del detector de masses a un determinat anàlit depèn de molts factors que sovint, són difícils de controlar. Aquests inclouen petites oscil·lacions en la temperatura de la font d'ionització, la de l'analitzador, de la pressió a la font, en els canvis de voltatge de les lents que focalitzen els ions formats etc. Altre factor a tenir en compte en aquests detectors és que només una petita part de les molècules que arriben a la font d'ionització arriben finalment a detectar-se es parla, doncs, de què l'eficiència de la ionització depèn en part de l'estructura molecular de l'anàlit. Però malgrat tots aquest inconvenients la quantificació és possible (Johnstone and Rose 1996).

Una bona forma de minimitzar tots els inconvenients prèviament mencionats en una anàlisi quantitativa és la utilització d'un patró intern.

El patró intern actua com un mim de l'anàlit, es pot addicionar a l'inici del procés analític, de forma que pot corregir de les possibles pèrdues d'anàlit al llarg de l'extracció i/o purificació. Al final es mesura la resposta de l'anàlit vers la resposta d'una quantitat fixa d'aquest patró intern. El fet de representar un quocient de respostes, fa que les fonts de variació instrumentals siguin mínimes, doncs, aquestes només afecten al valor absolut de la resposta, no el quocient de respostes.

Els patrons interns ideals han de presentar propietats físiques i químiques els més semblants possibles a l'anàlit d'interès. Aquests inclouen diferents tipus de compostos, els anàlegs estructurals, homòlegs estructurals, isòmers i els isotopòmers (Caprioli 1996). Aquests diferents tipus de

compostos presenten avantatges i inconvenients, però la utilització de patrons interns marcats sembla a priori, la millor elecció donada l'estreta semblança estructural amb l'anàlit.

La utilització de compostos estructuralment semblants a l'anàlit s'han vingut utilitzant amb èxit com a alternativa a la utilització de patrons interns marcats amb isòtops estables. En un treball de *Leis et al.* (Leis et al. 2004) es prepara un derivat estructural de l'anàlit i un derivat marcat, i en comparen els resultats. Els resultats amb la utilització d'un i altre patró intern són comparables des del punt de vista de precisió i exactitud. Un altre exemple d'utilització de patrons interns no marcats és el del treball de *Shroads et al.* (Shroads et al. 2004), en el que quantifiquen metabòlits de tirosina en orina i plasma amb bons resultats de precisió (DER inferior al 18 % per a n=5) i d'exactitud. Per últim mencionar un altre exemple d'aplicació de la utilització de patrons interns anàlegs estructurals, és el de *Nozal et al.* (Nozal et al. 2004). En el que quantifiquen aminoàcids lliures en mel i comparen els resultats de quantificació utilitzant dos detectors, el FID i el EM. Els resultats que presenten són altament comparables amb un i altre detector i els resultats de precisió del mètode són prou bons amb valors de DER inferiors al 10% per a n=5.

Si com hem comentat la utilització de patrons interns marcats és la opció ideal, aquesta tampoc està exempta d'inconvenients. Un d'aquests és que a vegades resulta molt difícil disposar de patrons interns marcats molt purs, si això succeeix la contribució de la part de molècules no marcades a la resposta de l'anàlit pot quantificar per excés (Chapman 1993). Altre inconvenient pot ser la modificació de la relació d'intensitats dels fragments utilitzats per quantificar quan varia la concentració d'anàlit als patrons de calibració o a les mostres. Aquest problema s'ha posat de manifest en la utilització d'alguns patrons deuterats (Chang et al. 2001).

Objectius

Un cop exposades totes les consideracions indicades a la introducció, es va plantejar com a objectiu general de la present tesi el d'aplicar les tècniques cromatogràfiques d'acoblament amb l'espectrometria de masses a l'anàlisi de patulina en suc de poma, utilitzant patrons interns per a la seva quantificació.

Per a aconseguir aquest objectiu general es van plantejar els següents objectius específics:

- La preparació de patulina derivatitzada amb heptafluorobutilimidazole per tal de ser utilitzada en l'anàlisi de patulina en suc de poma per CG-EM.
- La síntesi de compostos estructuralment relacionats a la patulina a partir del compost *tert*-butil[(5-{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-3-furil)metoxi]dimetilsilà, a partir del reactiu comercial el (2-furiloxi)(trimetil)silà i la síntesi d'èsters a partir de l'alcohol 4-(hidroximetil)furan-2-(5H)-ona en una assaig de síntesi en paral·lel en fase sòlida.
- Provar tots els compostos obtinguts en l'anàlisi cromatogràfica de patulina en suc de poma per CG-EM i HPLC-EM i seleccionar els millors candidats a ser utilitzats com a patrons interns.
- Posar a punt mètodes d'anàlisi quantitativa de patulina en suc de poma utilitzant els compostos seleccionats com a patrons interns.

CAPÍTOL 2. MATERIAL I MÈTODES

2.1. Instrumentació

- Mesurador de punt de fusió capillar Gallenkamp de Fisons .
- Espectrofotòmetre d'ultraviolat-visible UV2-UNICAM, de doble feix i detector de fotodíode, ample de banda 2 nm i amplada espectral de 7400-350 cm^{-1} .
- Espectrofotòmetre d'infraroig amb transformada de Fourier, Magna IR 560 de Nicolet. Software OMNIC 3.1 a. Amplada espectral 4000-400 cm^{-1} , detector de DTGS KBr, "beamsplitter" KBr.
- Espectròmetre de masses, Hewlett-Packard HP-MS Engine, 5989A MS, amb analitzador tipus quadripol, ionització per impacte electrònic (IE) i ionització química positiva (PCI) i negativa (NCI) amb sistema d'introducció directe de mostres (DIP). Interval de masses de 10-1000 uma. Acoblat a un cromatògraf de gasos HP 5980 Series II amb control electrònic de pneumàtica (EPC), dos injectors, un split/splitless (S/SL) i un "on-column" amb un injector-mostrejador automàtic. El software de l'equip es el UX-ChemSystem V. 3.0.A.
- Cromatògraf de gasos Agilent 6890N acoblat a un detector selectiu de masses 5973 MSD. Equip controlat per la MSD ChemStation versió D.00.0038. Analitzador tipus quadripol, amb ionització per impacte electrònic (IE) i ionització química positiva (PCI) i negativa (NCI), amb un interval de masses de 2-800 uma. El cromatògraf de gasos disposa de dos tipus d'injectors, un split/splitless (S/SL) i un "on-column", amb un injector-mostrejador automàtic.
- Cromatògraf HPLC Alliance de Waters 2695 acoblat a un detector de masses Micromass ZMD. Analitzador tipus quadripol, amb dos tipus d'interfases o sistemes d'ionització: una sonda d'electropulverització (ESI) i una sonda per ionització a pressió atmosfèrica (APCI). L'interval de masses es de 2-2000 amu. El software és el MassLynx v 4.0.

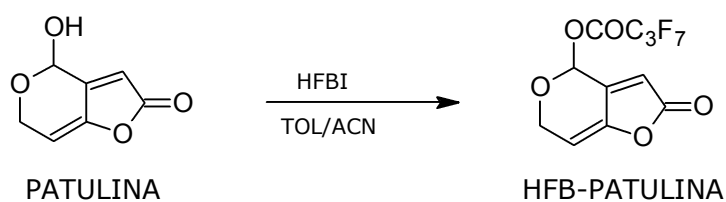
- Detector de xarxa de fotodiodes (PDA) Waters 996 de Millipore.
- Els espectres NMR de ^1H i ^{13}C es van mesurar a 25°C en un espectròmetre Varian Unity Plus a 300 MHz i en un Varian 400 MHz. Els desplaçaments químics (δ) s'indiquen en parts per milió ppm respecte al tetrametilsilà (TMS). Les constants d'acoblament es donen en Hertz (Hz). Els desdoblaments espectrals estan indicats com a s: singlet, d: doblet, t: triplet, q: quadruplet, m: multiplet (H's químicament no equivalents).

2.2. Síntesi

2.2.1. Preparació de l'heptafluorobutirat de patulina

Per a la preparació de l'heptafluorobutirat de patulina es va seguir el procediment de *Tarter i Scott*, (Tarter and Scott 1991) amb algunes modificacions. L'esquema de la reacció es presenta a continuació:

ESQUEMA REACCIÓ:



DISSOLVENTS I REACTIUS:

- 4-heptafluorobutirilimidazole, (HFBI), CAS 32477-35-3. p.s., Pierce.
- Hexaclorobenzè, (HCB), CAS 118-74-1. GC, Fluka Chemika.
- Patulina, CAS 149-29-1. Sigma.
- Toluè, (TOL), CAS 108-88-8. p.s. Fluka.
- Acetonitril, (ACN), CAS 75-05-8. Qualitat HPLC, J.T. Baker.
- Cloroform, (CHCl₃), CAS 67-66-3. Qualitat HPLC, Promochem.
- Bicarbonat de sodi, (NaHCO₃), CAS 144-55-8. ACS, p.a., Carlo Erba.
- Sulfat de sodi anhidre, (Na₂SO₄ anh.), CAS 7757-82-6. p.a., Merck.

MUNTATGE EXPERIMENTAL:

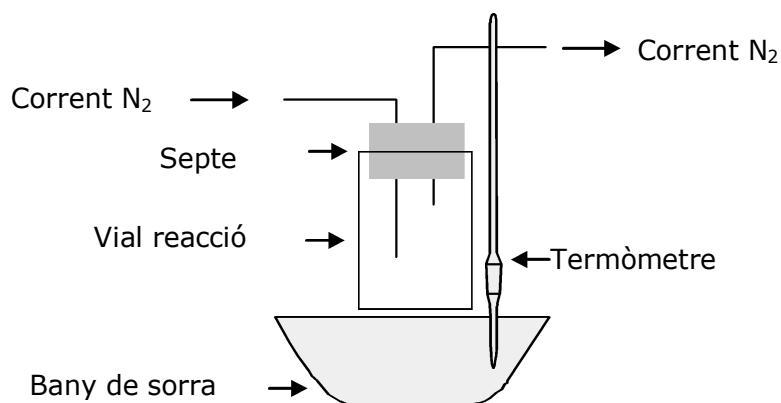


Figura 2.1. Esquema per a la realització de la reacció de derivatització de patulina amb heptafluorobutilimidazole.

Es van utilitzar vials de microreacció de 2 mL amb tap rosca i septum de Supelco.

PROTOCOL:

Prèviament s'escalfa el vial de reacció sota corrent de nitrogen per tal d'eliminar al màxim la humitat del sistema. L'entrada i sortida del corrent de nitrogen al vial es fa a través d'un tub de tefló connectat a una agulla que es clava al septum del vial. La mostra i els reactius s'addicionen mitjançant xeringues a través del septum del vial.

En funció de si es preparen patrons o mostres de suc es modificarà el següent pas:

a) Patrons. Afegir 200 μL ca. d'una solució estàndard de patulina de concentració coneguda en cloroform, evaporar el dissolvent sota corrent de nitrogen.

b) Mostres. Es treballa sobre el residu sec generat en el procés d'extracció d'una mostra de suc de poma a partir del protocol de *Rovira et al.*, (Rovira et al. 1993).

Seguidament afegir sobre el residu del pas a) o b) 500 μL de barreja toluè:acetonitril, (95:5) i 25 μL de reactiu heptafluorobutilimidazole (HFBI). Agitar 20-30 segons en un agitador de tubs. Escalfar el vial en un

bany de sorra a 60°C durant 10-15 min. Refredar el vial a temperatura ambient. Afegir 1 mL de solució de bicarbonat de sodi al 5% i 500 µL de solució d'estàndard intern (hexaclorobenzè) en acetonitril, agitar a l'agitador de tubs 45-60 s. Recuperar la fase orgànica i dessecar amb sulfat de sodi anhidre prèviament activat durant una hora a 250°C a l'estufa. Decantar i disposar la fase orgànica en vials per a injectar.

CONTROL REACCIÓ:

EL seguiment de la reacció es va fer per CG-EM.

Condicions CG-EM:

Columnes:

HP-1 MS 12 m x 0,20 mm x 0,33 µm.

HP-5 MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

Tipus d'injecció: "On-column" i "splitless".

T. injector: "oven tracking" o 250°C en funció de la tècnica d'injecció escollida.

T. inicial forn: 80°C, 1 min

Rampa 15°C/min fins 230°C durant 10 min.

Interval de masses: 40-550 amu. Velocitat d'escaneig: 1,04 *scans/s*.

T. font: 200°C. T. analitzador: 150°C.

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL:

EM (IE) m/z: 55 (100), 69 (66), 81 (29), 82 (19), 83 (16), 110 (18), 119 (19), 125 (19), 136 (54), 137 (59), 138 (19), 150 (16), 169 (18), 350 [M⁺] (6).

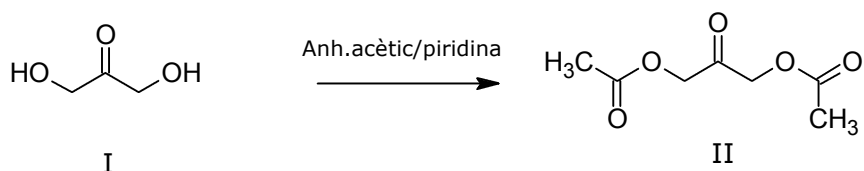
2.2.2. Síntesi de patulina

La ruta sintètica escollida va ser la de *Boukouvalas i Maltais*, (Boukouvalas and Maltais 1995).

2.2.2.1. Síntesi de l'acetat de 3-(acetiloxi)-2-oxopropil (II)

La síntesi del compost II es va dur a terme d'acord al treball de *Bentley i McCrae*, (Bentley and McCrae 1970) .

ESQUEMA REACCIÓ:



DISSOLVENTS I REACTIUS

- 1,3-dihidroxiacetona, CAS 96-26-4. p.s., Merck.
- Piridina, CAS 110-86-1. PRS, Panreac. Destil·lada i dessecada segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Anhídrid acètic, CAS 108-24-7. p.s., Probus. Destil·lat segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Toluè, (TOL), CAS 108-88-8. p.s. Fluka.
- Acetat d'etil (AcOEt), CAS 141-78-6. Proquibasa. Destil·lat.
- Hexà (HEX), CAS 110-54-3. Proquibasa. Destil·lat.
- Èter dietílic, CAS 60-29-7. p.s., SDS.
- Metanol, (MET), CAS 67-56-1. Proquibasa. Destil·lat.
- Àcid sulfúric, (H₂SO₄), CAS 7664-93-9. 95-98%, J.T. Baker.
- Àcid clorhídric, (HCl), CAS 7647-01-0. 35-38%, J.T. Baker.
- Clorur de sodi, (NaCl), CAS 7647-14-5. p.a., J.T.Baker.
- Sulfat de sodi anhidre. (Na₂SO₄ anh.), CAS 7757-82-6. p.a., Merck.

MUNTATGE EXPERIMENTAL:

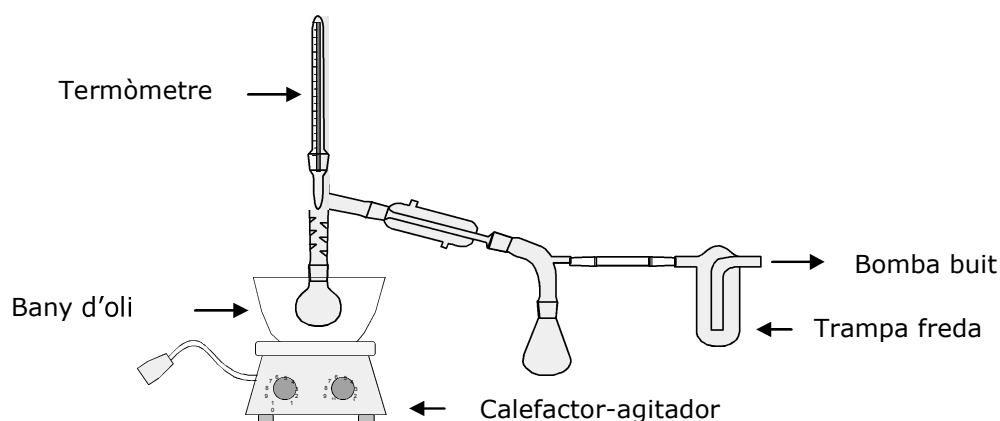


Figura 2.2. Muntatge experimental per a la destil·lació del dissolvent de la reacció d'obtenció del compost II.

PROTOCOL:

Posar en un matràs de fons rodó de 100 mL 15 g ca. (166,5 mmol) de 1,3-dihidroxiacetona (I), 50 mL de piridina destil·lada i 50 mL d'anhídrid acètic destil·lat. Deixar agitant a temperatura ambient 24 h . Eliminar el dissolvent per destil·lació a pressió reduïda (40°C i 53 mbars) segons el muntatge experimental proposat (Figura 2.2). Dissoldre el contingut del matràs en acetat d'etil, 30 mL. Comprovar la presència o no de piridina per capa prima utilitzant com a fase mòbil hexà/èter (1:1). Si queda piridina, rentar amb solució saturada de clorur de sodi. Si persisteix rentar amb solució d'àcid clorhídric al 3%. Dessecar la solució orgànica amb sulfat de sodi anhidre. Filtrar i evaporar el dissolvent a l'evaporador rotatori.

Pes de producte obtingut: 27,7 g, (159,1 mmol).

Rendiment de la reacció: 95,5%

CONTROL REACCIÓ:

Per cromatografia de capa prima, plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk, fase mòbil: hexà/èter (1:1).

PURIFICACIÓ:

Es purifica per cristallització amb toluè/hexà (1:5), 75 mL.

Pes de producte purificat: 23,3 g, (133,8 mmol).

Rendiment net de la reacció: 80,4%.

DESCRIPCIÓ PRODUCTE: Cristalls transparents en forma d'agulles fines.

Punt de fusió: 48,4-48,9°C, (46-47°C) (Bentley and McRae 1970).

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL:

IR (cm⁻¹), (CHCl₃): 1778, 1760, 1220, 1190, 1055.

EM (IE) m/z: 43 (100), 73 (24), 86 (4), 101 (45), 115 (3).

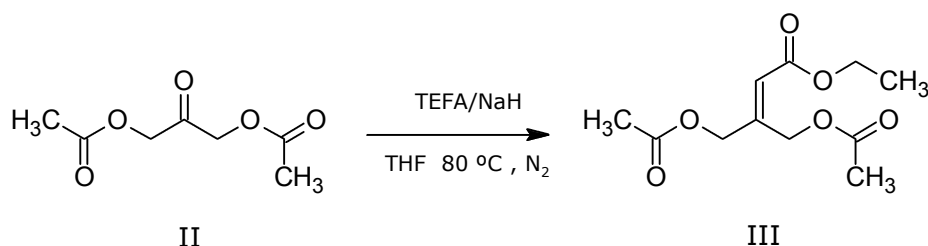
¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 2.16 (s, 6 H) 4.75 (s, 4 H).

¹³C NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ 20.35, 66.21, 170.01, 198.88.

2.2.2.2. Síntesi de 4-(acetiloxi)-3-[(acetiloxi)metil]-2-butenoiat d'etil (III)

La síntesi del compost III es va fer en base a *Gadir et al.*, (Gadir et al. 1986).

ESQUEMA REACCIÓ:



DISSOLVENTS I REACTIUS

- Producte II.
- Hidrur de sodi dispersat en oli, (HNa), CAS 7646-69-7. Fluka.
- Tetrahidrofuran (THF), CAS 109-99-9. HPLC, Promochem. Destil·lat i dessecat segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Fosfonoacetat de trietil (TEFA), CAS 867-13-0. purum, Fluka.
- Èter dietílic, CAS 60-29-7. p.s., SDS.
- Hexà, CAS 110-54-3. Proquibasa. Destil·lat.
- Sulfat de magnesi anhidre, (MgSO₄ anh.), CAS 7487-88-9. Q.P., Panreac.

MUNTATGE EXPERIMENTAL:

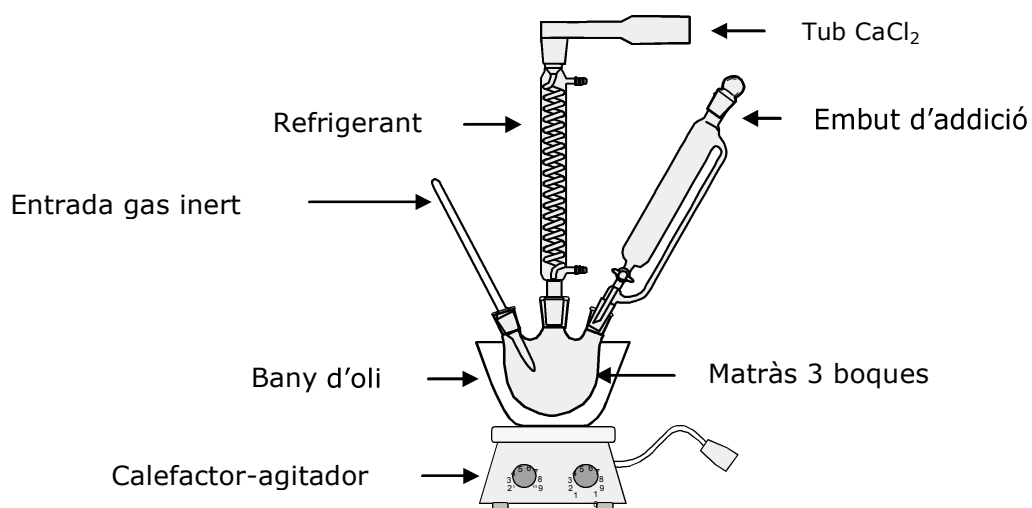


Figura 2.3. Muntatge per a la realització de la reacció d'obtenció del compost III.

PROTOCOL:

Disposar un muntatge tal com indica la Figura 2.3. Connectar un gas inert i dessecat al sistema (Ar o N_2), i escalfar (amb pistola d'aire calent) per tal d'eliminar-ne la humitat. Afegir 1,45 g ca. (60 mmol) de dispersió d'hidrur sòdic, rentar-lo amb hexà. Afegir 115 mL de tetrahidrofuran destil·lat i dessecat. Agitar amb un imant mitjançant un agitador magnètic. Afegir 13,45 g ca. (60 mmol) de fosfonoacetat de trietil en 38 mL de tetrahidrofuran a través de l'embut d'addició lentament (gota a gota). Agitar 1 h. Afegir 10,45 g ca. (60 mmol) del compost II en 30 mL de tetrahidrofuran a través de l'embut d'addició lentament (gota a gota). Agitar. Escalfar 0,5 h a 80°C , i observar l'aparició d'un precipitat amorf de color marró. Refredar. Rentar el precipitat amb un excés d'aigua, 200 mL. Extreure l'aigua amb èter 6 x 25 mL. Dessecar la fase orgànica amb sulfat de magnesi anhidre. Concentrar la fase orgànica a l'evaporador rotatori.

Pes de producte obtingut: 12,3 g (50,3 mmol).

Rendiment de la reacció: 83,8%

CONTROL REACCIÓ:

Per cromatografia de capa prima, plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk, fase mòbil: hexà/èter (1:1).

El control de la puresa del preparat es va fer per CG-EM.

Condicions CG-EM:

SP-2330 30 m x 0,25 mm x 0,20 µm.

HP-5 MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

T. injector: 220°C

T. inicial forn: 100°C, 1 min

Rampa 15°C/min fins 230°C 10 min.

Interval de masses : 40-550 amu. Velocitat d'escaneig: 1,04 *scans/s*.

T. font: 200°C. T. analitzador: 150°C.

Pressió cap de columna inicial 50 kPa. Gas portador: He.

PURIFICACIÓ:

Per destil·lació sota buit a 110-112°C i 0,5-0,6 mbars.

Pes de producte purificat: 11,7 g (47,9 mmol).

Rendiment net de la reacció: 79,8%.

DESCRIPCIÓ PRODUCTE: producte oliós de color groc pàllid.

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL:

IR (cm⁻¹), (CHCl₃): 3027.9, 2985, 2961, 1742, 1662, 1371.

EM (IE) m/z: 43 (100), 96 (55), 142 (53), 185 (27), 244 [M⁺] (2).

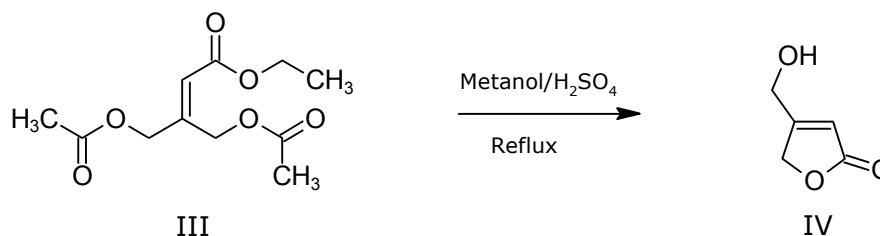
¹H (400 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1.26 (t, J=7.23 Hz, 3 H) 2.05 (s, 3 H) 2.10 (s, 3 H) 4.16 (q, J=7.03 Hz, 2 H) 4.70 (d, J=1.56 Hz, 2 H) 5.22 (s, 2 H), 5.97 (t, J=1.76 Hz, 5 H).

¹³C NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ 14.15, 20.5, 20.66, 60.46, 60.87, 63.58, 118.53, 148.53, 165.04, 170.00, 170.26.

2.2.2.3. Síntesi de 4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (IV)

La síntesi del preparat es va fer d'acord al protocol de *Gadir et al.*, (Gadir et al. 1986).

ESQUEMA REACCIÓ:



DISSOLVENTS I REACTIUS

- Producte III.
- Metanol, CAS 67-56-1. Proquibasa. Destil·lat.
- Àcid sulfúric, H₂SO₄, CAS 7664-93-9. 95-98%, J.T. Baker.
- Cloroform (CHCl₃), CAS 67-66-3. HPLC, Promochem.
- Sulfat de magnesi anhidre, (MgSO₄ anh.), CAS 7487-88-9. Q.P., Panreac.
- Bicarbonat de sodi, (NaHCO₃), CAS 144-55-8. ACS, p.a., Carlo Erba.

MUNTATGE EXPERIMENTAL:

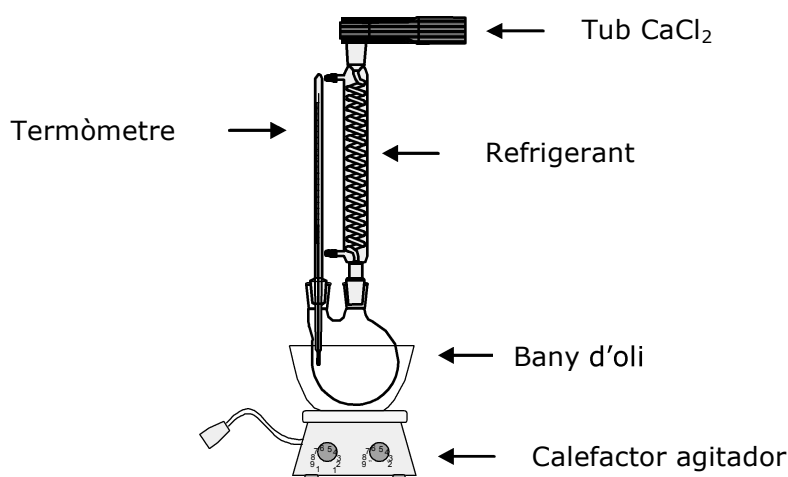


Figura 2.4. Esquema dels elements necessaris per a la realització de la reacció de síntesi del compost IV.

PROTOCOL:

Afegir 1,0 g ca. (4,1 mmol) del compost III, 2 mL de metanol:ac. sulfúric al 10% . Agitar i portar a reflux durant 3h. Refredar fins a temperatura ambient i neutralitzar amb bicarbonat de sodi sòlid. Filtrar i rentar el precipitat format amb metanol. Extreure el precipitat amb cloroform, 6 x 2 mL. Dessecar amb sulfat de magnesi anhidre i concentrar la fase orgànica a l'evaporador rotatori.

Pes de producte obtingut: 0,7 g, (6,1 mmol).

Rendiment de la reacció: 148,8%.

PURIFICACIÓ:

Per cromatografia en columna amb sílice (1:30), Silica Gel 60 (0,063-0,200 mm) (70-230 mesh ASTM) Merck. Fase mòbil cloroform:metanol, 1-5%.

Pes de producte purificat: 0,15 g (1,3 mmol).

Rendiment net de la reacció: 31,7%.

2.2.2.3.b. Síntesi de 4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (IV)

Aquesta modificació implica la utilització de clorotrimetilsilà com a catalitzador àcid de la reacció (Di Raddo 1993) i aquesta, es realitza a temperatura ambient.

DISSOLVENTS I REACTIUS:

- Producte III.
- Clorotrimetilsilà (CTMS), CAS 75-77-4. puriss., Fluka.
- Cloroform, (CHCl₃), CAS 67-66-3. HPLC, Promochem.
- Metanol, CAS 67-56-1. Proquibasa. Destil·lat.
- Sulfat de magnesi anhidre, (MgSO₄ anh.), CAS 7487-88-9. Q.P., Panreac.

PROTOCOL:

Afegir 3,1 g ca. (12,7 mmol) del compost sintetitzat III, 12 mL de metanol i 3 mL de clorotrimetilsilà. Agitar a temperatura ambient durant 3h. Filtrar i rentar el precipitat amb metanol. Extreure el precipitat amb cloroform, 6 x 2 mL. Dessecar amb sulfat de magnesi anhidre. Concentrar a l'evaporador rotatori.

Pes de producte obtingut: 1,62 g (14,2 mmol).

Rendiment de la reacció: 111,8%.

CONTROL REACCIÓ:

Per cromatografia de capa prima, plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk, fase mòbil: cloroform/metanol 5%.

El control de la puresa del preparat es va fer per CG-EM.

Condicions GC-EM:

HP-5 MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

T. injector: 220°C

T. inicial forn: 100°C, 1 min

Rampa 15°C/min fins 230°C 10 min.

Interval de masses: 40-550 amu. Velocitat d'escaneig: 1,04 scans/s.

T. font: 200. T. analitzador: 150°C.

Pressió cap de columna inicial 50 kPa. Gas portador: He.

PURIFICACIÓ:

Per cristallització amb cloroform:metanol. Dissoldre en 4 mL de cloroform, portar a reflux i afegir gota a gota metanol fins a aparició de turbidesa. Refredar i portar a nevera.

Pes de producte purificat: 0,9 g (7,9 mmol).

Rendiment net de la reacció: 62,2%.

DESCRIPCIÓ PRODUCTE: Cristalls transparents en forma d'agulles fines.
Punt de fusió: 52,3-53°C, (51-53°C) (Gadir et al. 1986).

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL:

IR (cm⁻¹), (CHCl₃): 3618, 3453.8, 3022.4, 2932.7, 1782.5, 1747.2, 1644, 1444.4.

EM (IE) m/z: 41 (15), 42 (14), 55 (99), 70 (100), 85 (84), 96 (10), 86 (4), 114 [M⁺] (4).

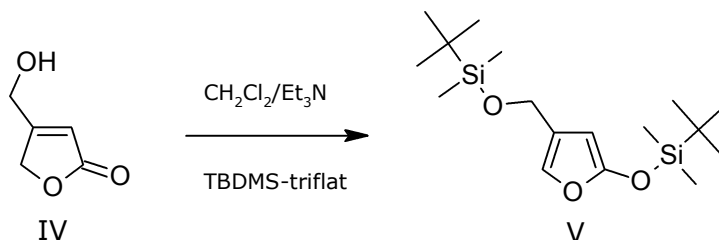
¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 3.71 (s, 1 H) 4.54 (d, J=1.17 Hz, 3 H) 4.85 (d, J=1.56 Hz, 2 H) 5.76-6.24 (m, 1 H).

¹³C NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ 58.92, 71.89, 114.76, 171.25, 174.88.

2.2.2.4 Síntesi de *tert*-butil[(5-{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-3-furil)metoxi]dimetilsilà (V)

Per a la preparació d'aquest compost es va seguir el protocol de *Jefford et al.*, (Jefford et al. 1994).

ESQUEMA REACCIÓ:



DISSOLVENTS I REACTIUS:

- Producte IV.
- Diclorometà (CH_2Cl_2), CAS 75-09-2. p.s., Promochem. Destillat i dessecat segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Trietilamina (Et_3N), CAS 121-44-8. GC, Fluka. Destillada i dessecada segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Trifluorometansulfonat de *tert*-butildimetilsilil (TBDMS-triflat), CAS 69739-34-0. p.s., Fluka.
- Pentà, CAS 109-66-0. P.A. Panreac.

MUNTATGE EXPERIMENTAL:

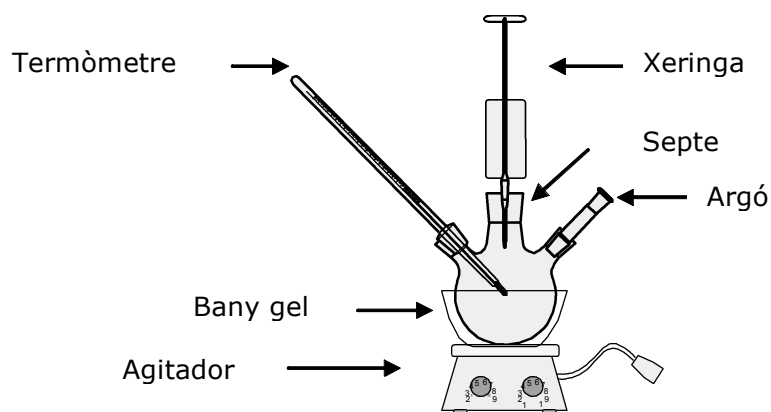


Figura 2.5. Esquema dels elements necessaris per a la realització de la reacció d'obtenció del compost V.

PROTOCOL:

Escalfar prèviament el sistema sota corrent de gas inert i sec, per tal d'eliminar la humitat. Afegir al matràs, 0,6 g ca. (5,26 mmol) del producte sintetitzat IV, 1,78 mL ca. (12,9 mmol) de trietilamina destil·lada i dessecada i 10 mL de diclorometà. Agitar. Portar el sistema a un bany de gel i sal i afegir gota a gota amb xeringa a través d'un septe, 2,8 mL ca. (12,1 mmol) de *tert*-butildimetilsililtrifluorometansulfonat. Agitar. Portar a temperatura ambient i deixar agitant 4 h. Eliminar el dissolvent a l'evaporador rotatori. Extreure el residu que queda amb pentà 3 x 5 mL. Refredar la fracció orgànica fins -80°C (congelador de -80°C) fins a la formació d'un sòlid blanquinós precipitat, 24 h. Extreure el líquid sobrenedant i rentar el sòlid amb pentà fred, (-80°C). Evaporar el dissolvent residual fins a l'obtenció del producte.

CONTROL REACCIÓ:

Cromatografia de capa prima, plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk, fase mòbil: cloroform/metanol 5%.

El control de la reacció es va seguir per CG-EM.

Condicions CG/EM:

Columna: HP-5 MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m.

T. injector: 250°C

T. inicial forn: 100°C, 1 min

Rampa 15°C/min fins 250°C 10 min.

Interval de masses: 40-550 amu. Velocitat d'escaneig: 1,04 *scans/s*. T.forn: 200°C. T. analitzador: 150°C.

Pressió cap de columna inicial 50 kPa. Gas portador: He.

PURIFICACIÓ: Per successius rentats del sòlid amb pentà a -80°C.

Pes producte purificat: 1,4 g (4,1 mmol).

Rendiment net de la reacció: 77,9%.

DESCRIPCIÓ PRODUCTE: Producte líquid transparent de consistència oliosa.

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL:

IR (cm^{-1}), (CHCl_3): 2927.88, 2843.80, 1220, 1629.78, 1561.46, 1251.39, 1083.21, 1072.70.

EM (IE) m/z: 73 (100), 147 (73), 211 (13), 257 (30), 285 (59), 342 [M^+] (52).

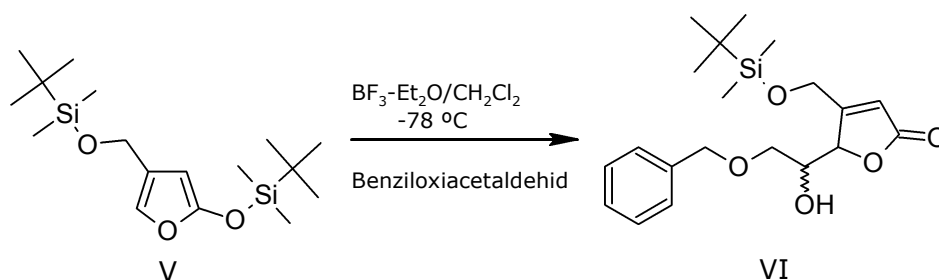
^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0.08 (s, 6 H) 0.24 (s 6 H) 0.91 (s, 9 H) 0.97 (s, 9 H) 4.49 (d, J=1.17 Hz, 2 H) 5.12 (d, J=1.56 Hz, 1 H) 6.75 (q, J=1.17 Hz, 1 H).

^{13}C NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ 156.9, 126.9, 84.16, 83.30, 58.08, 25.96, 25.85, 18.37, 18.06, -4.82, -4.90, -5.29, -5.13.

2.2.2.5. Síntesi de 5-[2-(benziloxi)-1-hidroxietil]-4-([1-(*tert*-butil)-1,1-dimetilsilil]oximetil)-2,5-dihidro-2-furanona (VI)

La síntesi del compost es va fer seguint el mètode descrit per *Boukouvalas i Maltais*, (Boukouvalas and Maltais 1995).

ESQUEMA REACCIÓ:



DISSOLVENTS I REACTIUS:

- Compost V.
- Trifluorur de bor-etil èter, (BF₃-Et₂O), CAS 109-63-7. Merck. Destillat segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Benziloxiacetaldehid, CAS 60656-87-3. p.s., Aldrich.
- Diclorometà (CH₂Cl₂), CAS 75-09-2. p.s., Promochem. Destillat i dessecat segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Clorur d'amoni, (NH₄Cl), CAS 12125-02-9. purum, p.a., <99%, Fluka.
- Sulfat de magnesi anhidre, (MgSO₄ anh.), CAS 7487-88-9. Q.P., Panreac.
- Bicarbonat de sodi, (NaHCO₃), CAS 144-55-8. ACS, p.a., Carlo Erba.
- Acetat d'etil, CAS 141-78-6. Proquibasa. Destillat.

MUNTATGE EXPERIMENTAL:

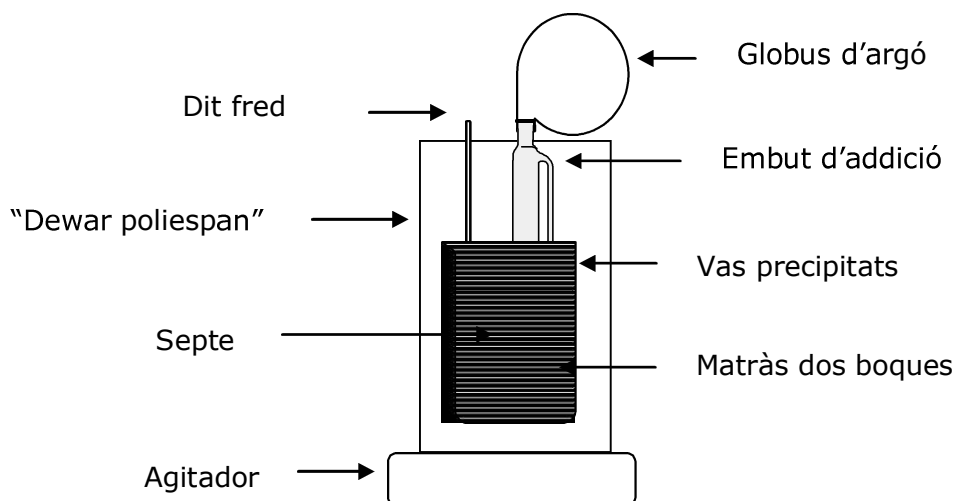


Figura 2.6. Muntatge experimental per a l'obtenció del producte VI.

PROTOCOL:

Escalfar el sistema per tal d'eliminar-ne la humitat. Desplaçar l'aire amb un corrent de gas inert (N_2 ó Ar). Tapar l'embut d'addició amb un septe elàstic. Afegir 310 μL ca. (2,5 mmol) de trifluorur de bor-etil èter amb xeringa a través del septe del matràs, seguidament afegir 5 mL de diclorometà destil·lat i dessecat. Agitar i posar el baló de reacció dins un vas de precipitats amb acetona prèviament refredada fins -78°C amb un dit fred. Tot el sistema es posa dins un recipient gran de "poliespan", (poliestirè expandit) tapat per tal de mantenir la temperatura estable. Afegir a través de l'embut d'addició 616 mg ca. (4 mmol) de benziloxiacetaldehid dissolts en 10 mL diclorometà destil·lat i dessecat i 1,4 g ca. (4,1 mmol) del compost V en 10 mL de diclorometà. Addicionar gota a gota. Tapar l'embut d'addició amb un globus ple d'argó. Deixar en agitació 12 h a -78°C . Portar el sistema fins a temperatura ambient. Afegir 15 mL de solució saturada de clorur d'amoni i deixar en agitació 2h. Mirar el pH. Si el pH és àcid, neutralitzar amb solució saturada de bicarbonat de sodi. Extreure utilitzant un embut de decantació amb 3 x 10 mL d'acetat d'etil. Dessecar la fase orgànica amb sulfat de magnesi anhidre. Filtrar i evaporar fins residu sec. També cal fer una extracció de la fase aquosa amb 10 mL d'acetat d'etil.

Dessecar amb sulfat de magnesi anhidre i evaporar el dissolvent a l'evaporador rotatori. Reservar per a confirmar la presència de producte.

Pes producte obtingut: 1,39 g (3,7 mmol).

Rendiment de la reacció: 90,2%

DESCRIPCIÓ PRODUCTE: Producte líquid transparent de consistència oliosa de color groc pàllid.

CONTROL REACCIÓ:

Per cromatografia de capa prima, plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk, fase mòbil: cloroform/metanol 5%.

El control de la reacció es va seguir per HPLC-EM.

Condicions HPLC-EM:

Una alíquota de la mostra d'aproximadament 50 µg/L ca. teòrics del compost es dissol en metanol.

Columna: Symmetry® C18, 5 µm, 2,1 x 150 mm, flux 0.2 mL/min i gradient:

Taula 2.1. Gradient i composició de la fase mòbil en l'anàlisi del producte VI per HPLC.

Temps	% H ₂ O	% MET	Flux (mL/min)
0	50	50	0,2
10	100	0	0,2
15	100	0	0,2
20	50	50	0,2
35	50	50	0,2

Paràmetres EM:

Voltatge del capillar 2,3 V, voltatge del con 20 i 50 V.

Temperatura de la font 100°C. Temperatura de desolvatació 110°C.

Ionització per electropulverització (ESI), tant positiva com negativa.

PURIFICACIÓ:

Per cromatografia "Dry flash" segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995a). Embut de filtració de placa porosa N° 3, de 40 mm de diàmetre (\emptyset) i 50 mm de longitud. Sílice "TLC grade" Merck, 30 g. Fracció de 25 mL. Fase mòbil hexà/acetat d'etil (2-50%). El control de presència de producte a les fraccions es fa per cromatografia de capa prima, fases mòbils: cloroform/metanol 5% i cloroform/metanol 1%.

Es reuneixen les fraccions de la 8-9 (30% d'acetat d'etil) per a confirmació estructural.

Pes fraccions: 8-9: 330 mg (0,87 mmol).

Rendiment net de la reacció: 21,3%.

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL:

VII-F8-9: IR (cm^{-1}), (CHCl_3): 3433.5 (OH), 2929.8, 28843.8, 2856.8, 1778.9, 1745.6, 1561.46, 1251.39, 1083.21, 1072.70.

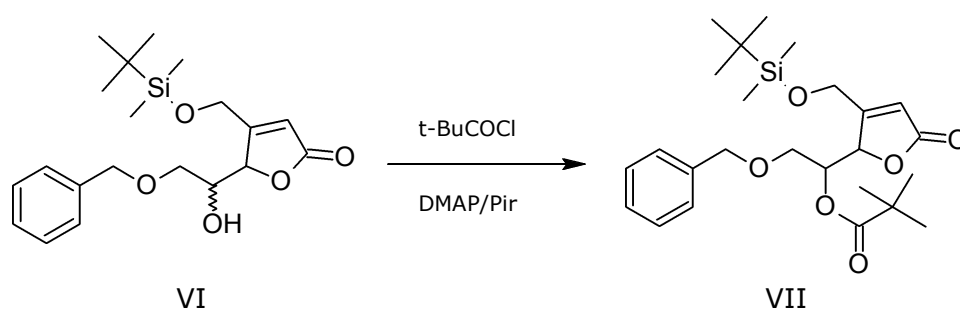
^1H NMR (400 MHz, $\text{CLOROFORM-}d$) δ ppm -2.37 (d, $J=1.95$ Hz, 6 H) -1.55 (s, 9 H) 1.17 (t, $J=5.86$ Hz, 2 H) 1.65 (d, $J=0.78$ Hz, 1 H) 2.04 (d, $J=1.95$ Hz, 2 H) 2.09 - 2.11 (m, 2 H) 2.63 (t, $J=1.95$ Hz, 1 H) 3.57 (q, $J=1.95$ Hz, 1 H) 4.80 (s, 5 H)

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{CLOROFORM-}d$) δ 172.60, 170.15, 137.47, 128.46, 127.90, 127.77, 116.25, 81.65, 73.58, 70.38, 68.80, 59.48, 25.67, 18.14, -5.56, -5.61.

2.2.2.6. Intent de síntesi de l'etilpivalat de 2-(benziloxi)-1-[3-([1-(*tert*-butil)-1,1-dimetilsilil]oximetil)-5-oxo-2,5-dihidro-2-furanil] (VII)

La síntesi es va realitzar d'acord a *Boukouvalas i Maltais*, (Boukouvalas and Maltais 1995).

ESQUEMA REACCIÓ:



DISSOLVENTS I REACTIUS

- Compost VI.
- 4-Dimetilaminopiridina (DMAP), CAS 1122-58-3. p.s., Fluka.
- Piridina (Pir), CAS 110-86-1. prs., Panreac. Destil·lada i dessecada segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Clorur de 2,2-dimetilpropanoil, (clorur de pivaloil, t-BuCOCl), CAS 3282-30-2. 99%, Aldrich.
- Àcid clorhídric (HCl), CAS 7647-01-0. 1M, J.T. Baker.
- Sulfat de magnesi anhidre (MgSO₄ anh.), CAS 7487-88-9. Q.P., Panreac.
- Bicarbonat de sodi (NaHCO₃), CAS 144-55-8. ACS, p.a., Carlo Erba.

MUNTATGE EXPERIMENTAL:

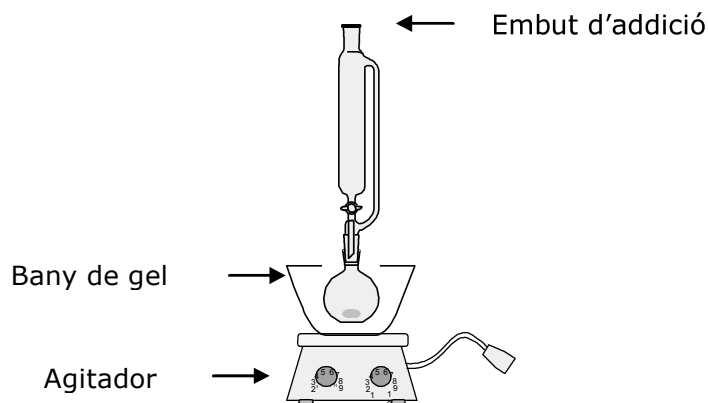


Figura 2.7. Esquema muntatge experimental per a la síntesi del compost VII.

PROTOCOL:

Afegir en un matràs 1,2 g ca. (3,2 mmol) del compost VI, juntament amb 195,5 mg ca. (1,6 mmol) de 4-dimetilaminopiridina dissolts en 7 mL de piridina. Agitar i portar amb un bany de gel a 0°C. Afegir molt lentament 591 µL ca. (4,8 mmol) de clorur de pivaloil en 2 mL de piridina a través de l'embut d'addició. Portar a temperatura ambient i deixar agitant 24 h. Després afegir 5 mL d'àcid clorhídric 1 M i 10 mL d'èter, i deixar en agitació 30 min. Mirar el pH de la fase aquosa. Si és àcid, decantar la fase orgànica. Si no afegir més àcid clorhídric 1 M. Rentar la fase orgànica amb solució saturada de bicarbonat de sodi. Dessecar amb sulfat de magnesi anhidre. Filtrar i evaporar fins a residu sec a l'evaporador rotatori.

CONTROL REACCIÓ:

Per cromatografia de capa prima, plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk, fase mòbil: cloroform/metanol 1%.

Es segueix la formació del compost per HPLC-EM.

Condicions iguals a les descrites en l'apartat anterior 2.2.2.5.

PURIFICACIÓ: Per cromatografia "Dry flash" segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995a).

Embut de filtració de placa porosa N^o 3, de 30 mm de Ø i 45 mm de longitud. Sílice "TLC grade", Silicagel 60H Merck, 20 g. Fracció de 20 mL. Fase mòbil hexà/acetat d'etil (2-60%). El control de l'elució del producte en les fraccions es fa per capa prima, fase mòbil: cloroform/metanol 1%.

Pes total de producte obtingut: 899,3 mg, (1,94 mmol).

Es recullen les fraccions 7, 9 i 11 (40% d'acetat d'etil) per a confirmació estructural.

Pes fracció 7: 57 mg

Pes fracció 9: 96 mg

Pes fracció 11: 11 mg

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL:

VII-F9: IR (cm⁻¹) (KBr), 3434.9 (OH), 2954.3, 2886.7, 2856.4, 1748.4, 1626.8, 1457.3.

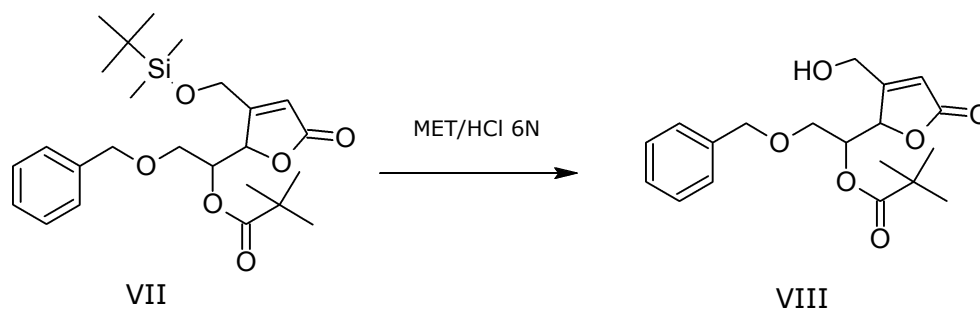
L'espectre d'RMN d'aquesta mateixa fracció també va posar de manifest la pràctica igualtat amb l'espectre De ¹H i de ¹³C del compost VI.

De cap de les fraccions no es va poder confirmar l'estructura del compost que es pretenia preparar.

2.2.2.7 Intent de síntesi de l'etilpivalat de 2-(benziloxi)-1-[3-(hidroximetil)-5-oxo-2,5-dihidro-2-furanil] (VIII)

La síntesi es fa d'acord a *Boukouvalas i Maltais*, (Boukouvalas and Maltais 1995) amb algunes modificacions, (Jefford et al. 1994; Szlosek et al. 1998).

ESQUEMA REACCIÓ:



DISSOLVENTS I REACTIUS:

- Compost VII.
- Metanol, CAS 67-56-1. HPLC, Promochem.
- Àcid clorhídric (HCl), CAS 7647-01-0. 6M, J.T. Baker.
- Sulfat de magnesi anhidre (MgSO₄ anh.), CAS 7487-88-9. Q.P., Panreac.
- Bicarbonat de sodi (NaHCO₃), CAS 144-55-8. ACS, p.a., Carlo Erba.

MUNTATGE EXPERIMENTAL:

El muntatge experimental és el mateix que el de la Figura 2.7.

PROTOCOL:

Afegir a un matràs 145 mg ca. (0,3 mmol) del compost VII dissolts en 4 mL de metanol. Agitar. Posar el sistema en un bany de gel. Afegir gota a gota amb l'embut d'addició 1 mL d'àcid clorhídric 6M. Portar a temperatura

ambient i deixar en agitació durant 4h. Afegir gota a gota una dissolució saturada de bicarbonat de sodi fins a pH 5-6. Extreure amb acetat d'etil, 3 x 10 mL. Dessecar amb sulfat de magnesi anhidre durant 1 h en agitació. Filtrar i evaporar el dissolvent a l'evaporador rotatori.

Pes de producte obtingut: 153 mg, (0,44 mmol).

CONTROL REACCIÓ:

Cromatografia de capa prima, plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk, fases mòbils assajades: cloroform/acetat d'etil 10%, cloroform/acetat d'etil 40%, cloroform/ acetat d'etil 50%; cloroform/metanol 5%.

Es segueix la formació del compost per HPLC-EM.

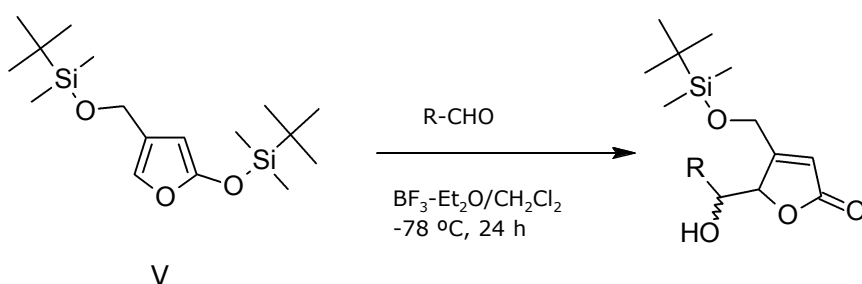
Condicions iguals a les descrites en l'apartat anterior 2.2.2.5.

No es va aconseguir aïllar cap producte que es pogués identificar amb el compost VII.

2.2.3. Síntesi de 5-(1-hidroxi)alquilfuranones a partir del *tert*-butil[(5-{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-3-furil)metoxi] dimetilsilà (V)

La síntesi es fa d'acord a *Boukouvalas i Maltais*, (Boukouvalas and Maltais 1995).

ESQUEMA REACCIÓ:



a:R=C₇H₉O; b:R=C₃H₇; c:R=C₄H₃O; d:R=C₇H₇; e:R=C₇H₁₅; f:R=C₆H₅O

DISSOLVENTS I REACTIUS:

- Producte V.
- Trifluorur de bor-etil èter, (BF₃-Et₂O), CAS 109-63-7. Merck. Destillat segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Diclorometà (CH₂Cl₂), CAS 75-09-2. p.s., Promochem. Destillat i dessecat segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Clorur d'amoni, (NH₄Cl), CAS 12125-02-9. purum, p.a., <99%, Fluka.
- Sulfat de magnesi anhidre (MgSO₄ anh.), CAS 7487-88-9. Q.P., Panreac.
- Bicarbonat de sodi (NaHCO₃), CAS 144-55-8. ACS, p.a., Carlo Erba.
- Acetat d'etil, CAS 141-78-6. Proquibasa. Destillat.
- Benziloxiacetaldehid, CAS 60656-87-3. p.s., Aldrich.
- Butiraldehid, CAS 123-72-8. p.s. Merck.
- Furfural, CAS 98-01-1. p.a., Carlo Erba.
- Fenilacetaldehid, CAS 122-71-1. p.a., Fluka.
- Octanal, CAS 204-683-8. p.s., Aldrich.

- Trans-3-(2-furil)acroleïna, CAS 39511-08-5. p.s., Adrich.

MUNTATGE EXPERIMENTAL: (Veure apartat 2.2.2.5).

PROTOCOL: (Veure apartat 2.2.2.5).

CONTROL REACCIÓ:

El control de la reacció es segueix per cromatografia de capa prima, plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk. Fase mòbil cloroform/metanol 5%.

La confirmació de la formació dels compostos es va seguir per HPLC-PDA i HPLC-EM.

Previ a l'anàlisi per cromatografia líquida amb detecció per xarxa de fotodiodes, es va mirar el màxim d'absorció dels aldehids utilitzats per a la preparació d'aquest compostos.

Condicions UV-VIS:

Interval d'escaneig : 200-400 nm. Amplada de banda 2 nm. Cel·la de quarz.

Es preparen solucions dels aldehids de 10 mg/mL ca. en etanol.

Taula 2.2. Aldehids que presenten absorció a UV, amb els màxims d'absorció (λ nm) i les unitats d'absorbància a cada màxim.

Aldehids	λ màx (nm) (ABS)*
Benziloxiacetaldeid	204 (1,41) 272 (0,85)
Furfural	226 (0,24) 273 (0,92)
Fenilacetaldehid	216 (0,24) 273 (0,70)
Trans-3-(2-furil)acroleïna	196 (0,51) 239 (0,14) 318 (1,64)

*Absorbància

Condicions HPLC-PDA:

Columnes: Spherisorb ODS-2, 10 μ m, 4 x 250 mm; Symmetry® C18 3,9 x 150 mm, flux 1 mL/min i Symmetry® C18, 5 μ m, 2,1 x 150 mm.

Flux 0,2 mL/min. Fases mòbils assajades: aigua/tetrahidrofurà (99:1) isocràtic, aigua/metanol (90:10), gradient i aigua/metanol (50:50) gradient.

Taula 2.3. Gradient utilitzat en l'anàlisi HPLC dels productes de síntesi XI-(a-f).

Temps	% H ₂ O	% MET	Flux (mL/min)
0	90	10	1
5	90	10	1
10	0	100	1
20	0	100	1
25	90	10	1
40	90	10	1

PDA: lectura a $\lambda = 276$ nm i interval d'escaneig de 200-350 nm.

També es van analitzar per HPLC-EM.

Condicions HPLC-EM:

Una alíquota de cada mostra d'uns 50 mg/L ca. de cada compost es dissol en fase mòbil, aigua/metanol (50:50). Columna: Symmetry® C18, 5 μ m, 2,1 x 150 mm. Flux 0,2 mL/min i gradient.

Taula 2.4. Gradient utilitzat en l'anàlisi HPLC-EM dels productes de síntesi XI-(a-f).

Temps	% H ₂ O	% MET	Flux (mL/min)
0	50	50	0,2
10	100	0	0,2
15	100	0	0,2
20	50	50	0,2
35	50	50	0,2

Paràmetres EM:

Voltatge del capillar 2,3 V, voltatge del con 20 i 50 V.

Temperatura de la font 100°C i temperatura de desolvatació 110°C.

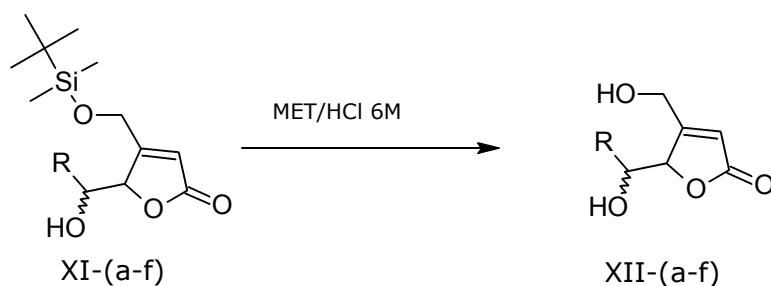
Ionització per electropulverització (ESI), tant positiva com negativa.

PURIFICACIÓ:

Per cromatografia "Dry flash" segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995a). Embut de filtració de placa porosa N° 3, de 40 mm de Ø i 50 mm de longitud. Sílice "TLC grade" Merck, 30 g. Fracció de 25 mL. Fase mòbil hexà/acetat d'etil (2-50%). El control de la separació del producte a les fraccions es fa per cromatografia de capa prima, fases mòbils: cloroform/metanol 5% i cloroform/metanol 1%.

2.2.3.1. Hidròlisi del grup *tert*-butildimetilsililoxi

El protocol a seguir es el mateix que el descrit en l'apartat 2.2.2.7., reactius i muntatge inclòs.

ESQUEMA REACCIÓ:

a:R=C₇H₉O; b:R=C₃H₇; c:R=C₄H₃O; d:R=C₇H₇; e:R=C₇H₁₅; f:R=C₆H₅O

CONTROL REACCIÓ:

El control de la reacció es va seguir per cromatografia de capa prima. Plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk, fase mòbil cloroform/metanol 5%.

La confirmació de la formació dels compostos es va fer per HPLC-EM.

Condicions HPLC-EM: les condicions d'anàlisi són igual a les del apartat 2.2.3.

PURIFICACIÓ: Es van purificar per cromatografia "Dry flash" segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995a).

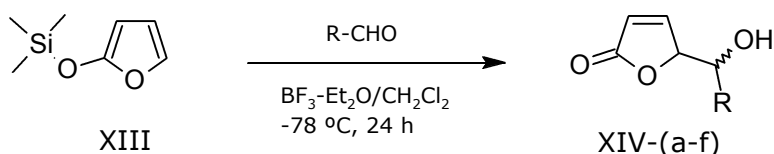
Embut de filtració de placa porosa N° 3, de 30 mm de diàmetre (Ø) i 45 mm de longitud. Sílice "TLC grade", Silicagel 60H Merck, 15 g. Fracció de 20 mL. Fase mòbil cloroform/acetat d'etil. El control de la separació del producte a les fraccions es fa per cromatografia de capa prima, fase mòbil: cloroform/acetat d'etil. La confirmació de l'obtenció dels productes es fa per HPLC-EM. En aquest últim cas es van utilitzar les mateixes condicions i paràmetres que en l'apartat 2.2.3.

2.2.4. Síntesi de 5-(1-hidroxi)alquil)furanones a partir de (2-furiloxi)(trimetil)silà

La preparació d'aquesta sèrie de compostos es basa en el treball de *Szlosek et al.*, (Szlosek et al. 1998).

El protocol i el muntatge experimental és molt semblant a l'utilitzat en la secció 2.2.3., aquí només indicarem les diferències.

ESQUEMA REACCIÓ:



a:R=C₇H₉O; b:R=C₃H₇; c:R=C₄H₃O; d:R=C₇H₇; e:R=C₇H₁₅; f:R=C₆H₅O

DISSOLVENTS I REACTIUS:

- (2-furiloxi)(trimetil)silà, CAS 61550-02-5. purum, Fluka.
- Trifluorur de bor-etil èter, (BF₃-Et₂O), CAS 109-63-7. Merck. Destillat segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Diclorometà (CH₂Cl₂), CAS 75-09-2. p.s., Promochem. Destillat i dessecat segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Clorur d'amoni, (NH₄Cl), CAS 12125-02-9. purum, p.a., <99%, Fluka.
- Sulfat de magnesi anhidre (MgSO₄ anh.), CAS 7487-88-9. Q.P., Panreac.
- Bicarbonat de sodi (NaHCO₃), CAS 144-55-8. ACS, p.a., Carlo Erba.
- Acetat d'etil, CAS 141-78-6. Proquibasa. Destillat.
- Benziloxiacetaldehid, CAS 60656-87-3. p.s., Aldrich.
- Butiraldehid, CAS 123-72-8. p.s. Merck.
- Furfural, CAS 98-01-1. p.a., Carlo Erba.
- Fenilacetaldehid, CAS 122-71-1. p.a., Fluka.
- Octanal, CAS 204-683-8. p.s., Aldrich.

- Trans-3-(2-furil)acroleïna, CAS 39511-08-5. p.s., Adrich.

MUNTATGE EXPERIMENTAL: (Veure apartat 2.2.2.5).

PROTOCOL: (Veure apartat 2.2.2.5).

El control de la reacció es va seguir com en l'apartat anterior per cromatografia de capa prima. Plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk, fase mòbil cloroform/metanol 5%.

La confirmació de l'obtenció dels productes es fa per HPLC-EM. En aquest últim cas es van utilitzar les mateixes condicions i paràmetres que en l'apartat 2.2.3.

PURIFICACIÓ:

Es van purificar per cromatografia "Dry flash" segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995a).

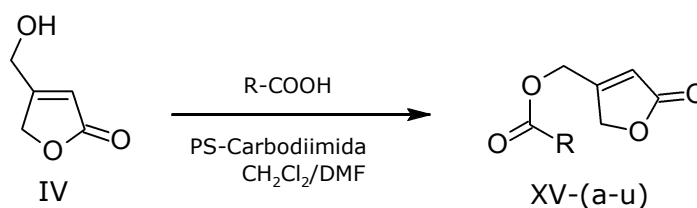
Embut de filtració de placa porosa N^o 3, de 30 mm de Ø i 45 mm de longitud. Sílice "TLC grade", Silicagel 60H Merck, 20 g. Fracció de 20 mL. Fase mòbil hexà/acetat d'etil (2-100%). El control de la separació del producte a les fraccions es va fer per capa prima, fase mòbil: cloroform/metanol 5%.

La confirmació de la purificació dels productes es va fer per HPLC-EM en les mateixes condicions descrites en l'apartat anterior.

2.2.5. Síntesi en paral·lel d'èsters a partir de la 4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (IV)

La reacció es fa utilitzant un dels reactius la N-ciclohexilcarbodiimida lligada a un suport sòlid, concretament a una resina de poliestirè-divinilbenzè. Per a la realització de la reacció es va seguir el protocol de preparació d'èsters proporcionat per la casa subministradora de la N-ciclohexilcarbodiimida (PS-Carbodiimida, Argonaut Tech.).

ESQUEMA REACCIÓ:



R = C₈H₇O₂, C₅H₃ClN, C₅H₄N, C₅H₄N, C₄H₃N₂, C₅H₄, CF₃, H, CHF₂, CH₃, C₃H₇, n-C₄H₉, CH₂Cl, CHCl₂, CH₂Br, C₉H₉O₂, CCl₃, C₇H₅, C₇H₁₄NO₂, C₈H₇, C₄H₃N₂.

DISSOLVENTS I REACTIUS:

- Producte IV.
- PS-Carbodiimida, CAS N/A. Argonaut Tech.
- Àcid acètic glacial, CAS 64-19-7. p.s., Probus. Destil·lat d'acord a *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Anhídrid acètic, CAS 108-24-7. p.s., Probus. Destil·lat segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Àcid cloroacètic CAS 79-11-8. Purum, Fluka.
- Àcid dicloroacètic, CAS 79-43-6. Puriss., Fluka.
- Àcid tricloroacètic, CAS 76-03-9. 98%, Aldrich.
- Àcid bromoacètic, CAS 79-08-3. Puriss., Fluka.
- Àcid difluoroacètic, CAS 381-73-7. Puriss., Fluka.
- Àcid trifluoroacètic, CAS 76-05-1. 99,5%, Fluka.

- Àcid cafeic, CAS 331-39-5. Purum, Fluka.
- Àcid fòrmic, CAS 64-18-6. p.a., Merck.
- Àcid isobutíric, CAS 79-31-2. p.s., Merck.
- N-*tert*-butiloxicarbonil- β -alanina, (BOC- β -Alanina), CAS 3303-84-2. Puriss., Fluka.
- Àcid butíric, CAS 107-92-6. p.s., Merck.
- Àcid octanoic, (àcid caprílic), CAS 124-07-2. 98%, Aldrich.
- Àcid piridin-2-carboxílic, (àc. picolínic), CAS 98-98-6. 99%, Aldrich.
- Àcid 2-cloronicotínic, CAS 2942-59-8. p.s., Fluka.
- Àcid nicotínic, CAS 59-67-6. Purum, $\geq 99,0\%$, Fluka.
- Àcid 2-cloronicotínic, CAS 2942-59-8. 99%, Aldrich.
- Àcid isonicotínic, CAS 55-22-1. Purum 99%, Fluka.
- Àcid 2(E)-3-fenilacrílic, (àc cinnàmic), CAS 621-82-9. p.s., Merck.
- Àcid 2-benzofurancarboxílic, CAS 496-41-3. Purum, $\geq 98,0\%$ Fluka.
- Àcid 2-pirazinacarboxílic, CAS 98-97-5. Purum, $\geq 98,0\%$, Fluka
- Àcid (2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrílic, (àc ferúlic), CAS 1135-24-6. 99% Aldrich.
- Diclorometà (CH_2Cl_2), CAS 75-09-2. p.s., Promochem. Destillat i dessecat segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Dimetilformamida (DMF) CAS 68-12-2. p.s., Probus. Destil·lada i dessecada segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Clorur de sodi, (NaCl), CAS 7647-14-5. p.a., J.T.Baker.
- Sulfat de magnesi anhidre, (MgSO_4 anh.), CAS 7487-88-9. Q.P., Panreac.
- Bicarbonat de sodi (NaHCO_3), CAS 144-55-8. ACS, p.a., Carlo Erba.
- Pentaòxid de fòsfor (P_2O_5), CAS 1314-56-3. Q.P. Panreac.

MUNTATGE EXPERIMENTAL:

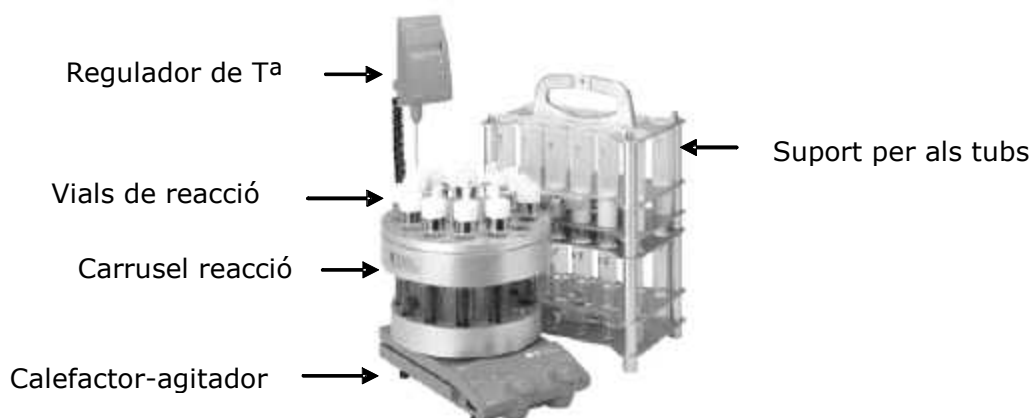


Figura 2.8. Carrusel de reacció per a la síntesi en paral·lel dels èsters XV-(a-u).

El carrusel de reacció i els vials de reacció són de la marca Radleys Discovery Technologies, Essex, U.K.

PROTOCOL:

Afegir a un tub de reacció 200 mg ca. (0,21 mmol) de resina (PS-carbodiimida) i dessecar sota buit en presència de pentaòxid de fòsfor durant 3h. Afegir al vial de reacció 0,17 mmol ca. de cada àcid dissolt en 2 mL de diclorometà destil·lat i dessecat i, si és necessari, afegir unes gotes de dimetilformamida per tal de solubilitzar-lo. Agitar suaument, durant 5 min mitjançant un imant amb un agitador magnètic. A continuació afegir 15 mg ca. (0,13 mmol) del compost IV en 2 mL de diclorometà. Deixar agitant un total de 18 h a temperatura ambient. Filtrar el producte a través d'un embut tapat amb cotó fluix. Rentar la resina amb 2 x 2 mL de diclorometà. Si queda àcid residual es pot eliminar rentant la solució orgànica amb 2 x 2 mL de solució saturada de bicarbonat de sodi, després amb 2 mL de solució saturada de clorur de sodi. Seguidament cal dessecar amb sulfat magnèsic anhidre durant 1 h en agitació, filtrar i evaporar el dissolvent a l'evaporador rotatori.

CONTROL REACCIÓ:

El seguiment de la reacció es va fer per cromatografia de capa prima. S'utilitzen plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk. Fase mòbil, cloroform/metanol 5% i es revelen amb solució de metanol-àcid sulfúric al 5%.

Es confirma l'estructura dels compostos per, HPLC-EM i CG-EM.

Condicions HPLC:

Columna: Symmetry® C18, 5µm, 2,1 x 150 mm. Flux 0,2 mL/min. Volum injectat 20 µL. Fase mòbil, H₂O:MET amb gradient (Veure taula 2.4)

DAD: Interval d'escaneig de 210-300 nm de λ.

ESI+/ ESI-: interval de masses de 200-280 uma. Voltatge del con: 20 i 50 V.

Condicions GC/MS: Columna: HP-5 MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Injecció "on-column" amb rampa de pressió: P. inicial 200 kPa, rampa de 650 kPa/min fins 350 kPa 0,3 min, després a flux constant.

Precolumna 1m x 0,32 mm. Volum injectat 1 µL.

Programa de forn:

T. inicial 80°C, 1 min, rampa de 15°C/min fins 250°C durant 10 min.

T. injector, "oven tracking" (augmenta progressivament amb la T. del forn).

T. interfase, 250°C. T. Font, 200°C.

Adquisició de dades en mode d'escaneig de 40-400 uma a una velocitat d'escaneig de 2,5 *scans/s*.

2.2.5.1. Reacció d'esterificació en dissolució

L'esquema de la reacció és el mateix que el de l'apartat 2.2.5. amb la diferència que la diciclocarbodiimida no està lligada a un suport sòlid, (Veure apartat 2.2.5.).

DISSOLVENTS I REACTIUS

Veure apartat 2.2.5. Aquí cal afegir:

- N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC), CAS 538-75-0. Puriss.,Fluka.
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP), CAS 1122-58-3. Purum >98%, Fluka.

- Dietil èter, CAS 60-29-7. p.s., SDS dessecat i destillat, segons *Leonard et al.*, (Leonard et al. 1995b).
- Clorur de sodi, (NaCl), CAS 7647-14-5. p.a., J.T.Baker.
- Sulfat de magnesi anhidre, (MgSO₄ anh.), CAS 7487-88-9. Q.P., Panreac.
- Bicarbonat de sodi (NaHCO₃), CAS 144-55-8. ACS, p.a., Carlo Erba.
- Solució d'àcid fosfomolíbdic al 20% en etanol, CAS 12026-57-2. Sigma-Aldrich.

MUNTATGE EXPERIMENTAL:

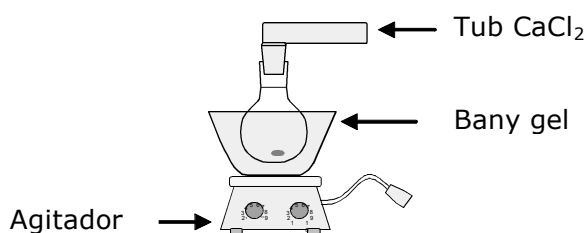


Figura 2.9. Esquema de la relació del material necessari per a la síntesi d'èsters en fase líquida.

PROTOCOL:

Afegir a un matràs 0,8 mmol ca. dels diferents àcids, dissolts en 5 mL de diclorometà, 79,87 mg ca. (0,7 mmol) del compost IV i 10 mg ca. (0,08 mmol) de 4-dimetilaminopiridina en 5 mL de diclorometà i agitar fins a total dissolució de tots els components, uns 15 min. Portar el matràs a un bany de gel i addicionar 185,7 mg ca. (0,9 mmol) de N,N'-Diciclohexilcabodiimida, continuar agitant. Transcorreguts 5 min passar a un bany d'aigua i deixar en agitació unes 3 h fins a l'aparició d'un precipitat. Filtrar al buit a través d'un embut de placa porosa del nº 3. Rentar el sòlid amb diclorometà sec i fred. Recuperar el filtrat i evaporar fins residu sec. Redissoldre el precipitat amb suficient quantitat d'èter i portar a congelador per tal d'eliminar al màxim la urea formada (per precipitació de la urea insoluble en fred). Si cal, repetir aquesta operació fins eliminació total la urea. Després cal rentar la fase d'èter amb solució d'àcid clorhídric 0,5 M

fins pH àcid, seguit d'un rentat amb dissolució saturada de bicarbonat de sodi fins a pH neutre i finalment amb solució saturada de clorur de sodi. Dessecar la fase orgànica amb sulfat de magnesi anhidre. Filtrar i evaporar el dissolvent a l'evaporador rotatori.

CONTROL REACCIÓ:

El control de la reacció es va fer per cromatografia de capa prima, es van utilitzar plaques d'alumini de Silicagel 60 F₂₅₄ de Merk. Fase mòbil, cloroform/metanol 5%, l'agent revelador és d'àcid fosfomolibdic al 20% en etanol.

Es confirma la puresa i l'estructura per CG-EM.

Condicions CG-EM:

Columna: HP-5 MS 30m x 0,25 mm x 0,25 µm. Injecció en columna i rampa de pressió: P. inicial 200 kPa, rampa de 650 kPa/min fins 350 kPa 0,3 min, després a flux constant.

Precolumna 1m x 0.32 mm. Volum injectat 1 µL.

Programa de forn:

Temperatura inicial 80°C, 1 min, rampa de 15°C/min fins 250°C durant 10 min.

Temperatura injector, "oven tracking" (augmenta progressivament amb la T. del forn). Temperatura interfase, 250°C. Temperatura font d'ions, 200°C. Adquisició dades en mode d'escaneig de 40-400 uma i una velocitat d'escaneig de 2,5 scans/s.

PURIFICACIÓ:

Per cromatografia "Dry flash" segons Leonard et al., (Leonard et al. 1995a). Embut de filtració de placa porosa N^o 3, de 30 mm de Ø i 45 mm de longitud. Sílice "TLC grade", Silicagel 60H Merck, 15 g. Fracció de 20 mL. Fase mòbil hexà/acetat d'etil (5-60%). El control de l'aïllament dels compostos es va seguir per cromatografia de capa prima. Fase mòbil: cloroform/metanol 5%.

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL:

XV-a, acetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil

Producte sòlid blanquinós.

Punt de fusió: 63-65°C.

^1H NMR (300 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 2.15 (s, 3H) 4.84 (m, $J=1.87$, 0.88, 0.76 Hz, 2H) 4.97 (m, $J=1.53$, 0.76 Hz, 2H) 6.06 (m, $J=3.55$, 1.81 Hz 1H).

^{13}C NMR (300 MHz, CLOROFORM-d) δ 20.41, 59.29, 71.02, 117.10, 163.17, 170.03, 172.56.

HRMS (EI^+) m/z calculat per $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_4$ 156,047226 trobat 156,047902.

XIII-b, cloroacetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil

Producte de consistència oliosa a temperatura ambient.

^1H NMR (300 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 4.15 (s, 2H) 4.87 (m, $J=1.91$, 0.88, 0.88 Hz, 2H) 5.10 (m, $J=1.64$, 0.78 Hz, 2H) 6.12 (m, $J=3.51$, 1.75, 1.75 Hz 1H).

^{13}C NMR (300 MHz, CLOROFORM-d) δ 40.19, 60.63, 70.87, 117.66, 161.90, 166.60, 172.26.

HRMS (EI^+) m/z calculat per $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClO}_4$ 190,003287 trobat 190,001701.

XV-j, butirat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil

Producte de consistència oliosa a temperatura ambient.

^1H NMR (300 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0.98 (t, $J=7.40$ Hz 3H) 1.69 (m, $J=14.76$ 7.40 Hz, 2H) 2.39 (t, $J=7.40$ Hz, 2H) 4.84 (s, 1H) 4.98 (s, 1H) 6.06 (m, $J=3.51$, 1.75, 1.75 Hz, 1H).

^{13}C NMR (300 MHz, CLOROFORM-d) δ 13.60, 18.30, 35.67, 59.12, 71.08, 117.05, 163.46, 172.75, 173.75.

HRMS (EI^+) m/z calculat per $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 184,073559 trobat 184,072065.

XV-l, propanoat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil

Producte sòlid a temperatura ambient de color blanquinós.

Punt de fusió: 66-67°C.

^1H NMR (300 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1.22 (d, $J=7.0.2$ Hz 6H) 2.65 (m, $J=6.98, 6.98, 6.98, 6.98$ Hz, 1H) 4.85 (m, $J=1.87, 0.88, 0.76$ Hz, 2H) 4.99 (m, $J=1.56, 0.82, 0.82$, 2H) 6.05 (m, $J=3.55, 1.81, 1.81$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (300 MHz, CLOROFORM-d) δ 18.78, 33.70, 59.14, 70.97, 116.77, 163.66, 172.63, 176.11.

HRMS (EI^+) m/z calculat per $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 184,073559 trobat 184,072996.

2.2.6. Purificació per cromatografia "Dry flash"

En pràcticament totes les seccions de l'apartat de síntesi es va utilitzar com a mètode de purificació la cromatografia "Dry Flash" (Leonard et al. 1995a). Aquesta tècnica representa una variant de la cromatografia "Flash" i es realitza sobre un embut de filtració de placa porosa d'unes determinades dimensions connectat a un sistema de buit. La mida de l'embut ve condicionada per la mida de la mostra a purificar, així com la quantitat de sílice i la mida de la fracció. A tall d'exemple veure taula 2.5.

Taula 2.5. Cromatografia "Dry Flash". Exemple de les dimensions de l'embut a utilitzar, el pes de sílice i la mida de la fracció en funció del pes de mostra a purificar.

Diàmetre embut (mm)	Longitud embut (mm)	Pes sílice (g)	Pes mostra (mg)	Mida fracció (mL)
30	45	15	15-500	10-15
40	50	30	500-200	15-30

Aquesta tècnica és fàcil de posar a punt i és molt ràpida. A partir de la informació obtinguda a partir dels controls d'obtenció de producte fets per cromatografia de capa prima previs, es selecciona la fase mòbil més adient per a assolir la separació del compost d'interès.

El protocol a seguir és el següent:

- 1.- En primer lloc, es carrega l'embut amb el pes de sílice indicat, dispersat amb el dissolvent de la fase mòbil menys polar i es compacta aplicant buit al sistema i pressionant la sílice de forma que no quedin esclatxes.
- 2.- Es fa una pre-elució amb la barreja de dissolvents de menys polaritat.
- 3.- Després es carrega la mostra dissolta en la fase mòbil, de la mateixa polaritat que la utilitzada en la pre-elució.
- 4.- Seguidament es va eluint la columna amb un número adequat de fraccions de polaritat creixent de fase mòbil. El procés es va controlant per capa prima.

2.2.7. Mètodes d'extracció i purificació del suc de poma

2.2.7.1. Mètode de Rovira

Aquest mètode d'extracció i purificació de suc de poma es va posar a punt per *Rovira et al.* l'any 1993, (Rovira et al. 1993).

DISSOLVENTS I REACTIUS:

- Acetat d'etil, (AcOEt), CAS 141-78-6. Proquibasa. Destil·lat.
- Sulfat de magnesi anhidre, (MgSO₄ anh.), CAS 7487-88-9. Q.P., Panreac.
- Cloroform, (CHCl₃), CAS 67-66-3. Proquibasa. Destil·lat.

PROTOCOL:

Si s'utilitza concentrat de suc, cal pesar 20 g i reconstituir amb 96 mL d'aigua destil·lada.

Pesar 100 mL de suc reconstituït. Extreure mitjançant un embut de decantació amb 3 x 100 mL d'acetat d'etil. Reunir les fraccions, evaporar a l'evaporador rotatori fins a residu sec. Redissoldre amb: 1^r.- 0,5 mL d'aigua destil·lada seguit de 10 mL de CHCl₃, 2ⁿ.- repetir l'etapa anterior, 3^r.- afegir 2 x 10 mL de CHCl₃. Reunir les 4 fraccions i dessecar amb 2g de MgSO₄ durant 1 h. Agafar alíquotes de 5 mL i passar-les per un SepPack® de sílice, prèviament condicionat amb 5 mL de cloroform. Passar successivament 1 mL de cloroform, 1mL de cloroform-acetat d'etil (8+2), i 1 mL de cloroform-acetat d'etil (5+5). Aquesta 1^a fracció es rebutja. La segona fracció s'obté amb 2 mL de cloroform-acetat d'etil (2+8) i finalment una tercera amb 3 mL d'acetat d'etil. Reunir la segona i tercera fracció i evaporar fins residu sec a l'evaporador rotatori i després mitjançant corrent de N₂. El residu final es dissol en el volum i dissolvent adequat en funció del tipus de tècnica analítica a emprar, HPLC o CG.

2.2.7.2. Mètode de Brause

Aquest mètode d'extracció i purificació del suc de poma es basa en el mètode descrit per *Brause et al.*, (Brause et al. 1996).

DISSOLVENTS I REACTIUS:

- Carbonat de sodi anhidre, (Na_2CO_3 anh.), CAS 497-19-8. p.a., Fluka.
- Sulfat de magnesi anhidre, (MgSO_4 anh.), CAS 7487-88-9. Q.P. Panreac.
- Acetat d'etil, (AcOEt), CAS 141-78-6. Proquibasa. Destil·lat.

PROTOCOL:

Si es parteix de concentrat de suc de poma, cal pesar 20 g i reconstituir amb 96 mL d'aigua destil·lada.

A.- Mètode d'extracció múltiple per a la preparació patrons.

Aquesta modificació ha estat proposada per nosaltres per tal d'optimitzar el procés d'extracció de cara a la preparació de patrons en matriu de suc de poma. Implica multiplicar per 20 les proporcions d'extracció del mètode original proposat, on la mida de la mostra de suc a extreure és de 5 mL.

Agafar 100 mL de suc, extreure amb 2 x 200 mL d'acetat d'etil. Rentar la fase orgànica amb 40 mL de dissolució de carbonat de sodi al 1,5%. Tornar a extreure la fase aquosa amb 100 mL d'acetat d'etil. Reunir la fase orgànica, dessecar amb 20 g de sulfat de magnesi anhidre, agitant durant 1h. Filtrar i enrasar en un matràs aforat de 500 mL. Agafar alíquotes de 25 mL i reduir el dissolvent a l'evaporador rotatori. Passar un vial d'1 mL de fons cònic, fent petits rentats amb acetat d'etil. Evaporar la resta de dissolvent fins a residu sec mitjançant un corrent de nitrogen suau. Finalment es reconstitueix el residu amb el volum i dissolvent adequats en cada cas en funció de la tècnica analítica escollida CG o HPLC.

Aquest protocol permet obtenir 19 mostres.

B.- Mètode per a una mostra. S'utilitza per a la preparació de mostres a les que s'addiciona una quantitat coneguda de patulina (Spiked samples) o per

a l'anàlisi de mostres problema. El protocol és exactament el descrit per *Brause et al.*, (Brause et al. 1996).

2.2.8. Preparació de patrons de patulina

2.2.8.1. Determinació espectrofotomètrica de la riquesa d'una solució de patulina

Aquest protocol es basa en el mètode oficial 970.44 de la AOAC per a la preparació de patrons per a l'anàlisi quantitatiu de micotoxines, (AOAC 1971).

DISSOLVENTS I REACTIUS:

- Dicromat de potassi, ($K_2Cr_2O_7$), CAS 7778-50-9. Patró primari, 99,97% \pm 0,05, Certipur ®, Merck.
- Àcid sulfúric, (H_2SO_4), CAS 7664-93-9. Extrapur 95-98%, Merck.
- Etanol, CAS 64-17-5. HPLC, J.T. BAKER.

PROTOCOL:

I.- Calcular el factor de correcció de l'espectrofotòmetre (CF) a utilitzar, si no es coneix o fa molt temps que no s'ha confirmat.

Primer cal preparar 3 solucions de dicromat de potassi de 0,25, 0,125 i 0,0625 mM en àcid sulfúric $9 \cdot 10^{-3}$ M (0,018 N) i mesurar el valor de l'absorbància utilitzant àcid sulfúric $9 \cdot 10^{-3}$ M com a blanc. Es calcula el valor de la absortivitat molar a cada concentració, $\epsilon = [A \times 1000/C \text{ (mM)}]$ i es calcula la mitjana dels valors calculats a cada concentració. A partir d'aquest valor es calcula el CF de l'aparell substituint el valor de la mitjana de ϵ en la següent equació, $CF = 3160/\epsilon$, on 3160 es el valor de ϵ del dicromat de potassi . Si CF es $<0,95$ ó $> 1,5$ caldrà revisar l'aparell.

II.- Un cop calculat el valor del CF, cal determinar la concentració de la solució de calibratge de patulina. Es prepara una solució de patulina en etanol d'aproximadament 10 ng/mL a partir de la solució estoc que es vol

confirmar. Es determina la concentració de la solució enregistrant l'espectre UV entre 250 i 350 nm en una cèl·lula de quarz d'1 cm de llum amb etanol a la cèl·lula de referència. Es calcula la concentració aplicant la fórmula següent:

$C = A \times M \times 1000 \times CF / \epsilon$. Essent C; la concentració de patulina en µg/mL (ppm), A; l'absorbància de la solució de calibració determinada a $\lambda = 276$ nm., M és la massa molecular de la patulina, 154.12 g/mol, ϵ és el coeficient d'absorció molar de la patulina en solució etanòlica al màxim d'absorció $\lambda = 276$ nm ($\epsilon = 14600$ L/mol x cm) i CF és el factor de correcció de l'espectrofotòmetre prèviament calculat.

2.2.8.2. Preparació de patrons de patulina per a l'anàlisi de patulina en suc de poma per HPLC-EM

DISSOLVENTS I REACTIUS:

- Patulina, 5 mg. CAS 149-29-1. >98% (TLC), Sigma.
- Acetat d'etil, CAS 141-78-6. HPLC, J.T.Baker.
- Metanol, CAS 67-56-1. HPLC, J.T. Baker

PROTOCOL:

Afegir a través del septo del vial que conté els 5 mg de patulina, un volum inferior a 2 mL d'acetat d'etil amb una xeringa, agitar enèrgicament fins total dissolució. Buidar el contingut del vial en un matràs aforat de 5 mL (classe A). Continuar rentant el vial amb petits volums d'acetat d'etil fins a enrasar el matràs. S'obté així una solució estoc de 1 mg/mL de patulina en acetat d'etil. Es prepara per dilució 1/10 una solució de treball de 100 µg/mL a partir de la qual es preparen les diferents solucions de calibratge a diferents concentracions de patulina i es fa la confirmació espectrofotomètrica de la riquesa de patulina.

Els patrons es preparen sobre matriu de suc de poma. Es fa una extracció d'una matriu de suc que no contingui patulina seguint el mètode de *Brause et al.*, (Brause et al. 1996) i el residu sec es redissol en 100 µL de les

diferents solucions de calibratge, que contenen concentracions creixents de patulina i una fixa de patró intern (PI) en aigua a pH 4-metanol (50:50).

Es preparen patrons de patulina de les següents concentracions:

Taula 2.6. Concentració dels patrons per a la quantificació de patulina en suc de poma per HPLC-EM, i la seva equivalència de concentració a suc de poma.

Patrons	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6
C* patulina (µg/mL)	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2,5
(µg/L) suc	5	10	15	20	30	50

* Concentració

2.2.8.3. Preparació de patrons de patulina per a l'anàlisi de patulina en suc de poma per GC-EM

Per a l'anàlisi de patulina en suc de poma per CG-EM també es preparen els patrons en matriu de suc de poma. Com s'ha mencionat en l'apartat anterior (2.2.8.2.) el protocol de preparació fins a la solució de treball de 100 µg/mL en acetat d'etil, és el mateix.

Es prepara una dilució 1/10 en etanol per a la confirmació espectrofotomètrica de la concentració. A partir de la solució de treball de 100 µg/mL en acetat d'etil es prepara per successives dilucions 1/10 una solució de 10 µg/mL de patulina i 0.8 µg/mL de patrons interns en acetat d'etil a partir de la qual es prepararan els patrons de calibració.

Es fa una extracció d'una matriu de suc de poma sense patulina seguint el protocol A (apartat 2.2.7.2), adaptació particular de *Brause et al.*, (Brause et al. 1996) i el residu es redissol en 200 µL de cada una de les diferents solucions de patrons preparats en acetat d'etil. La concentració de cada patró intern en els patrons de calibratge és de 0,2 µg/L.

Taula 2.7. Concentració de les solucions de calibratge per a l'anàlisi de patulina en suc de poma per CG-EM.

Patrons	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6
C* patulina (µg/mL)	0,15	0,25	0,375	0,5	0,75	1,25
C* patulina (µg/L) suc	6	10	15	20	30	50

* Concentració

2.2.9. Anàlisi quantitativa de patulina per HPLC-EM

CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES:

Columna HPLC utilitzada: Symmetry® C18, 5µm, 2,1 x 150 mm.

Flux: 0,2 mL/min. Fase mòbil: H₂O/THF (99:1) isocràtic.

Volum de mostra injectat 20 µL.

PARÀMETRES DEL EM:

- ESI: Temperatura de la font 110°C, temperatura de dessolvatació 300°C, Voltatge del capillar, 3.0 V. Flux de N₂ de dessolvatació 400 L/h.

Adquisició dades en mode SIR (selected ion recording) m/z 153 (ESI⁻) per la patulina i m/z 203 (ESI⁺) pel patró intern, el compost XIV-c.

- APCI: Temperatura de la font 100°C, Temperatura sonda 450°C, Voltatge de descàrrega de corona 3,30 KV, Voltatge con 20 V. Flux de N₂ de dessolvatació 153 L/h.

Adquisició dades en mode SIR m/z 154 (APCI⁻) per la patulina i m/z 203 (APCI⁺) pel patró intern el compost XIV-c.

2.2.10. Anàlisi quantitativa de patulina per GC-EM

MATERIAL FUNGIBLE:

Columnnes cromatogràfiques capillars utilitzades:

- Hewlett Packard, HP-5 MS (5% fenilmetilpolisiloxà) 30 m x 0,25 µm x 0,25 mm.
- Restek, RTX-200 MS (trifluoropropilmetilpolisiloxà) 30 m x 0,25 µm x 0,25 mm.

Precolumnnes:

- Agilent, tub de sílice desactivat 5 m x 0,25 mm.
- Agilent, tub de sílice desactivat 10 m x 0,32 mm.
- Restek, Tub de sílice desactivat 10 m x 0,32 mm.

Connectors:

- Connectors de columnnes universals de vidre desactivats, Agilent.

CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES:

Tipus d'injecció: "on column", i "oven tracking" amb rampa de pressió :

Pressió inicial 200 kPa, rampa de 650 kPa/min fins 300 kPa 0,3 min, rampa de 650 kPa/min fins 200 kPa. Flux constant.

Volum injectat 1 µL.

Programes de forn:

- Temperatura inicial 80°C 1 min, rampa de 15°C/min fins 250 durant 10 min.
- Temperatura inicial 140°C 1 min, rampa de 10 °C/min fins 280 durant 10 min.
- Temperatura inicial 140°C 1 min, rampa de 5°C/min fins 170, 0 min, rampa 15°C/min fins 280 min. Temps total 24 min.

PARÀMETRES DEL EM:

- HP-MS Engine, 5989A MS: Temperatura de la font 200°C;

Temperatura analitzador 100°C; Temperatura interfase 180°C.

Adquisició dades mode "scan": 40-400 amu. Velocitat d'escaneig de 1,5 amu/s. Adquisició dades en mode SIM (Selected ion monitoring): Ions

seleccionats, m/z 110, 126, 136, 154 per la patulina i m/z 282, 284, 286 pel patró intern hexaclorobenzè (HCB)

- Agilent 5973 MSD: Temperatura de la font 230°C; Temperatura analitzador 150°C; Temperatura interfase 280°C. Adquisició dades en mode d'escaneig: 40-400 amu. Velocitat d'escaneig 3.1 amu/s. Adquisició dades mode SIM: ions seleccionats, m/z 110, 126, 136, 154 per la patulina i m/z 96 pels patrons interns (èsters).

CAPÍTOL 3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. Anàlisi de patulina derivatitzada per CG-EM

Per tal de posar a punt un mètode d'anàlisi de patulina en suc de poma per cromatografia de gasos-EM ens vam plantejar la preparació d'un derivat de patulina que, a més a més de millorar la seva volatilitat, tingués una major massa molecular, de forma que en l'anàlisi per espectrometria de masses donés fragments iònics de massa gran per tal de poder-los utilitzar en l'anàlisi per monitoratge selectiu d'ions (SIM) i així millorar la selectivitat del mètode.

Una revisió bibliogràfica va posar de manifest que per a l'anàlisi de patulina per CG s'havien preparat diferents derivats. Derivats de tipus acil com ara l'acetat, el cloroacetat (Pohland and Allen 1970), el derivat amb heptafluorobutirilimidazole (Tarter and Scott 1991) i també els derivats de silil èter (Chaytor and Saxby 1981; Rychlik and Schieberle 1999; Suzuki et al. 1975).

Considerant el treball previ d'en *Chaytor i Saxby*, (Chaytor and Saxby 1981), en el que van preparar el derivat trimetilsililat de patulina i van utilitzar els fragments m/z 211 i 226 $[M^+]$ amb abundàncies relatives de 8 i 11 respectivament (bastant baixes) per a l'anàlisi del derivat per SIM, vam considerar més oportú iniciar el nostre treball amb la preparació de l'heptafluorobutirat de patulina. Aquest derivat presenta una massa nominal $[M^+]$ de 350 amb una abundància relativa del 20% i un pic base, el m/z 137 (100) segons el treball d'en *Tarter i Scott*, (Tarter and Scott 1991).

Es va iniciar l'estudi considerant com a referència el protocol proposat per *Tarter i Scott*, per a la preparació del derivat acilat de patulina. Per tant es va emprar heptafluorobutirilimidazole (HFBI) com a agent derivatitzant.

Preparació de l'heptafluorobutirat de patulina i confirmació de l'espectre de masses del derivat i del patró intern

El primer pas va consistir en la preparació del derivat seguint el protocol mencionat, treballant sobre una solució de 324 $\mu\text{g/L}$ de patulina en

cloroform. Es va preparar un blanc de la reacció i rèpliques de la mostra (solució de patulina en cloroform). S'analitzaren en mode d'escaneig (scan), per tal de confirmar l'espectre de masses del derivat i escollir els fragments iònics més adequats per a l'anàlisi mitjançant SIM. També es va preparar una solució del patró intern a utilitzar, l'hexaclorobenzè, per tal de confirmar el seu espectre de masses.

L'anàlisi d'aquest primer assaig es va fer utilitzant una columna de gasos HP-5 MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, el programa de temperatures del forn s'ha descrit a l'apartat 2.2.1. de Material i Mètodes.

En les figures 3.1., 3.2. i 3.3. es presenten els cromatogrames iònics totals (TIC) d'un blanc de reacció, d'un patró i del mateix patró injectat transcorregudes 24 h de la seva preparació i que es va guardar a temperatura ambient (Ta).

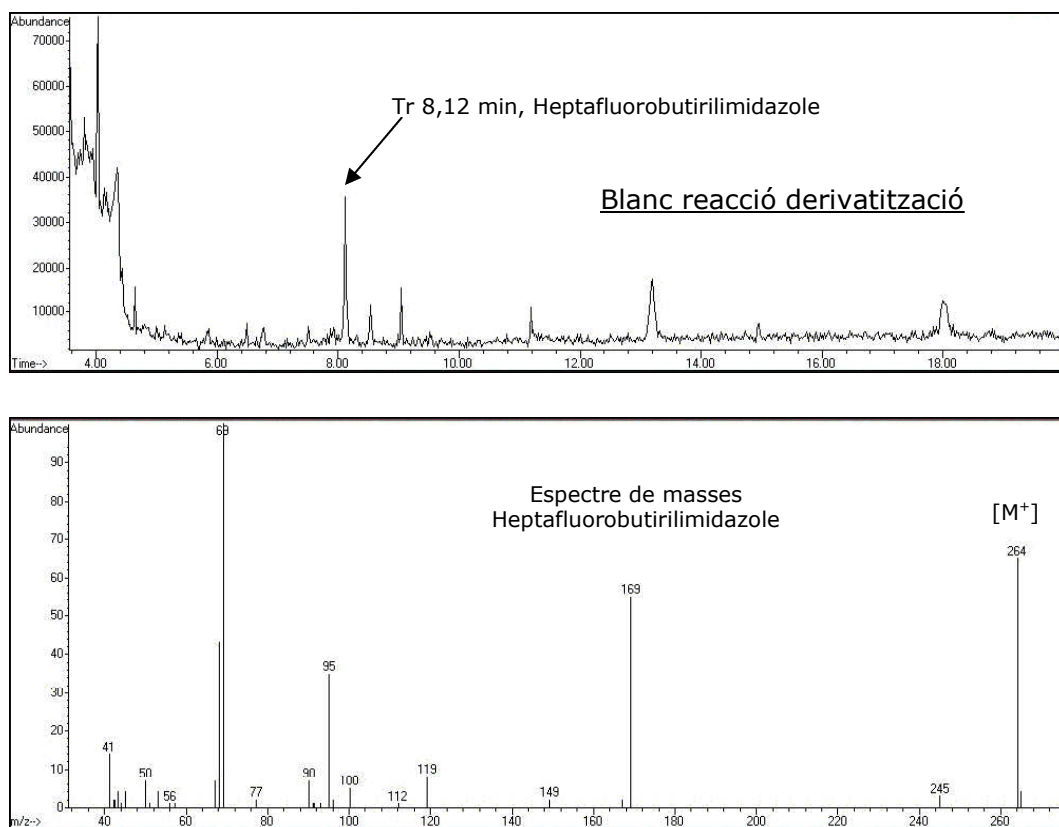


Figura 3.1. Cromatograma iònic total (TIC) corresponent a un blanc de la reacció de derivatització i l'espectre de masses de l'heptafluorobutirilimidazole, reactiu de derivatització utilitzat i que correspon al pic del TIC indicat per la fletxa a 8,12 min.

Del blanc de la reacció es va caracteritzar el pic a un temps de retenció de 8,12 min. corresponent a heptafluorobutirilimidazole que no havia reaccionat.

En la Figura 3.2. es presenta el cromatograma iònic total (TIC) corresponent a la reacció de formació del derivat de patulina sobre una mostra de patulina en cloroform de 324 µg/L i el corresponent espectre de masses del derivat format.

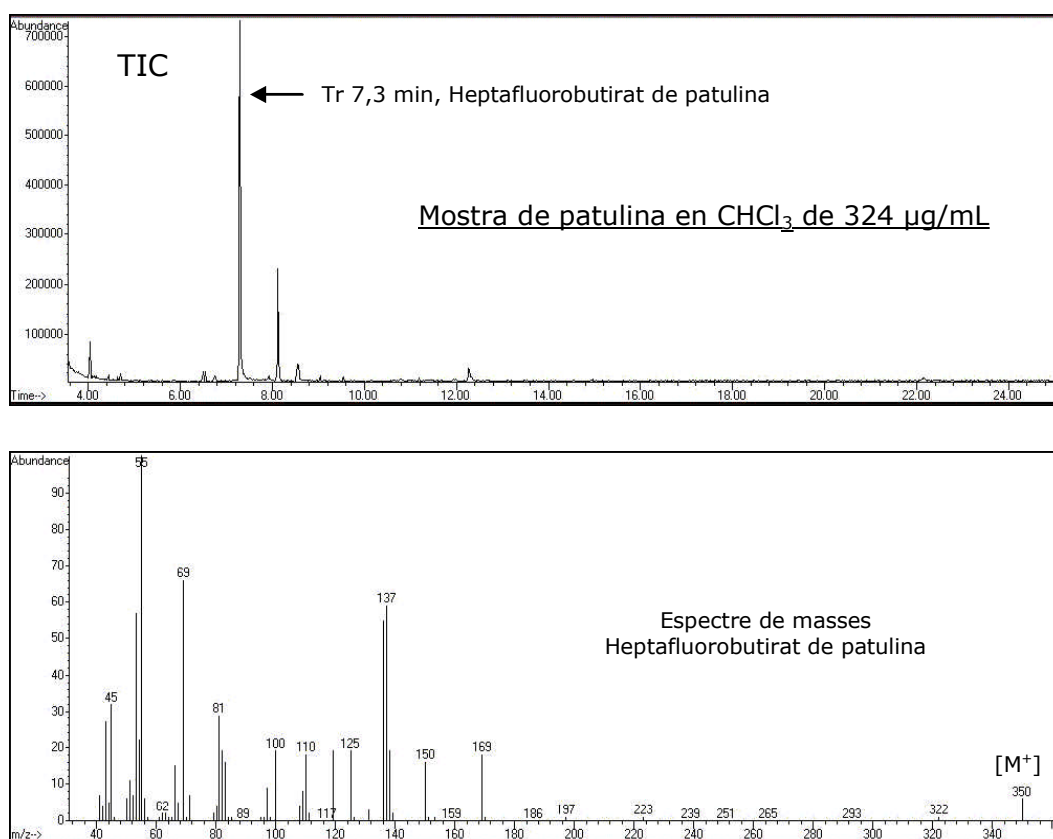


Figura 3.2. Cromatograma iònic total (TIC) corresponent a una mostra de patulina derivatitzada, la fletxa indica el temps de retenció a 7,3 min corresponent al heptafluorobutirat de patulina, i el seu espectre de masses corresponent, on s'hi indica el pic molecular [M⁺] 350.

L'espectre de masses del derivat heptafluorobutirat de patulina que es va obtenir en aquestes condicions va ser el següent:

EM (IE) m/z: 55 (100), 69 (66), 81 (29), 82 (19), 83 (16), 110 (18), 119 (19), 125 (19), 136 (54), 137 (59), 138 (19), 150 (16), 169 (18), 350 [M⁺] (6). Espectre de masses que es correspon amb el que descriu *Tarter i Scott* en el seu treball, (Tarter and Scott 1991).

Per tal de comprovar l'estabilitat del derivat d'heptafluorobutirat de patulina es va guardar una mostra de patulina derivatitzada a temperatura ambient i es va analitzar transcorregudes 24 h de la seva preparació. El resultat es presenta en la Figura 3.3.

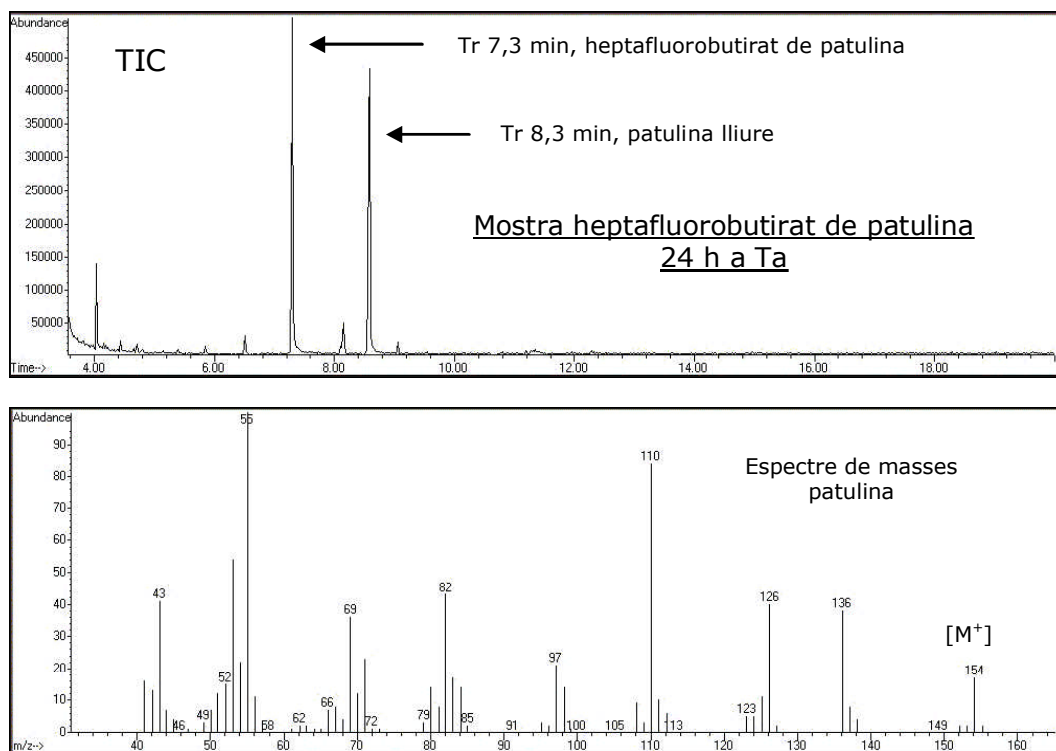


Figura 3.3. Cromatograma iònic total d'una mostra d'heptafluorobutirat de patulina transcorregudes 24 h de la seva preparació i guardada a $T.$ ambient. La fletxa indica la presència de patulina lliure a un temps de retenció de 8,3 min i a continuació es presenta el seu espectre de masses obtingut en aquestes condicions.

L'espectre de masses obtingut per la patulina sense derivatitzar és el següent:

EM (IE) m/z : 55 (100), 69 (37), 71 (23), 80 (13), 82 (42), 97 (23), 110 (84), 126 (39), 136 (35), 154 [M⁺] (17).

L'espectre de masses corresponent a l'hexaclorobenzè, el patró intern (PI) es detalla a continuació:

EM (IE) m/z : 71 (7), 107 (14), 142 (24), 179 (6), 214 (12), 282 [M⁺] (50), 284 [M+2] (100), 286 [M+4] (84), 288 [M+6] (35), 290 [M+8] (8).

A partir dels espectres de masses obtinguts per impacte electrònic (EI) es van seleccionar per a l'anàlisi per monitoratge selectiu d'ions (SIM) els

fragments m/z 137, 169 i 350 per al heptafluorobutirat de patulina i els fragments m/z 282 [M^+], 284 [M^++2] i 286 [M^++4] per a l'hexaclorobenzè.

Aquest primer assaig realitzat va posar de manifest la poca estabilitat del derivat guardat a temperatura ambient. A partir d'aquest fet es van introduir unes modificacions en el protocol de preparació del derivat. Primer es va canviar de dissolvent en la part final, es van afegir 500 μL d'isooctà en lloc de la barreja toluè/acetoni-tril (95:5) del protocol original. Finalment es va introduir un segon canvi, en el que s'assecava durant una hora la fase orgànica recuperada amb sulfat de sodi anhidre per tal d'evitar la degradació del derivat per la presència d'humitat a les mostres.

Estudi de la reproductibilitat en la preparació del heptafluorobutirat de patulina

En un segon estudi es van preparar mostres de patulina derivatitzada a partir de solucions de patulina en cloroform de diferent concentració, per tal d'estudiar la reproductibilitat en la preparació del derivat.

Es van preparar mostres de patulina derivatitzada de tres concentracions diferents i per triplicat i es van analitzar en les mateixes condicions descrites en l'assaig anterior, amb l'única diferència de que l'adquisició de dades es va fer en mode SIM. S'injectà 1 μL de cada per duplicat.

Es va mesurar l'àrea corresponent al cromatograma iònic del fragment seleccionat m/z 137 del heptafluoro derivat de patulina en cada mostra.

A continuació es presenten els resultats en la taula 3.1.

Taula 3.1. Valors de reproductibilitat en la preparació de l'heptafluorobutirat de patulina, expressada com a desviació estàndard relativa % (DER), a tres concentracions de patulina diferents.

C* de patulina en la mostra (µg/L)	12,0	265,4	319,6
DER % n=3	71,0	37,23	41, 8

*Concentració

Els resultats presentats en la taula 3.1. evidencien una molt baixa reproductibilitat en la preparació del derivat, molt allunyada de les dades aportades per en *Tarter i Scott*, (Tarter and Scott 1991), en el seu treball en el que aporta un valor de coeficient de variació del 4% per a n=6.

La manca de reproductibilitat dels resultats, ens va fer plantejar noves modificacions en el protocol per tal de millorar la preparació del derivat. Una d'aquestes modificacions va consistir a fer la preparació del derivat en vials en atmosfera inert, introduint el reactiu al vial de reacció mitjançant una xeringa a través d'un septo per evitar al màxim la descomposició del reactiu per la humitat.

En aquestes condicions ens vam plantejar preparar una sèrie de patrons de 4 concentracions diferents preparats per duplicat i utilitzar hexaclorobenzè com a patró intern. Les condicions cromatogràfiques van ser les mateixes que en els assajos anteriors (apartat 2.2.1. de Material i Mètodes).

Taula 3.2. Resultats de la preparació de patrons (n=2), d'heptafluorobutirat de patulina corresponents a 4 concentracions de patulina diferents. S'indica l'equivalència de patulina en suc de poma utilitzant com a mètode d'extracció-purificació el de Rovira et al. La reproductibilitat s'expressa com a desviació estàndard relativa (DER%). A la última fila s'hi indica l'equació de la recta de calibratge obtinguda i el valor del coeficient de determinació R^2 .

Patrons	P-1	P-2	P-3	P-4
µg/L a suc (Rovira et al.)	8	24	64	120
DER % n=2	54,71	30,65	5,88	8,31
[Àrea m/z 137/Àrea m/z 284]= 0,0001 C* (µg/mL) R²= 0.977				

*Concentració a vials d'injecció

La recta preparada cobreix un interval de concentració de patulina en suc de poma de 8 a 120 µg/L. Com es pot observar la variabilitat és més gran a concentracions baixes, com posen de manifest els valors de 54,71% i 30,65% corresponents als valor de desviació estàndard relativa dels patrons de 8 i 24 µg/L.

Influència de la matriu de suc de poma en la preparació i anàlisi del derivat d'heptafluorobutirat

Un altre aspecte a estudiar era la possible influència del suc de poma en els resultats del procés de derivatització i anàlisi del derivat. Es va procedir a la preparació del derivat de patulina en mostres de suc de poma. Es van preparar 4 mostres de suc de poma enriquides amb patulina per duplicat. Es van addicionar patulina de forma que tinguessin un valor de patulina en suc inferior al patró 3 (64 µg/L) de la recta de calibratge preparada

anteriorment (Taula 3.2). Es van extreure seguint el protocol d'extracció del mètode d'en *Rovira et al.* 1993 (veure Capítol 2 secció. 2.2.7.1.), es van derivatitzar segons el protocol d'en *Tarter i Scott* modificat (veure Capítol 2 secció 2.2.1.) i es van analitzar utilitzant mateixes condicions cromatogràfiques descrites en l'apartat 2.2.1. de Material i Mètodes. Els resultats obtinguts es presenten en la taula 3.3.

Taula 3.3. Resultats corresponents a l'anàlisi d'heptafluorobutirat de patulina en mostres de suc de poma enriquides. S'indica el valor de la DER i la Recuperació en %.

	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4
µg/L afegits	61,6	61,6	49,6	57,6
Mitjana µg/L calculats n=2	62,5	55,7	55,9	74,9
DER % n=2	11,42	42,3	25,3	14,2
Recuperació % n=2	101,5	90,4	112,7	130,1
[Àrea m/z 137/Àrea m/z 284]= 0,0001 C* (µg/mL) R²= 0.977				

C* concentració a vial d'injecció

En aquest assaig es pretenia avaluar la reproductibilitat de la preparació del derivat sobre una matriu de suc de poma, així com avaluar les dades de quantificació emprant per a fer els càlculs una recta de calibratge obtinguda a partir de patrons preparats sense matriu. Dels resultats obtinguts i presentats en la taula 3.3. es pot comprovar que malgrat les modificacions introduïdes en el protocol de preparació del derivat, els valors de reproductibilitat per a les mostres enriquides oscillen entre un 11 i un 42 %. La matriu introdueix, doncs, un factor extra de variabilitat en la preparació del derivat, que no és menyspreable.

Quan analitzem les dades corresponents a la quantificació del derivat de patulina en les mostres de suc de poma enriquides, emprant la recta de calibratge obtinguda a partir de patrons de patulina preparats en dissolvent, s'observa una tendència a quantificar per excés. Els valors de recuperació superiors al 100% per 3 de les 4 mostres preparades així ho indiquen (Taula 3.3).

Donat que per a un nivell de concentració de patulina alt, de més de 50 µg/L en suc, els resultats havien estat poc satisfactoris i que la preparació del derivat no permetia obtenir resultats del tot reproduïbles, malgrat les modificacions introduïdes en el protocol de preparació, i vist que en el primer experiment s'havia constatat la possibilitat d'analitzar patulina sense derivatitzar, es va decidir dirigir els esforços en aquesta direcció.

3.2. Anàlisi per CG-EM de patulina sense derivatitzar utilitzant hexaclorobenzè com a patró intern

Hem mencionat a la introducció, que el primer treball sobre detecció de patulina en suc de poma sense derivatitzar és de *Scott*, (Scott et al. 1972), treball on la CG-EM només s'utilitzava com a tècnica confirmativa. Uns quants anys més tard, amb els avantatges de la tècnica d'injecció "on-column", el perfeccionament de la pneumàtica digital en els reguladors de pressió dels gasos dels cromatògrafs i la utilització de columnes capillars, ens va fer plantejar la possibilitat de posar a punt un mètode d'anàlisi quantitatiu de patulina en suc de poma sense necessitat de derivatitzar aquesta substància.

Els treballs preliminars es van realitzar prenent com a referència el mètode cromatogràfic utilitzat per a l'anàlisi del heptafluorobutirat de patulina. Així mateix, es va utilitzar el mateix dissolvent per a la preparació dels patrons i mostres, isooctà, i també el mateix patró intern, l'hexaclorobenzè.

En una primera aproximació es va procedir a l'anàlisi qualitativa de patulina per espectrometria de masses. Es va enregistrar el seu espectre de masses en l'interval de masses de 40-400 uma. Així es va confirmar el seu espectre de masses per impacte electrònic (a 70 eV d'energia dels electrons) i es va establir l'abundància relativa dels ions més característics de cara a definir un criteri d'identificació per a la seva anàlisi quantitativa. L'anàlisi quantitativa es va fer en mode SIM (selected ions monitoring) per raons de sensibilitat i selectivitat.

Per tant i amb el propòsit d'establir un criteri d'identificació de patulina en una mostra complexa en mode SIM, es va decidir calcular les abundàncies relatives dels ions seleccionats en l'equip utilitzat. A partir d'una solució de patulina de 25 µg/mL en isooctà es va enregistrar el seu espectre de masses en mode d'escaneig en un interval de masses de 40-400 uma. D'acord a l'espectre de masses de la patulina, es van seleccionar els fragments m/z 110, 126, 136 i 154 [M⁺], i es va escollir el fragment més abundant, el m/z 110 per a quantificar. Tot seguit es van determinar els valors de les abundàncies relatives respecte al fragment m/z 110. El càlcul es va fer per integració de l'àrea de cada cromatograma iònic extret del cromatograma iònic total (TIC).

Els resultats obtinguts es presenten en la taula següent:

Taula 3.4. Caracterització de les abundàncies relatives dels ions escollits per a analitzar patulina per SIM respecte del m/z 110. S'indiquen els valor de la mitjana, desviació estàndard (DE) i de la desviació estàndard relativa (DER %) per a 14 rèpliques.

Abundàncies (relació d'àrees) respecte a m/z 110			
m/z	110/126	110/136	110/154
Mitjana (n=14)	1,8	2,9	3,7
DE	0,09	0,13	0,18
DER %	5	4	5

Un cop seleccionats els ions a utilitzar i determinada la seva abundància relativa es va procedir a comparar la resposta del detector quan es preparen patrons de patulina en dissolvent, en aquest cas es va utilitzar isooctà, i patrons de patulina sobre matriu lliure de patulina. Els patrons preparats corresponien a una concentració de patulina en suc de poma de 80, 240 i 480 µg/L.

Els patrons sobre matriu es van preparar extraient una matriu blanca de patulina segons el protocol de *Rovira et al.* (veure Cap 2 de Material i Mètodes apartat 2.2.7.1.) i sobre el residu de l'extracte es van afegir 500 µL d'una solució de patulina en isooctà de 1, 3, i 6 µg/L respectivament. En aquest cas no es va utilitzar patró intern. Les tres sèries es van analitzar per CG-EM utilitzant una columna HP-5 MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm amb un programa de forn de T. inicial 80°C 1 min i una rampa de 15 °C/min fins 270°C durant 5 min. S'injectà 1µL en un injector "on column", emprant una rampa de pressió: pressió inicial 200 kPa 0 min, rampa de 650 kPa/min fins a 350 kPa 0,3 min després a flux constant. Es van fer dos injectades de cada patró.

El resultat es presenten en la taula següent:

Taula 3.5. Valors de l'àrea dels cromatogrames iònics de m/z 110 per a tres nivells de concentració de patulina, en patrons en isooctà i patrons preparats sobre matriu blanca de suc de poma

C* patulina (µg/L)	Àrea mitjana m/z 110 (isooctà) n=2	Àrea mitjana m/z 110 (matriu de suc) n=2	Relació d'àrees: A-m/z 110 matriu vs A-m/z 110 isooctà
1	9796,5	26355,25	2,69
3	140771,5	184311,5	1,31
6	222785	228808	1,03

*Concentració

Dels resultats d'aquesta primera aproximació a l'anàlisi de patulina sense derivatitzar es pot destacar la diferència d'àrea en valor absolut, per a una mateixa concentració de patulina, entre un patró preparat en dissolvent i un patró preparat sobre un extracte de matriu de suc de poma. Aquesta diferència és més acusada a baixes concentracions (a 1 µg/L la relació d'àrees va ser de 2,3) i va disminuint a mesura que augmenta la concentració de patulina del patró. L'exemple presentat cobreix una concentració de patulina en suc de poma de 80-480 µg/L. Aquest és un interval alt de concentració de patulina en suc tenint en compte que el valor màxim regulat és de 50 µg/L en molts països i de 20 µg/L en alguns altres i en aliments destinats a la alimentació infantil segons la normativa a Europa.

Es d'esperar que aquest efecte serà més acusat encara en intervals de concentració més baixos, per exemple de 6-50 µg/L. Aquest fenomen és conegut com a "efecte matriu". La matriu (l'extracte de suc de poma) té un efecte potenciador en la detecció de l'anàlit en qüestió. Aquest efecte s'explica perquè la matriu en certa forma protegeix l'anàlit de la descomposició i/o adsorció a l'injector calent del cromatògraf de gasos (Aybar et al. 2003; Rantakokko et al. 2004; Schenck and Lehotay 2000). També té lloc en injectors tipus "on-column", on la adsorció pot tenir lloc al llarg de la precolumna. Aquest fenomen és propi d'anàlits amb grups funcionals polars, com és el cas de la patulina.

Observat aquest fenomen, el següent aspecte a estudiar va ser veure si l'estàndard intern a utilitzar, l'hexaclorobenzè, servia per a corregir aquest efecte. En aquest cas es va treballar en un interval de concentració més baix de patulina en suc de poma.

Es va preparar una sèrie de patrons a tres concentracions diferents de patulina en isooctà, deu cops més baixes que les utilitzades en l'experiència anterior, i altres dos sèries de patrons de concentració equivalent preparades sobre matriu. Com a patró intern es va utilitzar una concentració de 0,3 µg/mL d'hexaclorobenzè en isooctà. Es va cobrir un interval de concentració de 4 a 24 µg/L de patulina en suc de poma.

S'analitzaren en les mateixes condicions i es va comparar la relació d'àrees entre m/z 110, fragment utilitzat per a quantificar patulina, i el fragment m/z 284, corresponent al fragment escollit per a quantificar el patró intern. Es va injectar per duplicat 1 µL de cada una de les mostres de patrons preparades.

Els resultats es presenten en la taula següent.

Taula 3.6. Valors de la relació de les àrees de m/z 110/m/z 284 per a tres nivells de concentració de patulina, de patrons dissolts en isooctà i patrons preparats en matriu blanca de suc de poma i el valor del seu quocient. S'adjunta el valor de la desviació estàndard relativa (DER) % per a les dos sèries de patrons preparades.

µg/L suc	Àrea m/z 110 vs Àrea m/z 284 (isooctà)	A-110 vs A-284 Sèrie a (matriu)	A-110 vs A-284 Sèrie b (matriu)	Mitjana sèries A-110 vs A-284 (matriu)	DER % Sèries n=2
4	0,15	0,33	0,38	0,36	10,7
12,5	0,65	0,67	0,77	0,72	9,9
23,5	0,94	1,09	1,05	1,07	2,6

D'acord amb els resultats obtinguts, sembla a primera instància que malgrat la utilització d'un patró intern, el valor de la relació d'àrees entre m/z 110 i m/z 284 per a un mateix valor de concentració de patulina entre un patró en isooctà i un patró preparat en matriu és lleugerament diferent, essent aquesta relació més alta per als patrons preparats sobre matriu. Aquest fet no fa aconsellable la utilització de patrons preparats en dissolvent per a la quantificació de patulina.

Un següent assaig que es va realitzar va ser veure el comportament de l'estàndard intern, en un assaig de reproductibilitat entre dies. Es van preparar per duplicat patrons de patulina en matriu, en un interval de

concentració de patulina en suc de 4 a 56 µg/L. Sobre el residu de l'extracte d'una mostra de suc de poma extret segons el protocol de *Rovira et al.*, (Rovira et al. 1993) es van afegir 500 µL de solucions de patulina en isooctà, que contenen 0,1, 0,3, 0,6, 0,9 i 1,4 µg/mL de patulina i 0,1 µg/mL de patró intern. Es va injectar per duplicat 1 µL de cada patró i es va representar la relació d'àrees anàlit/patró intern, (A-110/A-284) en front de la concentració de patulina en el suc de poma.

De la comparació de les dades obtingudes en dos dies diferents en va resultar el següent gràfic:

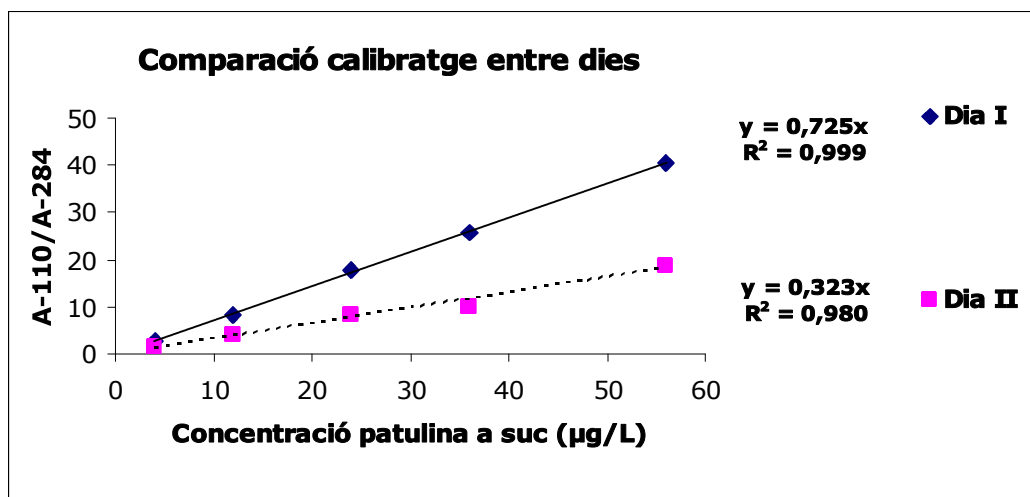


Figura 3.4. Gràfic de calibratge comparatiu entre patrons de patulina injectats en dos dies diferents, utilitzant hexaclorobenzè com a patró intern. Es representa la relació d'àrees entre l'anàlit i el patró intern vers la concentració de l'anàlit en suc de poma. Es presenta l'equació de cada recta i el R^2 coeficient de determinació corresponent a cada recta.

Cada punt de la recta representa la mitjana de dos rèpliques i dos injectades cada una.

Com es pot veure al gràfic la resposta és lineal en l'interval de concentració assajat, però hi ha una variació important en el pendent de la recta del dia II, respecte a la del dia I. Aquest canvi de pendent es pot atribuir a diferents factors. En primer lloc si es considera que no hi ha canvis en la concentració dels patrons, aquest canvi ha d'estar condicionat a un canvi de resposta del detector i a més, aquest canvi de resposta afecta de forma diferent a l'anàlit i al patró intern de forma que el patró intern no corregeix aquesta variable en el procés analític. Un altre factor que es pot considerar és que després d'un nombre determinat d'injeccions, la precolumna estigui parcialment bruta de material no volàtil dipositat. En aquestes condicions s'observa una disminució de la resposta degut a la retenció d'anàlit en aquesta zona, retenció que pot afectar de forma diferent l'anàlit i el patró intern. Un altre factor a considerar pot ser la diferència de mida entre els fragments escollits per a quantificar la patulina m/z 110 i el patró intern, m/z 284. El fet de ser dos ions de massa força diferent pot repercutir en que es poden veure afectats de diferent manera quan es realitza la calibració diària de l'aparell. Price ja menciona, en un dels treballs pioners en l'anàlisi de patulina per EM, la necessitat a l'hora de quantificar, de triar un patró intern amb fragments m/z el més similars possibles al fragment triat per a quantificar l'anàlit (Price 1979).

Tot i aquest desavantatge en la tria del patró intern, quedava estudiar el comportament del patró intern, l'hexaclorobenzè, en un assaig de recuperació. Per aquest motiu es va preparar de nou una recta de calibratge a partir de dos sèries de patrons preparats sobre matriu blanca de patulina. La recta de calibratge cobria un interval de concentració de 3,9 a 59,6 $\mu\text{g/L}$ de patulina en suc. També es van preparar, per triplicat, mostres de suc de poma enriquides a tres nivells de patulina, 10,2; 31,4 i 51,7 $\mu\text{g/L}$ de concentració. Les mostres enriquides, un cop extretes i purificades es van comparar a les corresponents mostres de concentracions teòriques de 3,9, 12,5 i 23,5 $\mu\text{g/L}$ de patulina. La concentració del patró intern hexaclorobenzè (PI), va ser de 300 $\mu\text{g/L}$.

Es van analitzar per CG-EM seguint les mateixes condicions descrites en aquest apartat.

Mentre que en la taula 3.7 es presenten els resultats obtinguts en preparar la recta de calibratge, en la taula 3.8. s'indiquen els resultats corresponents a les mostres de suc de poma enriquides que es van preparar.

Taula 3.7. Taula dels valors del calibratge amb els valors de concentració de patulina en suc, el valor de la mitjana per a la relació d'àrees entre m/z 110 (patulina) i m/z 284 (PI), la desviació estàndard (DE) i la desviació estàndard relativa (DER) per a n=2 sèries de patrons analitzats i l'equació de la recta.

µg/L suc	A-110/A-284 mitjana (n=2)	DE	DER %
3,9	0,36	0,04	10,74
12,5	0,72	0,07	9,92
23,5	1,07	0,03	2,59
39,2	1,87	0,25	13,18
59,56	2,76	0,18	6,55
[Àrea m/z 110/Àrea m/z 284] = 0,043 C*(µg/L) + 0,15; R²= 0.996			

Taula 3.8. S'indica el valor del nivell de patulina addicionat, el valor calculat a partir de la recta, el % de recuperació i els valors de desviació estàndard (DE) i la desviació estàndard relativa (DER %) corresponents a l'anàlisi de 3 rèpliques.

µg/L patulina addicionats suc	A-110/A-284 mitjana (n=3)	µg/L calculats mitjana (n=3)	Recuperació (%)	DE	DER%
10,2	0,65	14,0	137,37	0,06	9,48
31,4	1,93	43,9	139,95	0,10	4,44
51,7	2,87	66,1	127,94	0,35	26,18

De l'anàlisi de les dades obtingudes en destaca principalment el resultat del càlcul de la recuperació, que dona un valor de recuperació per a cada nivell molt alt. Aquest valor és alt perquè en la relació d'àrees m/z 110 (patulina) i l'àrea m/z 284 (PI) és més alta en les mostres enriquides que en els patrons de calibratge. Això implica que el procés d'extracció discrimina de forma diferent la patulina del patró intern. Aspecte que podria ser degut a la diferent polaritat entre la patulina i l'hexaclorobenzè, el patró intern.

L'elecció del patró intern és essencialment important, doncs, afecta a la precisió i l'exactitud del mètode (Leis et al. 2004). En el nostre cas hem vist com afecta de forma dràstica a l'exactitud, en canvi en la precisió el seu efecte és menys clar, si bé podem observar un valor de DER del 26% per al nivell de concentració més alt, essent aquest valor més atribuïble a nivells de concentració més petits on és d'esperar una dispersió més alta dels valors corresponents a les rèpliques.

Una vegada s'havia vist que era possible analitzar la patulina sense derivatitzar mitjançant GC-EM, però que el patró intern escollit no donava bons resultats es va plantejar procedir a l'obtenció de patrons interns que, per les seves característiques estructurals, poguessin proporcionar millors resultats quantitius.

3.3. Síntesi de possibles patrons interns

La síntesi orgànica en aquest treball, és una estratègia encaminada a l'obtenció d'uns compostos estructuralment relacionats amb la patulina per a la seva utilització com a patrons interns en l'anàlisi quantitativa per cromatografia amb detectors selectius de masses.

La utilització de compostos anàlegs marcats isotòpicament és la opció més adequada per a assolir major exactitud i precisió en l'anàlisi per SIM, però la utilització de compostos estructuralment relacionats pot ser una

alternativa igualment vàlida, més econòmica i en alguns casos la única possible.

En aquest apartat es presenten diferents estratègies sintètiques encaminades a l'obtenció de compostos aptes per a ser utilitzats com a patrons interns.

3.3.1. Intent de síntesi de patulina marcada

L'obtenció de patulina a partir de la síntesi química és un requisit per a la preparació de patulina marcada. A partir de l'estudi d'una ruta sintètica es pretén trobar vies d'introducció d'isòtops estables, com per exemple reactius marcats amb deuteri (^2H), amb ^{13}C o també ^{18}O .

Així el primer pas va consistir a triar una ruta sintètica de la bibliografia i explorar les possibilitats de marcar la molècula de patulina en alguna de les etapes. Dels treballs publicats consultats, la majoria utilitzaven la via que parteix d'un compost relativament assequible, l'arabinosa i a partir de 4, 5 ó 6 etapes obtenir patulina (Bennett et al. 1991; Gill et al. 1988; Seijas et al. 1989) . El rendiment descrit oscilla entre un 65% i un 79%

Altres treballs que utilitzen una via sintètica diferent són els de *Tada et al.* i el de *Boukouvalas i Maltais*, (Boukouvalas and Maltais 1995; Tada et al. 1994). Aquests utilitzen una via que implica en els seus inicis la preparació d'un compost derivat del furan. La ruta proposada per *Tada et al.* consta de 8 etapes i com ja menciona l'autor, és fàcil la introducció d'isòtops per a marcar la molècula en alguna d'aquestes etapes. El rendiment mitjà descrit és del 60%.

Nosaltres vam escollir la via proposada per *Boukouvalas i Maltais*, (Boukouvalas and Maltais 1995), que al igual que en la de *Tada et al.* possibilita la introducció d'àtoms marcats en diferents posicions de la molècula, aspecte que pot permetre preparar amb facilitat un derivat

marcat amb un pes molecular superior en més de dues unitats al de la patulina. Disminuint així la possibilitat que anàlit i patró intern donin algun fragment de massa equivalent. No vam escollir la via proposada per *Tada et al.* en el seu treball ja que en aquest últim cas el rendiment mitjà indicat pels autors era inferior (Tada et al. 1994) a pesar de què l'esquema sintètic proposat per *Boukouvalas i Maltais*, (Boukouvalas and Maltais 1995) (veure figura 3.5) és una mica més llarg (10 etapes).

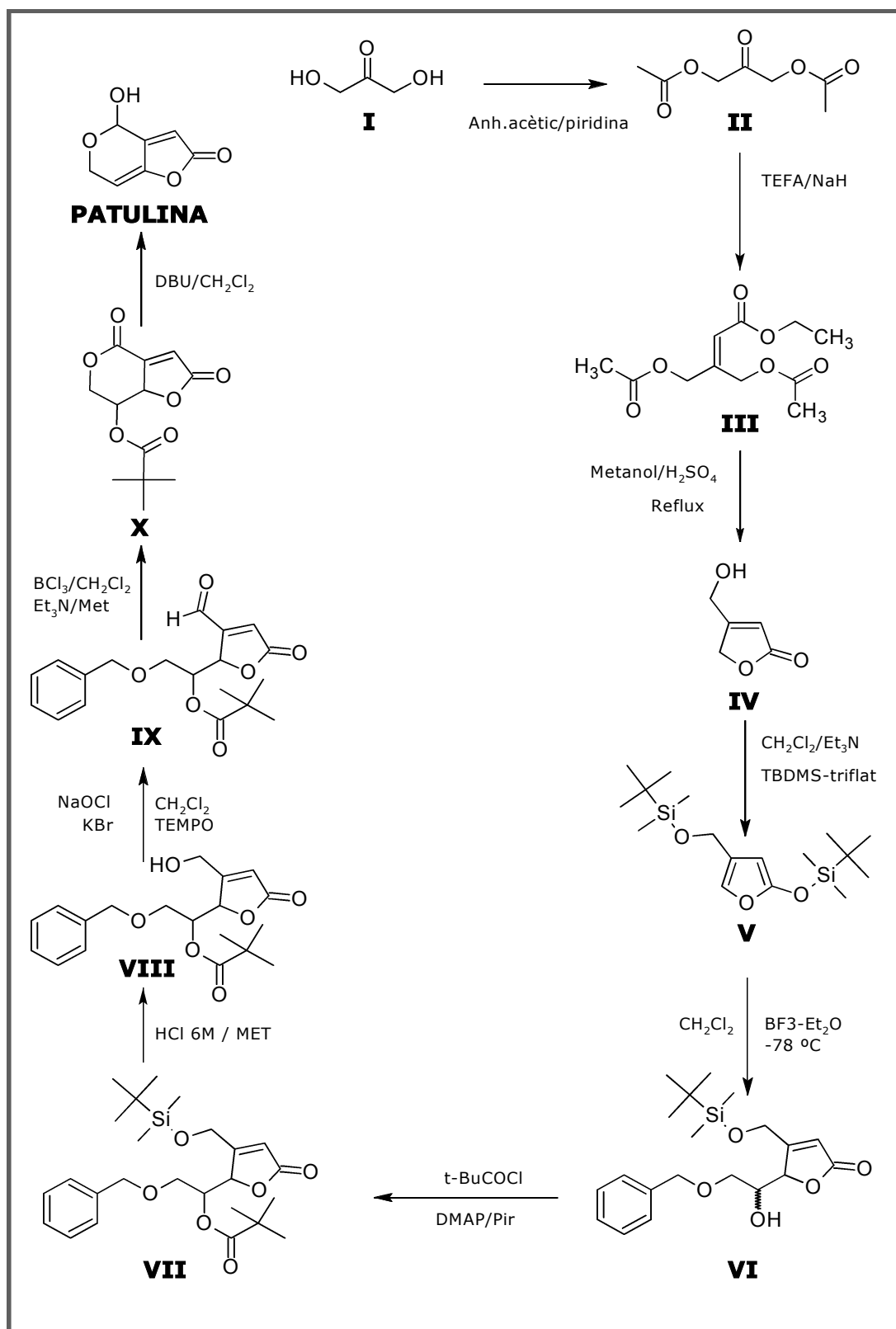


Figura 3.5. Esquema síntesi de patulina de Boukouvalas i Maltais, (Boukouvalas and Maltais 1995).

El control de l'obtenció dels productes en cada etapa es va fer per cromatografia de gasos-EM. Les condicions utilitzades estan descrites en l'apartat 2.2.2. de Material i Mètodes. A partir del compost V el control de la reacció es va fer per HPLC-EM, donat la poca volatilitat d'aquest compost.

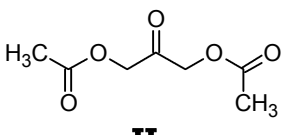
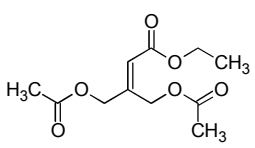
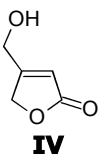
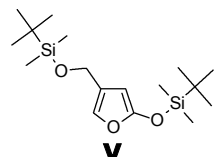
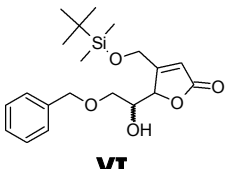
Cada compost obtingut, i un cop purificat es va caracteritzar estructuralment. Es va determinar el punt de fusió (en els sòlids), l'espectre UV-Vis, l'espectre de masses, i l'espectre RMN de ^{13}C i ^1H .

De la preparació del producte IV (apartat 2.2.2.3. de Material i Mètodes) es va assajar una metodologia diferent a la proposada per en *Boukouvalas i Maltais*. En aquesta, es va utilitzar clorotrimetilsilà com a catalitzador àcid de la reacció i es va fer a temperatura ambient, (veure apartat 2.2.2.3.b de Material i Mètodes) (Di Raddo 1993). Aquesta modificació presentava l'avantatge de que la reacció resultava ser més neta. Si el rendiment brut de la reacció del protocol de *Boukouvalas i Maltais* era del 148,8% amb el protocol de *Di Raddo* s'obté un rendiment del 111% que fa pensar en la presència de menys productes collaterals a la reacció. Aquest fet també es va confirmar a partir de l'anàlisi qualitativa per cromatografia de capa prima, on es va observar una menor presència de subproductes de la reacció.

L'obtenció dels 4 primers compostos corresponents a les 4 primeres etapes de la síntesi de patulina d'en *Boukouvalas i Maltais* (Boukouvalas and Maltais 1995), va resultar fàcil i amb un rendiment net mitjà d'aquests 4 etapes del 60%.

El rendiment net per a l'etapa següent va ser del 21%, bastant baix comparat amb els rendiments nets obtinguts en les etapes anteriors. En la taula 3.9 s'indica l'estructura química, fórmula empírica, massa molecular, el rendiment net de la obtenció del producte i el nom dels compostos preparats en aquesta seqüència sintètica estudiada.

Taula 3.9. Relació de compostos preparats per aplicació de la metodologia sintètica descrita per Boukouvalas i Maltais. S'indica l'estructura, el rendiment net i la referència.

SÍNTESI PATULINA (Boukouvalas and Maltais 1995)		
COMPOST	Rendiment net (%)	NOM
 <p style="text-align: center;">II</p>	80,4	3-(acetoxi)-2-oxopropil acetat (Bentley and McRae 1970)
 <p style="text-align: center;">III</p>	79,8	butenoat de 2-etil-4-(acetiloxi)-3- [(acetiloxi)metil] (Gadir et al. 1986)
 <p style="text-align: center;">IV</p>	62,2	4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (Gadir et al. 1986)
 <p style="text-align: center;">V</p>	77,9	<i>tert</i> -butil[(5-{[<i>tert</i> -butil(dimetil)silil]oxi}- 3-furil)metoxi]dimetilsilà (Jefford et al. 1994)
 <p style="text-align: center;">VI</p>	21,3	5-[2-(benziloxi)-1-hidroxietil]-4-([1-(<i>tert</i> - butil)-1,dimetilsilil]oximetil)-2,5-dihidro-2- furanona (Boukouvalas and Maltais 1995)

Ara bé, tots els intents que es van fer per prosseguir més enllà de l'etapa 6 van resultar infructuosos. En totes les proves realitzades no es va observar, analitzant el cru de la reacció per capa prima, la formació de cap compost

majoritari que ens permetés conèixer quin era el resultat de cada una de les proves que vam fer, la qual cosa va dificultar tant la identificació com la purificació posterior del compost d'interès. Fins hi tot vam intentar posar-nos en contacte amb els autors de la ruta sintètica seguida, per tal de comenta'ls-hi les nostres dificultats però no vam rebre resposta.

Tenint en compte que la síntesi de patulina per aquesta via semblava difícil d'assolir, i que quan estàvem plantejant una nova possible aproximació a aquest objectiu, es va publicar el treball de *Rychlik i Schieberle* (Rychlik and Schieberle 1998) en el que es descrivia la síntesi i ús de patulina marcada, ens vam plantejar utilitzar els precursors IV i V obtinguts, com a possibles reactius inicials per preparar possibles estàndards interns, alternatius a la patulina marcada.

3.3.2. Estratègia de síntesi de patrons interns no marcats

En l'esquema que es presenta a continuació es resumeix l'estratègia alternativa a la preparació de patulina marcada. Vam considerar que els compostos IV i V de la ruta de *Boukouvalas i Maltais* podien ser emprats com a precursors de noves estructures, possibles candidates a ser utilitzades com a patrons interns en l'anàlisi de patulina. Així, doncs, es van plantejar 3 sèries sintètiques. La sèrie 1 que partia del compost V, tenia com a finalitat l'obtenció de 5-(1-hidroxi)alquilfuranones obtingudes per addició sobre un seguit de 6 aldehids diferents. Una segona sèrie, la sèrie 2, consistia en addicionar sobre els mateixos 6 aldehids un compost comercial, el (2-furiloxi)(trimetil)silà. I una tercera sèrie (sèrie 3) en que es va utilitzar l'alcohol IV per a la obtenció per síntesi en paral·lel de 21 èsters diferents. Tots ells relacionats estructuralment amb la patulina i possibles candidats a ser emprats en una anàlisi cromatogràfica quantitativa de patulina utilitzant detectors selectius de masses.

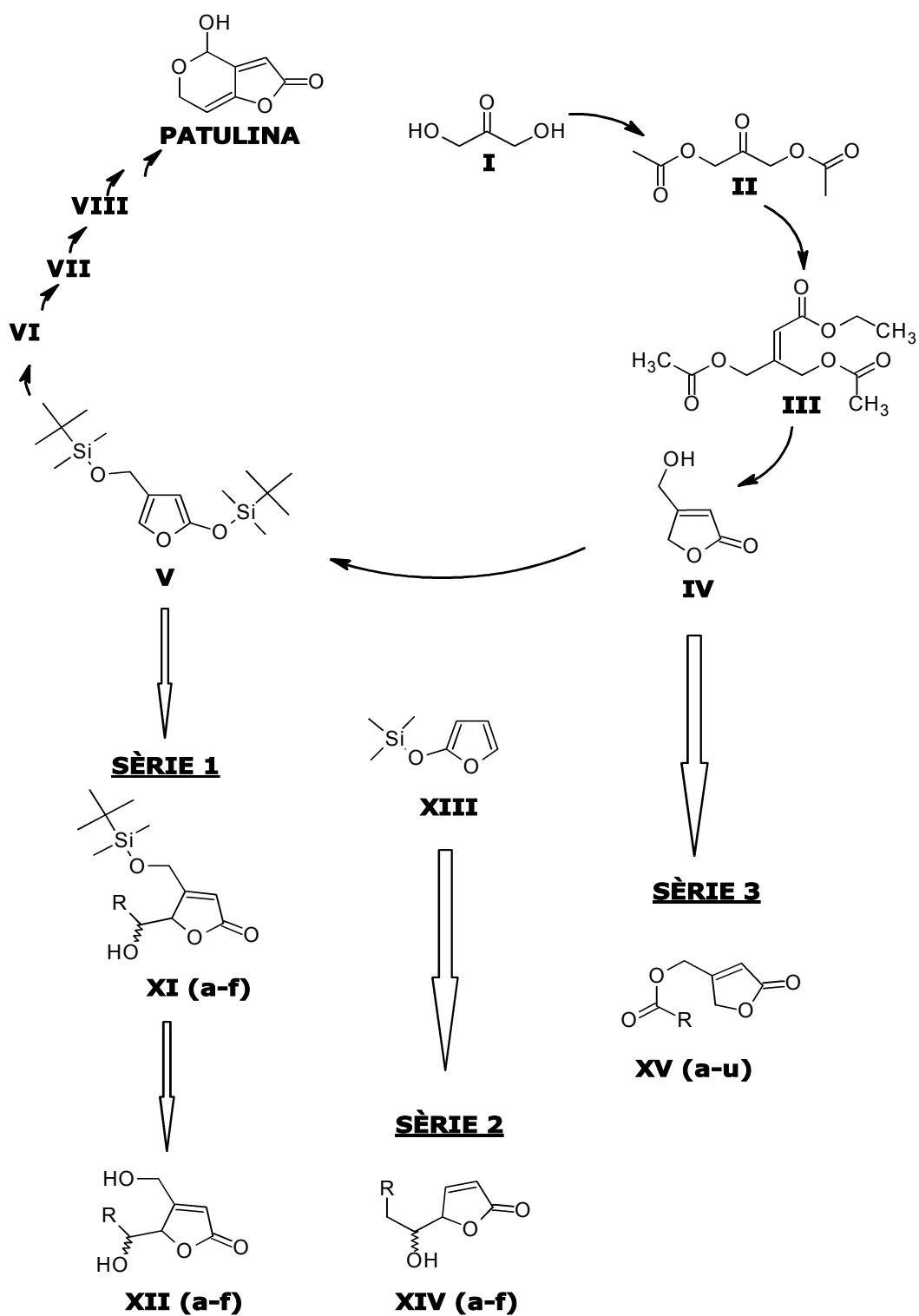


Figura 3.6. Diferents estratègies sintètiques dissenyades per a l'obtenció d'anàlegs estructurals de patulina encaminats a ser utilitzats com a patrons interns.

3.3.2.1. Síntesi de 5-(1-hidroxi)alquilfuranones a partir del *tert*-butil[(5-{*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-3-furil)metoxi] dimetilsilà (V)

Una vegada es va concloure que l'estratègia plantejada en la síntesi de patulina no havia donat els resultats esperats es va plantejar una nova aproximació, basada en la utilització del compost V per a preparar un seguit d'anàlegs estructurals obtinguts per addició 1,2 entre aquest i un conjunt d'aldehids de diferent estructura. El compost V reacciona amb facilitat amb aldehids per donar derivats de 4-hidroxi-5-(1-hidroxi)alquilfuranones, fàcilment convertibles en furanones. En aquest cas es va triar un total de 6 aldehids diferents descrits a l'apartat 2.2.3 de Material i Mètodes. La reacció entre cada un d'ells i el compost V, amb catalisi àcida (trifluorur de bor) hauria de portar a la formació de dos centres quirals a la nova estructura, fet que hauria d'originar una mescla de dos diaestereoisòmers.

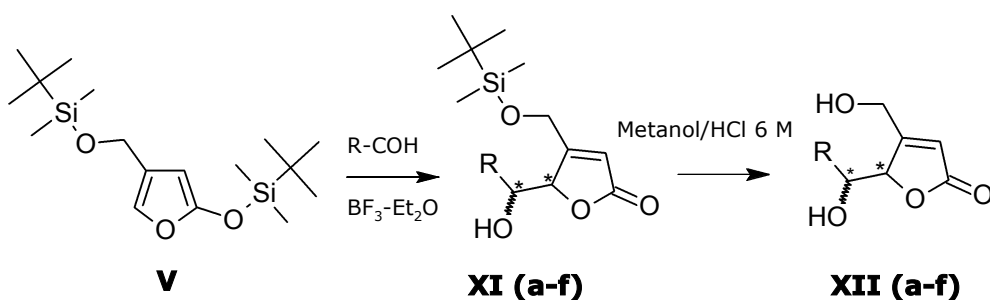


Figura 3.7. Reacció de síntesi de 5-(1-hidroxi)alquilfuranones a partir del compost V. S'indica amb un asterisc (*) els carbonis quirals.

Una vegada fetes les sis reaccions, es va procedir a analitzar els corresponents crús de reacció. Així, es van preparar solucions del cru de reacció en metanol que contenien aproximadament 50 µg/L teòrics de cada compost preparat, i es va procedir a realitzar una primera anàlisi per HPLC-DAD. D'aquesta manera s'avaluaven les possibles interferències a la longitud d'ona d'anàlisi de la patulina.

Ara bé, tant emprant una columna Spherisorb ODS-2 com una columna Symmetry C₁₈ només es van poder observar senyals cromatogràfiques assignables a un nou compost, en el cas del derivat preparat amb furfural i el producte V. Amb la primera columna s'observa dos pics (degut a la formació dels 2 diastereoisòmers) a un temps de retenció de 11 i 16 minuts, la fase mòbil utilitzada en aquesta anàlisi va ser aigua/tetrahidrofur (99:1). Mentre que amb la segona columna i utilitzant també la mateixa fase mòbil, s'obtenien els mateixos dos pics a temps de retenció menors. Per tal d'intentar descartar o no la formació dels corresponents productes de reacció es va procedir a analitzar cada un dels crús de reacció per HPLC-EM.

Donat que eren productes nous i que no es disposava de patrons, es va utilitzar per a l'anàlisi una interfase d'ionització per electropulverització i unes condicions inicials estàndard. Per la mateixa raó es van enregistrar simultàniament els espectres en mode positiu i negatiu i a dos voltatges de con diferents, 20 i 50 V. La fase mòbil utilitzada en aquesta ocasió va ser aigua:metanol (50:50).

Els resultats d'aquesta anàlisi confirmativa es presenten en la taula 3.10.

Taula 3.10. Resultat de l'anàlisi confirmativa per HPLC-EM de l'obtenció dels compostos XI (a-f). Fragments utilitzats per a la seva identificació, temps de retenció.

Compost	Massa nominal [M]	ESI⁻ [M-1]⁻	ESI⁺ [M+23]⁺	Tr* (min)	Condicions més favorables
XI-a	378	377	401	14,8	ESI⁺, 50V
XI-b	300	299	323	14,1	ESI⁺, 50V
XI-c	324	323	347	13,4	ESI⁺, 50V
XI-d	348	347	371	14,7	ESI⁺, 50V
XI-e	356	355	379	16,1	ESI⁺, 50V
XI-f	350	349		13,8	ESI⁻, 20 V

*Temps de retenció de la barreja de diastereoisòmers.

En les condicions descrites, el fragment observat majoritàriament per electropulverització en mode negatiu ha estat el $[M-1]^-$ i el majoritari en mode positiu ha estat el $[M+23]^+$, corresponent a la formació de l'adducte del fragment molecular amb un àtom de sodi, $[M+Na]^+$.

Aquesta primera anàlisi qualitativa va permetre confirmar la presència del producte d'interès, establir un ordre d'elució, comparar dos voltatges de con diferents i els modes de ionització. Considerant aquests últims paràmetres, s'ha indicat en la taula les condicions d'ionització més favorables atenent al mode positiu o negatiu i al voltatge del con.

Per a cada compost d'aquesta sèrie, excepte el XI-f, es va veure que la ionització positiva i 50 V de voltatge de con eren els paràmetres més favorables per a la seva anàlisi per electropulverització. Pel cas del XI-f les condicions millors foren ionització negativa i voltatge de con de 20 V.

Una observació que cal destacar, és que en utilitzar la fase mòbil aigua:metanol (50:50) i gradient, no s'observen els diastereoisòmers separats. Per aquest motiu en la taula 3.10, s'indica un únic temps de retenció, corresponent a la barreja de diastereoisòmers no separats.

A continuació es presenta una taula resum de la síntesi d'aquesta sèrie.

Taula 3.11. Síntesi sèrie 1. S'indiquen les quantitats de reactiu V utilitzades, les quantitats de producte obtingut sense purificar, i el rendiment brut estimat de cada compost.

Resum de la síntesi dels productes XI (a-f) a partir del compost V i els aldehids corresponents					
Compost V (mg)	mmols	Referència producte obtingut (XI)	Pes producte obtingut (mg)	mmols	Rendiment teòric (%)
358	1,04	XI-a	408,3	1,1	105,3
172	0,50	XI-b	155,9	0,52	104
177,7	0,52	XI-c	217	0,67	128,8
180	0,52	XI-d	185	0,53	101,9
189	0,55	XI-e	171	0,48	87,3
189,6	0,55	XI-f	236,7	0,67	121,8

Considerant que els productes d'aquesta sèrie tenien encara l'alcohol primari del substituent 4-hidroxietil protegit, fet que podia provocar un retard en el temps d'elució respecte a la patulina, es va procedir a desprotegir aquest grup funcional tal com està descrit en l'apartat 2.2.3.1 de Material i Mètodes, (veure figura 3.7 en aquest apartat).

Un cop desprotegits del grup *tert*-butildimetilsilil, es van analitzar per HPLC-EM cada un dels productes obtinguts per tal de confirmar la formació del producte desitjat i establir l'ordre d'elució cromatogràfica.

En la taula 3.12 es presenten els resultats de l'anàlisi qualitativa per HPLC-EM-ESI d'aquests sis crús de reacció.

Taula 3.12. Caracterització per ESI dels compostos XII (a-f). S'indica la referència del compost, la massa nominal, les masses dels fragments i/o adductes formats que s'han utilitzat per a caracteritzar-los, tant en mode negatiu com positiu, i el temps de retenció del producte en aquestes condicions.

Producte	Massa nominal [M]	ESI ⁻ [M-1] ⁻	ESI ⁺ [M+23] ⁺	Tr* (min)	Condicions més favorables
XII-a	264	263	287	4,5	ESI ⁺ , 20V
XII-b	186	185	209	2.6	ESI ⁺ , 20V
XII-c	210	209	233	2.8	ESI ⁺ , 20V
XII-d	234	233	257	4,2	ESI ⁺ , 20V
XII-e	242	241	265	10,8	ESI ⁺ , 20V
XII-f	236	235	259	-	-
Patulina				2.5	

*Temps de retenció de la barreja de diastereoisòmers.

El compost XII-f no va poder ser detectat, ja que va resultar ser un producte força inestable. Així, quan el cru de reacció es va dissoldre en diclorometà es va formar ràpidament un precipitat fosc, insoluble en qualsevol dels dissolvents que es van provar. Un procés de descomposició semblant va ser observat en fer servir altres dissolvents alternatius.

A continuació en la taula 3.13 es presenten el resultats de la reacció de desprotecció.

Taula 3.13. S'indica la referència i el pes del producte a desprotegir sense purificar, el pes brut del cru obtingut, el pes i el rendiment teòric de la reacció sense purificar. També es donen les dades del producte XI-f a pesar de què no es va identificar, com ja s'ha indicat abans.

Resum de la hidròlisi dels compostos XI (a-f)						
Compost	Pes (IX) (mg)	mmols	Pes de producte hidrolitzat	Ref. producte	mmols	Rendiment teòric (%)
XI-a	81,66	0,2	132,7	XII-a	0,5	250
XI-b	62,36	0,2	43,6	XII-b	0,2	100
XI-c	86,8	0,2	56,0	XII-c	0,3	150
XI-d	74,0	0,2	24,4	XII-d	0,1	50
XI-e	68,4	0,2	39,3	XII-e	0,2	100
XI-f	94,68	0,2	52,9	XII-f	0,2	100

Tenint en compte el temps de retenció (temps de la barreja de diastereoisòmers) respecte del de la patulina en aquestes condicions, es van escollir per a purificar i fer nous assajos els compostos XII-b i XII-c, amb temps de retenció de 2,6 i 2,8 min respectivament. La purificació es va portar a terme per cromatografia de "Dry flash" i les fraccions obtingudes es van analitzar per HPLC-EM. Els resultats del procés aplicat sobre els compostos seleccionats es resumeixen en la taula 3.14.

Taula 3.14. Resultats del procés de purificació dels compostos XII-b i XII-c. S'indica el pes de producte inicial, la fase mòbil utilitzada, el pes de les fraccions on s'ha separat i la composició de la fase mòbil que els ha separat.

Producte	Pes (mg)	F. mòbil	Fraccions reunides: pes (mg)	Composició de la F. mòbil
XII-b	108	CHCl ₃ /AcOEt 5-70%	F ₈₋₁₀ : 24,5 F ₁₁₋₁₅ : 8,5	40-50% 50-60%
XII-c	125	CHCl ₃ /AcOEt 5-70%	F ₁₀₋₁₉ : 35,7	50-60%

AcOEt.- Acetat d'etil.

3.3.2.2. Síntesi de 5-(1-hidroxi)alquilfuranones a partir de (2-furiloxi)(trimetil)silà

En essència aquesta reacció (Szlosek et al. 1998), és igual a la descrita en l'apartat 3.3.2.1. Es tracta d'una addició 1,2 del (2-furiloxi)(trimetil)silà, un compost comercial, sobre els mateixos 6 aldehids utilitzats per a l'obtenció dels derivats de 5-(1-hidroxi)alquilfuranones en l'apartat 3.3.2.1. Es va utilitzar el mateix catalitzador àcid, el BF_3 .

Els compostos preparats segons aquest protocol són els corresponent a la sèrie sintètica 2 (Figura 3.6) i s'han identificat amb la referència XIV.

Aquests compostos sintetitzats en aquesta segona sèrie també es van analitzar sense purificar, per tal de confirmar la seva preparació i veure el temps de retenció respecte de la patulina.

En la següent taula, tal com s'ha fet per la sèrie anterior es presenten els resultats de l'anàlisi per HPLC-EM. Com en el cas anterior, s'indiquen els fragments utilitzats per tal de caracteritzar-los, el temps de retenció en les condicions d'anàlisi descrites (veure apartat 3.3.2.1) i les condicions més favorables d'ionització i de voltatge de con.

Taula 3.15. Caracterització per ESI dels compostos XIV. S'indica la referència del compost, la massa nominal, les masses dels fragments i/o adductes formats que s'han utilitzat per a caracteritzar-los, tant en mode negatiu com positiu, i el temps de retenció del producte en aquestes condicions.

Compost	Massa nominal [M]	ESI ⁻ [M-1] ⁻	ESI ⁺ [M+23] ⁺	Tr* (min)	Condicions més favorables
XIV-a	234	233	257	5,1	ESI ⁺ , 50V
XIV-b	156	155	179	3,3	ESI ⁺ , 20V
XIV-c	180	179	203	2,8	ESI ⁺ , 20V
XIV-d	204	203	227	4,7	ESI ⁺ , 50V
XIV-e	212	211	235	11,4	ESI ⁺ , 20V
XIV-f	206	205	229	3,6	ESI ⁺ , 20 V
Patulina				2.5	

*Temps de retenció de la barreja de diastereoisòmers.

En la següent taula es presenten els rendiments teòrics corresponents a cada un dels productes preparats.

Taula 3.16. S'indiquen les quantitat de reactiu, de producte obtingut, la referència del compost preparat i el rendiment teòric de la reacció.

Resum de la síntesi dels compostos de la sèrie 2 (XIV) a partir de (2-furiloxi)(trimetil)silà (XIII)					
XI (mg)	mmols	Referència Producte obtingut	Pes producte obtingut (mg)	mmols	Rendiment teòric (%)
234,4	1,5	XIV-a	259,1	1,1	73,3
234,4	1,5	XIV-b	153	0,97	65,3
234,4	1,5	XIV-c	217	1,2	80,3
234,4	1,5	XIV-d	378,3	1,85	123,5
234,4	1,5	XIV-e	236	1,1	73,3
234,4	1,5	XIV-f	273	1,32	88,3

També com en el cas anterior, es van seleccionar aquells compostos amb un temps de retenció més proper al de la patulina per tal de purificar-los per cromatografia "Dry Flash". A continuació es presenta en forma de taula resum els resultats del procés de purificació.

Taula 3.17. Resultats del procés de purificació dels compostos XIV seleccionats. S'indica els pes de producte a purificar, la composició de la fase mòbil utilitzada, el número de les fraccions on s'han separat, el pes de producte purificat i la composició de la fase mòbil que els ha separat.

Producte	Pes (mg)	F. mòbil	Número i pes fraccions (mg)	Polaritat fracció
XIV-b	153	Hex/AcOet 5-60%	F ₁₁₋₁₃ : 14,2 F ₁₄₋₁₅ : 10,9 F ₁₇₋₁₈ : 23,1 F ₁₉₋₁₃ : 28,8	30% 40% 40% 50%
XIV-c	217	Hex/AcOet 5-80%	F ₁₅₋₂₁ : 179,8	40-50%
XIV-f	273	Hex/AcOet 20-90%	F ₁₂₋₁₉ : 134,3 F ₂₀₋₂₇ : 11,7	40-50% 60-70%

AcOet.- Acetat d'etil
Hex.- Hexà.

Igualment com en l'apartat anterior la separació del compost d'interès en les fraccions es va confirmar per HPLC-EM.

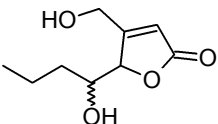
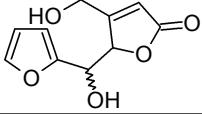
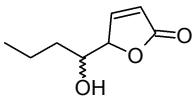
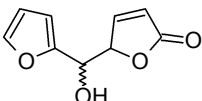
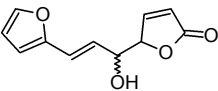
3.3.2.3. Anàlisi de les 5-(1-hidroxiàlquil)furanones seleccionades per HPLC-EM

Els compostos seleccionats i purificats en els apartats 3.3.2.1 i 3.3.2.2 es van analitzar conjuntament utilitzant les condicions d'anàlisi de patulina per HPLC-DAD seguint el mètode d'extracció i purificació de *Rovira et al.* (Rovira et al. 1993). Aquest mètode utilitza una fase mòbil que és pràcticament aigua (aigua/THF, 99:1). Es tracta d'una fase mòbil que, a part de ser

especialment econòmica, permet separar clarament la patulina del 2-hidroximetilfurfural. Ara bé, el canvi de fase mòbil respecte a l'emprada en els apartats anteriors, va implicar la necessitat de determinar de nou el temps de retenció dels compostos sintetitzats i comprovar també la possible presència d'alguna impuresa que pogués interferir en l'anàlisi de patulina.

Els resultats d'aquesta nova anàlisi es presenten en la taula 3.18.

Taula 3.18. Anàlisis dels compostos XII i XIV seleccionats per HPLC segons el mètode de Rovira et al., (Rovira et al. 1993). Es presenta l'estructura del compost, la fracció "Dry Flash" on s'han separat i el temps de retenció en les noves condicions.

Estructura	Compost	Fracció Dry Flash	**Tr Mètode Rovira et al.
	XII-b	F ₈₋₁₀	Tr > 20 min
		F ₁₁₋₁₅	
	XII-c	F ₁₀₋₁₉	11,3-12,7
Patulina			8,1
	XIV-b	F ₁₁₋₁₃	Tr > 20 min
		F ₁₄₋₁₅	
		F ₁₇₋₁₈	
		F ₁₉₋₁₃	
	XIV-c	F ₁₅₋₂₁	14,1-16,5
	XIV-f	F ₁₂₋₁₉	Tr > 20 min
		F ₂₀₋₂₇	

**S'indica el temps de retenció corresponent a cada diastereoisòmer.

A la vista dels resultats, es dedueix que els únics productes susceptibles de ser utilitzats com a patrons interns en l'anàlisi de patulina per HPLC-EM són el XII-c i el XII-c. Ambdós presenten temps de retenció no massa allunyats

del que presenta la patulina en les mateixes condicions d'anàlisi i a la vegada surten en una zona del cromatograma on no s'observa cap senyal cromatogràfica interferent en les condicions de detecció emprades. El doble temps de retenció indicat per aquests dos compostos és degut a la presència dels dos diastereoisòmers formats a conseqüència, com ja s'ha comentat, de la presència en aquestes molècules de dos carbonis asimètrics i que s'aconsegueixen separar quan s'utilitza aigua:tetrahidrofurà (99:1) com a fase mòbil.

La resta de compostos es van descartar per eluir a temps de retenció massa diferents del de la patulina (Tr 8,1 min).

A continuació es presenten els cromatogrames enregistrats en PDA dels compostos escollits on es pot apreciar el doble pic degut als diastereoisòmers.

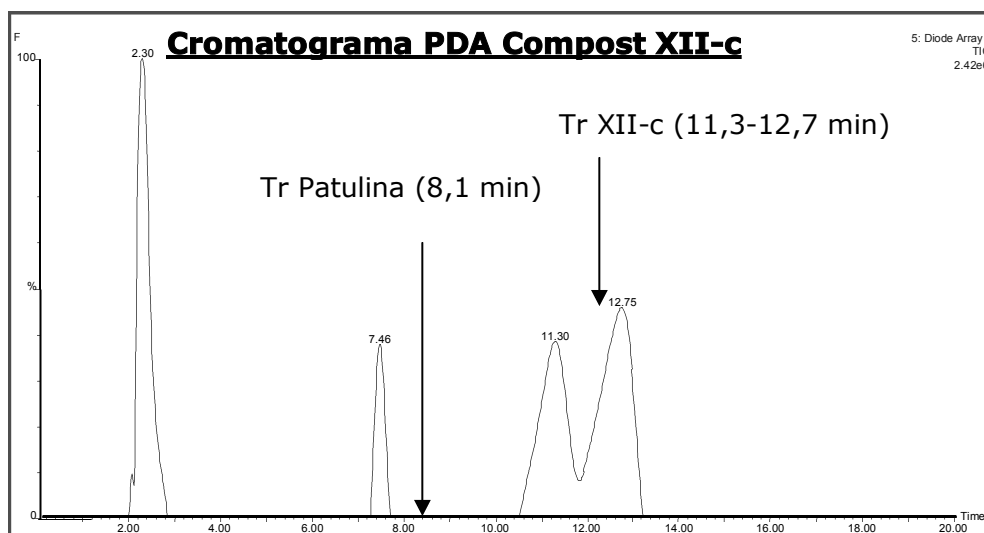


Figura 3.8. Cromatograma del compost de la sèrie 1, el XII-c, seleccionat per a ser provat com a patró intern en l'anàlisi de patulina per HPLC-EM. S'indica amb una fletxa la posició teòrica, (Tr) de la patulina i el temps de retenció dels dos diastereoisòmers.

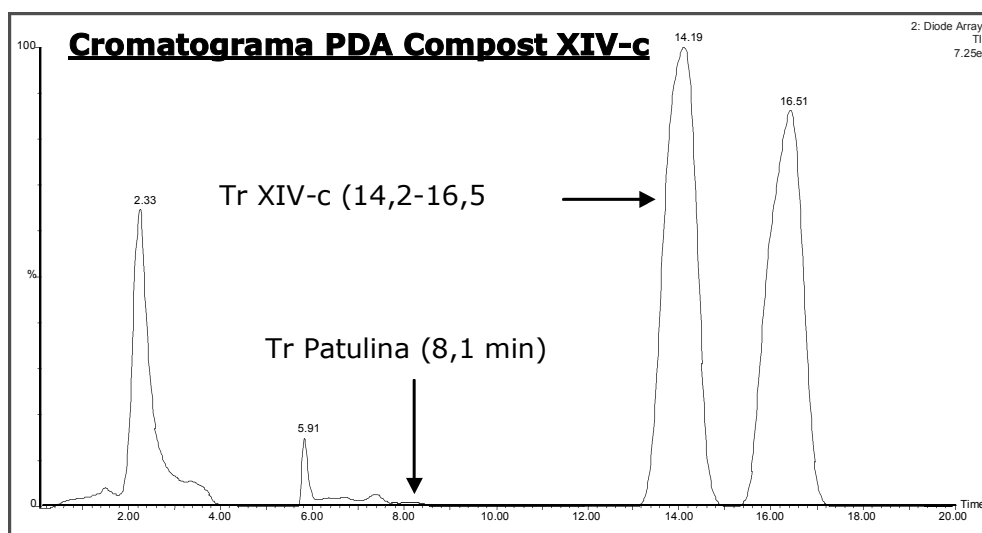


Figura 3.9. Cromatograma del compost de la sèrie 2, el XIV-c, seleccionat per a ser provat com a patró intern en l'anàlisi de patulina per HPLC-EM. S'indica amb una fletxa la posició teòrica, (Tr) de la patulina i el temps de retenció dels dos diastereoisòmers.

3.3.2.4. Síntesi d'èsters a partir de la 4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (IV)

La preparació d'aquests compostos obeeix a la mateixa estratègia que la dels apartats anteriors. Es tracta d'aprofitar un reactiu intermediari en la ruta sintètica de la patulina segons els protocol de *Boukouvalas i Maltais*, per tal de preparar a través d'una reacció senzilla, una bateria de compostos per tal de ser assajats com a patrons interns en l'anàlisi de patulina en suc de poma, ja sigui per cromatografia de gasos o líquida acoblada a l'espectrometria de masses.

En aquest cas en concret es va procedir a sintetitzar un seguit d'èsters, aprofitant el grup hidroxil present al compost 4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona (IV), amb un seguit d'àcids comercials d'estructura molt variada. Es va escollir un total de 21 àcids diferents (veure apartat 2.2.5. del capítol de Material i Mètodes) i la síntesi en paral·lel es va dur a terme emprant N-ciclohexilcarbodiimida lligada a un suport sòlid, concretament a una resina de poliestirè-divinilbenzè. La utilització d'aquest reactiu suportat va

condicionar el dissolvent a utilitzar. Els dissolvents compatibles amb la utilització d'aquest tipus de resines són: diclorometà, dicloroetà, tetrahidrofur i dimetilformamida.

L'avantatge de preparar reaccions en fase sòlida, és que el producte de la reacció es recupera en el filtrat de la reacció pràcticament pur, es pot treballar a petita escala, amb petites quantitat de reactius i es pot optimitzar la seva preparació amb la utilització de carrusels de reacció que permeten la síntesi simultània de varis productes.

En la figura 3.10 es presenta l'esquema d'obtenció de la sèrie 3 de compostos.

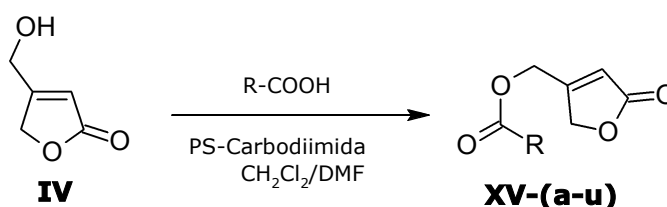


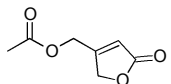
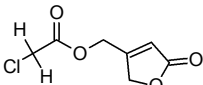
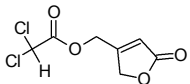
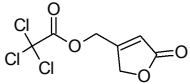
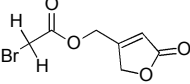
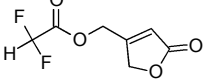
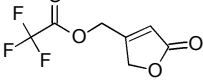
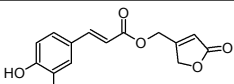
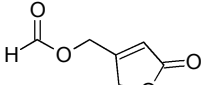
Figura 3.10. Obtenció de la sèrie 3 de compostos. Reacció d'esterificació a partir del compost IV i 21 àcids diferents.

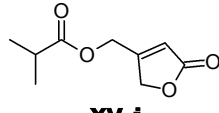
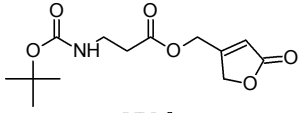
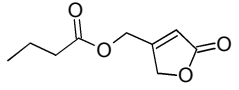
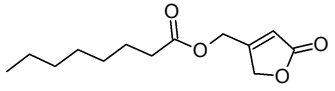
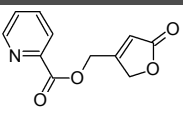
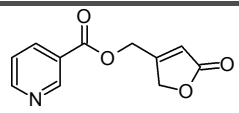
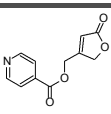
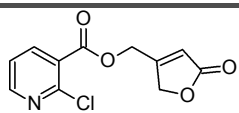
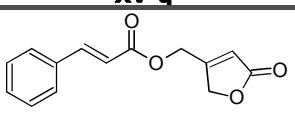
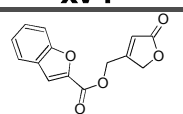
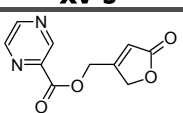
En aquesta tercera sèrie es van sintetitzar un total de 21 èsters, XV (a-u) i es van caracteritzar per CG-EM un total de 15. En la taula 3.19 es presenten les estructures químiques dels productes que es pretenia preparar i l'espectre de masses per impacte electrònic dels 15 productes obtinguts.

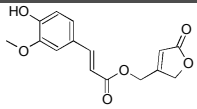
L'èter XV-h preparat a partir de l'àcid cafeic (àcid (E)-3-(3,4 dihidroxifenil)-2-propenoic) no es va poder caracteritzar per CG-EM, doncs, no va ser prou volàtil. No es va observar la formació de cap derivat en el cas dels àcids picolínic, nicotínic, cloronicotínic, isonicotínic i pirazinacarboxílic.

Segurament degut a la dificultat de solubilitzar-los en el dissolvent que es va utilitzar.

Taula 3.19. Relació de compostos preparats en la sèrie 3. Es presenta l'estructura, la fórmula empírica, la massa molecular (MM), l'espectre de masses i el temps de retenció en la seva anàlisi per CG-EM.

Síntesi d'èsters a partir dels compost IV			
COMPOST	*Tr (min)	F.E/MM	EM
 <p>XV-a</p>	6,1	C ₇ H ₈ O ₄ 156,14	m/z 53 (9), 55 (13), 68 (66), 96 (100), 156 [M ⁺] (2)
 <p>XV-b</p>	8,3	C ₇ H ₇ ClO ₄ 190,58	m/z 53 (12), 67 (95), 68 (42), 77 (37), 79 (12), 190 [M ⁺] (2)
 <p>XV-c</p>	8,6	C ₇ H ₆ Cl ₂ O ₄ 225,03	m/z 53 (11), 67 (96), 68 (43), 76 (12), 83 (46), 85 (53), 96 (100), 97 (56), 224 [M ⁺] (2)
 <p>XV-d</p>	9,1	C ₇ H ₅ Cl ₃ O ₄ 259,50	m/z 53 (14), 67 (100), 68 (36), 83 (13), 83 (12), 96 (84), 97 (62), 117 (43), 119 (46), 121 (16)
 <p>XV-e</p>	8,6	C ₇ H ₇ BrO ₄ 235,03	m/z 55 (11), 67 (36), 68 (36), 85 (30), 96 (100), 97 (19), 121 (24), 123 (24), 234 [M ⁺] (2)
 <p>XV-f</p>	5,8	C ₇ H ₆ F ₂ O ₄ 192,12	m/z 51 (58), 57 (13), 67 (69), 68 (46), 85 (50), 96 (100), 97 (28), 121 (2), 125 (6)
 <p>XV-g</p>	4,5	C ₇ H ₅ F ₃ O ₄ 210,11	m/z 55 (18), 59 (46), 67 (58), 68 (44), 69 (88), 87 (20), 96 (100), 97 (41), 153 (25), 181 (17)
 <p>XV-h</p>	-	C ₁₄ H ₁₂ O ₆ 276,24	No volàtil
 <p>XV-i</p>	5,3	C ₆ H ₆ O ₄ 142,11	m/z 53 (10), 55 (36), 57 (19), 66 (12), 67 (33), 68 (47), 70 (19), 85 (31), 96 (100), 142 [M ⁺] (2)

Síntesi d'èsters a partir dels compost IV (continuació 1)			
COMPOST	*Tr (min)	F.E/MM	EM
 <p>XV-j</p>	7,1	C ₉ H ₁₂ O ₄ 184,19	m/z 43 (90), 67 (36), 71 (100), 96 (66), 184 [M ⁺] (4)
 <p>XV-k</p>	11,9	C ₁₃ H ₁₉ NO ₆ 285,29	m/z 56 (24), 57 (100), 67 (15), 88 (36), 98 (34), 184 212 (14)
 <p>XV-l</p>	7,4	C ₉ H ₁₂ O ₄ 184,19	m/z 43 (84), 67 (36), 71 (100), 96 (53), 184 [M ⁺] (2)
 <p>XV-m</p>	10,3	C ₁₃ H ₂₀ O ₄ 240,30	m/z 57 (100), 67 (54), 96 (74), 110 (22), 114, (12), 127 (63), 156, (40), 240 [M ⁺] (13)
 <p>XV-n</p>	-	C ₁₁ H ₉ NO ₄ 219,19	-
 <p>XV-o</p>	-	C ₁₁ H ₉ NO ₄ 219,19	-
 <p>XV-p</p>	-	C ₁₁ H ₉ NO ₄ 219,19	-
 <p>XV-q</p>	-	C ₁₁ H ₈ ClNO ₄ 253,64	-
 <p>XV-r</p>	12,5	C ₁₄ H ₁₂ O ₄ 244,24	m/z 51 (26), 68 (26), 77 (57), 103 (61), 131, (100), 147 (26), 244 [M ⁺] (30)
 <p>XV-s</p>	13,0	C ₁₄ H ₁₀ O ₅ 258,23	m/z 63 (31), 68 (29), 89 (65), 96 (57), 118, (15), 145 (86), 162 (84), 258 [M ⁺] (100)
 <p>XV-t</p>	-	C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₄ 220,18	-

Síntesi d'èsters a partir dels compost IV (continuació 2)			
COMPOST	*Tr (min)	F.E/MM	EM
 <p>XIII-u</p>	8,9	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ 290,27	m/z 51 (39), 62 (17), 73 (31), 175 (25), 203 (57), 205 (36), 218 (100), 220 (63), 290 [M ⁺] (2)

* Temps de retenció (Tr) obtinguts en les condicions d'anàlisi descrites a l'apartat 2.1.2.5.2. de Material i Mètodes.

En una primera aproximació, i tenint en compte el temps de retenció de la patulina, que en aquestes condicions és de 7,1 min, dels quinze compostos obtinguts es van seleccionar per a una anàlisi posterior per CG-EM els sis compostos indicats en la taula 3.20.

Taula 3.20. Relació dels èsters seleccionats disposats en ordre creixent d'acord al seu temps de retenció (Tr).

Compost	Tr
XV-i	5,3
XV-a	6,8
Patulina	7,1
XV-j	7,1
XV-l	7,4
XV-b	8,3
XV-e	8,6

Amb aquests sis compostos es va realitzar un primer estudi per tal de determinar la seva potencial utilitat com a possibles patrons interns en l'anàlisi de patulina en suc de poma per CG-EM. L'estudi va consistir en determinar la recuperació absoluta de cada un d'ells en un procés estàndard

d'anàlisi de patulina. La descripció detallada d'aquest estudi es fa a l'apartat 3.5.1. A partir dels resultats d'aquest estudi preliminar, considerant els valors de recuperació absoluta dels mateixos al llarg del protocol d'extracció-purificació, es va concloure que només quatre dels sis presentaven valors de recuperació adequats per tal de ser potencialment emprats com estàndards interns en el protocol d'anàlisi de patulina en suc de poma considerat.

Una vegada escollits aquests quatre compostos i per tal de disposar de major quantitat dels mateixos es va procedir a sintetitzar cada un d'ells segons el mètode descrit a l'apartat 2.2.5.1 de Material i Mètodes. Aquest mètode és una alternativa a la preparació d'èsters en fase sòlida. La reacció, en aquest cas, té lloc en dissolució. Si s'hagués volgut preparar la mateixa reacció en fase sòlida, utilitzant l'estequiometria original, s'hagués hagut d'emprar una quantitat de resina important, que a la vegada que encaria molt el procés introduïa problemes en l'homogeneïtzació del cru de la reacció per la dificultat d'agitar de forma suau el matràs de reacció.

La taula 3.21. recull els resultats de la síntesi d'èsters en fase líquida.

Taula 3.21. Síntesi en fase líquida dels èsters seleccionats. S'indiquen les quantitats de producte IV utilitzades, el pes de producte obtingut i el rendiment teòric de la reacció.

Síntesi d'èsters en fase líquida a partir del compost IV					
Compost IV (mg)	mmols	Producte	Pes obtingut (mg)	mmols	Rendiment teòric (%)
75,3	0,66	XV-a	95,6	0,61	92,7
75,3	0,66	XV-b	130,3	0,69	104,7
75,3	0,66	XV-j	134,2	0,68	103,6
75,3	0,66	XV-l	90,4	0,49	74,3

La preparació d'èsters en fase líquida va fer necessària la purificació del producte obtingut. Tal com està descrit en l'apartat 2.2.5.1 els compostos preparats segons aquest protocol es van purificar per cromatografia "Dry Flash" i, un cop purificats, es van caracteritzar estructuralment.

A continuació es presenta una taula amb els resultats de la purificació dels productes per "Dry Flash".

Taula 3.22. Resultats de la purificació dels èsters obtinguts per síntesi en fase líquida. S'indica el pes de producte a purificar, la composició de la fase mòbil utilitzada, el número de les fraccions on s'han separat i la polaritat de la fracció.

Producte	Pes (mg)	F. mòbil	Pes fracció	Polaritat fracció
XV-a	95,6	Hex/AcOEt 10-90%	F ₁₆₋₂₄ : 20,0 mg	40-90%
XV-b	130,3	Hex/AcOEt 10-50%	F ₁₂₋₁₆ : 67,6 mg	40%
XV-j	90,4	Hex/AcOEt 15-30%	F ₈₋₁₆ : 32,6 mg	25%
XV-l	134,2	Hex/AcOEt 20-50%	F ₆₋₁₁ : 61,0 mg	30%

AcOEt.- Acetat d'etil
Hex.- Hexà.

3.4. Anàlisi de patulina per HPLC-EM

El mètode cromatogràfic utilitzat per a l'anàlisi de patulina per HPLC és el que es va posar a punt en el Departament de Química en un treball previ (Rovira et al. 1993). En aquest treball s'utilitzava la barreja aigua:tetrahidrofuran en la proporció (99:1) com a fase mòbil, i una columna de fase invertida C₁₈ amb detecció UV.

Les variacions introduïdes per nosaltres, condicionades pel tipus de detector (EM), van ser: escollir una columna analítica de dimensions més reduïdes de forma que fos possible treballar a un flux de 0,2 mL/min, compatible amb la interfase d'electropulverització, sense necessitat de treballar amb el flux dividit mitjançant un divisor de flux. Així, doncs, donada l'experiència de què es disposava amb la utilització de columnes de fase invertida Symmetry C₁₈ es va triar aquesta columna per a l'anàlisi HPLC, (Veure apartat 2.1.9. de Material i Mètodes).

Un altra modificació introduïda va ser la d'ajustar el pH de l'aigua de la fase mòbil a 4 amb àcid acètic tal com s'indica en el mètode oficial 995.10 de la AOAC (AOAC 1995) per a la preparació dels patrons de patulina.

Es va utilitzar un detector de masses amb dos tipus de sondes per a ionitzar la mostra en l'acoblament HPLC-EM, la sonda o interfase per electropulverització (electrospray, ESI) ja sigui en mode positiu (ES⁺) o negatiu (ES⁻) i la interfase per sonda d'ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) també en mode positiu i negatiu.

3.4.1. Anàlisi de patulina per HPLC i ionització per electropulverització (ESI)

Un aspecte important de l'anàlisi mitjançant electropulverització consisteix en trobar els paràmetres instrumentals d'anàlisis més apropiats pel tipus de compost a analitzar. Aquests paràmetres fan referència a la font

d'ionització, (com per exemple el voltatge del capillar, el del con, el de l'extractor) a la temperatura de la font, del gas de desolvatació, el flux del gas de nebulització. És important ajustar aquest paràmetres per tal de trobar els valors òptims d'adquisició per a cada tipus d'anàlisi.

Optimització dels paràmetres del "tune" per a l'anàlisi de patulina per ESI

Es va preparar una solució de patulina de 20 µg/mL en fase mòbil (aigua:THF, 99:1) i es va analitzar mitjançant infusió directa a raó de 5 µL/min. Es va sintonitzar el fragment m/z 153, [M-1]⁻, en mode ES⁻ i es va procedir a ajustar els paràmetres com s'indica en els següents punts per tal d'obtenir la màxima abundància del fragment sintonitzat.

Efecte de la temperatura de desolvatació

Es va considerar que tenint en compte la composició de la fase mòbil, majoritàriament aigua, la temperatura de desolvatació seria un paràmetre a tenir en compte. L'augment de la temperatura de desolvatació mantenint la resta de paràmetres constant es va traduir en un augment de l'abundància del fragment m/z 153, però també va augmentar la formació d'adductes, el més abundant va ser el corresponent a m/z 189 que corresponia a [M-1+2H₂O]⁻ l'adducte amb dos molècules d'aigua.

Tenint en compte que l'anàlisi quantitativa s'ha de fer en mode SIR (Selected Ion Recording), també anomenat SIM (Selected Ion Monitoring), la presència o formació d'adductes no hauria d'afectar l'anàlisi (si aquests són estables) i és per aquest motiu que es va fixar el valor de la temperatura de desolvatació a 300°C, temperatura a la qual s'obtenia una major sensibilitat per a la massa 153, l'escollida per a l'anàlisi de patulina.

Efecte del voltatge del con

Per tal d'avaluar aquest paràmetre, es va utilitzar com a mètode d'introducció de mostra a la font una solució de patulina de 100 µg/mL en fase mòbil (aigua/THF, 99:1) a través d'una vàlvula connectada directament a la font. Es va injectar un volum de 20 µL. D'aquesta forma també s'avaluava la influència de la fase mòbil en el procés d'ionització, ja que el flux de fase mòbil des de la vàlvula a la interfase d'ionització és de 0,2 mL/min i és el mateix que en una anàlisi en columna. Per a cada injecció a través de la vàlvula, es van enregistrar les dades en mode d'escaneig en un interval de 100-260 amu i a 4 voltatges de con diferents: 10, 20, 30 i 40 volts.

L'augment del voltatge del con mantenint la resta de paràmetres fixes, va implicar un canvi qualitatiu en l'espectre enregistrat. Conforme augmenta el voltatge, disminueix la formació d'adductes i, a 40 v, l'espectre només presentava dos fragments majoritaris el m/z 153 i el 109, però l'abundància del m/z 153 era inferior que a 20v.

Voltatge del capillar

Aquest paràmetre, si bé en un principi es va observar que augmentant el seu valor augmentava l'abundància del fragment m/z 153, es va haver de mantenir a 3 KV perquè en l'anàlisi en mode negatiu es va observar descàrrega de corona a l'extrem del capil·lar, fenomen que pot afectar a la reproductibilitat de les anàlisis (Cole and Harrata 1993; Gaskell 1997).

En resum els paràmetres optimitzats per a l'anàlisi de patulina per electropulverització van ser:

Voltatge del capillar: 3 KV

Voltatge con: 20 v

T.de la font: 110°C

T. de desolvatació 300°C

Flux de N₂: 400 L/h

Optimització dels paràmetres d'anàlisi dels compostos susceptibles de ser utilitzats com a patrons interns en l'anàlisi de patulina per HPLC-EM-ESI

Una vegada optimitzats els paràmetres del "tune" per a l'anàlisi de patulina, calia trobar aquells paràmetres que es poguessin modificar en cada adquisició de dades per al patró intern. Així, es podia mirar el mode d'ionització més adequat, positiu o negatiu, i el voltatge del con que donava major sensibilitat per al registre d'un determinat fragment del patró intern.

En aquest cas es van preparar les corresponents dissolucions del compost d'interès de 100 µg/mL de concentració. Es va utilitzar com a dissolvent aigua:tetrahidrofuran (99:1) o, en el cas de què la substància no fos soluble, es va utilitzar metanol aigua (50:50). Seguidament es van injectar 20 µL de cada una de les dissolucions corresponents a través d'una vàlvula.

En la taula següent es presenten els resultats pel conjunt de compostos escollits.

Taula 3.23. Optimització dels paràmetres d'anàlisi per als compostos seleccionats. S'indica per a cada mode d'ionització els fragments utilitzats més abundants i el voltatge del con que va donar major sensibilitat.

Compost	ES ⁺			ES ⁻	
	[M+1] ⁺	[M+23] ⁺	Voltatge con (v)	[M-1] ⁺	Voltatge con (v)
XII-c	211	233	10	209	10
XIV-c	181	203	10		
XV-a	157	179	10	155	10
XV-i	143		10		

De tots aquests compostos sintetitzats es va triar el XIV-c per tal d'estudiar el seu possible ús com a patró intern. El compost XII-c, una de les 5-(1-

hidroxialquil)furanones de la primera sèrie es va descartar al no poder resoldre correctament els dos pics cromatogràfics corresponents als dos diastereoisòmers. Aquesta manca de resolució afectava negativament la integració de cada pic. El pic cromatogràfic corresponent al compost XV-i també presentava problemes de manca de resolució amb altres components de la matriu, fet que dificultava també la seva integració. Per últim, l'èster XV-a presentava interferències en la zona d'elució de la patulina.

3.4.1.1. Anàlisi quantitativa de patulina per HPLC i ionització per electropulverització (ESI) utilitzant el compost XIV-c com a patró intern

En aquest primer assaig es va estudiar el comportament del compost XIV-c com a patró intern en l'anàlisi de patulina per electropulverització.

Es van preparar patrons en matriu, per triplicat (veure protocol descrit en la secció 2.2.8.2. de Material i Mètodes) que corresponien a valors de patulina en suc de poma de 5, 10, 15, 20, 30 i 50 µg/L. Com a dissolvent es va utilitzar metanol:aigua pH 4 (50:50) i es van injectar 20 µL. Les condicions d'anàlisi són les descrites a l'apartat 2.2.9 de Material i Mètodes. També es van preparar patrons sense matriu en metanol:aigua pH 4 (50:50) de la mateixa concentració per tal d'avaluar l'efecte de la matriu en l'anàlisi. La concentració de patró intern era de 50 ng/µL .

Els fragments enregistrats van ser el m/z 153 [M-1]⁻ i el m/z 154 [M]⁻ per la patulina, el m/z 181 [M+1]⁺ i el 203 [M+23]⁺ pel patró intern (XIV-c).

Per a la quantificació es van utilitzar els fragments de major abundància: el m/z 153 [M-1]⁻ per la patulina i el m/z 203 [M+23]⁺ pel patró intern (XIV-c).

El compost XIV-c, com ja s'ha mencionat, presentava dos pics cromatogràfics, corresponents a cada un dels dos diastereoisòmers. Es van

preparar rectes de calibratge considerant en cada una, un dels dos diastereoisòmers. D'aquesta manera es podia avaluar la utilitat de disposar per separat de cada un dels dos isòmers.

Taula 3.24. Valors del calibratge de patulina utilitzant patrons preparats en matriu de suc de poma i prenent com a referència de patró intern el pic 1 (pic de menor temps de retenció). S'indica la concentració dels patrons, el valor de la mitjana de la relació m/z 153/203, la desviació estàndard (DE), la desviació estàndard relativa DER % per a n=3 rèpliques, l'equació de la recta i el valor del coeficient de determinació R².

Calibratge patulina ESI, Pic 1 (PI)			
Concentració a suc (µg/L)	Mitjana A-153/A-203 (n=3)	DE (n=3)	DER % (n=3)
5	0,10	0,027	26,20
10	0,21	0,030	14,03
15	0,28	0,037	12,99
20	0,39	0,043	11,08
30	0,57	0,038	6,72
50	0,81	0,003	0,42
Y = 0,016x + 0,06; R² = 0,987			

La resposta (y) ve indicada per la relació entre l'àrea de l'ió m/z 153 de la patulina i el m/z 203 del patró intern, integrant en aquest cas el primer pic (pic1) que correspon al diastereoisòmer que elueix primer.

En la taula següent es presenten els resultats obtinguts quan s'utilitza el segon pic (pic 2) del patró intern. S'indiquen els valors numèrics, igual que en la taula anterior, però aquí s'ha utilitzat l'àrea del segon pic del patró intern per a preparar la recta.

Taula 3.25. Valors del calibratge de patulina utilitzant patrons preparats en matriu de suc de poma i prenent com a referència de patró intern el pic 2 (pic de major temps de retenció). S'indica la concentració dels patrons, el valor de la mitjana de la relació m/z 153/203, la desviació estàndard (DE), la desviació estàndard relativa DER % per a n=3 rèpliques, l'equació de la recta i el valor del coeficient de determinació R².

Calibratge patulina ESI, Pic 2 (PI)			
Concentració a suc (µg/L)	Mitjana A-153/A-203 (n=3)	DE (n=3)	DER % (n=3)
5	0,16	0,04	26,22
10	0,27	0,05	18,92
15	0,37	0,08	20,54
20	0,54	0,07	11,08
30	0,74	0,04	6,18
50	1,13	0,14	12,12
Y = 0,022x + 0,06; R² = 0,995			

En ambdós casos es pot veure que la reproductibilitat no es gaire bona tenint en compte que les tres sèries de patrons es van preparar exactament igual a partir de les mateixes solucions de calibratge. Si assumim que no hi ha errors en la preparació dels patrons cal atribuir aquesta desviació, valors de DER >15 %, a la diferent resposta del detector envers l'anàlit i el patró intern quan hi ha present la matriu del suc de poma.

També resulta curiós observar l'augment de resposta quan s'utilitza el segon pic de l'estàndard intern per a quantificar. Tot i tenint en compte la diferent proporció entre els dos diastereoisòmers, no s'esperaria observar un canvi de pendent tant pronunciat. L'increment de resposta és de l'ordre del 12,5-14%.

Per tal d'avaluar l'efecte de la matriu en l'anàlisi de patulina per ESI, es van comparar les rectes de calibratge obtingudes amb patrons preparats sobre

matriu de suc de poma i patrons preparats sense matriu considerant també en cada cas la utilització d'un i altre pic del patró intern.

A continuació es presenten les gràfiques comparatives on es posa de manifest l'influència de la matriu en l'anàlisi.

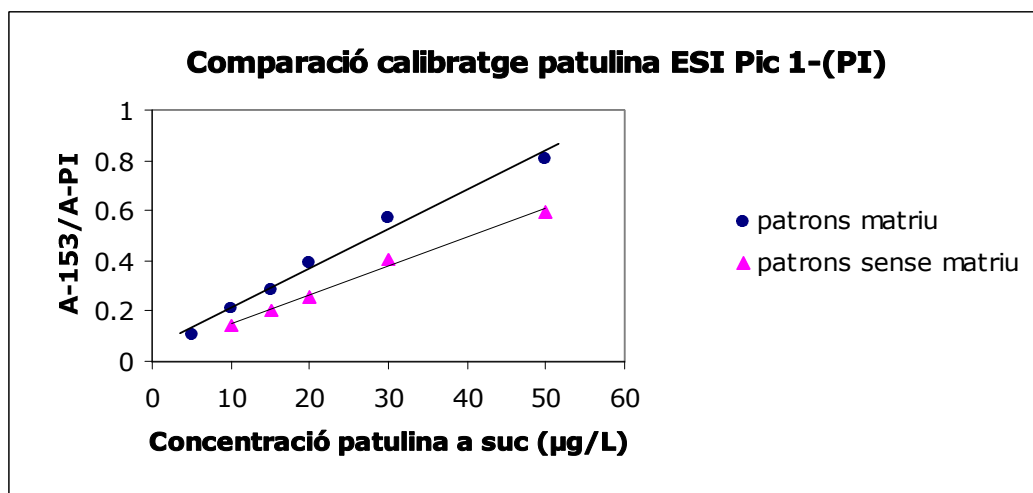


Figura 3.11. Efecte de la matriu en l'anàlisi de patulina per ESI. Es comparen les rectes de calibratge obtingudes amb patrons preparats en matriu de suc i sense, utilitzant com a patró intern el diastereoisòmer 1 (Pic1).

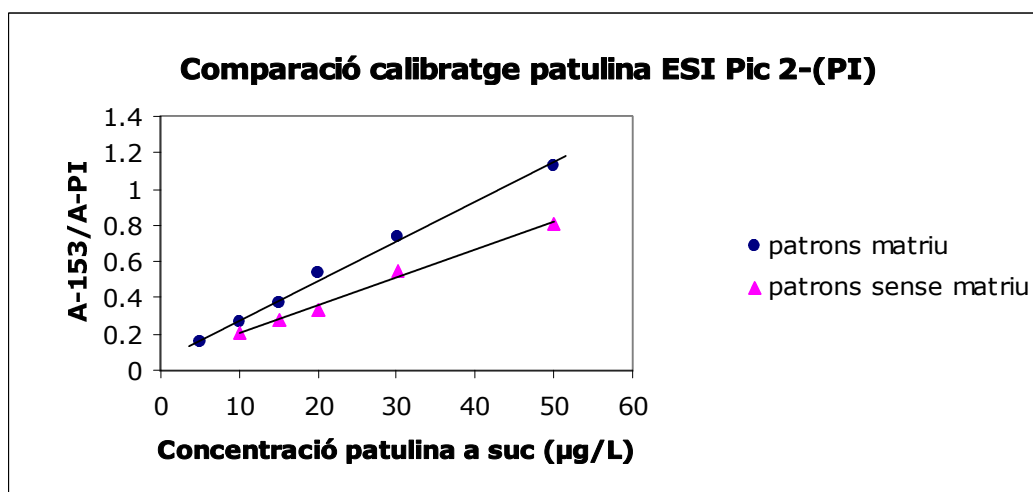


Figura 3.12. Efecte de la matriu en l'anàlisi de patulina per ESI. Es comparen les rectes de calibratge obtingudes amb patrons preparats sobre matriu de suc i sense, utilitzant com a patró intern el diastereoisòmer 2 (Pic2).

En ambdues gràfiques es pot observar el canvi de pendent en el cas que s'utilitzi un o altre diastereoisòmer (pic 1 o pic 2) del patró intern. Aquest canvi afecta tant als patrons preparats en matriu com als altres. El pendent de les rectes generades amb patrons amb matriu és més gran en ambdós casos, tant si es considera el pic 1 com el pic 2 del patró intern. Aquest efecte és a priori sorprenent, doncs, en la majoria de les anàlisis per ionització mitjançant electropulverització, els components de la matriu en general, actuen suprimint en cert grau la ionització de l'anàlit. Efecte que es coneix amb el nom de supressió iònica i es produeix per una competència en l'eficiència de la ionització entre les molècules de la matriu i les de l'anàlit. El mecanisme exacte d'aquest efecte resulta encara ara desconegut (Taylor 2005). Una discussió més detallada d'aquest fenomen es presenta al final d'aquest capítol.

Per veure si aquest efecte era degut més al patró intern que a la pròpia matriu es van comparar els resultats del calibratge de patulina obtinguts sense la utilització de patró intern. Es van comparar els patrons preparats en matriu i sense, aquest cop sense considerar el patró intern.

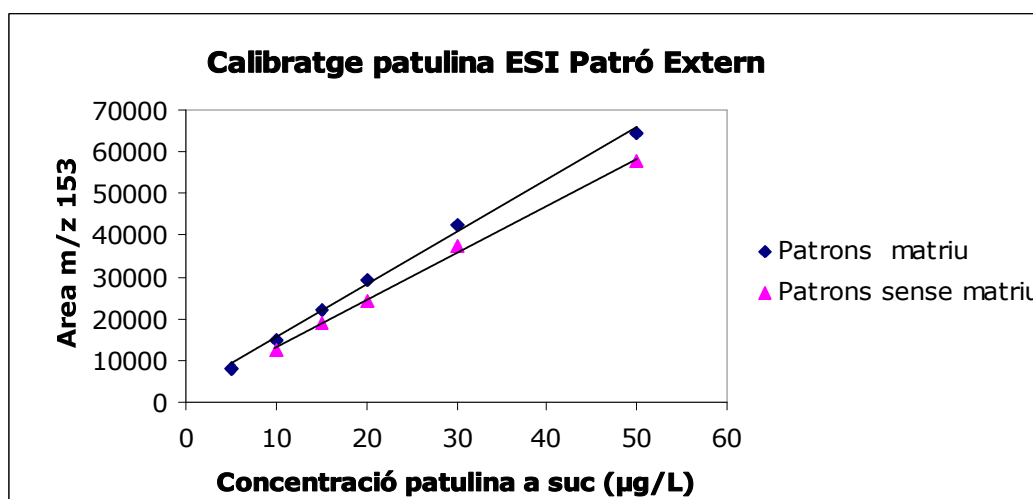


Figura 3.13. Efecte de la matriu en l'anàlisi de patulina per ESI. Es comparen les rectes de calibratge obtingudes amb patrons preparats en matriu de suc i sense, i no es considera el patró intern.

Tal com es pot veure en el gràfic comparatiu 3.13, en que es posa de manifest la major resposta per als patrons preparats en matriu de suc de poma, es pot afirmar que l'efecte potenciador de la resposta del detector en la patulina està deslligat de la influència del patró intern i que és tracta d'un efecte lligat a la presència de la matriu.

Les dades obtingudes de la comparació dels resultats de calibratge utilitzant patró intern i patró extern es presenten en la taula 3.26.

Taula 3.26. Comparació entre els valors de desviació estàndard relativa (DER %) corresponents a les rèpliques, per a cada nivell de concentració dels patrons preparats en matriu, considerant el calibratge per patró intern, cada pic del patró intern (PI) i el calibratge per patró extern. S'indica l'equació de la recta i el coeficient de determinació (R²).

Concentració patulina (µg/L)	Calibratge patró intern DER % (n=3)		Calibratge patró extern DER % (n=3)
	A-153/A-203		A-153
	Pic 1 (PI)	Pic 2 (PI)	No PI
5	26,2	26,2	19,11
10	14,0	18,9	3,84
15	12,9	20,5	5,50
20	11,1	12,6	4,34
30	6,7	6,2	3,03
50	0,4	12,1	3,48
	$y = 0,0156x + 0,06$ $R^2 = 0,987$	$y = 0,0218x + 0,06$ $R^2 = 0,995$	$Y = 1256,4x + 3 \times 10^{-4}$ $R^2 = 0,997$

Com es pot observar en la taula 3.26, en el cas del calibratge per patró extern els valors de la DER de les tres rèpliques de l'anàlisi dels patrons preparats en matriu són substancialment inferiors als calculats pel calibratge per patró intern, fet que posa de manifest la menor

reproductibilitat dels resultats quan es considera el patró intern en el calibratge. L'efecte de la matriu afecta més negativament al patró intern que a la l'anàlit (patulina) així ho fan considerar els valors de DER % més grans que quan no es considera el patró intern. Aquest augment de la incertesa i la constatació de que el patró intern assajat, com s'ha vist, no corregeix l'efecte potenciador de la resposta en l'anàlisi de patulina per electropulverització, fa qüestionar si més no la utilitat d'aquest compost de cara a ser emprat com a patró intern en l'anàlisi de patulina en aquestes condicions.

Per raons de sensibilitat es va escollir el mode positiu d'ionització per a l'anàlisi del al patró intern (m/z 203 $[M+23]^+$). En aquest mode d'ionització sempre hi sol haver més interferències que quan s'utilitza el mode negatiu, que és més selectiu i ha estat el que s'ha escollit per a l'anàlisi de patulina. Això podria explicar en part els resultats de baixa precisió quan s'analitzen les rèpliques de patrons considerant el patró intern. Un altre factor a considerar podria ser que la formació de l'adducte amb sodi $[M+23]^+$, ió triat per a quantificar l'àrea del patró intern, estigui influenciat de forma més sensible per petites variacions dels paràmetres instrumentals, variacions que afecten de forma més dràstica la reproductibilitat de la seva anàlisi per ESI.

A la vista d'aquest resultats es va decidir provar l'altra interfase d'ionització.

3.4.2. Anàlisi de patulina per HPLC i ionització química a pressió atmosfèrica (APCI)

De forma similar amb el que es va fer per trobar el paràmetres òptims en l'anàlisi per electropulverització, es va fer per a l'anàlisi per APCI.

Es va preparar una solució de patulina en fase mòbil de 30 $\mu\text{g/mL}$. El dissolvent emprat va ser aigua:THF (99:1). La mostra es va introduir a una velocitat continua de 5 $\mu\text{L/min}$ a la interfase mitjançant un bomba de

xeringa. En aquest cas els paràmetres a tenir en compte van ser la temperatura de la sonda, el voltatge de l'agulla de descàrrega de corona, el voltatge del con i el de l'extractor.

Optimització dels paràmetres del "tune" per a l'anàlisi de patulina per APCI

Els paràmetres optimitzats per a l'anàlisi de patulina per APCI van ser:

T. de la sonda APCI: 450°C

T. del bloc de la font: 125°C

Voltatge de l'agulla de descàrrega de corona: 3,3 KV

Voltatge con: 20 v

Voltatge de l'extractor 2 v

Flux de N₂ de desolvatació: 153 L/h

En aquest cas per analitzar patulina es va utilitzar l'ió m/z 154 [M]⁻, que va ser el més abundant de l'espectre de la patulina en aquestes condicions d'anàlisi. Per al patró intern es va utilitzar el mateix que per ESI, l'adducte amb sodi [M+Na]⁺, m/z 203.

3.4.2.1. Anàlisi quantitativa de patulina per HPLC i ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) utilitzant el compost XIV-c com a patró intern

Els assaigs previs realitzats amb APCI van posar de manifest una major sensibilitat de resposta comparada amb la resposta per electropulverització, de forma que es van preparar patrons de patulina de concentració més baixa i la concentració de l'estàndard intern es va haver d'ajustar a 0,15 µg/mL, que representava una concentració de 3 µg/L a suc.

Els patrons es van preparar d'acord al protocol descrit en la secció 2.2.8.2. de Material i Mètodes, i corresponien a valors de patulina en suc de poma de 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 30 i 50 µg/L. Es van preparar en metanol:aigua pH 4 (50:50) i es van injectar 20 µL. Les condicions d'anàlisi van ser les descrites a l'apartat 2.2.9 de Material i Mètodes secció APCI. El flux de fase mòbil era de 0,3 mL/min. Es van preparar patrons sense matriu en metanol:aigua pH 4 (50:50) de la mateixa concentració per tal d'avaluar l'efecte de la matriu en l'anàlisi per APCI.

Per tal d'avaluar l'efecte de la matriu en la resposta de l'anàlisi per APCI, es van comparar les rectes de calibratge amb patrons preparats en matriu i sense matriu. També en aquest cas es van tenir en compte els dos diastereoisòmers del patró intern per a quantificar. Es van comparar les rectes de patrons amb matriu i sense considerant com en el cas de l'ESI, el pic del patró intern de menor temps de retenció, pic 1 i el segon, el pic 2.

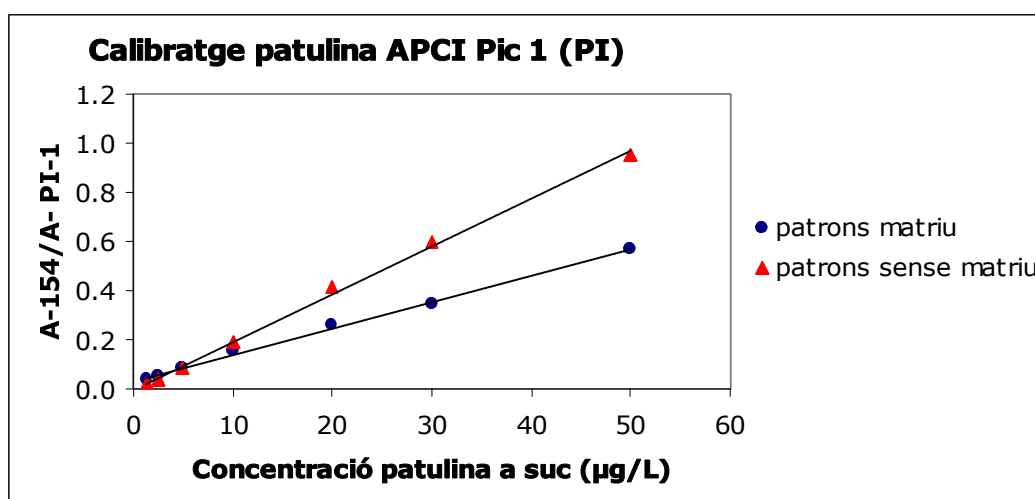


Figura 3.14. Efecte de la matriu en l'anàlisi de patulina per APCI. Es comparen les rectes de calibratge obtingudes amb patrons preparats en matriu de suc i sense, utilitzant com a patró intern el diastereoisòmer 1 (Pic1) del compost XIV-c. Cada punt representa la mitjana de dos injectades.

Els resultats presentats posen de manifest que quan es comparen les rectes preparades a partir de patrons en matriu i sense en l'anàlisi per APCI i considerant el primer pic del patró intern, s'aprecia un canvi de pendent entre les dos rectes de patrons comparades. Es pot veure com la recta obtinguda a partir de patrons sense matriu presenta un pendent més gran, 0,02 en front del valor de 0,01 de la recta preparada amb patrons en matriu. S'aprecia un clar efecte supressor de la resposta APCI a concentracions més grans en els patrons preparats en matriu de suc.

Si passem a comparar les rectes amb matriu i sense però tenint en compte l'àrea del pic 2 del patró intern, s'obtenen els següents resultats

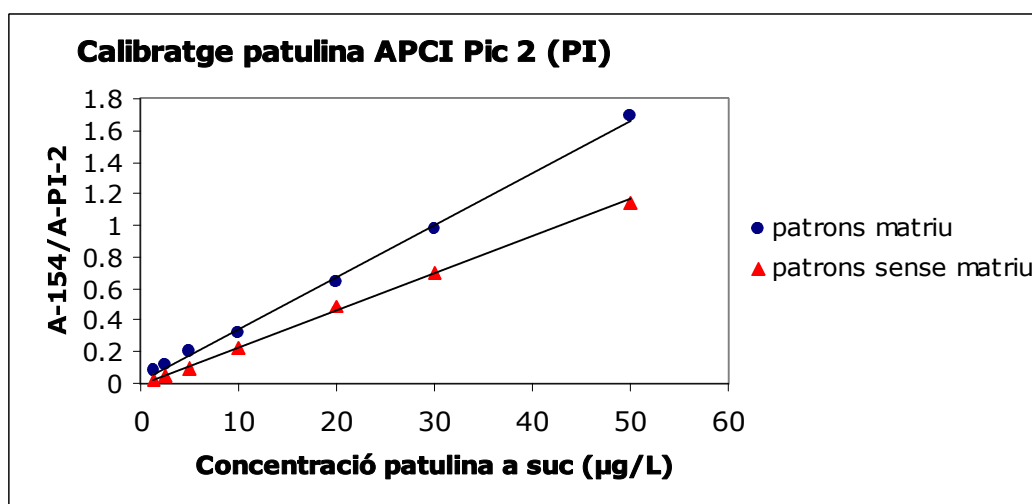


Figura 3.15. Efecte de la matriu en l'anàlisi de patulina per APCI. Es comparen les rectes de calibratge obtingudes amb patrons preparats en matriu de suc i sense, utilitzant com a patró intern el diastereoisòmer 2 (Pic 2) del compost XIV-c. Cada punt representa la mitjana de dos injectades.

A diferència del cas anterior, en que es considerava el pic 1 del patró intern, quan es considera el segon pic del diastereoisòmer per a la definició de les rectes de calibratge, s'observa una major resposta en els patrons preparats

en matriu que en els preparats sense matriu. Els valors dels pendents són en aquest cas 0,03 per la recta de patrons en matriu i de 0,02 per la recta preparada a partir de patrons sense matriu.

Si comparem totes les 4 rectes de calibratge (Figura 3.16), les obtingudes a partir de patrons sense matriu i amb matriu considerant l'un i l'altre pic del patró intern, s'aprecia molt clarament l'efecte de la matriu en considerar un i altre pic del patró intern. Els valors del pendent en el cas de patrons en matriu són més diferents en considerar un pic o l'altre del patró intern implicant per tant un canvi de resposta molt més acusat. Si es considera el pic 1 del patró intern, es pot interpretar que la matriu exerceix un efecte supressor del senyal en canvi, quan es considera el pic 2 del patró intern, la matriu actua potenciant la resposta.

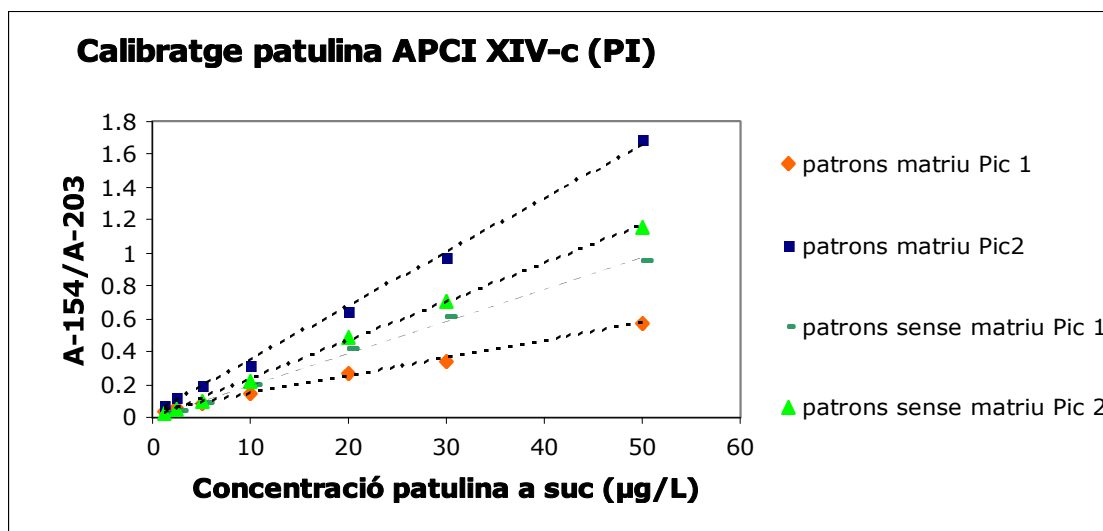


Figura 3.16. Comparació del calibratge de patulina per APCI. Es comparen rectes de calibratge de patulina per APCI utilitzant el compost XII-c (pic 1 i pic 2) com a patró intern, i els patrons preparats en matriu de suc i sense.

Si considerem els valors dels pendents de les rectes comparades en la figura 3.14 es poc apreciar que la diferencia entre els valors dels pendents

entre les rectes de patrons sense matriu quan es considera un pic i altre del patró intern, es del 17%, essent major el valor, quan es considera el pic2 del patró intern. En canvi el valor del pendent varia fins al 67% quan es comparen els pendents dels patrons preparats sobre matriu de suc de poma, essent també en aquest cas més gran el pendent de la recta que quantifica utilitzant el pic 2 del patró intern. Aquests resultats, a l'igual que els observats en el cas de la ionització per ESI, no tenen una interpretació fàcil. Es sabut que en les dues tècniques d'ionització l'efecte de la matriu sobre el rendiment net de la ionització de l'anàlit és molt important i pot tenir un efecte diferent sobre l'anàlit (patulina en el nostre cas) i sobre el patró intern (Avery 2003; Zrostlikova et al. 2002).

A pesar de la observació d'aquest efecte matriu diferent en considerar un i altre pic del patró intern, es va voler estudiar el comportament del patró intern en un assaig de recuperació a partir de mostres enriquides per tal d'avaluar la seva recuperació en el protocol d'extracció-purificació utilitzat i confirmar la seva utilitat com a veritable patró intern. Per això es van preparar dos rèpliques de mostres de suc de poma enriquides a 4 nivells de patulina diferents. Les mostres es van preparar afegint 50 µL de diferents solucions de patulina de concentració diferent i una fixa de patró intern en acetat d'etil a 5 mL de suc de poma sense patulina. Les mostres contenien 5, 10, 20 i 50 µg/L de patulina i 3 µg/L de patró intern. Es van extreure i purificar d'acord amb el protocol de *Brause et al.*(apartat 2.2.7.2. de Material i Mètodes), el residu de l'extracte es va redissoldre en 100 µL d'aigua pH 4:metanol (50:50) i es van injectar 20 µL. Es van injectar el mateix dia que els patrons de calibratge.

En primer lloc es va calcular l'estimació de la recuperació del patró intern, tenint en compte un i altre diastereoisòmer (pic 1 i pic 2). L'estimació de la recuperació es va calcular per comparació de la mitjana del valor de l'àrea de cada pic en els patrons i en les mostres enriquides calculat com s'expressa a continuació:

$$Q_{PI-i}\% = (\bar{A}_{ENR} \text{ m/z } 203\text{-pic}_i / \bar{A}_{PAT} \text{ m/z } 203\text{-pic}_i) \times 100$$

On $Q_{PI-i}\%$ expressa el percentatge de recuperació de cada diastereoisòmer ($i = \text{pic 1 o pic 2}$), \bar{A}_{ENR} m/z 203-pic_i representa la mitjana de l'àrea de l'ió m/z 203 calculada per a cada pic (1 i 2)) en les mostres enriquides, i \bar{A}_{PAT} m/z 203-pic_i representa la mitjana de l'àrea de l'ió m/z 203, calculada per a cada un dels pics en els patrons de calibratge preparats en matriu.

Taula 3.27. Càlcul de la recuperació de cada diastereoisòmer (Pic 1 i Pic 2). S'indiquen els valors de la mitjana de l'àrea de cada pic en les mostres i en els patrons de calibratge, la desviació estàndard (DE), la desviació estàndard relativa (DER%) i el valor de la recuperació de cada diastereoisòmer (Q_{PI-i}).

	Mostres enriquides		Patrons calibratge	
n=8	Àrea m/z 203 Pic 1	Àrea m/z 203 Pic 2	Àrea m/z 203 Pic 1	Àrea m/z 203 Pic 2
Mitjana	$1,4 \times 10^{-5}$	$0,7 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$	$0,6 \times 10^{-5}$
DE	$0,5 \times 10^{-5}$	$0,2 \times 10^{-5}$	$0,3 \times 10^{-5}$	$0,06 \times 10^{-5}$
DER %	41,2	25,3	23,9	10,7
Recuperació patró intern				
	$Q_{PI-1} \%$		$Q_{PI-2} \%$	
	99,6		124,8	

Els valors de recuperació estimats per a un i altre pic del patró intern van ser del 99,6% per al primer pic i del 124,8% per el segon (Taula 3.27). El valor de recuperació elevat de 124,8% per al pic 2 fa pensar en la presència d'un interferent de la matriu que origina una resposta anormalment alta per a aquest compost. Un altre aspecte a destacar és la baixa reproductibilitat dels valors de la mesura de les àrees dels pics de patró intern en les mostres enriquides, amb valors de DER del 41,2% pel pic 1 i un 25,3% pel segon i que a la vegada són més alts que els corresponent valors de DER obtinguts per als patrons de calibratge i que com es pot apreciar en la taula 3.27, són del 23,9% per al pic 1 i del 10,7% per al pic 2.

El procés d'extracció i purificació introdueix un factor d'incertesa extra en la quantificació, avaluat en forma d'augment de la dispersió dels valors del càlcul de l'àrea del patró intern. Aquest factor resulta més rellevant quan es considera el pic 2 del patró intern.

Quan es va quantificar el contingut de patulina en les dos rèpliques de mostres enriquides a partir de les rectes de calibratge considerant un i altre pic del patró intern, es van obtenir els resultats següents, presentats en la taula 3.28.

Taula 3.28. Resultats de l'assaig d'enriquiment considerant cada un dels pics del patró intern. Es presenten les equacions de les rectes de calibratge utilitzades per a quantificar el contingut de patulina, els valors de patulina calculada, el valor de la desviació estàndard (DE), la desviació estàndard relativa % de les rèpliques i el valor de la recuperació (Rec.) per a cada nivell de concentració.

Patulina afegida a suc (µg/L)	Pic 1			Pic 2		
	Y=0,01x+0,03 R ² = 0,998			Y=0,03+0,02 R ² = 0,998		
	Patulina calculada mitjana ±DE (n=2)	Rec. %	DER %	Patulina calculada mitjana ±DE (n=2)	Rec. %	DER %
5	4,7 ± 1,5	94,0	19,5	3,8 ± 1,0	79,9	26,3
10	8,9 ± 0.1	89,2	1,1	3,5 ± 1,1	39,5	31,4
20	17,1 ± 3,4	85,4	19,8	6,6 ± 1,5	38,8	22,7
50	44,9 ± 3,5	89,8	7,8	15,7 ± 1,0	34,9	6,4

Els valors obtinguts també posen de manifest una mala quantificació quan s'utilitza el pic 2 del patró intern. Els resultats obtinguts en considerar aquest pic, són poc precisos i radicalment inexactes. En canvi, quan es considera el pic 1, la recuperació està entre un 85 i un 94%, amb una precisió entre rèpliques correcta, s'obtenen valors de desviació estàndard relativa (DER) inferiors al 20% per a cada nivell d'enriquiment.

Aquests resultats tant diferents, obtinguts quan es considera un pic i altre del patró intern, s'han d'analitzar des de la perspectiva de la presència d'interferents de la matriu que elueixen en el temps de retenció del segon pic del diastereoisòmer dificultant el seu anàlisi per APCI. En realitat l'eficiència en la ionització dels dos pics del patró intern (dos diastereoisòmers), hauria de ser igual o pràcticament igual en absència d'interferències. Els resultats de % recuperació o eficiència de recuperació al llarg del procés extractiu i de purificació també hauria de ser similar per un i altre pic en absència d'interferències de la matriu.

Considerant els resultats obtinguts a partir de la anàlisi per APCI de patulina utilitzant el diastereoisòmer 1 del patró intern utilitzat, es pot afirmar que aquest compost pot ser un bon candidat a patró intern en l'anàlisi de patulina per HPLC-EM-APCI. Es pot afirmar que si hi ha problemes de supressió o augment de la resposta per efecte de la matriu, és una bona pràctica utilitzar patrons preparats sobre matriu per a quantificar, de cara a evitar inexactituds i també és una bona pràctica la utilització d'un patró intern per a quantificar, de cara a compensar la variabilitat dels paràmetres instrumentals durant les anàlisis. Les anàlisis quantitatives utilitzant detectors selectius de masses requereixen la utilització de patrons interns. La discussió que es presenta a continuació, és aplicable a les tècniques d'ionització a pressió atmosfèrica tractades, l'electropulverització (ESI) i la ionització química a pressió atmosfèrica (APCI).

Es creia en un principi que l'abast de l'efecte matriu en el procés de la ionització dels anàlits era assignable només a la ionització per electropulverització, s'ha vist posteriorment, que és pot considerar influent en ambdues tècniques (Antignac et al. 2005; Kloepfer et al. 2005; Zrostlikova et al. 2002).

En l'anàlisi quantitativa per HPLC-EM la presència de determinats components de la matriu, poden causar problemes com ara la disminució/augment de la resposta de l'anàlit o del patró intern que es tradueix en una inestabilitat del senyal del detector durant l'anàlisi de les

seqüències de mostres. Aquest efecte es conegut com efecte matriu. L'efecte matriu s'origina com a conseqüència de què determinats components presents a la matriu co-elueixen amb els compostos d'interès, anàlits i/o patrons interns, modificant l'eficiència de la ionització d'uns i/o altres en la interfase (Taylor 2005). El mecanisme exacte d'aquest fenomen es poc clar i es parla de competència entre l'anàlit i els compostos no detectats que co-elueixen envers la ionització. Altres autors afirmen que és dependent de l'estructura química de l'anàlit i que és important considerar-ho quan es vol triar un patró intern per a quantificar (Bonfiglio et al. 1999).

En la majoria dels casos, l'efecte matriu s'explica per una disminució de l'eficiència en la ionització de determinats compostos (anàlits, patrons interns) també anomenat supressió iònica. Les conseqüències d'aquest fenomen són variades, disminució del senyal, baixa repetibilitat, l'efecte supressiu pot diferir d'una mostra a un altra, pot modificar el quocient entre ions (entre el de l'anàlit i el patró intern), pot comportar una sobreestimació dels resultats de quantificació (falsos positius). Un altre efecte fàcilment observable és la significant diferència de resposta entre un anàlit en una mostra en matriu i sense (anàlit en dissolvent, fase mòbil etc.) (Kloepfer et al. 2005; Zrostlikova et al. 2002). Si es considera el seu efecte supressiu sobre el patró intern, pot originar una sobre estimació de l'anàlit (Antignac et al. 2005).

Els mecanismes proposat per tal d'evitar aquests problemes també solen ser variats i depenen de cada cas concret. L'efecte matriu es pot veure compensat amb la utilització de patrons interns marcats isotòpicament (Kloepfer et al. 2005). Si aquests no són accessibles, altres estratègies poden ser, millorar la separació cromatogràfica (Antignac et al. 2005), o canviar la tècnica de purificació de les mostres. Altres estratègies encaminades a la millorar la purificació de la mostra pot ser la utilització de la cromatografia bidimensional que amb l'ajut de vàlvules automatitzades permeten automatitzar el procés (Taylor 2005)

3.5. Anàlisi de patulina sense derivatitzar per CG-EM, utilitzant anàlegs estructurals com a patrons interns

La necessitat de trobar un patró intern més adequat es posà de manifest en l'anàlisi de patulina sense derivatitzar descrita en l'apartat 3.2 d'aquest capítol. La utilització d'hexaclorobenzè com a patró intern en l'anàlisi de patulina per CG-EM no compensava de les variacions instrumentals en la sensibilitat de la resposta entre dies degut a la diferència estructural entre l'anàlit i el patró intern utilitzat (Llovera et al. 1999).

Els èsters sintetitzats en la sèrie 3, a partir del compost IV es van provar com a patrons interns en l'anàlisi de patulina sense derivatitzar per cromatografia de gasos, degut al millor comportament cromatogràfic dels mateixos en CG que en HPLC.

El mètode d'extracció i purificació triat per a preparar les mostres va ser el de *Brause et al.* (Brause et al. 1996) per la seva simplicitat i perquè és un mètode oficial de la AOAC. El dissolvent que s'utilitza en aquest protocol d'extracció és l'acetat d'etil, dissolvent que dissol perfectament els èsters que es volen provar. Per tant, es va triar l'acetat d'etil com a dissolvent de treball en la preparació de mostres i patrons de calibratge. La tècnica d'injecció escollida va ser "on-column" amb precolumna i rampa de pressió per tal d'afavorir al màxim el pas de la mostra a la precolumna. Es va fer necessari utilitzar aquesta tècnica degut als problemes de retenció de patulina a la zona de l'injector, principalment al "liner" de vidre, observat en anàlisis prèvies en els que s'havia fet servir un injector tipus split/splitless.

En primer lloc es va procedir a l'optimització d'alguns paràmetres que afecten de forma directa la qualitat de l'anàlisi cromatogràfica. Aquest són la temperatura inicial del programa de forn i el flux de gas portador.

Optimització de la temperatura inicial del forn

Aquest assaig es va realitzar injectant per triplicat una solució de patulina en acetat d'etil de 2,5 µg/mL a diferents temperatures. La columna emprada va ser una HP-5 MS de 30 m x 0,25mm x 0,25 µm.

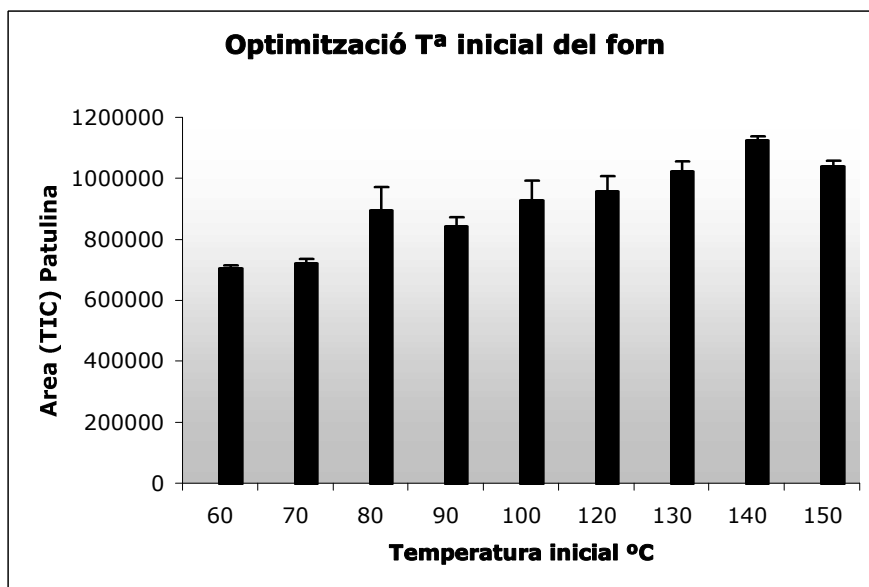


Figura 3.17. Optimització de la temperatura inicial del forn. Es representa el valor de la mitjana de tres rèpliques i les barres d'error indiquen el valor de la desviació estàndard (DE).

A partir d'aquests resultats es va determinar que la temperatura inicial òptima era la de 140°C.

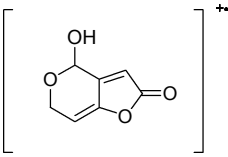
De forma similar es va optimitzar la pressió inicial de la rampa de pressió per a una temperatura inicial de 140°C. El valor òptim trobat va ser de 200 kPa, la qual rendeix un flux òptim de 2,5 mL/min, que es manté constant al llarg del programa del forn. La velocitat mitjana lineal en aquestes condicions és de 60 cm/s.

3.5.1. Anàlisi qualitativa de patulina per CG-EM

Degut a que la patulina acostuma a trobar-se en el suc de poma a nivell de traça en la majoria dels casos, la confirmació de la seva presència en un suc, en una anàlisi per CG-EM s'ha de fer en mode SIM tot establint el compliment dels criteris de les abundàncies relatives per als ions seleccionats. Aquest és un requisit que resulta convenient confirmar-lo per a cada equip que s'utilitzi i per cada sistema de calibratge de l'espectròmetre de masses. Ja que, com s'ha comentat en l'apartat previ d'anàlisi de patulina sense derivatitzar, les abundàncies relatives dels ions escollits poden ser diferents en funció de l'equip instrumental utilitzat (Eichelberger et al. 1973; Troost and Olavesen 1996).

En la taula 3.29 es presenten els fragments que es van fer servir per l'anàlisi en mode SIM de la patulina. En cada cas es presenta el fragment de molècula que s'elimina en el procés de reorganització molecular.

Taula 3.29. Estructura de l'ió molecular de la patulina i els fragments més representatius del seu espectre de masses que es van utilitzar per a l'anàlisi per SIM.

Patró de fragmentació de la patulina. Fragments més representatius (Roach et al. 2002; Rupp and Turnipseed 2000; Rychlik and Schieberle 1998)		
 <p>m/z 154 [M]⁺⁺ C₇H₆O₄</p>	[M-H ₂ O] ⁺	m/z 136 C ₇ H ₄ O ₃
	[M-CO] ⁺	m/z 126 C ₆ H ₆ O ₃
	[M-C ₂ H ₄ O] ⁺	m/z 110 C ₅ H ₂ O ₃

Els 6 compostos seleccionats com a possibles candidats a patrons interns per a l'anàlisi quantitativa de patulina, que s'han indicat en la taula 3.20 d'aquest capítol van ser caracteritzats pel seu espectre de masses (Taula 3.19) els fragments escollits per a l'anàlisi en SIM es presenten en la taula 3.30.

Taula 3.30. Selecció dels 6 èsters obtinguts en la sèrie 3 per a ser utilitzats com a patrons interns. S'indica la referència del compost, el nom i els fragments més abundants per a l'anàlisi per SIM.

Èsters seleccionats	Ions característics (m/z)
acetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil (XV-a)	68/96
cloroacetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil (XV-b)	85/96
bromoacetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil (XV-e)	96/123
formiat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil (XV-i)	96
2-metilpropionat de 10(5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil (XV-j)	71/96
butirat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil (XV-l)	71/96

La pràctica totalitat d'aquests èsters presenta un patró de fragmentació molt similar, essent el fragment comú a tots ells el m/z 96 associat a una fórmula proposada de $[C_5H_4O_2]^+$, que correspondria al fragment de l'anell lactònic comú a tots ells. Aquest fragment escollit per a la quantificació dels possibles patrons interns és molt similar al fragment escollit per quantificar patulina el m/z 110 $[C_5H_2O_3]^+$, i es va considerar que en absència

d'interferències les possibles variacions en la sensibilitat afectarien de forma similar ambdós fragments. Per tant, aquest va ser el fragment que es va seleccionar per a l'anàlisi en mode SIM.

3.5.2. Anàlisi quantitativa de patulina per CG-EM utilitzant una fase estacionària de 5% fenilmetilpolisiloxà

Per tal de comprovar l'efectivitat dels èsters seleccionats com a patrons interns, es va preparar un assaig de recuperació. Es van preparar patrons de calibratge en matriu segons el protocol descrit a la secció 2.2.8.3 de Material i Mètodes, corresponents a una concentració de patulina en suc de 6, 10, 15, 20, 30 i 50 µg/L.

L'estimació de la recuperació dels compostos a assajar com a patrons interns al llarg del procés d'extracció i purificació es va calcular tal com s'ha descrit a l'apartat 3.4.2.1 d'aquest capítol. Així, es va comparar la mitjana del valor de l'àrea del patró intern en els patrons de calibratge i en les mostres enriquides tal com s'expressa a continuació:

$$Q_{PI-i}\% = (\bar{A}_{ENR} / \bar{A}_{PAT}) \times 100$$

On $Q_{PI-i}\%$ expressa el percentatge de recuperació de cada candidat a PI, \bar{A}_{ENR} representa la mitjana de l'àrea de l'ió m/z 96 calculada per a cada PI en les mostres enriquides i \bar{A}_{PAT} representa la mitjana de l'àrea de l'ió m/z 96, calculada per a cada un dels patrons de calibratge preparats amb matriu.

En la taula 3.31 es presenten els resultats obtinguts per a cada un dels 6 possibles patrons interns triats.

Taula 3.31. Resultats de l'assaig de recuperació dels èsters al llarg del procés extractiu. S'indica la mitjana de l'àrea del PI (patró intern) a les mostres enriquides, als patrons de calibratge, el valor de la desviació estàndard (DE), el valor de la recuperació en % i el valor de la desviació estàndard relativa (DER)%.

Èsters seleccionats (PI)	$\bar{A}_{ENR} \pm DE^*$ (n=10)	$\bar{A}_{PAT} \pm DE$ (n=10)	Q_{PI}%	DER (Q_{PI})%
XV-a	$2,2 \times 10^{-4} \pm 0,1 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-4} \pm 0,3 \times 10^{-4}$	93,5	16,1
XV-b	$3,9 \times 10^{-4} \pm 0,7 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4} \pm 0,5 \times 10^{-4}$	108,7	23,2
XV-e	$1,5 \times 10^{-4} \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-4} \pm 0,6 \times 10^{-4}$	37,5	18,2
XV-i	$0,6 \times 10^{-4} \pm 0,1 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-4} \pm 0,2 \times 10^{-4}$	26,1	22,0
XV-j	$1,7 \times 10^{-4} \pm 0,4 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4} \pm 0,3 \times 10^{-4}$	90,1	27,1
XV-l	$2,0 \times 10^{-4} \pm 0,3 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4} \pm 0,3 \times 10^{-4}$	101,5	20,6

A partir dels resultats obtinguts es van descartar per a ser utilitzats com a estàndards interns els que van presentar una recuperació inferior al 90% a resultes d'aplicar el mètode d'extracció i purificació (Brause et al. 1996) al suc de poma enriquit. Així, doncs, es va decidir no seguir provant els èsters XV-e i XV-i degut a la baixa recuperació al llarg del procés d'extracció-purificació.

Els 4 compostos seleccionats es van utilitzar en un nou assaig per tal de confirmar i verificar els paràmetres de calibratge, la precisió en la quantificació de mostres enriquides i l'exactitud en la predicció del valor de patulina de les mostres enriquides a partir de les rectes de calibratge preparades amb cada patró intern.

Es van preparar per duplicat patrons de calibratge en matriu corresponents a unes concentracions de patulina en suc de 6, 10, 15, 20, 30 i 50 µg/L, segons el protocol descrit a l'apartat 2.2.8.3. de Material i Mètodes. De

manera paral·lela es van preparar mostres enriquides que presentaven concentracions de patulina de l'ordre de 10, 30 i 50 µg/L en suc i de 0,8 µg/L de cada patró intern. Aquestes mostres es van preparar per triplicat.

Quan es van calcular les rectes de calibratge a partir dels patrons preparats en matriu utilitzant el fragment m/z 110 per a quantificar patulina, totes les rectes van presentar un valor d'ordenada a l'origen important. Com a exemple es presenta una recta de calibratge preparada amb el patró intern XV-d.

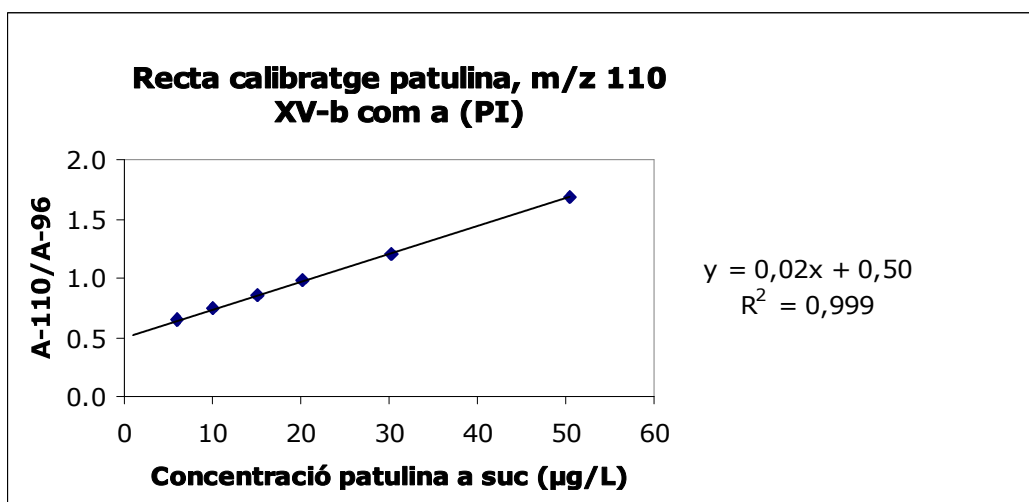


Figura 3.18. Recta de calibratge de patulina utilitzant com a patró intern el compost XV-b. Cada punt representa la mitjana de dos rèpliques. S'indica l'equació de la recta i el coeficient de determinació R^2 .

En tots els casos les rectes que es van obtenir presentaven coeficients de determinació (R^2) superiors a 0,99, però els valors de l'ordenada a l'origen eren elevats. Aquest fet va posar de manifest que la utilització d'aquestes rectes per a quantificar nivells de patulina en mostres en la zona de baixes concentracions, podria donar lloc a falsos positius.

Aquest efecte de la matriu que es va traduir en la presència d'una ordenada a l'origen no menyspreable en les rectes de calibratge, estava originat per un interferent de la matriu que eluïa simultàniament amb la patulina. Aquest interferent contribuïa a l'abundància del fragment a m/z 110 al mateix temps de retenció de la patulina. La contribució era petita (abundància de m/z 110 petita), però es feia palesa a concentracions baixes de patulina, (Figura 3.18). Això va provocar que, a baixes concentracions de patulina, l'abundància relativa dels fragment escollits per a caracteritzar-la en mode SIM, no complia els criteris establerts per a la seva identificació, essent el valor de m/z 110 més alt del que li correspondria. A concentracions més altes aquest efecte era poc rellevant.

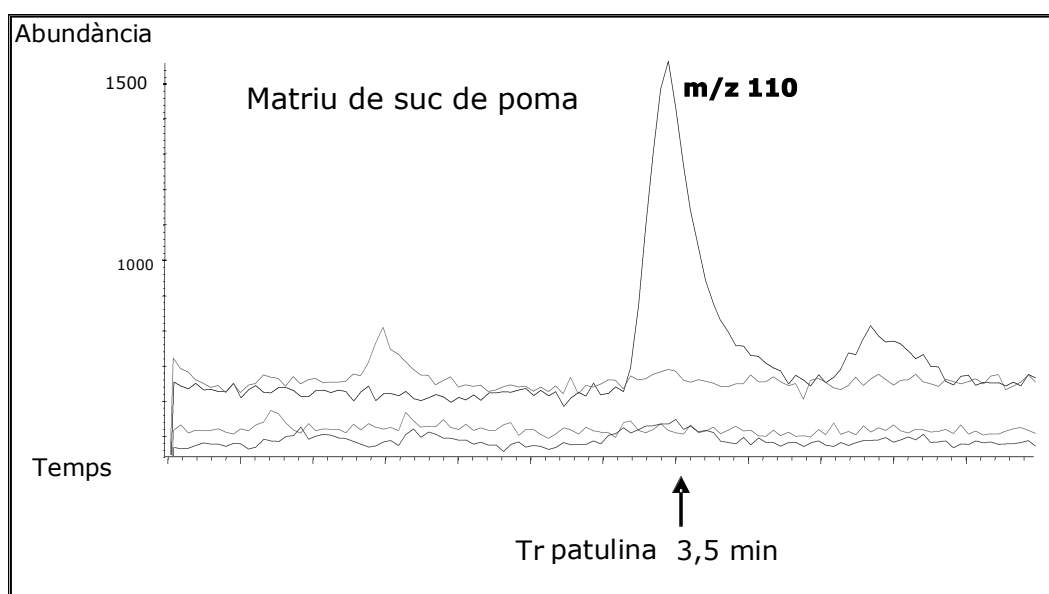


Figura 3.19. Cromatograma iònic d'un blanc de matriu de suc de poma a la zona d'elució de la patulina. S'indica amb una fletxa el temps de retenció de la patulina i la contribució a la abundància del fragment m/z 110.

En la figura 3.19 es presenta un fragment del cromatograma iònic d'un blanc de matriu de suc de poma. Es pot apreciar el pic corresponent a una

interferència a m/z 110. L'abundància del qual seria comparable a la d'un patró de patulina d'uns 6 µg/L.

En canvi si s'utilitza el fragment m/z 126 per a quantificar la patulina, aquest problema no es produeix (Figura 3.20). Utilitzar aquest fragment per a quantificar la patulina podria representar una alternativa (Figura 3.20), però la menor abundància relativa d'aquest fragment en l'espectre de masses de la patulina, produïa una reducció del valor del pendent, ja que el quocient entre m/z 126 i m/z 110 és $0,55 \pm 0,05$. Aquest fet comportava la pèrdua d'un punt de calibratge, el corresponent a 6 µg/L. En aquestes condicions l'interval de calibratge només es podia establir entre 10 i 50 µg/L.

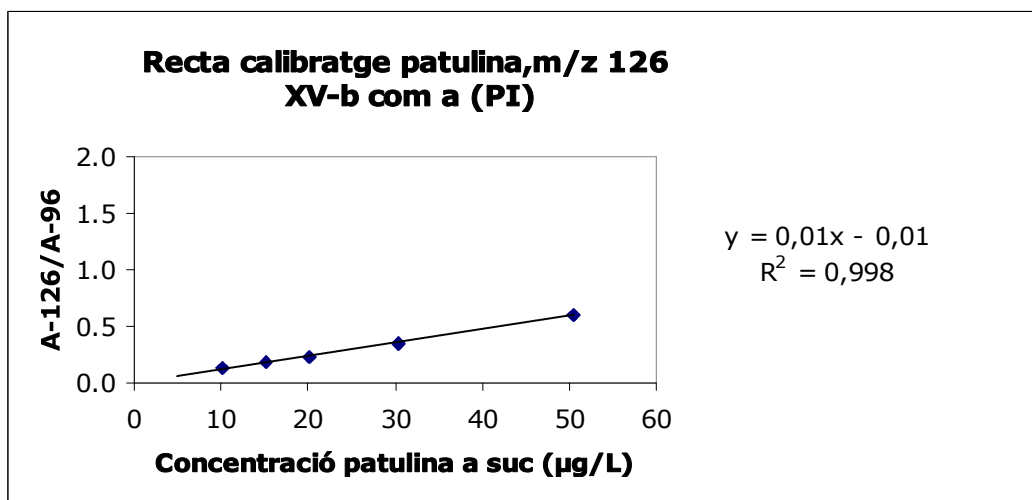


Figura 3.20. Recta de calibratge de patulina utilitzant com a patró intern el compost XV-b i el fragment m/z 126 per a quantificar patulina. Cada punt representa la mitjana de dos rèpliques. S'indica l'equació de la recta i el coeficient de determinació R^2 .

A la Taula 3.32 es presenten els paràmetres de les rectes de calibratge corresponents a cada patró intern provat, utilitzant el fragment m/z 126 per a quantificar patulina.

Taula 3.32. Paràmetres de calibratge corresponents a cada recta calculada per a cada patró intern provat, utilitzant el fragment m/z 126 per quantificar la patulina. Els valors s'han obtingut a partir de la mitjana de dos sèries de patrons.

Paràmetres rectes calibratge patulina, HP-5-MS Y = [àrea m/z 126/àrea PI]				
	XV-a	XV-j	XV-l	XV-b
Pendent (b)	0,02	0,03	0,02	0,01
Desviació estàndard pendent, S_b	0,0005	0,001	0,001	0,0003
Ordenada (a)	-0,03	-0,03	-0,04	-0,02
Desviació estàndard ordenada, S_a	0,01	0,02	0,02	0,01
Desviació estàndard residus, S_{y,x}	0,02	0,03	0,03	0,01
Coeficient de determinació R ²	0,998	0,996	0,998	0,998
Interval de calibratge (µg/L)	10-50	10-50	10-50	10-50
Límit de detecció (LD) (µg/L)	3,7	3,8	4,1	2,5
N=5				

Com es pot observar, es van obtenir ajustos força bons per les diferents rectes de calibratge com ho demostren els valors de coeficient de determinació (R²) superiors a 0,99 per a tots els PI assajats. En aquestes condicions l'estàndard intern que presentava uns valors de paràmetres de calibratge millors era el XV-b. La recta calculada utilitzant aquest PI era la que presentava els menors valors d'errors corresponents a l'estimació del pendent, l'ordenada a l'origen i els residus.

Quan es van utilitzar aquestes rectes per tal de predir el valor del contingut de patulina en les mostres enriquides es van obtenir els resultats indicats a la taula 3.33.

Taula 3.33. Quantificació dels valors de patulina en les mostres enriquides utilitzant en cada cas l'equació corresponent a cada patró intern assajat. S'indica el valor de la concentració de patulina afegida i els valors calculats amb el corresponent error estàndard de predicció (S_x).

Quantificació de patulina en mostres enriquides HP-5MS m/z 126				
Valor afegit ($\mu\text{g/L}$)	Valors de concentració calculats ($\mu\text{g/L}$) mitjana $\pm S_x$ (n=3)			
	XV-a	XV-j	XV-l	XV-b
9,9	12,9 \pm 0,7	10,3 \pm 0,9	11,4 \pm 0,9	10,7 \pm 0,5
29,8	38,2 \pm 0,7	37,3 \pm 0,9	31,2 \pm 0,9	29,8 \pm 0,5
49,8	60,8 \pm 0,7	60,0 \pm 0,9	53,1 \pm 0,9	50,4 \pm 0,5

Aquests resultats de predicció del valor de patulina en les mostres enriquides posaven de manifest que, en la utilització del patró intern XV-b s'obtenia un error estàndard de predicció de 0,5, valor inferior als calculats per a la resta de patrons interns estudiats. La quantificació utilitzant aquest patró intern també va resultar ser més exacta, obtenint-se uns valors de recuperació del 108,1%, 100,0% i 101,2% per als nivells assajats de 10, 30 i 50 $\mu\text{g/L}$ respectivament. Finalment, tal com s'indica en la taula 3.34, la desviació estàndard relativa (DER) mai va ser superior al 15%, valor que indica una adequada precisió del mètode posat a punt.

Taula 3.34. Valors de la desviació estàndard relativa (DER) de les rèpliques per a cada nivell de concentració assajat, utilitzant el fragment m/z 126 per a quantificar patulina i per a cada patró intern.

HP-5 MS m/z 126				
Concentració enriquiments	DER% (n=3)			
	(µg/L)	XV-a	XV-j	XV-l
9,9	8,76	4,30	10,50	5,9
29,8	7,66	2,34	4,50	3,72
49,8	1,62	1,78	7,06	3,61

3.5.3. Anàlisi quantitativa de patulina per CG-EM utilitzant una fase estacionària de trifluoropropilmetilpolisiloxà

Com a resultat de la presència de la interferència de la matriu al temps de retenció de la patulina, ens vam plantejar millorar la resolució del mètode cromatogràfic per tal d'evitar l'interferent. Ara bé, ni modificant el programa de temperatura del forn ni el flux es va aconseguir millorar la resolució per tal d'evitar la interferència. Per altra banda, es va descartar canviar la longitud de la columna (si no resultava del tot necessari), doncs, un augment de la longitud no sempre millora la separació però si que comportaria necessàriament augmentar considerablement el temps d'anàlisi. Finalment, es decidí estudiar la possibilitat d'emprar un nou tipus de fase estacionària cromatogràfica. La diferent selectivitat de les fases estacionàries molt sovint ajuda a resoldre aquest tipus d'interferències.

En un treball de *Roach et al.* (Roach et al. 2000) es mencionava la millora en l'anàlisi de patulina per CG quant s'emprava determinades fases estacionàries. Una d'aquestes fases estava constituïda de trifluoropropilmetilpolisiloxà. Es va decidir provar aquesta nova fase per

veure si s'aconseguia eliminar el problema de resolució amb l'interferent de la matriu de suc de poma a m/z 110.

Es va canviar la columna cromatogràfica utilitzant una columna amb la nova fase tot mantenint la longitud, el diàmetre i el diàmetre intern. En aquesta noves condicions es va ajustar el programa de forn i el temps total d'anàlisi. El temps de retenció de la patulina en aquestes condicions era de $5,4 \pm 0.3$ min. Primerament es va confirmar la no presència d'interferents a la zona d'elució de la patulina analitzant una matriu de suc de poma sense patulina.

En el la figura 3.17 es presenta una secció d'un cromatograma iònic d'un blanc de matriu de suc de poma on no es va detectar patulina. En aquest cromatograma es pot observar l'absència d'interferències en la zona d'elució de la patulina.

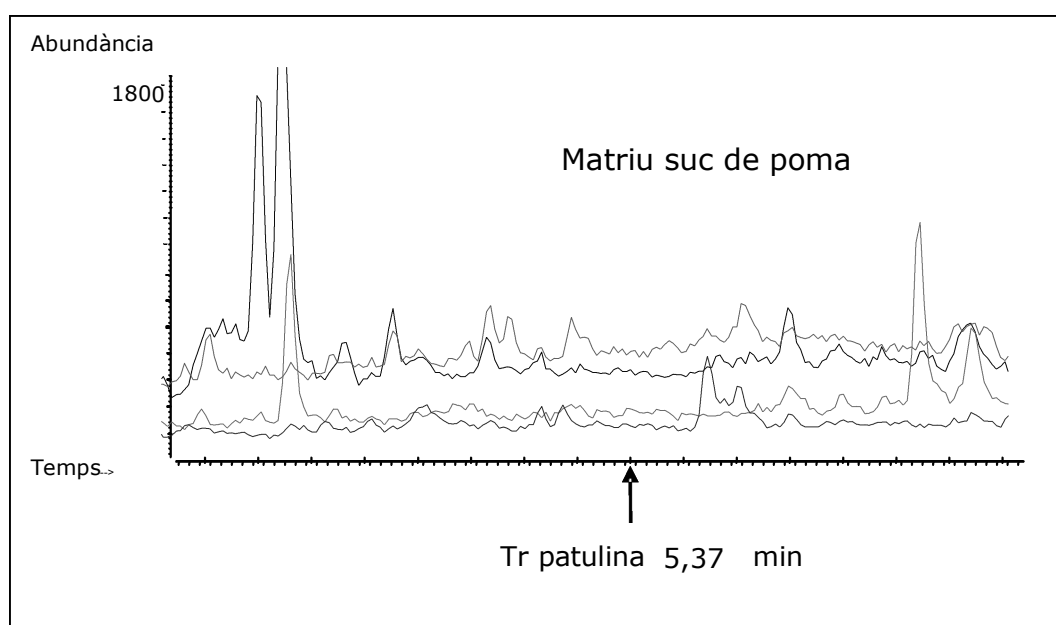


Figura 3.21. Cromatograma iònic d'un blanc de matriu de suc de poma a la zona d'elució de la patulina utilitzant una fase estacionària de trifluoropropilmetilpolisiloxà. S'indica amb una fletxa el temps de retenció de la patulina.

Una vegada confirmada la no presència d'interferents en la zona d'elució de la patulina, es procedí a realitzar un nou assaig de calibratge, emprant els 4 compostos triats anteriorment per tal de ser novament avaluats com a patrons interns en aquestes noves condicions d'anàlisi.

Els patrons de calibratge es van preparar per duplicat i de forma que corresponguessin a les concentracions de 6, 10, 15, 20 i 30 µg/L de patulina en suc de poma. Les mostres enriquides a analitzar es van preparar per triplicat enriquint-les fins a concentracions de 6, 10 i 30 µg/L en suc de poma. Tot seguit es procedí a injectar els diferents patrons i a analitzar cada una de les mostres preparades. Els resultats obtinguts es presenten en la taula 3.35.

Taula 3.35. Paràmetres de calibratge corresponents a cada recta calculada per a cada patró intern provat utilitzant el fragment m/z 110 per la patulina i una columna RtX-200-MS (trifluoropropilmetilpolisiloxà). Els valors s'han obtingut a partir de la mitjana de dos sèries de patrons.

Paràmetres rectes calibratge patulina, RtX-200-MS Y = [àrea m/z 110/àrea PI]				
	XV-a	XV-j	XV-l	XV-b
Pendent (b)	0,07	0,06	0,05	0,04
Desviació estàndard pendent, S_b	0,001	0,002	0,002	0,003
Ordenada (a)	0,01	0,05	0,01	-0,13
Desviació estàndard ordenada, S_a	0,02	0,05	0,03	0,05
Desviació estàndard residus, S_{y,x}	0,02	0,05	0,03	0,05
Coeficient de determinació R ²	0,999	0,996	0,997	0,985
Interval de calibratge (µg/L)	6-30	6-30	6-30	6-30
Límit de detecció (LD) (µg/L)	1,0	2,2	1,9	4,5
N=5				

En tots els casos es pot observar que els coeficients de regressió obtinguts són bons, si bé en aquest assaig el patró intern que presenta millor comportament és el XV-a. Amb la utilització d'aquest compost com a patró intern s'obté el millor valor per al coeficient de determinació, $R^2=0,999$, la menor desviació estàndard dels residus i del pendent, així com la ordenada a l'origen més petita. El límit de detecció calculat per a aquest cas també és el més petit.

En l'assaig de predicció dels valors de patulina en les mostres enriquides, s'han obtingut els resultats presentats en la taula 3.36.

Taula 3.36. Quantificació dels valors de patulina en les mostres enriquides utilitzant en cada cas l'equació corresponent a cada patró intern assajat, utilitzant una columna Rtx-200 MS i el fragment m/z 110. S'indica el valor de la concentració de patulina afegida i els valors calculats amb el corresponent error estàndard de predicció (S_x).

Quantificació de patulina en mostres enriquides Rtx-200-MS m/z 110				
Valor afegit ($\mu\text{g/L}$)	Valors de concentració calculats ($\mu\text{g/L}$) mitjana $\pm S_x$ (n=3)			
	XV-a	XV-j	XV-l	XV-b
6,0	6,9 \pm 0,2	5,6 \pm 0,5	5,3 \pm 0,4	8,2 \pm 1,0
10,0	9,8 \pm 0,2	9,1 \pm 0,5	7,2 \pm 0,4	9,8 \pm 1,0
30,0	28,1 \pm 0,2	26,4 \pm 0,5	21,8 \pm 0,4	21,3 \pm 1,0

També en aquest cas ha resultat ser el patró intern XV-a el que ha presentat un menor error de predicció, $S_x = 0,2$ i una millor exactitud. Els valors de precisió entre rèpliques es presenten en la taula 3.37.

Taula 3.37. Valors de la desviació estàndard relativa (DER) $n=3$, per a cada nivell de concentració assajat, utilitzant el fragment m/z 110 per a quantificar patulina i la columna Rtx-200-MS (trifluoropropilmetilpoloisiloxà) per a cada patró intern .

Rtx-200-MS m/z 110				
Concentració enriquiments ($\mu\text{g/L}$)	DER% (n=3)			
	XV-a	XV-j	XV-l	XV-b
6,0	9,5	13,42	9,49	5,01
10,0	8,88	5,51	13,05	10,44
30,0	1,07	7,72	7,8	10,35

En aquest cas també els valors de desviació estàndard relativa són inferiors al 15%, valors acceptables tenint en compte que s'ha treballat a nivell d'anàlisi de residus. Utilitzant aquesta fase estacionaria i el compost XV-a com a patró intern s'assoleix un límit de detecció de 1 $\mu\text{g/L}$, també el nivell de quantificació més petit de la recta de calibratge, corresponent a 6 $\mu\text{g/L}$ és lleugerament inferior que el límit de quantificació assolit per *Sheu et al.* en el seu treball (Sheu and Shyu 1999). Els citats autors proposen un mètode d'anàlisi de patulina per CG-EM que implica una derivatització i una extracció utilitzant una tècnica de diàlisi difàsica. Un altre treball de *Rychlik i Schieberle*, (*Rychlik and Schieberle 1999*) millora considerablement el límit de detecció assolint un valor de 12 ng/L utilitzant com a patró intern patulina marcada amb ^{13}C . Aquest límit el van assolir utilitzant un analitzador d'alta resolució (sector magnètic) i utilitzant una mida de mostra de 100 mL seguit d'un protocol de purificació més extens. Resultà un treball interessant però difícil d'aplicar en una anàlisi de rutina. Per últim, el treball de Roach et al., (Roach et al. 2000) utilitzen l'injecció on-column i la CG-EM-SIM només com a tècnica de confirmació, la quantificació dels nivells de patulina el fan per HPLC-UV.

CAPÍTOL 4. CONCLUSIONS

- La preparació de patulina derivatitzada amb heptafluorobutilimidazole per tal de ser analitzada per CG-EM ha resultat ser un procés poc efectiu, sensible i reproduïble. L'estabilitat del derivat és crítica a temperatura ambient i en presència d'humitat.
- L'anàlisi cromatogràfica de patulina sense derivatitzar per CG-EM-SIM, és possible gràcies a la utilització de la tècnica d'injecció en columna i l'aplicació d'una rampa de pressió en el moment de la injecció.
- Una de les 5-(1-hidroxi)alquil)furanones preparades a partir del reactiu comercial, el (2-furiloxi)(trimetil)silà i 6 aldehids diferents, concretament el compost 5-[2-furil(hidroxi)metil]furan-2(5H)-ona (XIV-c) es va utilitzar com a patró intern en l'anàlisi de patulina en suc de poma per HPLC-APCI. L'interval de concentració assajat va ser de 5-50 µg/L. Els valors de reproductibilitat per als 4 nivells de concentració assajats al llarg de tot l'interval de calibratge van ser inferiors 20% expressat en % de desviació estàndard relativa (DER). La recuperació calculada va oscil·lar entre el 85,4% i el 94 %.
- La utilització de determinades estratègies de síntesi, com ara la síntesi en paral·lel en fase sòlida ha demostrat ser una opció ràpida, eficaç i senzilla per a l'obtenció de llibreries de compostos relacionats, en pràcticament una sola etapa i sense necessitat de purificar. Aquests compostos poden ser utilitzats com a patrons interns. L'aplicació d'aquesta estratègia ens ha permès sintetitzar 21 compostos de tipus èster. El nucli comú a tots ells és l'alcohol 4-(hidroximetil)furan-2-(5H)-ona (IV) un compost intermedi en la ruta de síntesi de patulina de Boukouvalas i Maltais. D'aquests èsters, 4 han resultat ser bons candidats a patrons interns en l'anàlisi de patulina per CG-EM.
- Si per a l'anàlisi de patulina per CG-EM-SIM s'utilitzen columnes analítiques amb fases estacionàries de tipus apolar com ara de dimetilfenilpolisiloxà, pot succeir que determinats interferents de la matriu del suc de poma dificultin l'anàlisi. La presència a la matriu d'un

compost que elueix al mateix temps de retenció que la patulina i que presenta el mateix fragment m/z 110 que l'utilitzat per a quantificar la patulina per SIM, pot donar lloc a la quantificació de falsos positius. Aquest inconvenient es pot obviar utilitzant el fragment m/z 126 per a quantificar patulina i com a patró intern un dels èsters sintetitzats, el cloroacetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil (XV-b).

- Una alternativa per tal d'augmentar la selectivitat del mètode d'anàlisi de patulina per CG-EM-SIM és la utilització d'un altra fase estacionària com és la de trifluoropropilmetilpolisiloxà. En aquestes condicions i utilitzant com a patró intern l'èster XV-a, l'acetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil, s'aconsegueix quantificar de forma exacta i precisa patulina en suc de poma en un interval baix de concentració, de 6-30 $\mu\text{g/L}$, assolint un límit de detecció de 1 $\mu\text{g/L}$.
- L'anàlisi quantitativa de patulina sense derivatitzar per CG-EM-SIM és possible també amb la utilització de patrons interns no marcats.

BIBLIOGRAFIA

- Abrunhosa, L.; Paterson, R.R.M.; Kozakiewicz, Z.; Lima, N.; Venancio, A. **2001**. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, *32*, 240-242.
- Acar, J.; Gokmen, V.; Taydas, E.E. **1998**. The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A-Food Research and Technology*, *207*, 328-331.
- Andersen, B.; Smedsgaard, J.; Frisvad, T.C. **2004**. *Penicillium expansum*: Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 2421-2428.
- Antignac, J.P.; de Wasch, K.; Monteau, F.; De Brabander, H.; Andre, F.; Le Bizec, B. **2005**. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Analytica Chimica Acta*, *529*, 129-136.
- AOAC. **1971**. Official Method 970.44. Preparation of Standards for Mycotoxins. Final action 1971. In *Official methods of analysis of AOAC International*. Horwitz, W., Ed.; 17 ed. AOAC International: Gaithersburg, Maryland. ISBN 0-935584-67-6.
- AOAC. **1974**. Official Method 974.18. Patulin in apple juice. Thin Layer Chromatographic method. First action 1974. Final action 1982. In *Official methods of analysis of AOAC International*. Horwitz, W., Ed.; 17 ed. AOAC International, 2000: Gaithersburg, Maryland. ISBN 0-935584-67-6.
- AOAC. **1995**. Official Method 995.10. Patulin in apple juice. Liquid Chromatographic method. AOAC-IUPAC-IFJU method. First action 1995. In *Official methods of analysis of AOAC International*. Horwitz, W., Ed.; 17 ed. AOAC International, 2000: Gaithersburg, Maryland. ISBN 0-935584-67-6.
- Apsimon, J.W.; Blackwell, B.A.; Blais, L.; Fielder, D.A.; Greenhalgh, R.; Kasitu, G.; Miller, J.D.; Savard, M. **1990**. Mycotoxins from *Fusarium* species: detection, determination and variety. *Pure and Applied Chemistry*, *62*, 1339-1346.
- Arranz, I.; Derbyshire, M.; Kroeger, K.; Mischke, C.; Stroka, J.; Anklam, E. **2005**. Liquid chromatographic method for quantitation of patulin at 10 ng/mL in apple-based products intended for infants: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, *88*, 518-525.
- Ascar, A. **1999**. Patulin in apple juice and children's apple food. *Fruit Processing*, *3*, 74-77.
- Avery, M.J. **2003**. Quantitative characterization of differential ion suppression on liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometric bioanalytical methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *17*, 197-201.

- Aybar, J.; Fernández, E.; Garcia-Ayuso, L.E.; González, A.; Cuadros-Rodríguez, L. **2003**. A new approach to qualitative analysis of organophosphorus pesticide residues in cucumber using a double gas chromatographic system: GC-pulsed-flame photometry and retention time locking GC-mass spectrometry. *Talanta*, *60*, 433-447.
- Aziz, N.H.; Moussa, L.A.A. **2002**. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control*, *13*, 281-288.
- Bahçeci, K.S.; Gokmen, V.; Serpen, A.; Acar, J. **2003**. The effects of different technologies on *Alicyclobacillus acidoterrestris* during apple juice production. *European Food Research and Technology*, *217*, 249-252.
- Bailly, J.D.; Tabuc, C.; Querin, A.; Guerre, P. **2005**. Production and stability of patulin, ochratoxin A, citrinin, and cyclopiazonic acid on dry cured ham. *Journal of Food Protection*, *68*, 1516-1520.
- Bennett, J.W.; Klich, M. **2003**. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*, 497-516.
- Bennett, M.; Gill, G.B.; Pattenden, G.; Shuker, A.J.; Stapleton, A. **1991**. Ylidenebutenolide Mycotoxins - Concise Syntheses of Patulin and Neopatulin from Carbohydrate Precursors. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 929-937.
- Bentley, P.H.; McRae, W. **1970**. An efficient synthesis of symmetrical 1,3-diglycerides. *Journal of Organic Chemistry*, *35*, 2082-2083.
- Betina, V. **1989a**. *Mycotoxins. Chemical, Biological and Environmental aspects. Bioactive molecules*, Vol.9, Elsevier: Amsterdam. ISBN 0-444-98885-8.
- Betina, V. **1989b**. Patulin and other small lactones. In *Mycotoxins. Chemical, Biological and Environmental Aspects. Bioactive molecules*. Elsevier: Amsterdam. Vol. 9, Cap.11; pp. 242-262. ISBN 0-444-98885-8.
- Bhatnagar, D. **1992**. *Handbook of Applied Mycology. Mycotoxins in Ecological Systems*. Bhatnagar, D., Lillehoj, E. B., and Arora, D. K. (ed.); Handbook of Applied Mycology, Vol.5, Marcel Dekker, inc.: New York.
- Birkinshaw, J.H.; Bracken, A.; Michael, S.E.; Raistrick, H. **1943**. Patulin in the common cold. II. Biochemistry and Chemistry. *The Lancet*, *242*, 625-630.
- Bissessur, J.; Permaul, K.; Odhav, B. **2001**. Reduction of patulin during apple juice clarification. *Journal of Food Protection*, *64*, 1216-1219.
- BOE **1988**. Real Decreto 475/1988, de 13 de mayo, por el que se establecen los límites máximos permitidos de las aflatoxina B1, B2, G1 y G2 en alimentos para el consumo humano. *Boletín Oficial del Estado*, *121*, 15329.
- BOE **2001a**. Ley 11/2001 de 5 de julio por la que se crea la Agencia Española de Seguridad Alimentaria. *Boletín Oficial del Estado*, *161*, 24250-24255.
- BOE **2001b**. Real Decreto 90/2001, de 2 de febrero, por el que se establecen los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del

- contenido máximo de aflatoxinas en cacahuets, frutos de cáscara, frutos desecados, cereales, leche y los productos derivados de su transformación. *Boletín Oficial del Estado*, 47, 6996-7000.
- BOE **2002**. Real Decreto 709/2002, de 19 de julio, por el que se aprueba el Estatuto de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria. *Boletín Oficial del Estado*, 178, 27560-27570.
- BOE **2003a**. Orden SCO/388/2003, de 25 de febrero, por la que se modifican los anexos I y II del Real Decreto 90/2001, de 2 de febrero, por el que se establecen los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido máximo de aflatoxinas en cacahuets, frutos de cáscara, frutos desecados, cereales, leche y los productos derivados de su transformación. *Boletín Oficial del Estado*, 50, 7839-7840.
- BOE **2003b**. Real Decreto 294/2003, de 7 de marzo, por el que se establecen los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de ocratoxina A en cereales y uvas pasas. *Boletín Oficial del Estado*, 60, 9482-9485.
- BOE **2004a**. Orden SCO/2797/2004, de 28 de julio de 2004, por la que se modifican los anexos I y II del Real Decreto 90/2001, de 2 de febrero, por el que se establecen los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido máximo de aflatoxinas en cacahuets, frutos de cáscara, frutos desecados, cereales, leche y los productos derivados de su transformación. *Boletín Oficial del Estado*, 199, 29312-29313.
- BOE **2004b**. Orden SCO/4225/2004, de 16 de diciembre, por la que se modifican los anexos del Real Decreto 294/2003, de 7 de marzo, por el que se establecen los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de ocratoxina A en cereales y uvas pasas, por lo que respecta a los alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad. *Boletín Oficial del Estado*, 321, 42046-42047.
- BOE **2004c**. Orden SCO/4226/2004, de 16 de diciembre, por la que se modifican los anexos del Real Decreto 90/2001, de 2 de febrero, por el que se establecen los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido máximo de aflatoxinas en cacahuets, frutos de cáscara, frutos desecados, cereales, leche y los productos derivados de su transformación, por lo que respecta a los alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad. *Boletín Oficial del Estado*, 312, 42047-42048.
- BOE **2004d**. Real Decreto 481/2004, de 26 de marzo, por el que se fijan los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de patulina en determinados productos alimenticios. *Boletín Oficial del Estado*, 88, 14897-14899.
- Bonfiglio, R.; King, R.C.; Olah, T.V.; Merkle, K. **1999**. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 13, 1175-1185.

- Boonzaaijer, G.; Bobeldijk, I.; van Osenbruggen, W.A. **2005**. Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method. *Food Control*, *16*, 587-591.
- Boukouvalas, J.; Maltais, F. **1995**. An efficient total synthesis of the antibiotic patulin. *Tetrahedron Letters*, *36*, 7175-7176.
- Brackett, R.E.; Marth, E.H. **1979a**. Ascorbic Acid and Ascorbate Cause Disappearance of Patulin from Buffer Solutions and Apple Juice. *Journal of Food Protection*, *42*, 864-866.
- Brackett, R.E.; Marth, E.H. **1979b**. Stability of Patulin at pH 6.0-8.0 and 25-Degrees-C. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, *169*, 92-94.
- Brause, A.R.; Trucksess, M.W.; Thomas, F.S.; Page, S.W. **1996**. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International*, *79*, 451-455.
- Budavari, S. **1996**. *The Merck index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 12 ed.; Budavari, S. (ed.); Merck Research Laboratories Merck&Co., Inc.: Whitehouse Station, NJ.
- Cabras, P.; Angioni, A.; Melis, M.; Minelli, E.V.; Pirisi, F.M. **1997**. Simplified multiresidue method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *Journal of Chromatography A*, *761*, 327-331.
- CAC **1998**. "Informe de la 30 Reunion del Comité del Código sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos". ALINORM 99/12A, FAO-OMS. Roma.
- CAC **1999**. "Informe de la 31 Reunion del Comité del Código sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos". ALINORM99/12A, FAO-OMS. Roma.
- CAC/RCP50 **2003**. "Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por patulina del zumo (jugo) de manzana e ingredientes de zumo (jugo) de manzana en otras bebidas.". Normas Codex. CAC/RCP 50-2003, Comité del Codex Alimentarius.
- Cai, Y.X.; Kingery, D.; McConnell, O.; Bach, A.C. **2005**. Advantages of atmospheric pressure photoionization mass spectrometry in support of drug discovery. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *19*, 1717-1724.
- Canas, P.; Aranda, M. **1996**. Decontamination and inhibition of patulin-induced cytotoxicity. *Environmental Toxicology and Water Quality*, *11*, 249-253.
- Caprioli, R.M. **1996**. *Selected Topics in Mass Spectrometry in the Biomolecular Sciences*. Caprioli, R. M., Malorni, A., and Sindona, G. (ed.); NATO ASI Series. Series C: Mathematical and Physical Sciences, Vol.504, Kluvert: ISBN 0-7923-4849-4.

- Careri, M.; Bianchi, F.; Corradini, C. **2002**. Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. *Journal of Chromatography A*, *970*, 3-64.
- CE **2000**. "White paper on Food Safety". COM (1999) 719 final Brussels.
- Chain, E.; Florey, H.W.; Jennings, M.A. **1942**. An antibacterial substance produced by *Penicillium claviforme*. *British Journal of Experimental Pathology*, *23*, 202-205.
- Chang, W.T.; Wang, C.C.; Chiu, J.; Liu, R.H. **2001**. Analyte/Internal standard ion pair intensity ratio in the quantitative determination of methamphetamine in urine. The intensity factor. *Analytical Sciences*, *17*, i1121-i1124.
- Chapman, J.R. **1993**. *Practical Organic Mass Spectrometry. A guide for chemical and Biochemical Analysis*. 2^a ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester. ISBN 0-471-95831-X.
- Chaytor, J.P.; Saxby, M.J. **1981**. Determination of patulin and penicillic acid in unroasted cocoa beans. *Journal of Chromatography*, *214*, 135-139.
- Chen, L.; Ingham, B.H.; Ingham, S.C. **2004**. Survival of *Penicillium expansum* and patulin production on stored apples after wash treatments. *Journal of Food Science*, *69*, C669-C675.
- Ciegler, A. **1976**. Teratogenicity of Patulin and Patulin Adducts Formed with Cysteine. *Applied and Environmental Microbiology*, *31*, 664-667.
- Ciegler, A.; Detroy, R.W.; Lillejoj, E.B. **1971**. Patulin, penicillic acid and other carcinogenic lactones. In *Microbial Toxins, vol. VI: fungal toxins*. Ciegler, A.; Kadis, S.; Ajl, S.J., Eds.; Academic Press: New York. pp. 409-434.
- Ciegler, A.; Vesonder, R.F.; Jackson, K. **1977**. Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *33*, 1004-1006.
- Coldwell, R.D.; Trafford, D.J.H.; Makin, H.L.J. **1995**. Mass Fragmentographic Assay for 25-Hydroxyvitamin-D in Plasma Without Derivatization - Enhanced Sensitivity for Metabolites of Vitamin-D-2 and Vitamin-D-3 After Precolumn Dehydration. *Journal of Mass Spectrometry*, *30*, 348-356.
- Cole, R.B.; Harrata, A.K. **1993**. Solvent Effect on Analyte Charge-State, Signal Intensity, and Stability in Negative-Ion Electrospray Mass-Spectrometry - Implications for the Mechanism of Negative-Ion Formation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *4*, 546-556.
- CurrentScience **2004**. 'Patulin'- A remedy for common cold (Reprinted from Current Science, vol XIII, Feb, 1944). *Current Science*, *86*, 1476.
- Damoglou, A.P.; Campbell, D.S. **1986**. The Effect of Ph on the Production of Patulin in Apple Juice. *Letters in Applied Microbiology*, *2*, 9-11.
- Dekker. **1998**. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Sinha, K. K. and Bhatnagar, D (ed.); Marcel Dekker: New York. ISBN 0-8247-0192-5.

- Delage, N.; d'Harlingue, A.; Ceccaldi, B.C.; Bompeix, G. **2003**. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food Control*, *14*, 225-227.
- Di Raddo, P. **1993**. A convenient method of esterification of fatty acids: An undergraduate organic laboratory experiment. *Journal of Chemical Education*, *70*, 1034.
- Dickens, F.; Jones, H.E. **1961**. Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. *British Journal of Cancer*, *15*, 85-100.
- DOCE **2001**. Reglamento (CE) N° 466/2001 de la Comisión de 8 de marzo de 2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, *L77*, 1-13.
- DOCE **2002a**. Recomendación de la Comisión de 12 de marzo de 2002 relativa a los programas coordinados de controles en el ámbito de la alimentación animal para el año 2002 de conformidad con la directiva 95/53/CE del Consejo. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, *L 70*, 20-22.
- DOCE **2002b**. Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, *L 31*, 1-24.
- DOCE **2002c**. Reglamento (CE) N° 257/2002 de la Comisión de 13 de febrero de 2002 que modifica el Reglamento (CE) N° 194/97 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, y el Reglamento (CE) n° 466/2001, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, *L 41*, 12-15.
- DOCE **2002d**. Reglamento (CE) N° 472/2002 de la Comisión de 12 de marzo de 2002 que modifica el Reglamento (CE) n° 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, *L 75*, 18-20.
- DOCE **2003a**. Directiva 2003/78/CE de la Comisión de 11 de agosto de 2003 por la que se fijan los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de patulina en productos alimenticios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, *L 203*, 40-44.
- DOCE **2003b**. Recomendación de la Comisión de 11 de agosto de 2003 relativa a la prevención y la reducción de la contaminación por patulina del zumo de manzana y los ingredientes de zumo de manzana en otras bebidas. *Diario Oficial de la Unión Europea*, *L203*, 54-59.
- DOCE **2003c**. Reglamento (CE) N° 2174/2003 de la Comisión de 12 de diciembre de 2003 que modifica el Reglamento (CE) N° 466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas. *Diario Oficial de la Unión Europea*, *L 326*, 12-15.

- DOCE **2003d.** Reglamento (CE) N°1425/2003 de la Comisión de 11 de agosto de 2003 que modifica el Reglamento (CE) N°466/2001 en lo relativo a la patulina. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L203, 1-3.*
- DOCE **2004a.** Recomendación de la Comisión de 17 de febrero de 2004 relativa al programa coordinado de controles en el ámbito de la alimentación animal para el año 2004 de conformidad con la directiva 95/53/CE del Consejo. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L 52, 70-76.*
- DOCE **2004b.** Reglamento (CE) N° 455/2004 de la Comisión de 11 de marzo de 2004 que modifica el Reglamento (CE) N°466/2001 en lo relativo a la patulina. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L 74, 11.*
- DOCE **2004c.** Reglamento (CE) N° 683/2004 de la Comisión de 13 de abril de 2004 que modifica el Reglamento (CE) N°466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas y a la ocratoxina A en los alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L 106, 3-5.*
- DOCE **2005a.** Recomendación de la Comisión de 2 de marzo de 2005 relativa al programa coordinado de controles en el ámbito de la alimentación animal para el año 2005 de conformidad con la Directiva 95/53/CE del Consejo. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L 62, 22-29.*
- DOCE **2005b.** Reglamento (CE) N° 123/2005 de la Comisión de 26 de enero de 2005 que modifica el reglamento (CE) n° 466/2001 con respecto a la ocratoxina A. *Diario Oficial de la Union Europea, L 25, 3-5.*
- DOCE **2005c.** Reglamento (CE) N° 856/2005 de la Comisión de 6 de junio de 2005 por el que modifica el Reglamento (CE) n° 466/2001 en lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium*. *Diario Oficial de la Union Europea, L 143, 3-8.*
- DOCE **2006.** Reglamento CE N°401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Union Europea, L70, 12-34.*
- DOGC **2002.** Llei 20/2002, de 5 de juliol, de seguretat alimentària. *Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya, 3679, 13041-13047.*
- DOGC **2003.** Decret 162/2003 de 8 de juliol pel qual s'aproven els Estatuts de l'Agència Catalana de Seguretat Alimentària. *Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya, 3928, 14459.*
- Dragacci, S. **1991.** Surveillance et prévention de la contamination des aliments par les mycotoxines. La Lettre de l'ARET Juin 1991.
- Drusch, S.; Ragab, W. **2003.** Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *Journal of Food Protection, 66, 1514-1527.*
- Dulaney, E.L.; Jacobsen, C.A. **1987.** Synergy of patulin with other antibiotics. *The Journal of antibiotics, XL, 1211-1212.*
- Dutton, M. **1996.** Fumonisin, Mycotoxins of increasing importance: Their nature and their Effects. *Pharmacology and Therapeutics, 70, 137-161.*

- EFSA **2004a**. 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. *The EFSA Journal* 39, 1-27. (EFSA-Q-2003-035).
- EFSA **2004b**. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission Related to Deoxynivalenol (DON) as Undesirable Substance in Animal Feed. *The EFSA Journal*, 73, 1-41.
- EFSA **2004c**. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission Related to Zearalenone as Undesirable Substance in Animal Feed. *The EFSA Journal*, 89, 1-35.
- EFSA **2004d**. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to Ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, 101, 1-36.
- Egmond, H.P. **1999**. "Tercera conferencia Internacional Mixta FAO/OMS-PNUMA sobre micotoxinas. Reglamentación mundial de las micotoxinas". Myc-conf/99/8aTúnez, 3-6 marzo 1999.
- Eiceman, G.; Hill, HH.; Gardea-Torresdey, J. **1996**. Gas chromatography. *Analytical Chemistry*, 68, 291R-308R.
- Eichelberger, J.W.; Harris, L.E.; Budde, W.L. **1973**. Reference compound to calibrate ion abundance measurements in gas chromatography-mass spectrometry systems. *Analytical Chemistry*, 47, 995-1000.
- Eisele, T.A.; Gibson, M.Z. **2003**. Syringe-cartridge solid-phase extraction method for patulin in apple juice. *Journal of AOAC International*, 86, 1160-1163.
- Errampalli, D.; Northover, J.; Skog, L.; Brubacuer, R.; Collucci, C.A. **2005**. Control of blue mold (*Penicillium expansum*) by fludioxonil in apples (cv Empire) under controlled atmosphere and cold storage conditions. *Pest Management Science*, 61, 591-596.
- EU **2002**. "SCOOP-Task 3.2.8. Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU members states". 3.2.8., Directorate General Health and Consumer Protection.
- Fan, X.T.; Niemira, B.A.; Thayer, D.W. **2004**. Low-dose ionizing radiation of fruit juices: Benefits and concerns. *Irradiation of Food and Packaging: Recent Developments*, 875, 138-150.
- FAO **1995**. "Worldwide regulations for mycotoxins". D/W 1380, FAO. Rome.
- FAO. **1996**. *IX International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins*. Miraglia, M., Brera, C., and Onori, R. (ed.); Instituto Superiore di Sanita: Rome.
- FAO. **1997**. *Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium*. FAO Food and Nutrition Paper-64, ISBN 9251039607.
- FAO **1999**. Food, Nutrition and agriculture. *Food, Nutrition and Agriculture* 23, 1-56.

- FAO. **2003.** *Manual sobre la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las Micotoxinas.* FAO (ed.); FAO Food and Nutrition Papers-73, ISBN 9253046112.
- FAO. **2004.** *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003.* FAO Food and Nutrition Paper-81, ESNS: Roma. ISBN 9253051620.
- FAO-OMS **1995.** "Application of Risk analysis to Food Standards Issues". Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. Who/FNU/FOS/95.3 Geneva, Switzerland.
- FAO-OMS-UNEP **1999.** "Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins. Report of the Conference". Tercera conferencia Internacional Mixta FAO/OMS-PNUMA sobre micotoxinas. Túnez, 3-6 marzo 1999. Myc-conf/99/Repe
- FAO-WHO **1996.** "Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants.". International Programme on Chemical Safety. WHO FOOD ADDITIVES SERIES, 35. 35
- Fliege, R.; Metzler, M. **1999.** The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks in vitro involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and alpha-amino groups. *Chemico-Biological Interactions*, 123, 85-103.
- Fliege, R.; Metzler, M. **2000a.** Electrophilic properties of patulin. Adduct structures and reaction pathways with 4-bromothiophenol and other model nucleophiles. *Chemical Research in Toxicology*, 13, 363-372.
- Fliege, R.; Metzler, M. **2000b.** Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts. *Chemical Research in Toxicology*, 13, 373-381.
- Fremy, J.M.; Gleizes, E. **1991.** Degradation of patulin by using ammoniation. In *Laboratory de-contamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes.* Castegnaro, J.J., Ed.; IARC Scientific Publications: Lyon. pp. 41-45.
- Friedman, M.; Cavins, J.F.; Wall, J.S. **1965.** Relative Nucleophilic Reactivities of Amino Groups and Mercaptide Ions in Addition Reactions with α,β -Unsaturated Compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 87, 3672-3681.
- Frisvad, J.C.; Smedsgaard, J.; Larsen, T.O.; Samson, R.A. **2004.** Mycotoxins, drugs and other extralites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 201-241.
- Fujimoto, Y.; Suzuki, T.; Hoshino, Y. **1975.** Determination of penicillic acid and patulin by gas liquid chromatography with an electron capture detector. *Journal of Chromatography*, 105, 99-106.
- Gadir, S.a.; Smith, Y.; Taha, A.A.; Thaller, V. **1986.** Synthesis of 4-hydroxymethylfuran-2(5H)-one, a metabolite of the Celastraceae *Siphonodon australe*. *Journal of Chemical Research (S)*, 222-223.

- Gaskell, S.J. **1997**. Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry*, *32*, 677-688.
- Geiger, W.B.; Conn, J.E. **1945**. The Mechanism of the Antibiotic Action of Clavacin and Penicillic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, *67*, 112-116.
- Gilbert, J. **1987**. *Applications of Mass Spectrometry in Food Science*. 1^a ed.; Gilbert, J. (ed.); Elsevier: London. ISBN 1-85166-081-X.
- Gill, G.B.; Pattenden, G.; Stapleton, A. **1988**. A Concise Synthesis of Patulin from Arabinose. *Tetrahedron Letters*, *29*, 2875-2878.
- Gohlke, R.S. **1959**. Time-Of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography. *Analytical Chemistry*, *31*, 535-541.
- Gohlke, R.S. **1962**. Time-Of-Flight Mass Spectrometry - Application to Capillary Column Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*, *34*, 1332-1333.
- Gohlke, R.S.; McLafferty, F.W. **1993**. Early gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *4*, 367-371.
- Gokmen, V.; Acar, J. **1999**. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *847*, 69-74.
- Gokmen, V.; Acar, J.; Sarioglu, K. **2005**. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, *543*, 64-69.
- Gokmen, V.; Artik, N.; Acar, J.; Kahraman, N.; Poyrazoglu, E. **2001**. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. *European Food Research and Technology*, *213*, 194-199.
- Guerre, P. **2000**. Intérêt des traitements des matières premières et de l'usage d'adsorbants lors d'une contamination des aliments du bétail par des mycotoxines. *Revue de Médecine Veterinaire*, *151*, 1095-1106.
- Gye, W.E. **1943**. III. Preliminary Trial in the Common Cold. *The Lancet*, *242*, 630-631.
- Hanold, K.A.; Fischer, S.M.; Cormia, P.H.; Miller, C.E.; Syage, J.A. **2004**. Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS. *Analytical Chemistry*, *76*, 2842-2851.
- Harwig, J.; Blanchfield, B.J.; Jarvis, G. **1977**. Effect of Water Activity on Disappearance of Patulin and Citrinin from Grains. *Journal of Food Science*, *42*, 1225-1228.
- Hasan, H.A.H. **2000**. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *16*, 607-612.

- Herrman, J.L.; Walker, R. **1999**. Risk analysis of mycotoxins by the Joint Fao/WHOExpert Committee on Food Additives (JECFA). *Food, Nutrition and Agriculture*, *23*, 17-24.
- Hubbard, C.; Mighell, A.; Ware, G. **1977**. 4-Hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-one (dl-patulin). *Acta Crystallographica B*, *33*, 928-931.
- Huebner, H.J.; Mayura, K.; Pallaroni, L.; Ake, C.L.; Lemke, S.L.; Herrera, P.; Phillips, T.D. **2000**. Development and characterization of a carbon-based composite material for deducing patulin levels in apple juice. *Journal of Food Protection*, *63*, 106-110.
- IARC **1986**. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some natural occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. 40, 83-98. International agency for research on cancer. Lyon. IARC Monographs.
- IARC **1987**. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. Report of an IARC Expert Committee. Supplement 7. Supplement 7. Lyon. IARC Monographs.
- IARC **1993a**. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. 56. IARC Monographs.
- IARC **1993b**. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Toxins derived from *Fusarium sporotrichioides*: T-2 toxin. Vol 56, 467-488. Lyon France. IARC Monographs.
- Ito, R.; Yamazaki, H.; Inoue, K.; Yoshimura, Y.; Kawaguchi, M.; Nakazawa, H. **2004**. Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination level in Japan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 7464-7468.
- Jackson, L.S.; Beacham-Bowden, T.; Keller, S.E.; Adhikari, C.; Taylor, K.T.; Chirtel, S.J.; Merker, R.I. **2003**. Apple quality, storage, and washing treatments affect patulin levels in apple cider. *Journal of Food Protection*, *66*, 618-624.
- Jackson, L.S.; Reynolds, B.H.; Keller, S.E. **2000**. Effect of apple quality and sanitation on patulin levels in apple cider. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, *219*, U38.
- Jefford, C.W.; Rossier, J.C.; Boukouvalas, J.; Huang, P. **1994**. A concise synthesis of (E)- and (Z)-neomanoalides. *Helvetica Chimica Acta*, *77*, 661-667.
- Johnstone, R.A.W.; Rose, M.E. **1996**. *Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*. 2 ed.; Cambridge University Press: Cambridge. ISBN 0-521-42497-6.
- Jones, J.B.; Young, J.M. **1968**. Carcinogenicity of Lactones. III. The reactions of Unsaturated γ -Lactones with L-Cysteine. *Journal of Medicinal Chemistry*, *11*, 1176-1182.

- Kadalkal, C.; Nas, S. **2002**. Effect of activated charcoal on patulin, fumaric acid and some other properties of apple juice. *Nahrung-Food*, *46*, 31-33.
- Kadalkal, C.; Nas, S. **2003**. Effect of heat treatment and evaporation on patulin and some other properties of apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *83*, 987-990.
- Karasek, F.W.; Clement, R.E. **1988**. *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Principles and techniques*. 1 ed.; Elsevier: Amsterdam. The Netherlands. ISBN 0-444-42760-0.
- Katzman, P.A.; Hays, E.E.; Cain, C.K.; Van Wyk, J.J.; Reithel, F.J.; Thayer, S.A.; Doisy, E.A. **1944**. Clavacin, an antibiotic substance from *Aspergillus clavatus*. *Journal of Biological Chemistry*, *154*, 475-486.
- Kellert, M.; Baltes, W.; Blaas, W.; Wittkowski, M. **1983**. Determination of Patulin in apple products by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry (Historical Archive)*, *23*, 245-246.
- Keski-Hynnala, H.; Kurkela, M.; Elovaara, E.; Antonio, L.; Magdalou, J.; Luukkanen, L.; Taskinen, J.; Kostianen, R. **2002**. Comparison of electrospray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization in the identification of apomorphine, dobutamine, and entacapone phase II metabolites in biological samples. *Analytical Chemistry*, *74*, 3449-3457.
- Kloepfer, A.; Quintana, J.B.; Reemtsma, T. **2005**. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *Journal of Chromatography A*, *1067*, 153-160.
- Krivobok, S.; Seiglemurandi, F.; Steiman, R.; Benoitguyod, J.L.; Bartoli, M.H. **1994**. Antitumoral Activity of Patulin and Patulin-Cysteine Adducts. *Pharmazie*, *49*, 277-279.
- Krska, R.; Welzig, E.; Berthiller, F.; Molinelli, A.; Mizaikoff, B. **2005**. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Additives and Contaminants*, *22*, 345-353.
- Kubacki, S.J.; Goszcz, H. **1988**. HPLC methods for the determination of patulin in apple juice. *Pure and Applied Chemistry*, *60*, 871-876.
- Kuiper-Goodman, T. **1999**. Approaches to the risk analysis of mycotoxins in the food supply. *Food Nutrition and Agriculture*, *23*, 10-15.
- Lahlali, R.; Serrhini, M.N.; Jijakli, M.H. **2005**. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, *103*, 315-322.
- Lai, W.K.; Pang, C.P.; Law, L.K.; Wong, R.; Li, C.K.; Yuen, P.M.-P. **1998**. Routine analysis of plasma busulfan by gas chromatography-mass fragmentography. *Clin Chem*, *44*, 2506-2510.

- Laidou, I.A.; Thanassouloupoulos, C.C.; Liakopoulou-Kyriakides, M. **2001**. Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four post-harvest pathogens. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, *149*, 457-461.
- Larsen, J. **2004**. "Trichotecens with a special focus on DON". ILSI Europe Report Series. ILSI Press. Belgium.
- Legarda, T.M.; Burdaspal, P.A. **2006**. Patulina en alimentos infantiles a base de manzana comercializados en España y otros países europeos, usando un método de análisis adecuado para su determinación a niveles inferiores a 10 µg/Kg. *Alimentaria*, *368*, 69-79.
- Leggott, N.L.; Shephard, G.S. **2001**. Patulin in South African commercial apple products. *Food Control*, *12*, 73-76.
- Leggott, N.L.; Shephard, G.S.; Stockenstrom, S.; Staal, E.; van Schalkwyk, D.J. **2001**. The reduction of patulin in apple juice by three different types of activated carbon. *Food Additives and Contaminants*, *18*, 825-829.
- Leis, H.M.; Fauler, G.; Windischhofer, W. **2004**. Synthesis of d(1)-N-ethyltramadol as an internal standard for the quantitative determination of tramadol in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *804*, 369-374.
- Lennox, J.E.; McElroy, L.J. **1984**. Inhibition of growth and patulin synthesis in *Penicillium expansum* by potassium sorbate and sodium propionate in culture. *Applied and Environmental Microbiology*, *48*, 1031-1033.
- Leonard, J.; Lygo, B.; Procter, G. **1995a**. Purification. In *Advanced practical organic chemistry*. Second ed. Blackie Academic & Professional: Oxford. Cap.11; pp. 184-224. ISBN 0-7514-0200-1.
- Leonard, J.; Lygo, B.; Procter, G. **1995b**. Reagents: Preparation, purification and handling. In *Advanced practical organic chemistry*. second ed. Blackie Academic & Professional: Oxford. Cap.6; pp. 69-106. ISBN 0-7514-0200-1.
- Lesney, M.S. **1998**. Creating a Central Science. A brief history of "color writing". *Today's Chemist at Work*, *7*, 67-72.
- Lindroth, S.; Vonwright, A. **1978**. Comparison of Toxicities of Patulin and Patulin Adducts Formed with Cysteine. *Applied and Environmental Microbiology*, *35*, 1003-1007.
- Llovera, M.; Balcells, M.; Torres, M.; Canela, R. **2005**. Parallel Synthesis: A New Approach for Developing Analytical Internal Standards. Application to the analysis of Patulin by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Science*, *53*, 6643-6648.
- Llovera, M.; Viladrich, R.; Torres, M.; Canela, R. **1999**. Analysis of underivatized patulin by a GC/MS technique. *Journal of Food Protection*, *62*, 202-205.

- Logrieco, A.; Bottalico, A.; Mule, G.; Moretti, A.; Perrone, G. **2003**. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, *109*, 645-667.
- Lopez-Garcia, R.; Park, D.L.; Phillips, T.D. **1999**. Integrated management systems. *Food, Nutrition and Agriculture*, *23*, 28-48.
- LopezDiaz, T.M.; Flannigan, B. **1997a**. Mycotoxins of *Aspergillus clavatus*: Toxicity of cytochalasin E, patulin, and extracts of contaminated barley malt. *Journal of Food Protection*, *60*, 1381-1385.
- LopezDiaz, T.M.; Flannigan, B. **1997b**. Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. *International Journal of Food Microbiology*, *35*, 129-136.
- LopezDiaz, T.M.; RomanBlanco, C.; GarciaArias, M.T.; GarciaFernandez, M.C.; GarciaLopez, M.L. **1996**. Mycotoxins in two Spanish cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*, *30*, 391-395.
- Lovett, J.; Peeler, J.T. **1973**. Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution. *Journal of Food Science*, *38*, 1094-1095.
- Lovett, J.; Thompson, R.G.; Boutin, B.K. **1975**. Trimming as a means of removing patulin from fungus-rotted apples. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, *58*, 909-911.
- Lucas, E. **2001**. Aspectos generales de las micotoxinas. Evaluación según el codex Alimentarius.
<http://www.fao.org/Regional/LAmerica/prior/comagric/codex/pdf/toxinas.pdf>
- Magan, N. **2004**. *Mycotoxins in Food. Detection and Control*. Magan, N. and Olsen, M. (ed.); Woodhead publishing limited. CRC Press. Boca Raton: Cambridge. ISBN 1-85573-733-7.
- Mayer, V.W.; Legator, M.S. **1969**. Production of petite mutants of *Sacharomyces cerevisiae* by patulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *17*, 454-456.
- McCallum, J.L.; Tsao, R.; Zhou, T. **2002**. Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*, *65*, 1937-1942.
- McLafferty, F.W. **1980**. *Interpretation of Mass spectra*. 3^a ed.; Organic Chemistry Series, ISBN 0-935702-04-0.
- Melchert, H.U.; Pabel, E. **2004**. Reliable identification and quantification of trichothecenes and other mycotoxins by electron impact and chemical ionization-gas chromatography-mass spectrometry, using an ion-trap system in the multiple mass spectrometry mode - Candidate reference method for complex matrices. *Journal of Chromatography A*, *1056*, 195-199.
- Miller, J.D. **1991**. Significance of grain mycotoxins for health and nutrition. Champ, B.R.; Highley, E.; Hocking, A.D.P.J.I., Eds.; ACIAR Proceedings N° 36. Canberra, Australia. pp. 126-136. ISBN **ISBN**: 1 86320 040 1.

- Miller, J.D.; Trenholm, H.L. **1994**. *Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxins*. Miller, J. D. and Trenholm, H. L. (ed.); Eagan press: St. Paul. ISBN 0-9624407-5-2.
- Moodley, R.S.; Govinden, R.; Odhav, B. **2002**. The effect of modified atmospheres and packaging on patulin production in apples. *Journal of Food Protection*, *65*, 867-871.
- Mortimer, D.N.; Parker, I.; Shepherd, M.J.; Gilbert, J. **1985**. A limited survey of retail apple and grape juices for the mycotoxin patulin. *Food Additives and Contaminants*, *2*, 165-170.
- Moss, M.O. **1998**. Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, *84*, 62S-76S.
- Moss, M.O.; Long, M.T. **2002**. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Additives and Contaminants*, *19*, 387-399.
- Moulé, Y.; Hatey, F. **1977**. Mechanism of the in vitro inhibition of transcription by patulin, a mycotoxin from *Byssoclamys nivea*. *FEBS Letters*, *74*, 121-125.
- Mutlu, M.; Gokmen, V. **1998**. Determination of effective mass transfer coefficient (K-c) of patulin adsorption on activated carbon packed bed columns with recycling. *Journal of Food Engineering*, *35*, 259-266.
- Niessen, W.M.A. **1999**. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Second ed.; Dekker, M. (ed.); Chromatographic Science Series, Vol.79, Dekker, M.: New York. ISBN 0-8247-1936-0.
- Niessen, W.M.A. **2000**. Mass Spectrometry: Innovation and Application. *Journal of Chromatography A*, *970*, 1.
- Nozal, M.J.; Bernal, J.L.; Toribio, M.L.; Diego, J.C.; Ruiz, A. **2004**. Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, *1047*, 137-146.
- Okeke, B.; Seiglemurandi, F.; Steiman, R.; Benoitguyod, J.L.; Kaouadji, M. **1993**. Identification of Mycotoxin-Producing Fungal Strains - A Step in the Isolation of Compounds Active Against Rice Fungal Diseases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*, 1731-1735.
- Pareles, S.R.; Rosen, J.D. **1974**. Quantitative-Analysis by Dynamic Single Ion Detection. *Analytical Chemistry*, *46*, 2056-2059.
- Park, D.L.; Njapau, H.; Boutrif, E. **1999**. Minimizing risk posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. *Food, Nutrition and Agriculture*, *23*, 49-56.
- Paster, N.; Huppert, D.; Barkai-Golan, R. **1995**. Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres. *Food Additives and Contaminants*, *12*, 51-58.

- Paul, W.; Steinwedel, H. **1953**. A new mass spectrometer without magnetic field. *Journal of Physical Sciences*, *8A*, 448-450.
- Peraica, M.; Radic, B.; Lucic, A.; Pavlovic, M. **2000**. Efectos toxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bulletin of the World Health Organization*, *77*, 754-766.
- Pero, R.W.; Harvan, D.; Owens, R.G. **1972**. A gas chromatographic method for the mycotoxin penicillic acid. *Journal of Chromatography*, *65*, 501-506.
- Pfohl, A. **1999**. *Les mycotoxines dans l'alimentation: evaluation et gestion du risque*. TED AND DOC ed.;Section de l'Alimentation et de la Nutrition, Conseil Sup'erieur d'Hygiène Publique de France: Paris. ISBN 2-7430-0293-X.
- Pohland, A.E.; Allen, R. **1970**. Stability Studies with patulin. *Journal of the AOAC*, *53*, 688-691.
- Pohland, A.E.; Shuller, P.L.; Steyn, P.S. **1982**. Physicochemical data for some selected mycotoxins. *International Journal of Pure and Applied Chemistry*, *54*, 2219-2284.
- Poole, C.F.; Poole, S.K. **1991**. *Chromatography Today*. 1^a ed.;Elsevier: Amstendam. ISBN 0-444-89161-7.
- Price, K.R. **1979**. Comparison of 2 Quantitative Mass-Spectrometric Methods for the Analysis of Patulin in Apple Juice. *Biomedical Mass Spectrometry*, *6*, 573-574.
- Priest, J.W.; Light, R.J. **2001**. Aplications of high performance liquid chromatography to quantitation of metabolites and enzymes of the patulin pathway from *Penicillium patulum*. *Journal of Chromatography*, *513*, 237-246.
- Prieta, J.; Moreno, M.A.; Blanco, J.L.; Suarez, G.; Dominguez, L. **1992**. Determination of Patulin by Diphasic Dialysis Extraction and Thin-Layer Chromatography. *Journal of Food Protection*, *55*, 1001-1002.
- Prieta, J.; Moreno, M.A.; Díaz, S.; Suárez, G.; Domínguez, L. **1994a**. La patulina como indicador de calidad en productos elaborados con manzana. *Alimentaria*, 75-79.
- Prieta, J.; Moreno, M.A.; Díaz, S.; Suárez, G.; Domínguez, L. **1994b**. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*, 1701-1703.
- Raistrick, H. **1943**. Patulin in the Common Cold, Collaborative Research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier: I. Introduction. *The Lancet*, *242*, 625.
- Rantakokko, P.; Yritys, M.; Vartianen, T. **2004**. Matrix effects in the gas chromatographic-mass spectrometric determination of brominated analogues

- of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone. *Journal of Chromatography A*, 1028, 179-188.
- Roach, J.A.D.; White, K.D.; Trucksess, M.W.; Thomas, F.S. **2000**. Capillary Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Chemical Ionisation and Negative Ion Detection for Confirmation of Identity of Patulin in Apple Juice. *Journal of AOAC International*, 38, 104-112.
- Roach, J.A.G.; Brause, A.R.; Eisele, T.A.; Rupp, H.S. **2002**. HPLC detection of patulin in apple juice with GC/MS confirmation of patulin identity. *Mycotoxins and Food Safety*, 504, 135-140.
- Rosen, J.D.; Pareles, S.R. **1974**. Quantitative analysis of patulin in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, 1024-1026.
- Rovira, R.; Ribera, F.; Sanchis, V.; Canela, R. **1993**. Improvements in the quantitation of patulin in apple juice by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 214-216.
- Rundberget, T.; Wilkins, A.L. **2002**. Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 964, 189-197.
- Rupp, H.S.; Turnipseed, S.B. **2000**. Confirmation of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in apple juice by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 83, 612-620.
- Rychlik, M.; Schieberle, P. **1998**. Synthesis of ¹³C-Labeled Patulin [4-hydroxy-4-*H*-furo[3,2-*c*] pyran-2(6*H*)-one¹] to be used as internal standard in a stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5163-5169.
- Rychlik, M.; Schieberle, P. **1999**. Quantification of the mycotoxin patulin by a Stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3749-3755.
- Rychlik, M.; Schieberle, P. **2001**. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. *European Food Research and Technology*, 212, 274-278.
- Ryu, D.; Holt, D.L. **1993**. Growth Inhibition of *Penicillium expansum* by Several Commonly Used Food Ingredients. *Journal of Food Protection*, 56, 862-867.
- Sands, D.C.; McIntyre, J.L.; Walton, G.S. **1976**. Use of Activated-Charcoal for Removal of Patulin from Cider. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 388-391.
- SCF **2000a**. "Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 2¹: Zearalenone (ZEA)". SCF/CS/CNTM/MYC/22. Rev 3 Final, European Commission. Brussel, Belgium.
- SCF **2000b**. "Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 3 ¹: Fumonisin B1 (FB1)". SCF/CS/CNTM/MYC/24 Final, European Commission. Brussel, Belgium.

- SCF **2003**. "Updated Opinion of the Scientific Committee on Food on Fumonisin B1, B2 and B3". SCF/CS/CNTM/MYC/28Final, European Commission. Brussel, Belgium.
- Schenck, F.J.; Lehotay, S.J. **2000**. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? *Journal of Chromatography A*, *868*, 51-61.
- Scott, A.I.; Yalpani, M. **1967**. Mass-spectrometric study of biosynthesis. Conversion of deuterio-m-cresol into patulin. *Chemical Communications*, *18*, 945-946.
- Scott, P.M. **1974**. Collaborative study of a chromatographic method for determination of patulin in apple juice. *Journal of the AOAC*, *57*, 621-625.
- Scott, P.M.; Fuleki, T.; Harwig, J. **1977**. Patulin Content of Juice and Wine Produced from Moldy Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *25*, 434-437.
- Scott, P.M.; Kennedy, P.C. **1973**. Improved method for the thin layer chromatographic determination of patulin in apple juice. *Journal of the AOAC*, *56*, 813-816.
- Scott, P.M.; Miles, W.F.; Toft, P.; Dube, J.G. **1972**. Occurrence of patulin in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *20*, 450-451.
- Scott, P.M.; Somers, E. **1968**. Stability of Patulin and Penicillic Acid in Fruit Juices and Flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *16*, 483-&.
- Scott, R.P.W. **2005**. Principles and Practice of Chromatography. The Chrom-Ed Chromatography Series.
- Seijas, J.A.; Vázquez, M.P.; Estévez, R.; Castedo, L.; Riguera, R. **1989**. New total synthesis of patulin. *Heterocycles*, *29*, 181-184.
- Sekiguchi, J.; Shimamoto, T.; Yamada, Y.; Gaucher, G.M. **1983**. Patulin Biosynthesis - Enzymatic and Non-Enzymatic Transformations of the Myco-Toxin (E)-Ascladiol. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*, 1939-1942.
- Sewram, V.; Nair, J.J.; Nieuwoudt, T.W.; Leggott, N.L.; Shephard, G.S. **2000**. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *897*, 365-374.
- Shah, V.P.; Midha, K.K.; Findlay, J.; Hill, H.M.; Hulse, H.; McGilveray, I.; McKay, G.; Miller, K.; Patnaik, R.N.; Powell, M.L.; Tonelli, A.; Viswanathan, C.T.; Yacobi, A. **2000**. Bioanalytical method validation. A revisit whit a decade of progress. *Pharmaceutical Research*, *17*, 1551-1556.
- Shephard, G.S.; Leggott, N.L. **2000**. Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *Journal of Chromatography A*, *882*, 17-22.

- Sheu, F.; Shyu, Y.T. **1999**. Analysis of patulin in apple juice by diphasic dialysis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 2711-2714.
- Sheu, F.; Lee, O.; Shyu, Y.T. **1999**. The synthesis of antigens and the product of antibodies against patulin derivatives. *Journal of Food and Drug Analysis*, *7*, 65-72.
- Shroads, A.L.; Henderson, G.N.; Cheung, J.; James, M.O.; Stacpoole, P.W. **2004**. Unified gas chromatographic-mass spectrometric method for quantitating tyrosine metabolites in urine and plasma. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *808*, 153-161.
- Sommer, N.F.; Buchanan, J.R.; Fortlage, R.J. **1974**. Production of Patulin by *Penicillium expansum*. *Applied Microbiology*, *28*, 589-593.
- Stansfeld, J.M.; Francis, A.E.; Stuart-Harris, C.H. **1944**. Laboratory and Clinical Trials of Patulin. *The Lancet*, *244*, 370-372.
- Steiman, R.; Seigle-Murandi, F.; Sage, L.; Krivobok, S. **1989**. Production of Patulin by Micromycetes. *Mycopathologia*, *105*, 129-133.
- Stinson, E.E.; Huhtanen, C.N.; Zell, T.E.; Schwartz, D.P.; Osman, S.F. **1977**. Determination of Patulin in Apple Juice Products As 2,4-Dinitrophenylhydrazone Derivative. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *25*, 1220-1222.
- Stinson, E.E.; Osman, S.F.; Bills, D.D. **1979**. Water-Soluble Products from Patulin During Alcoholic Fermentation of Apple Juice. *Journal of Food Science*, *44*, 788-8.
- Stinson, E.E.; Osman, S.F.; Huhtanen, C.N.; Bills, D.D. **1978**. Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *Applied and Environmental Microbiology*, *36*, 620-622.
- Stuart-Harris, C.H.; Francis, A.E.; Stansfeld, J.M. **1943**. Patulin in the Common Cold. *The Lancet*, *242*, 684.
- Sumbu, Z.L.; Thonart, P.; Bechet, J. **1983**. Action of patulin on a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*, 110-115.
- Suzuki, T.; Fujimoto, Y.; Hoshino, Y.; Tanaka, A. **1975**. Trimethylsilylation of penicillic acid and patulin, and the stability of the products. *Journal of Chromatography*, *105*, 95-98.
- Sydenham, E.W.; Vismar, H.F.; Marasas, W.F.O.; Brown, N.; Schlechter, M.; Vanderwesthuizen, L.; Rheeder, J.P. **1995**. Reduction of Patulin in Apple Juice Samples - Influence of Initial Processing. *Food Control*, *6*, 195-200.
- Sydenham, E.W.; Vismar, H.F.; Marasas, W.F.O.; Brown, N.L.; Schlechter, M.; Rheeder, J.P. **1997**. The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. *Food Additives and Contaminants*, *14*, 429-434.

- Szlosek, M.; Franck, X.; Figadere, B.; Cave, A. **1998**. Highly enantioselective 1,2-addition of 2-[(trimethylsilyl)oxy]furan to aldehydes: Application to muricatacin synthesis. *Journal of Organic Chemistry*, *63*, 5169-5172.
- Tabata, S.; Iida, K.; Suzuki, J.; Kimura, K.; Ibe, A.; Saito, K. **2004**. A quantification and confirmation method of patulin in apple juice by GC/MS. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, *45*, 245-249.
- Tada, M.; Ohtsu, K.; Chiba, K. **1994**. Synthesis of patulin and its cyclohexane analogue furan derivatives. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, *42*, 2167-2169.
- Taeymans, D. **2000**. New technologies for ensuring the quality, safety and availability of food. *Food Nutrition and Agriculture*, *26*, 24-37.
- Takino, M.; Daishima, S.; Nakahara, T. **2003**. Liquid chromatography/mass spectrometric determination of patulin in apple juice using atmospheric pressure photoionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *17*, 1965-1972.
- Taniwaki, M.H.; Hoenderboom, C.J.M.; Vitali, A.D.; Eiroa, M.N.U. **1992**. Migration of Patulin in Apples. *Journal of Food Protection*, *55*, 902-904.
- Tarter, E.J.; Scott, P.M. **1991**. Determination of Patulin by Capillary Gas-Chromatography of the Heptafluorobutyrate Derivative. *Journal of Chromatography*, *538*, 441-446.
- Taylor, P.J. **2005**. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, *38*, 328-334.
- Troost, J.R.; Olavesen, E.Y. **1996**. Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Calibration Bias. *Analytical Chemistry*, *68*, 708-711.
- Tsao, R.; Zhou, T. **2000**. Micellar electrokinetic capillary electrophoresis for rapid analysis of patulin in apple cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 5231-5235.
- Tudos, A.J.; Lucas-Van Den Bos, E.R.; Stigter, E.C.A. **2003**. Rapiidsurface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 5843-5848.
- Van Egmond, H.P. **1989**. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Additives and Contaminants*, *6*, 139-188.
- Van Schothorst, M. **2004**. "A simple guide to understanding and applying the Hazard Analysis Critical Control Point Concept.". ILSI Europe Concise Monographs Series. ILSI Press. Belgium.
- Vero, S.; Vazquez, A.; Cerdeiras, M.P.; Soubes, M. **1999**. A rapid TLC-scanning method for the determination of patulin in apple products. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc*, *12*, 172-174.

- Ware, G.M.; Thorpe, C.W.; Pohland, A.E. **1974**. Liquid chromatographic method for determination of patulin in apple juice. *Journal of the AOAC*, *57*, 1111-1113.
- Weidenborner, M. **2001**. *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer: Berlin. ISBN 3-540-67556-6.
- Weiss, P.; Freudenschuss, P.; Krskas, R.; Mizaikoff, B. **2005**. Improving methods of analysis for mycotoxins: molecularly imprinted polymers for deoxinivalenol and zearalenone. *Food Additives and Contaminants*, *20*, 386-396.
- WHO. **2002**. *Evaluation of certain mycotoxins in food*. Who technical report series 906. 56 report of the Joint FAO-WHO Expert committee on Food Additives.,
- Wiesner, B.P. **1942**. Bactericidal effects of *Aspergillus clavatus*. *Nature*, *149*, 356-357.
- Wilson, D.M.; Nuovo, G.J. **1973**. Patulin production in apples decayed by *Penicillium expansum*. *Applied Microbiology*, *26*, 124-125.
- Woodward, R.B.; Singh, G. **1949**. The Structure of Patulin. *Journal of the American Chemical Society*, *71*, 758-759.
- Woodward, R.B.; Singh, G. **1950**. The Structure of Patulin. *Experientia*, *6*, 238-240.
- Workman, J.; Koch, M.; Veltkamp, D.J. **2003**. Process Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry*, *75*, 2859-2876.
- Zegota, H.; Zegota, A.; Bachman, S. **1988**. Effect of Irradiation on the Patulin Content and Chemical-Composition of Apple Juice Concentrate. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, *187*, 235-238.
- Zrostlikova, J.; Hajslova, J.; Poustka, J.; Begany, P. **2002**. Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. *Journal of Chromatography A*, *973*, 13-26.
- [Anon] **1945**. Fungicidal Titer of Clavacin. *Jama-Journal of the American Medical Association*, *129*, 280.

Llista de Taules

Taula 1.1. Exemples de floridures i les micotoxines presents en diferents aliments.	6
Taula 1.2. Estructura química, fórmula molecular, massa molecular (MM) de les aflatoxines més importants i les seves espècies productores.	8
Taula 1.3. Estructura química, fórmula molecular, massa molecular (MM) de l'OTA i les seves espècies productores.	10
Taula 1.4. Estructura química general, fórmula molecular, massa molecular (MM) de les fumonisines més importants i les seves espècies productores.	12
Taula 1.5. Estructura química, fórmula molecular, massa molecular (MM) de la zearalenona i les seves principals espècies productores.	13
Taula 1.6. Estructura química, fórmula molecular, massa molecular (MM) de 3 exemples de tricotecens i les seves principals espècies productores.....	15
Taula 1.7. Estructura química i principals dades que caracteritzen la patulina i la seva reactivitat química.	35
Taula 1.8. Resum dels mètodes més representatius d'anàlisis de patulina per cromatografia de capa prima (TLC).....	46
Taula 1.9. Resum dels mètodes d'anàlisis de patulina derivatitzada, per CG amb detectors convencionals.	48
Taula 1.10. Resum dels mètodes d'anàlisis de patulina en suc de poma i derivats per HPLC-UV	51
Taula 1.11. Resum dels mètodes d'anàlisis de patulina en suc de poma i derivats per HPLC-EM	54
Taula 1.12. Resum dels mètodes d'anàlisis de patulina en suc de poma i derivats per CG-EM.	58
Taula 2.1. Gradient i composició de la fase mòbil en l'anàlisi del producte VI per HPLC.	89
Taula 2.2. Aldehids que presenten absorció a UV, amb els màxims d'absorció (λ nm) i les unitats d'absorbància a cada màxim.	97
Taula 2.3. Gradient utilitzat en l'anàlisi HPLC dels productes de síntesi XI-(a-f).....	98
Taula 2.4. Gradient utilitzat en l'anàlisi HPLC-EM dels productes de síntesi XI-(a-f).	98
Taula 2.5. Cromatografia "Dry Flash". Exemple de les dimensions de l'embut a utilitzar, el pes de sílice i la mida de la fracció en funció del pes de mostra a purificar.....	111
Taula 2.6. Concentració dels patrons per a la quantificació de patulina en suc de poma per HPLC-EM, i la seva equivalència de concentració a suc de poma.	116

Taula 2.7. Concentració de les solucions de calibratge per a l'anàlisi de patulina en suc de poma per CG-EM.	117
Taula 3.1. Valors de reproductibilitat en la preparació de l'heptafluorobutirat de patulina, expressada com a desviació estàndard relativa % (DER), a tres concentracions de patulina diferents.	129
Taula 3.2. Resultats de la preparació de patrons (n=2), d'heptafluorobutirat de patulina corresponents a 4 concentracions de patulina diferents. S'indica l'equivalència de patulina en suc de poma utilitzant com a mètode d'extracció-purificació el de Rovira et al. La reproductibilitat s'expressa com a desviació estàndard relativa (DER %). A la última fila s'hi indica l'equació de la recta de calibratge obtinguda i el valor del coeficient de determinació R ²	130
Taula 3.3. Resultats corresponents a l'anàlisi d'heptafluorobutirat de patulina en mostres de suc de poma enriquides. S'indica el valor de la DER i la Recuperació en %.	131
Taula 3.4. Caracterització de les abundàncies relatives dels ions escollits per a analitzar patulina per SIM respecte del m/z 110. S'indiquen els valor de la mitjana, desviació estàndard (DE) i de la desviació estàndard relativa (DER %) per a 14 rèpliques.	133
Taula 3.5. Valors de l'àrea dels cromatogrames iònics de m/z 110 per a tres nivells de concentració de patulina, en patrons en isooctà i patrons preparats sobre matriu blanca de suc de poma	134
Taula 3.6. Valors de la relació de les àrees de m/z 110/m/z 284 per a tres nivells de concentració de patulina, de patrons dissolts en isooctà i patrons preparats en matriu blanca de suc de poma i el valor del seu quocient .S'adjunta el valor de la desviació estàndard relativa (DER) % per a les dos sèries de patrons preparades.	136
Taula 3.7. Taula dels valors del calibratge amb els valors de concentració de patulina en suc, el valor de la mitjana per a la relació d'àrees entre m/z 110 (patulina) i m/z 284 (PI), la desviació estàndard (DE) i la desviació estàndard relativa (DER) per a n=2 sèries de patrons analitzats i l'equació de la recta.	139
Taula 3.8. S'indica el valor del nivell de patulina addicionat, el valor calculat a partir de la recta, el % de recuperació i els valors de desviació estàndard (DE) i la desviació estàndard relativa (DER %) corresponents a l'anàlisi de 3 rèpliques.	139

Taula 3.9. Relació de compostos preparats per aplicació de la metodologia sintètica descrita per Boukouvalas i Maltais. S'indica l'estructura, el rendiment net i la referència.....	145
Taula 3.10. Resultat de l'anàlisi confirmativa per HPLC-EM de l'obtenció dels compostos XI (a-f). Fragments utilitzats per a la seva identificació, temps de retenció.	149
Taula 3.11. Síntesi sèrie 1. S'indiquen les quantitats de reactiu V utilitzades, les quantitats de producte obtingut sense purificar, i el rendiment brut estimat de cada compost.	151
Taula 3.12. Caracterització per ESI dels compostos XII (a-f). S'indica la referència del compost, la massa nominal, les masses dels fragments i/o adductes formats que s'han utilitzat per a caracteritzar-los, tant en mode negatiu com positiu, i el temps de retenció del producte en aquestes condicions.	152
Taula 3.13. S'indica la referència i el pes del producte a desprotegir sense purificar, el pes brut del cru obtingut, el pes i el rendiment teòric de la reacció sense purificar. També es donen les dades del producte XI-f a pesar de què no es va identificar, com ja s'ha indicat abans.	153
Taula 3.14. Resultats del procés de purificació dels compostos XII-b i XII-c. S'indica el pes de producte inicial, la fase mòbil utilitzada, el pes de les fraccions on s'ha separat i la composició de la fase mòbil que els ha separat.	153
Taula 3.15. Caracterització per ESI dels compostos XIV. S'indica la referència del compost, la massa nominal, les masses dels fragments i/o adductes formats que s'han utilitzat per a caracteritzar-los, tant en mode negatiu com positiu, i el temps de retenció del producte en aquestes condicions.	155
Taula 3.16. S'indiquen les quantitat de reactiu, de producte obtingut, la referència del compost preparat i el rendiment teòric de la reacció.	155
Taula 3.17. Resultats del procés de purificació dels compostos XIV seleccionats. S'indica els pes de producte a purificar, la composició de la fase mòbil utilitzada, el número de les fraccions on s'han separat, el pes de producte purificat i la composició de la fase mòbil que els ha separat.	156
Taula 3.18. Anàlisis dels compostos XII i XIV seleccionats per HPLC segons el mètode de Rovira et al., (Rovira et al. 1993). Es presenta l'estructura del compost, la fracció "Dry Flash" on s'han separat i el temps de retenció en les noves condicions.....	157

- Taula 3.19.** Relació de compostos preparats en la sèrie 3. Es presenta l'estructura, la fórmula empírica, la massa molecular (MM), l'espectre de masses i el temps de retenció en la seva anàlisi per CG-EM.....161
- Taula 3.20.** Relació dels èsters seleccionats disposats en ordre creixent d'acord al seu temps de retenció (Tr).....163
- Taula 3.21.** Síntesi en fase líquida dels èsters seleccionats. S'indiquen les quantitats de producte IV utilitzades, el pes de producte obtingut i el rendiment teòric de la reacció.....164
- Taula 3.22.** Resultats de la purificació dels èsters obtinguts per síntesi en fase líquida. S'indica el pes de producte a purificar, la composició de la fase mòbil utilitzada, el número de les fraccions on s'han separat i la polaritat de la fracció.....165
- Taula 3.23.** Optimització dels paràmetres d'anàlisi per als compostos seleccionats. S'indica per a cada mode d'ionització els fragments utilitzats més abundants i el voltatge del con que va donar major sensibilitat.....169
- Taula 3.24.** Valors del calibratge de patulina utilitzant patrons preparats en matriu de suc de poma i prenent com a referència de patró intern el pic 1 (pic de menor temps de retenció). S'indica la concentració dels patrons, el valor de la mitjana de la relació m/z 153/203, la desviació estàndard (DE), la desviació estàndard relativa DER % per a n=3 rèpliques, l'equació de la recta i el valor del coeficient de determinació R².....171
- Taula 3.25.** Valors del calibratge de patulina utilitzant patrons preparats en matriu de suc de poma i prenent com a referència de patró intern el pic 2 (pic de major temps de retenció). S'indica la concentració dels patrons, el valor de la mitjana de la relació m/z 153/203, la desviació estàndard (DE), la desviació estàndard relativa DER % per a n=3 rèpliques, l'equació de la recta i el valor del coeficient de determinació R².....172
- Taula 3.26.** Comparació entre els valors de desviació estàndard relativa (DER %) corresponents a les rèpliques, per a cada nivell de concentració dels patrons preparats en matriu, considerant el calibratge per patró intern, cada pic del patró intern (PI) i el calibratge per patró extern. S'indica l'equació de la recta i el coeficient de determinació (R²).....175
- Taula 3.27.** Càlcul de la recuperació de cada diastereoisòmer (Pic 1 i Pic 2). S'indiquen els valors de la mitjana de l'àrea de cada pic en les mostres i en els patrons de calibratge, la desviació estàndard (DE), la desviació estàndard relativa (DER%) i el valor de la recuperació de cada diastereoisòmer (Q_{PI}-i).182

Taula 3.28. Resultats de l'assaig d'enriquiment considerant cada un dels pics del patró intern. Es presenten les equacions de les rectes de calibratge utilitzades per a quantificar el contingut de patulina, els valors de patulina calculada, el valor de la desviació estàndard (DE), la desviació estàndard relativa % de les rèpliques i el valor de la recuperació (Rec.) per a cada nivell de concentració.	183
Taula 3.29. Estructura de l'ió molecular de la patulina i els fragments més representatius del seu espectre de masses que es van utilitzar per a l'anàlisi per SIM.	188
Taula 3.30. Selecció dels 6 èsters obtinguts en la sèrie 3 per a ser utilitzats com a patrons interns. S'indica la referència del compost, el nom i els fragments més abundants per a l'anàlisi per SIM.	189
Taula 3.31. Resultats de l'assaig de recuperació dels èsters al llarg del procés extractiu. S'indica la mitjana de l'àrea del PI (patró intern) a les mostres enriquides, als patrons de calibratge, el valor de la desviació estàndard (DE), el valor de la recuperació en % i el valor de la desviació estàndard relativa (DER)%.	191
Taula 3.32. Paràmetres de calibratge corresponents a cada recta calculada per a cada patró intern provat, utilitzant el fragment m/z 126 per quantificar la patulina. Els valors s'han obtingut a partir de la mitjana de dos sèries de patrons.	195
Taula 3.33. Quantificació dels valors de patulina en les mostres enriquides utilitzant en cada cas l'equació corresponent a cada patró intern assajat. S'indica el valor de la concentració de patulina afegida i els valors calculats amb el corresponent error estàndard de predicció (S_x).	196
Taula 3.34. Valors de la desviació estàndard relativa (DER) de les rèpliques per a cada nivell de concentració assajat, utilitzant el fragment m/z 126 per a quantificar patulina i per a cada patró intern.	197
Taula 3.35. Paràmetres de calibratge corresponents a cada recta calculada per a cada patró intern provat utilitzant el fragment m/z 110 per la patulina i una columna RtX-200-MS (trifluoropropilmetilpolisiloxà). Els valors s'han obtingut a partir de la mitjana de dos sèries de patrons.	199
Taula 3.36. Quantificació dels valors de patulina en les mostres enriquides utilitzant en cada cas l'equació corresponent a cada patró intern assajat, utilitzant una columna Rtx-200 MS i el fragment m/z 110. S'indica el valor de la concentració de patulina afegida i els valors calculats amb el corresponent error estàndard de predicció (S_x).	200

Taula 3.37. Valors de la desviació estàndard relativa (DER) n=3, per a cada nivell de concentració assajat, utilitzant el fragment m/z 110 per a quantificar patulina i la columna Rtx-200-MS (trifluoropropilmetilpolisiloxà) per a cada patró intern201

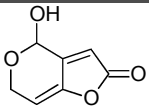
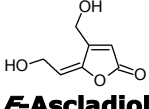
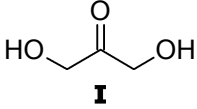
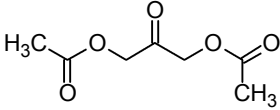
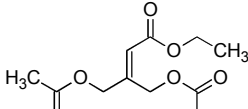
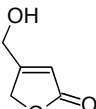
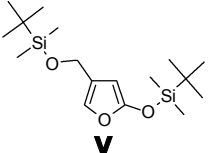
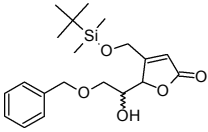
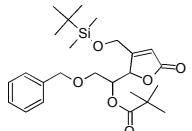
Llista de Figures

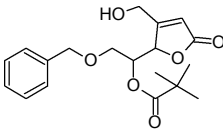
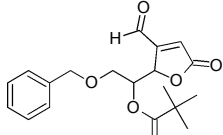
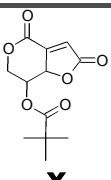
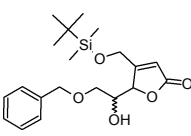
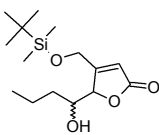
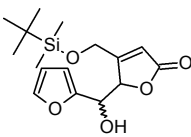
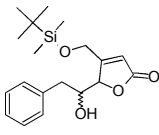
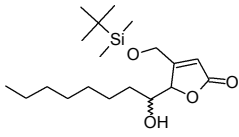
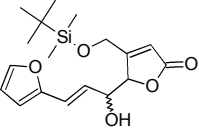
Figura 1.1. Esquema del marc per a l'anàlisi del risc en la seguretat alimentària (Kuiper-Goodman 1999).	20
Figura 1.2. Esquema del percentatge de la població mundial amb reglamentació sobre micotoxines (FAO 2004).	25
Figura 1.3. Micotoxines en els aliments reglamentades a Europa (FAO 2004).	28
Figura 1.4. Estructura química de l'Ascladiol	38
Figura 2.1. Esquema per a la realització de la reacció de derivatització de patulina amb heptafluorobutilimidazole	72
Figura 2.2. Muntatge experimental per a la destil·lació del dissolvent de la reacció d'obtenció del compost II.	75
Figura 2.3. Muntatge per a la realització de la reacció d'obtenció del compost III.	78
Figura 2.4. Esquema dels elements necessaris per a la realització de la reacció de síntesi del compost IV.	81
Figura 2.5. Esquema dels elements necessaris per a la realització de la reacció d'obtenció del compost V.	85
Figura 2.6. Muntatge experimental per a l'obtenció del producte VI.	88
Figura 2.7. Esquema muntatge experimental per a la síntesi del compost VII.	92
Figura 2.8. Carrusel de reacció per a la síntesi en paral·lel dels èsters XV-(a-u).	105
Figura 2.9. Esquema de la relació del material necessari per a la síntesi d'èsters en fase líquida.	107
Figura 3.1. Cromatograma iònic total (TIC) corresponent a un blanc de la reacció de derivatització i l'espectre de masses de l'heptafluorobutilimidazole, reactiu de derivatització utilitzat i que correspon al pic del TIC indicat per la fletxa a 8,12 min.	125
Figura 3.2. Cromatograma iònic total (TIC) corresponent a una mostra de patulina derivatitzada, la fletxa indica el temps de retenció a 7,3 min corresponent al heptafluorobutirat de patulina, i el seu espectre de masses corresponent, on s'hi indica el pic molecular $[M^+]$ 350.	126
Figura 3.3. Cromatograma iònic total d'una mostra d'heptafluorobutirat de patulina transcorregudes 24 h de la seva preparació i guardada a T. ambient. La fletxa indica la presència de patulina lliure a un temps de retenció de 8,3 min i a continuació es presenta el seu espectre de masses obtingut en aquestes condicions.	127

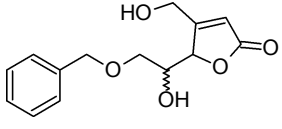
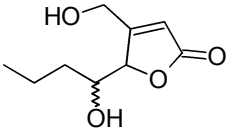
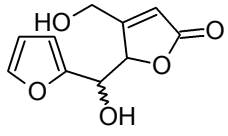
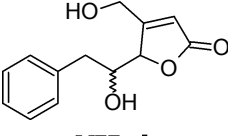
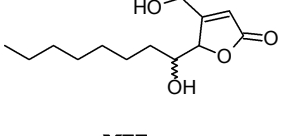
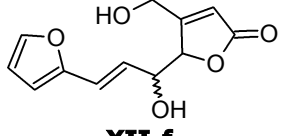
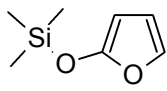
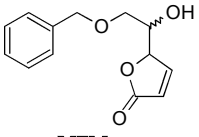
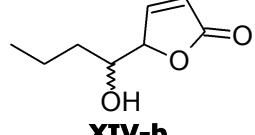
- Figura 3.4.** Gràfic de calibratge comparatiu entre patrons de patulina injectats en dos dies diferents, utilitzant hexaclorobenzè com a patró intern. Es representa la relació d'àrees entre l'anàlit i el patró intern vers la concentració de l'anàlit en suc de poma. Es presenta l'equació de cada recta i el R^2 coeficient de determinació corresponent a cada recta.137
- Figura 3.5.** Esquema síntesi de patulina de Boukouvalas i Maltais, (Boukouvalas and Maltais 1995).143
- Figura 3.6.** Diferents estratègies sintètiques dissenyades per a l'obtenció d'anàlegs estructurals de patulina encaminats a ser utilitzats com a patrons interns.147
- Figura 3.7.** Reacció de síntesi de 5-(1-hidroxi)alquilfuranones a partir del compost V. S'indica amb un asterisc (*) els carbonis quirals.148
- Figura 3.8.** Cromatograma del compost de la sèrie 1, el XII-c, seleccionat per a ser provat com a patró intern en l'anàlisi de patulina per HPLC-EM. S'indica amb una fletxa la posició teòrica, (Tr) de la patulina i el temps de retenció dels dos diastereoisòmers.158
- Figura 3.9.** Cromatograma del compost de la sèrie 2, el XIV-c, seleccionat per a ser provat com a patró intern en l'anàlisi de patulina per HPLC-EM. S'indica amb una fletxa la posició teòrica, (Tr) de la patulina i el temps de retenció dels dos diastereoisòmers.159
- Figura 3.10.** Obtenció de la sèrie 3 de compostos. Reacció d'esterificació a partir del compost IV i 21 àcids diferents.160
- Figura 3.11.** Efecte de la matriu en l'anàlisi de patulina per ESI. Es comparen les rectes de calibratge obtingudes amb patrons preparats en matriu de suc i sense, utilitzant com a patró intern el diastereoisòmer 1 (Pic1).....173
- Figura 3.12.** Efecte de la matriu en l'anàlisi de patulina per ESI. Es comparen les rectes de calibratge obtingudes amb patrons preparats sobre matriu de suc i sense, utilitzant com a patró intern el diastereoisòmer 2 (Pic2).173
- Figura 3.13.** Efecte de la matriu en l'anàlisi de patulina per ESI. Es comparen les rectes de calibratge obtingudes amb patrons preparats en matriu de suc i sense, i no es considera el patró intern.174
- Figura 3.14.** Efecte de la matriu en l'anàlisi de patulina per APCI. Es comparen les rectes de calibratge obtingudes amb patrons preparats en matriu de suc i sense, utilitzant com a patró intern el diastereoisòmer 1 (Pic1) del compost XIV-c. Cada punt representa la mitjana de dos injectades.178

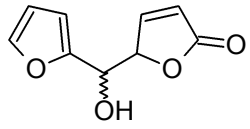
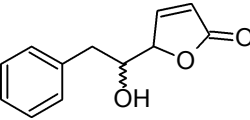
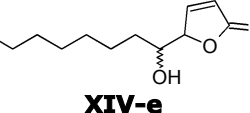
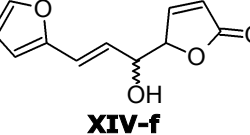
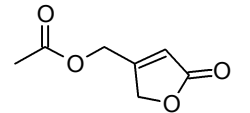
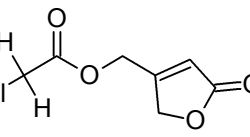
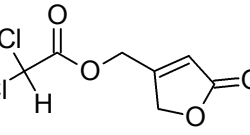
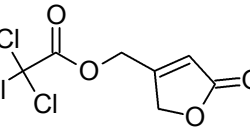
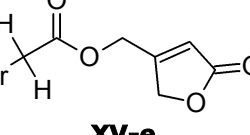
- Figura 3.15.** Efecte de la matriu en l'anàlisi de patulina per APCI. Es comparen les rectes de calibratge obtingudes amb patrons preparats en matriu de suc i sense, utilitzant com a patró intern el diastereoisòmer 2 (Pic 2) del compost XIV-c. Cada punt representa la mitjana de dos injectades.179
- Figura 3.16.** Comparació del calibratge de patulina per APCI. Es comparen rectes de calibratge de patulina per APCI utilitzant el compost XII-c (pic 1 i pic 2) com a patró intern, i els patrons preparats en matriu de suc i sense.....180
- Figura 3.17.** Optimització de la temperatura inicial del forn. Es representa el valor de la mitjana de tres rèpliques i les barres d'error indiquen el valor de la desviació estàndard (DE).187
- Figura 3.18.** Recta de calibratge de patulina utilitzant con a patró intern el compost XV-b. Cada punt representa la mitjana de dos rèpliques. S'indica l'equació de la recta i el coeficient de determinació R^2192
- Figura 3.19.** Cromatograma iònic d'un blanc de matriu de suc de poma a la zona d'elució de la patulina. S'indica amb una fletxa el temps de retenció de la patulina i la contribució a la abundància del fragment m/z 110.193
- Figura 3.20.** Recta de calibratge de patulina utilitzant con a patró intern el compost XV-b i el fragment m/z 126 per a quantificar patulina. Cada punt representa la mitjana de dos rèpliques. S'indica l'equació de la recta i el coeficient de determinació R^2194
- Figura 3.21.** Cromatograma iònic d'un blanc de matriu de suc de poma a la zona d'elució de la patulina utilitzant una fase estacionària de trifluoropropilmetilpolisiloxà. S'indica amb una fletxa el temps de retenció de la patulina.198

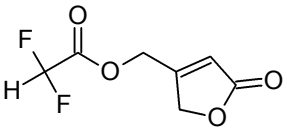
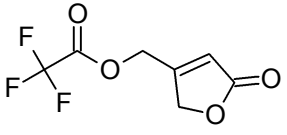
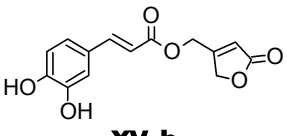
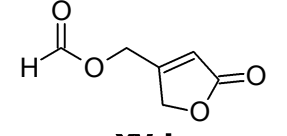
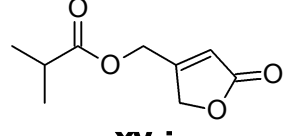
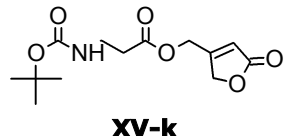
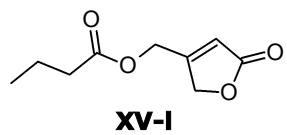
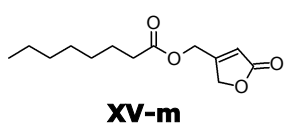
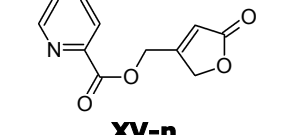
ANNEX-A. Llista de Compostos

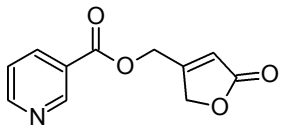
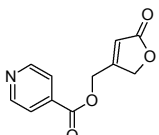
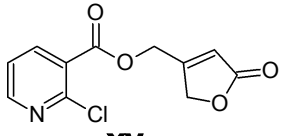
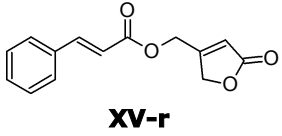
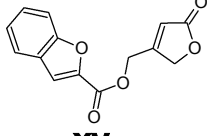
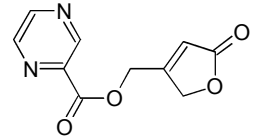
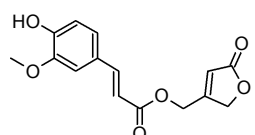
COMPOST	FE/MM*	NOM
 <p>Patulina</p>	C ₇ H ₆ O ₄ 154,12	4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona
 <p>E-Ascladiol</p>	C ₇ H ₈ O ₄ 156,14	(5E)-5-(2-hidroxietiliden)-4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona
 <p>I</p>	C ₃ H ₆ O ₂ 174,15	1,3-dihidroxiacetona
 <p>II</p>	C ₇ H ₁₀ O ₅ 174,15	acetat de 3-(acetoxi)-2-oxopropà
 <p>III</p>	C ₁₁ H ₁₆ O ₆ 244,24	2-butenolat de 4-(acetiloxi)-3-[(acetiloxi)metil]etil
 <p>IV</p>	C ₅ H ₆ O ₃ 114,10	4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona
 <p>V</p>	C ₁₇ H ₃₄ O ₃ Si ₂ 342,62	<i>tert</i> -butil[(5-{[<i>tert</i> -butil(dimetil)silil]oxi}-3-furil)metoxi]dimetilsilà
 <p>VI</p>	C ₂₀ H ₃₀ O ₅ Si 378,53	5-[2-(benziloxi)-1-hidroxietil]-4-([1-(<i>tert</i> -butil)-1,dimetilsilil]oximetil)-2,5-dihidro-2-furanona
 <p>VII</p>	C ₂₅ H ₃₈ O ₆ Si 462,65	pivalat de 2-(benziloxi)-1-[3-([1-(<i>tert</i> -butil)-1,dimetilsilil]oximetil)-5-oxo-2,5-dihidro-2-furanil]etil

 <p>VIII</p>	<p>$C_{19}H_{24}O_6$ 348,39</p>	<p>pivalat de 2-(benziloxi)-1-[3-(hidroximetil)-5-oxo-2,5-dihidro-2-furanil]etil</p>
 <p>IX</p>	<p>$C_{19}H_{17}O_6$ 341,39</p>	<p>pivalat de 2-(benziloxi)-1-[3-(formil)-5-oxo-2,5-dihidro-2-furanil]etil</p>
 <p>X</p>	<p>$C_{12}H_{14}O_6$ 254,34</p>	<p>pivalat de 2,4-dioxo-2,6,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,2-c]piran-7-il</p>
 <p>XI-a</p>	<p>$C_{20}H_{30}O_5Si$ 378,53</p>	<p>5-[2-(benziloxi)-1-hidroxietil]-4-([1-(<i>tert</i>-butil)-1,1-dimetilsilil]oximetil)-furan-2(5<i>H</i>)-ona</p>
 <p>XI-b</p>	<p>$C_{15}H_{28}O_4Si$ 300,46</p>	<p>5-(1-hidroxibutil)-4-([1-(<i>tert</i>-butil)-1,1-dimetilsilil]oximetil)-furan-2(5<i>H</i>)-ona</p>
 <p>XI-c</p>	<p>$C_{16}H_{24}O_5Si$ 324,44</p>	<p>5-[2-furil(hidroxi)metil]-4-([1-(<i>tert</i>-butil)-1,1-dimetilsilil]oximetil)-furan-2(5<i>H</i>)-ona</p>
 <p>XI-d</p>	<p>$C_{19}H_{28}O_4Si$ 348,51</p>	<p>5-(1-hidroxi-2-feniletil)-4-([1-(<i>tert</i>-butil)-1,1-dimetilsilil]oximetil)-furan-2(5<i>H</i>)-ona</p>
 <p>XI-e</p>	<p>$C_{19}H_{36}O_4Si$ 356,7</p>	<p>5-(1-hidroxiocetil)-4-([1-(<i>tert</i>-butil)-1,1-dimetilsilil]oximetil)-furan-2(5<i>H</i>)-ona</p>
 <p>IX-f</p>	<p>$C_{18}H_{26}O_5Si$ 350,82</p>	<p>5-[(2<i>E</i>)-3-(2-furil)-1-hidroxi-prop-2-en-1-il]-4-([1-(<i>tert</i>-butil)-1,1-dimetilsilil]oximetil)-furan-2(5<i>H</i>)-ona</p>

 <p>XII-a</p>	<p>$C_{14}H_{16}O_5$ 264,27</p>	<p>5-[2-(benziloxi)-1-hidroxiètil]-4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona</p>
 <p>XII-b</p>	<p>$C_9H_{14}O_4$ 186,20</p>	<p>5-(1-hidroxibutil)-4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona</p>
 <p>XII-c</p>	<p>$C_{10}H_{10}O_5$ 210,18</p>	<p>5-[2-furil(hidroxi)metil]-4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona</p>
 <p>XII-d</p>	<p>$C_{13}H_{14}O_4$ 234,25</p>	<p>4-(hidroximetil)-5-(1-hidroxi-2-feniletil)furan-2(5H)-ona</p>
 <p>XII-e</p>	<p>$C_{13}H_{22}O_4$ 242,31</p>	<p>4-(hidroximetil)-5-(1-hidroxiòctil)furan-2(5H)-ona</p>
 <p>XII-f</p>	<p>$C_{12}H_{12}O_5$ 236,22</p>	<p>5-[(2E)-3-(2-furil)-1-hidroxi-prop-2-en-1-il]-4-(hidroximetil)furan-2(5H)-ona</p>
 <p>XIII</p>	<p>$C_7H_{12}O_2Si$ 156,25</p>	<p>(2-furiloxi)(trimetil)silà</p>
 <p>XIV-a</p>	<p>$C_{13}H_{14}O_4$ 234,250</p>	<p>5-[2-(benziloxi)-1-hidroxiètil]furan-2(5H)-ona</p>
 <p>XIV-b</p>	<p>$C_8H_{12}O_3$ 156,18</p>	<p>5-(1-hidroxibutil)furan-2(5H)-ona</p>

 <p>XIV-c</p>	<p>C₉H₈O₄ 180,16</p>	<p>5-[2-furil(hidroxi)metil]furan-2(5<i>H</i>)-ona</p>
 <p>XIV-d</p>	<p>C₁₂H₁₂O₃ 204,22</p>	<p>5-(1-hidroxi-2-Feniletil)furan-2(5<i>H</i>)-ona</p>
 <p>XIV-e</p>	<p>C₁₂H₂₀O₃ 212,2854</p>	<p>5-(1-hidroxiocetil)furan-2(5<i>H</i>)-ona</p>
 <p>XIV-f</p>	<p>C₁₁H₁₀O₄ 206,1947</p>	<p>5-[(2<i>E</i>)-3-(2-furil)-1-hidroxi-prop-2-en-1-il]furan-2(5<i>H</i>)-ona</p>
 <p>XV-a</p>	<p>C₇H₈O₄ 156,136</p>	<p>acetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>
 <p>XV-b</p>	<p>C₇H₇ClO₄ 190,58</p>	<p>cloroacetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>
 <p>XV-c</p>	<p>C₇H₆Cl₂O₄ 225,03</p>	<p>dicloroacetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>
 <p>XV-d</p>	<p>C₇H₅Cl₃O₄ 259,47</p>	<p>tricloroacetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>
 <p>XV-e</p>	<p>C₇H₇BrO₄ 235,03</p>	<p>bromoacetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>

 <p style="text-align: center;">XV-f</p>	$C_7H_6F_2O_4$ 192,12	difluoroacetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil
 <p style="text-align: center;">XV-g</p>	$C_7H_5F_3O_4$ 210,11	trifluoroacetat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil
 <p style="text-align: center;">XV-h</p>	$C_{14}H_{12}O_6$ 276,24	(2 <i>E</i>)-3-(3,4-dihidroxifenil)acrilat de(5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il) metil
 <p style="text-align: center;">XV-i</p>	$C_6H_6O_4$ 142,11	formiat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil
 <p style="text-align: center;">XV-j</p>	$C_9H_{12}O_4$ 184,19	propanoat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil 2-metil
 <p style="text-align: center;">XV-k</p>	$C_{13}H_{19}NO_6$ 285,29	β -alaninat de <i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxicarbonil) (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil
 <p style="text-align: center;">XV-l</p>	$C_9H_{12}O_4$ 184,19	butirat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil
 <p style="text-align: center;">XV-m</p>	$C_{13}H_{20}O_4$ 240,29	octanoat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil
 <p style="text-align: center;">XV-n</p>	$C_{11}H_9NO_4$ 219,19	piridina-2-carboxilat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil

 <p>XV-o</p>	<p>$C_{11}H_9NO_4$ 219,19</p>	<p>nicotinat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>
 <p>XIII-p</p>	<p>$C_{11}H_9NO_4$ 219,19</p>	<p>isonicotinat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>
 <p>XV-q</p>	<p>$C_{11}H_8ClNO_4$ 253,64</p>	<p>2-cloronicotinat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>
 <p>XV-r</p>	<p>$C_{14}H_{12}O_4$ 244,24</p>	<p>(2<i>E</i>)-3-fenilacrilat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>
 <p>XV-s</p>	<p>$C_{14}H_{10}O_5$ 258,23</p>	<p>1-benzofuran-2-carboxilat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>
 <p>XV-t</p>	<p>$C_{10}H_8N_2O_4$ 220,18</p>	<p>pirazine-2-carboxilat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>
 <p>XV-u</p>	<p>$C_{15}H_{14}O_6$ 290,27</p>	<p>(2<i>E</i>)-3-(4-hidroxi-3-metioxifenil)acrilat de (5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)metil</p>

*Fórmula empírica/massa molecular

ANNEX-B.Publicacions relacionades amb la tesi

Research Note

Analysis of Underivatized Patulin by a GC-MS Technique

MONTSERRAT LLOVERA,¹ REMEI VILADRICH,¹ MERCÈ TORRES,² AND RAMON CANELA^{1,3*}

¹Chemistry Department, Universitat de Lleida, ²Department of Food Technology, Universitat de Lleida, and ³Area de Protecció de Conreus, Centre R+D de Lleida (UdL-IRTA), Rovira Roure, 177, 25198-Lleida, Spain

MS 98-25: Received 26 January 1998/Accepted 6 August 1998

ABSTRACT

An alternative approach based on the use of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) is used to confirm the presence of patulin in apple juice. In the gas chromatography (GC) methods previously described, derivatization of patulin was always necessary in order to achieve good chromatographic detection. The use of electronic pressure control (EPC) and on-column injection avoids the need for patulin derivatization and allows a sensitive analysis of patulin. A detection limit of 4 µg/liter in apple juice can be attributed to the method.

Patulin is a secondary metabolite produced by a large number of fungi, including *Penicillium expansum*, a causal organism of apple rot. The main source of patulin in the human diet is probably apple juice prepared from apples contaminated with molds. Patulin is toxic and produces tumors in rats when injected subcutaneously, but there are no published toxicological or epidemiological data to indicate whether consumption of patulin is harmful to humans (7). However, health authorities in Switzerland, Sweden, Belgium, Russia, and Norway apparently regard patulin contamination of food as a problem, and have set a maximum permitted concentration (MPC) of 50 ppb for patulin in apple juice (5, 18). Patulin has also become a quality indicator of fruit used in the processing of apple juice. Because of this, methods for determining patulin in apple juice are important to processors and governments interested in monitoring the quality of apple juice and concentrate.

Many methods have been developed for the analysis of patulin in apple juice. A fast method for the analysis of patulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) using sodium carbonate as the only purification step has been used in two collaborative studies (2, 9), although some doubts exist about the stability of this toxin in such a basic system (3, 8, 10). Many other methods using thin layer chromatography (TLC), reversed-phase HPLC, gas chromatography (GC), or GC with mass spectrometry (GC-MS) have been published (11, 12, 15). Among HPLC methods, Bartolomé et al. (1) introduced diode array detection to determine patulin in apple juice.

During a survey of apple juice for patulin we found several samples showing a signal in the HPLC chromatogram with the same retention time as patulin but with a

nonequivalent ultraviolet (UV) spectrum. We therefore decided to try to confirm our results by mass spectrometry.

In this paper we present a method for confirming the presence of patulin in apple juice. The method involves gas chromatography analysis with electronic pressure control (EPC) on-column injection and selected ion monitoring (SIM) mass spectrometry detection (GC-MS).

MATERIALS AND METHODS

Samples. Apple juice concentrates were received from a Catalan producer, and samples were prepared as in (13) and (2).

Reagents and standards. Water was purified by the Milli-pore Milli-Q system. Solvents used for extraction were distilled in glass. Tetrahydrofuran (THF) and chloroform (CHCl₃) used were HPLC grade (Promochem, Wesel, Germany). Patulin was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Patulin standard stock solution was prepared by dissolving 1.00 mg of patulin in 10 ml of CHCl₃ and was stored in aluminum foil-wrapped bottles at -20°C. Solution was stable for ca. 1 month. The UV spectrum of patulin standard stock solution was recorded, and the patulin concentration was calculated as in reference 14.

For HPLC analysis, working standards of 0.1, 0.2, 0.5, and 1 µg/ml were prepared by dilution of stock solution with water-THF (99:1, vol/vol). New standards and working solutions were made weekly.

Apparatus. The HPLC system used was a Waters series (Waters Cromatografia S.A., Barcelona, Spain), integrated with a Model 610 fluid unit pumping system, a Model 717 plus autosampler injector, a Model 996 photo diode array (PDA) detector, and a Millennium 2010 system as data processor. A mobile phase consisting of water-THF (99:1, vol/vol) was used at a flow rate of 1 ml/min. A Spherisorb ODS-2 analytical column (25 by 0.4 cm) (Technokroma, San Cugat del Vallés, Spain) and a Symmetry analytical column (15 by 0.4 cm) (Waters Cromatografia S.A., Barcelona, Spain) were used for the separation.

Mass spectra were acquired on a Hewlett-Packard (HP) Model 5989A quadrupole instrument interfaced to an HP 5890 Series II gas chromatograph. The GC was equipped with an autosampler

* Author for correspondence. Mailing address: Chemistry Department (Universitat de Lleida), Rovira Roure, 177, 25198-Lleida, Spain. Tel: +3473702529; Fax: +34 73 23 82 64; E-mail: canela@quimica.udl.es.

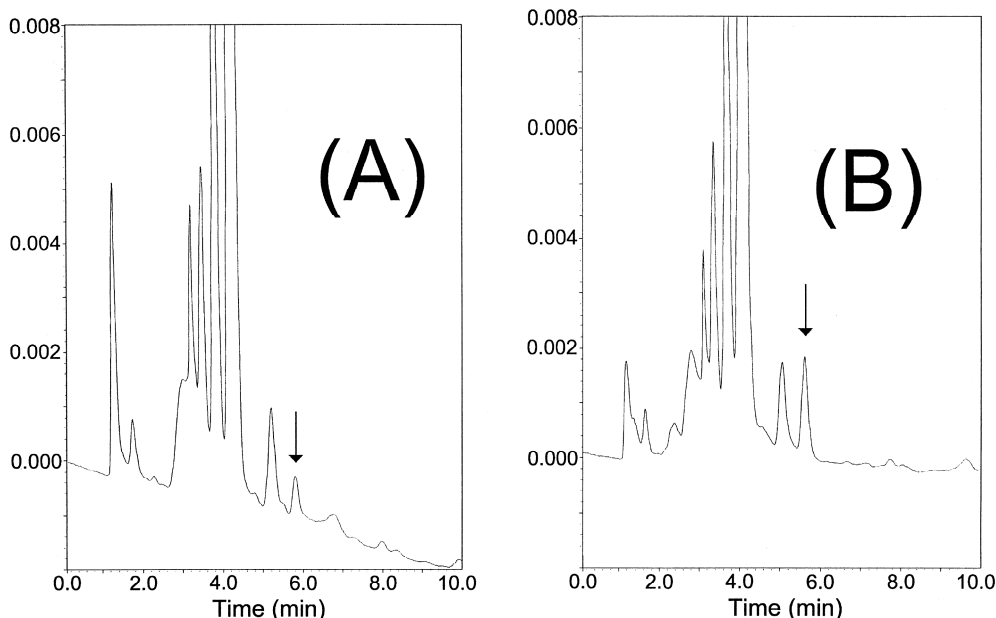


FIGURE 1. HPLC chromatograms from a blank matrix sample (A) and an apple juice sample fortified with patulin at 0.5 ng/μl (B) using a Symmetry column. The arrows show the retention time for patulin.

on-column injector, HP Model 7673. GC analysis was performed on an HP-5 MS cross-linked methyl silicone capillary column (30 m by 0.25 mm inside diameter) with an uncoated and deactivated HP retention gap (1.5 m by 0.25 mm inside diameter). The GC system incorporated an EPC system. The carrier gas was helium. The column head pressure was programmed to improve transfer of sample to the column. Injection was made using a pressure pulse technique (4). The inlet program was initial pressure at 200 kPa at the initial time 0.0 min, increasing at a rate of 650 kPa/min to 350 kPa with a hold time of 0.3 min, then decreasing at 650 kPa/min to 200 kPa. The rest of GC program was set at constant flow. GC injector temperature was programmed as "oven tracking." The column was held at 80°C for 1 min after injection, programmed to 250°C at 15°C/min, and held for 5 min. The transfer line temperature was selected at 250°C, and the ion source temperature was 200°C. The electron impact ionization mode was set at an energy of 70 eV.

GC-MS analysis. The confirmation of the presence of patulin in apple juice was performed in the SIM mode, in order to maximize sensitivity and reduce sample matrix interferences. The mass pattern has been established for the system in use with a patulin standard. We monitored the ions in two groups. The ions selected in the first group were at m/z 110 (base peak), 126, 136,

and 154 (M^+), corresponding to patulin, and in the second were at m/z 282, 284 (base peak), and 286 ($M + 1$)⁺ corresponding to the internal standard, hexachlorobenzene (HCB). The volume injected was 1 μl. Patulin in the sample extract was identified by matching its retention time and characteristic relative ion abundances (a given relative ion abundance must agree within 20% with that in the mass spectrum of its standard).

To assess the linearity of the detector response, two curves were prepared using five blank apple-spiked samples. Thus, 500-μl aliquots of respective stock solutions containing 0.1, 0.3, 0.6, 0.9, and 1.4 μg/ml of patulin and 100 ng/ml of HCB as internal standard were added to apple samples obtained by the methods described above. One microliter of each of the resulting samples, corresponding to concentration ranges of 4, 12, 24, 36, and 54 μg/liter in apple juice for the method of Rovira et al. (13), was then injected into the GC-MS system, and the quotient of the area of the peak at m/z 110 divided by the area of the peak at m/z 284 (A110/A284) was plotted.

RESULTS AND DISCUSSION

During a survey of apple juice for patulin by reversed-phase HPLC we found some samples showing a chromatographic peak that occurred at the same retention time as patulin but had a UV spectrum different from that of patulin. Results were equivalent for the two purification methods described and were also column independent. Thus, Figure 1 shows the HPLC chromatograms of a sample before and after being spiked with a patulin standard; Figure 2 shows the UV spectra of a patulin standard and the unidentified co-eluting peak. As Figure 2 shows, although the UV spectrum from the unidentified peak is different from that of patulin, it is not possible to be sure about the lack of patulin in the sample. These results show the possibility of pitfalls in patulin determination when retention time and a monochannel UV detector are used as the only identifying parameters for patulin analysis in apple juice.

To solve this problem, one possibility is to use GC-MS

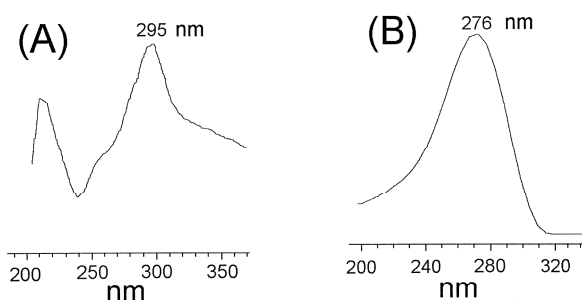


FIGURE 2. UV spectra recorded from the diode array detector for a patulin standard (B) and the peak (A) found at the same retention time as patulin in the blank matrix sample (Fig. 1A).

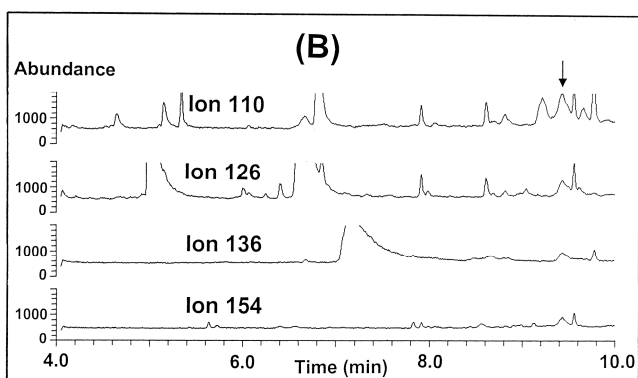
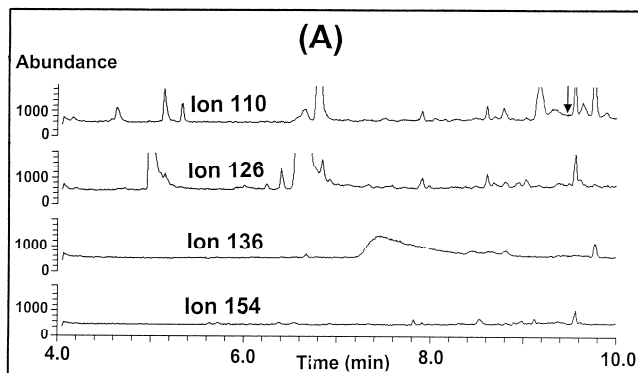


FIGURE 3. SIM chromatogram from a blank matrix sample (A) and an apple juice sample fortified with patulin at 12 $\mu\text{g}/\text{liter}$ (0.3 ng of patulin injected) (B). The arrows show the retention time for patulin.

as an alternative analytical technique. Since “on-column” injection can be used to analyze thermolabile substances, we have used this injection technique to carry out a GC-MS patulin analysis without previous derivatization. Hexachlorobenzene was used as an internal standard to compensate as far as possible for the intrinsic variability of the mass spectrometer. Linearity was studied by spiking samples from apple juice with a patulin content up to the maximum permitted concentration. The MS response for patulin was linear in the assessed range. Figure 3 shows the chromatograms of a sample plotted in SIM mode before and after patulin spiking. Figure 4 shows the good linearity obtained in studies carried out on two successive days, although the patulin/HCB base peak area ratio varies between days. We suppose that the daily MS tuning is the factor responsible for the variation in the A110/A284 quotient chosen to quantify the patulin/internal standard ratio. In fact, the sensitivity enhancement following tuning should affect the target ions at m/z 110 (patulin) and m/z 284 (HCB) differently because of their significantly different mass values (the mass spectrometer was tuned daily, and the sensitivity specifications were met by use of the tuning parameters established by the “Autotune” system; it sets source, analyzer, and detector parameters to provide maximum performance over a specific mass range).

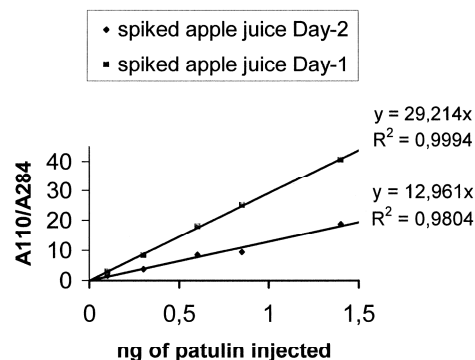


FIGURE 4. Regression curves to assess linearity of the method for the ratio of area of the patulin base peak to area of the internal standard base peak for the samples fortified with patulin at different levels and analyzed on separate study days. Each point represents the mean of two replications.

To improve the reproducibility of MS measurements between days, the internal standard should have intense ion peaks close to those of sample molecules. However, stable isotope-labeled analogs of patulin are lacking at present.

From these values a detection limit of 0.1 ng can be inferred for this technique for patulin in apple juice. This limit implies a level of 4 $\mu\text{g}/\text{liter}$ in apple juice if the method of Rovira et al. (13) is used to prepare the sample and 10 $\mu\text{g}/\text{liter}$ if the sample is obtained according to the method of Brause et al. (2). Both limits are substantially below 50 $\mu\text{g}/\text{liter}$, the maximum level accepted by several countries.

Although the detection limit with the proposed technique is either similar to (6, 16) or higher than (17) that of the methods described by several authors, all of these previous methods involve an additional derivatization step, which lengthens the analysis time and introduces a possible additional interference with the patulin analysis.

We propose GC-MS as a qualitative method for confirming patulin without derivatization in apple juice and concentrate, not as a routine quantitative method. An approach to a quantitative assessment can be made by running a new standard calibration curve for every day.

Studies are in progress to obtain a stable labeled analog of patulin to improve the reproducibility of the patulin/internal standard ratio between days.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge support for this research by the Spanish Ministry of Education and Culture (CICYT: Project grant ALI94-0417-CO3-01). We also thank Albert Sans for helpful advice.

REFERENCES

1. Bartolomé, B., M. L. Bengochea, F. J. Pérez-Illzarbe, T. Hernandez, I. Estrella, and G. Gómez-Cordovés. 1994. Determination of patulin in apple juice by high performance liquid chromatography with diode array detection. *J. Chromatogr.* 664:39–43.
2. Brause, A. R., M. W. Truckesess, F. S. Thomas, and S. W. Page. 1996. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 79:451–455.
3. Budavari, S., ed. 1996. The Merck index, 12th ed. Merck & Co., Whitehouse Station, N.J.
4. Doherty, L. 1992. Improving the sensitivity of your GC/MS system

- with electronic pressure control. Hewlett-Packard Company, MS application brief MS 92-5, 23, 5091-5493E.
5. FAO. 1996. Worldwide regulations for mycotoxins. Food and nutrition paper, advance copy. FAO, Rome.
 6. Fujimoto, Y., T. Suzuki, and Y. Hoshino. 1975. Determination of penicillic acid and patulin by gas-liquid chromatography with an electron-capture detector. *J. Chromatogr.* 105:99-106.
 7. IARC. 1986. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, vol 40. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
 8. Jefferys, E. G. 1952. The stability of antibiotics in soils. *J. Gen. Microbiol.* 7:295.
 9. Kubacki, S. J., and H. Goszcz. 1988. HPLC methods for the determination of patulin in apple juice. *Pure Appl. Chem.* 60:871-876.
 10. Lovett, J., and J. T. Peeler. 1973. Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution. *J. Food Sci.* 38:1094-1095.
 11. Price, K. R. 1979. A comparison of two quantitative mass spectrometric methods for the analysis of patulin in apple juice. *Biomed. Mass Spectrom.* 6:573-574.
 12. Priest, J. W., and R. J. Light. 1990. Applications of high performance liquid chromatography to quantitation of metabolites and enzymes of the patulin pathway from *Penicillium patulum*. *J. Chromatogr.* 513:237-246.
 13. Rovira, R., F. Rivera, V. Sanchis, and R. Canela. 1993. Improvements in the quantitation of patulin in apple juice by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 41:214-216.
 14. Scott, P. M. 1974. Collaborative study of a chromatographic method for determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57:621-625.
 15. Scott, P. M., and B. P. C. Kennedy. 1973. Improved method for the thin layer chromatographic determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 56:813-816.
 16. Suzuki, T., Y. Fujimoto, Y. Hoshino, and A. Tanaka. 1975. Trimethylsilylation of penicillic acid and patulin, and the stability of the products. *J. Chromatogr.* 105:95-98.
 17. Tarter, E. J., and P. M. Scott. 1991. Determination of patulin by capillary gas chromatography of the heptafluorobutyrate derivative. *J. Chromatogr.* 538:441-446.
 18. Van Egmond, H. P. 1989. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Addit. Contam.* 6:139-188.

Parallel Synthesis: A New Approach for Developing Analytical Internal Standards. Application to the Analysis of Patulin by Gas Chromatography–Mass Spectrometry

MONTSERRAT LLOVERA,[†] MERCÈ BALCELLS,^{†,‡} MERCÈ TORRES,[§] AND
 RAMON CANELA^{*,†,‡}

Chemistry Department and Department of Food Technology, Universitat de Lleida, and Area de Protecció de Conreus Centre R+D UdL-IRTA de Lleida, Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain

The polymer-assisted reaction of 4-(hydroxymethyl)furan-2(5H)-one (4HM2F) with 21 carboxylic acids using polystyrene-carbodiimide (PS-carbodiimide) yielded an ester library. Four of the esters, (5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl acetate (IS-1), (5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl butyrate (IS-2), (5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl 2-methylpropanoate (IS-3), and (5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl chloroacetate (IS-4), were tested as internal standards for the quantification of patulin in apple juice by gas chromatography–mass spectrometry in the selected ion monitoring mode (GC-MS-SIM). The developed method combines an AOAC official extractive step and a GC-MS-SIM analysis. Using a chromatographic column containing trifluoropropylmethylpolysiloxane as the stationary phase and IS-1 as the internal standard, it was possible to perform an accurate and precise quantification of underivatized patulin in apple juice at concentrations down to 6 µg/L. A detection limit of 1 µg/L was established.

KEYWORDS: Solid phase synthesis; esters; internal standard; apple juice; underivatized patulin; GC-MS-SIM; quantification

INTRODUCTION

Several approaches have been used to analyze patulin content in apple juice. To date, the most widely used method has been liquid chromatography (LC), since patulin is a polar compound (1, 2). Even so, conventional LC methods with UV (ultraviolet) detection exhibited poor selectivity because interfering compounds, like 5-hydroxymethylfurfural (HMF), can simultaneously elute with patulin from a reverse phase column (3). Hyphenated techniques such as liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) (4–6) and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) (7–9) have therefore been developed and applied to the analysis of patulin residues. Whereas most GC and GC-MS procedures imply the use of patulin derivatives (7–10), adequate detection of underivatized patulin has also been achieved using the on-column injection technique (3, 11).

Although LC-MS and GC-MS are intensively applied in the analysis of many xenobiotics present in complex matrices, an accurate quantitative approach for these techniques requires using internal standards (IS). Isotopically labeled analogues (ILAs) of analytes are the preferred IS for mass spectrometric analysis (12). However, the use of structurally related analogues can offer an alternative to expensive ILAs (13). Moreover, solid

support techniques have recently been developed to synthesize libraries of structurally related compounds. These techniques offer important advantages with respect to conventional synthetic chemistry, allowing the relatively rapid preparation of sets of related chemical compounds.

The main purpose of the present work is to show how a parallel synthesis strategy can yield a set of esters that can then be tested as ISs for the quantitative analysis of patulin in apple juice by GC-MS-selected ion monitoring (SIM). The synthesis of the esters was carried out using a solid phase approach. Thus, carbodiimide in a solid phase support was used to obtain a wide variety of similar esters from 4-(hydroxymethyl)furan-2(5H)-one (4HM2F) and 21 different acids. One new IS obtained, (5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl acetate (IS-1), allows us to considerably improve our earlier work for the analysis of patulin developed in our laboratory (3).

EXPERIMENTAL SECTION

Solvents and Reagents. Dichloromethane, ethyl acetate, tetrahydrofuran, and dimethylformamide (DMF), for organic residue analysis, were purchased from J. T. Baker (Deventer, Holland). Chloroform and methanol, synthesis grade, were purchased from Scharlab Chemie S. A. (Barcelona, Spain). 4HM2F was synthesized according to refs 14 and 15. Polystyrene (PS)-carbodiimide resin was obtained from Argonaut Technologies (NET Interlab, Spain). Patulin was supplied by Sigma (Steinheim, Germany).

Solid Phase Parallel Synthesis of Esters. Parallel synthesis was performed on a carousel reaction station with 12 threaded glass reaction

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 973 702843. Fax: +34 973 238264. E-mail: canela@quimica.udl.es.

[†] Chemistry Department, Universitat de Lleida.

[‡] Area de Protecció de Conreus Centre R+D UdL-IRTA de Lleida.

[§] Department of Food Technology, Universitat de Lleida.

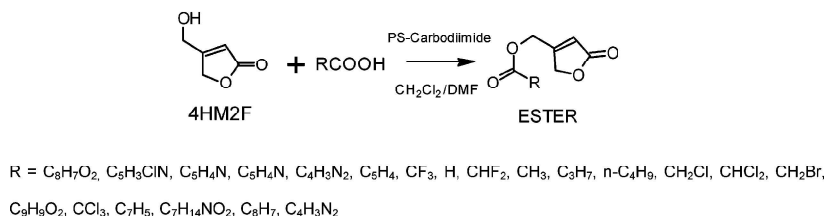


Figure 1. Synthesis of esters and the relation of 21 acids used.

tubes, 24 mm × 150 mm (Radleys Discovery Technologies, Essex, United Kingdom). One gram (1.05 mmol) of PS-carboxydimide resin was added to a dry reaction tube. Each acid (0.85 mmol) was dissolved in 7 mL of dry dichloromethane (with 1% dry DMF if required). Figure 1 shows all different acids essayed. The solution was then added to the dry resin, and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. Then, 75.3 mg (0.66 mmol) of 4HM2F in 3 mL of dry CH₂Cl₂ was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The progress of the reaction was monitored by thin-layer chromatography analysis on silica gel 60 F₂₅₄ (chloroform–methanol 5%). The reaction mixture was filtered, and the resin was washed twice with the reaction solvent. To evaluate the presence of ester and its purity, the filtrate was subsequently analyzed by GC-MS as described below. A scheme of the reaction is given in Figure 1.

Calibration Standards. Patulin stock solution was prepared according to the AOAC Official Method 2000.02 (2). Calibration standards were prepared from free patulin extract obtained according to Brause et al. (16). The extract solution was evaporated under vacuum conditions at 40 °C, and the final residue was redissolved in 200 μL of standard solutions containing 0.2 μg/mL of ISs and either 0.15, 0.25, 0.38, 0.50, 0.75, or 1.25 μg/mL of patulin.

Spiked Samples. A working solution of 100 μg/mL of patulin was used to prepare a set of ethyl acetate solutions containing 0.6, 1.0, 3.0, and 5.0 μg/mL of patulin and 0.8 μg/mL of the ISs (IS-1, IS-2, IS-3, and IS-4). Five milliliters of free patulin apple juice was then spiked with 50 μL of these ethyl acetate solutions. After shaking vigorously for 1 min to homogenize, samples were extracted and cleaned-up as described by Brause et al. (16). The final residue was dissolved in 200 μL of ethyl acetate and analyzed by GC-MS as described below. The essays were carried out in triplicate. A UV/vis UV2 spectrophotometer from Unicam was used to confirm the concentration of patulin in the stock solution.

GC-MS Analysis. Analysis was carried out using an Agilent 6890N gas chromatograph interfaced to a 5973N mass selective detector. Mass spectrometric data were collected in full-scan and SIM modes. Full scan data were used for preliminary selection of best target *m/z* ions and qualifiers. In other cases, the SIM mode was used to quantify patulin in apple juice in order to maximize sensitivity and selectivity. SIM was performed monitoring the ions in one group, and the dwell time applied for each ion was 50 ms with a rate of 3.03 cycles/s.

One microliter of the extract was injected using the on column mode and following a ramp pressure technique and track oven temperature programmed. A fused silica deactivated retention gap of 3m × 0.32 mm (Agilent, Anorsa, Barcelona, Spain) was connected between the injector and the analytical column using a universal deactivated press fit connector (Agilent). The carrier gas was helium at a constant flow rate of 1.5 mL/min. The columns used were a HP-5 MS (cross-linked 5% phenylmethylpolysiloxane) 30 m × 0.25 mm i.d. column, df = 0.25 μm (Agilent, Cromlab, Barcelona, Spain) and a Rtx-200 MS (crossbond trifluoropropylmethylpolysiloxane) 30 m × 0.25 mm i.d. column, df = 0.25 μm (Restek, Teknokroma Barcelona, Spain). GC temperature parameters varied slightly according to the column used. The oven temperature was programmed at 140 °C and was ramped at 10 °C/min up to a maximum of 280 °C for 10 min when a DB-5 MS was used. When a Rtx-200 MS was used, the GC temperature was programmed at 140 °C, initially ramped at 5 °C/min to 170 °C, further ramped at 15 °C/min up to 280 °C, and then held until a total run time of 24 min. The GC-MS transfer line was held at 280 °C, and the quadrupole analyzer and the ion source heaters were maintained at 150 and 230 °C, respectively.

Ion abundance ratios and retention times were applied as criteria for identification of patulin in samples. The ions selected for patulin identification were as follows: *m/z* 110 (M – C₂H₄O)⁺, which was used as the target ion; and 126 (M – CO)⁺, 136 (M – H₂O)⁺, and 154 (M⁺), which were used as qualifier ions. The specificity of the chromatographic method coupled to a MS detector was readily demonstrated by establishing the ratios for patulin identification, *m/z* 126/110 = 55.0 ± 5%, *m/z* 136/110 = 34.0 ± 5%, and *m/z* 154/110 = 27.0 ± 5% (mean ± RSD %, *n* = 14). Those ratios were calculated from the different mass spectra obtained analyzing spiked samples with 100 μg/L of patulin in full scan mode (40–400 amu). To confirm the presence of patulin in samples analyzed in SIM mode, the specified ratios were calculated by integrating the individual ion chromatograms. The ion selected for ester quantification was *m/z* 96 (C₅H₄O₂)⁺.

Statistical Analysis. Calibration curves were generated in EXCEL using least-squares linear regression analysis. We established the utility of esters as ISs by predicting the concentration of spiked samples throughout the calibration range for three different levels of patulin. Predictions were made on the basis of the fitted line and the estimated standard deviation (*S_e*) of a predicted value for *x_i* (17). The calculation of the limit of detection (LOD) was based on the residual standard deviation of the regression line (*S_{y/x}*) and the slope (*b*), LOD = (3.3 × *S_{y/x}*)/*b*.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation of Putative IS. Table 1 summarizes the results of the solid phase syntheses carried out as indicated in Figure 1. The efficiency of the process and the chromatographic behavior in the GC-MS analysis is shown for each synthesized ester. The first six compounds listed in Table 1 were discarded due to the low yields of their synthesis (<50%). The yield of the synthesis for the other esters was 80–85%. One microliter of a 100 μg/mL ethyl acetate solution of each of the chosen esters was injected into the GC-MS to determine its relative retention time (*tR_i*) to patulin. The predominant fragments from their mass spectra obtained in scan mode (scan range 40–400 amu) were also determined. Compounds with *tR_i* values similar to that of patulin were then selected for the recovery assays. All of the selected compounds exhibited an *m/z* 96 fragment (C₅H₄O₂)⁺ (Table 1), which was very similar to *m/z* 110 (C₅H₂O₃)⁺, the main fragment selected for patulin. Thus, in the absence of sources of interference, MS performance should affect fragments in the same way.

Recovery studies were carried out by spiking 5 mL of apple juice with 50 μL of a mixture of selected esters, each in a concentration of 0.8 μg/mL. The samples were then extracted and cleaned-up as described in the Experimental Section (16). Table 2 shows the recovery efficiency of the esters (*Q_{is}*) throughout the selected extraction method. *Q_{is}* was calculated for each ester according to the following equation:

$$Q_{is} = \bar{A}_{IS-sp} \times 100 / \bar{A}_{IS-std}$$

where \bar{A}_{IS-sp} is the mean chromatographic peak area of *m/z* 96 corresponding to each ester from the spiked samples and \bar{A}_{IS-std} is the expected mean value for each ester. The esters with recovery rates greater than 90%, IS1, IS2, IS3, and IS4, were

Table 1. Synthesized Compounds Sorted by Ascending Order of Relative Retention Time with Respect to Patulin, Yields > 50%, and Reference Ions

compound name	yield > 50%	rR _p ^a (min)	reference ions (m/z)
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate			
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl 2-chloronicotinate			
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl isonicotinate			
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl nicotinate			
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl pyrazine-2-carboxylate			
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl pyridine-2-carboxylate			
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl trifluoroacetate	+	0 . 6 3	6 9 / 9 6
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl formate	+	0 . 7 5	9 6
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl difluoroacetate	+	0 . 8 2	9 6
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl acetate	+	0 . 8 6	6 8 / 9 6
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl 2-methylpropanoate	+	1 . 0 1	7 1 / 9 6
patulin (4-hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)one)			
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl butyrate	+	1 . 0 4	7 1 / 9 6
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl chloroacetate	+	1 . 1 7	8 5 / 9 6
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl dichloroacetate	+	1 . 2 0	6 7 / 9 6
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl bromoacetate	+	1 . 2 1	9 6 / 1 2 3
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate	+	1 . 2 6	2 0 3 / 2 1 8
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl trichloroacetate	+	1 . 2 8	9 6 / 1 1 9
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl octanoate	+	1 . 4 7	9 6 / 1 2 7 / 2 4 0
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl N-(tert-butoxycarbonyl)-β-alaninate	+	1 . 6 8	9 8 / 2 1 2
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl (E)-3-phenylacrylate	+	1 . 7 6	1 3 1 / 2 4 4
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl 1-benzofuran-2-carboxylate	+	1 . 8 5	1 4 5 / 1 6 2 / 2 5 8

^a Relative retention time with respect to patulin.

Table 2. Extraction Efficiencies of Selected Esters Determined by the Extractive Method

esters tested for recovery assays	Q _{IS} % mean ± RSD % (n = 10)
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl formate	±30
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl acetate (IS 1)	±16
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl 2-methylpropanoate (IS 3)	±20
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl butyrate (IS 2)	±19
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl chloroacetate (IS 4)	±21
(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl bromoacetate	±22

chosen as putative ISs. Characterization data such as high-resolution (HR) mass spectra, ¹H NMR, and ¹³C NMR were obtained. Elemental compositions deduced from the accurate measurement of the molecular mass fragment obtained confirmed the expected empirical formulas. HR mass spectra obtained were also in agreement with those obtained using a quadrupole analyzer (see Supporting Information).

GC-MS Conditions for Patulin Analysis. First, the column injection program was studied in order to prevent peak width broadening and achieve sharp peaks. The oven temperature program was optimized by comparing the TIC (total ion chromatogram) area of patulin at different initial temperatures and at maximum inlet pressure. The results obtained indicated that the optimum initial oven temperature was 140 °C (Figure 2). Moreover, this high temperature appeared to reduce the accumulation of low volatility compounds from the apple juice in the retention gap. It was consequently possible to carry out a large number of analyses without cutting or replacing the retention gap.

Matrix-induced response enhancement was observed when standards prepared in blank matrix extract were compared with those prepared in solvent solution (18–20). It was then necessary to use matrix-matched calibration to achieve an accurate quantification of patulin. The calibration solutions were prepared from extracts of blank samples to counteract the matrix effect. This was considered an effective way to avoid potential errors deriving from the matrix effects in the quantification process.

Influence of the Stationary Phase upon IS Behavior. Preliminary chromatographic analyses were carried out using cross-linked 5% phenylmethylpolysiloxane stationary phase.

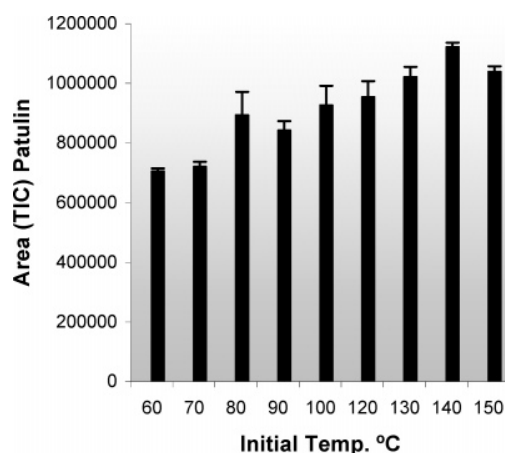


Figure 2. Initial oven temperature optimization for "on column" injection. Each height represents the mean area of TIC (The standard deviation is represented by the error bar). A 2.5 ng amount of patulin was injected ($n = 3$) at different temperatures with an initial ramped pressure on injection, 200 kPa at 0 min, ramped at 650 kPa/min to 350 kPa and hold 0.3 min with a HP5-MS column.

When standards and spiked samples were analyzed, matrix interference was observed with respect to the target ion (m/z 110) for patulin (Figure 3A). As a result of that matrix interference, spiked samples did not meet the ratio limits stated on the Experimental Section, especially at low levels of patulin. Figure 4A evidences that the relative abundance of m/z 110 is higher than the expected when the other patulin ions are

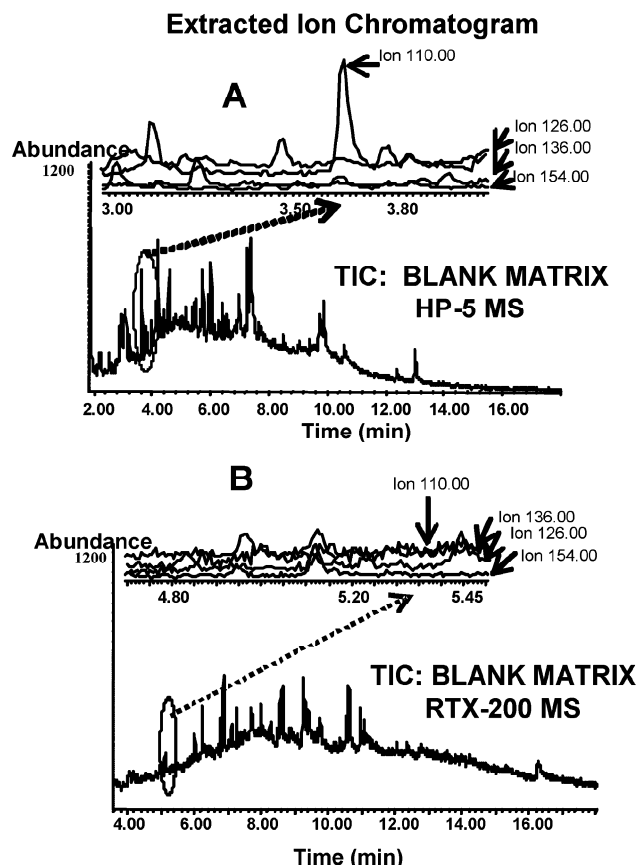


Figure 3. TICs and the extracted ions chromatograms of a blank sample matrix analyzed in **A)** HP-5 MS and **B)** RTX-200 MS chromatographic column. A zoom of where patulin is expected is presented. The arrow linked to m/z 110 indicates patulin retention time.

considered. The resulting calibration curves consequently exhibited considerable values for the intercept (data not shown). This problem was overcome by using the m/z 126 fragment as a target ion to quantify patulin. Linearities were acceptable ($r^2 > 0.99$) in both cases. By using the ion 126 to quantify patulin, a reduction in the slope value in the calibration line was observed. It was a consequence of the minor relative abundance of that ion in the patulin fragmentation pattern. The ratio calculated with respect to 110 was m/z 126/110 = 0.55 ± 0.05 . The calibration range was established from 10 to 50 $\mu\text{g/L}$. Linearity was validated over the whole range. For each IS assayed, a correlation coefficient (r^2) greater than 0.99 was obtained (Table 3). Under such conditions, the best calibration parameters were obtained when using IS-4 as the IS. In such cases, the estimated standard deviations calculated for the slope, intercept, and regression were smaller than the respective values obtained for the other IS tested.

The precision of the replications determined at each spiked level did not exceed 15% of the relative standard deviation (RSD %). Results were shown in Table 7. The results obtained confirmed the low standard error (S_x) calculated for predicted values (Table 4). Of the four compounds tested, (5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl chloroacetate (IS-4) showed the smallest standard error in the prediction of the concentration of patulin in spiked samples. This compound was therefore shown to be the best IS for determining patulin residues in samples with a 5% phenylmethylpolysiloxane stationary phase.

A chromatographic column with trifluoropropylmethylpolysiloxane as stationary phase was studied in order to assess whether matrix interference at m/z 110 could be prevented by

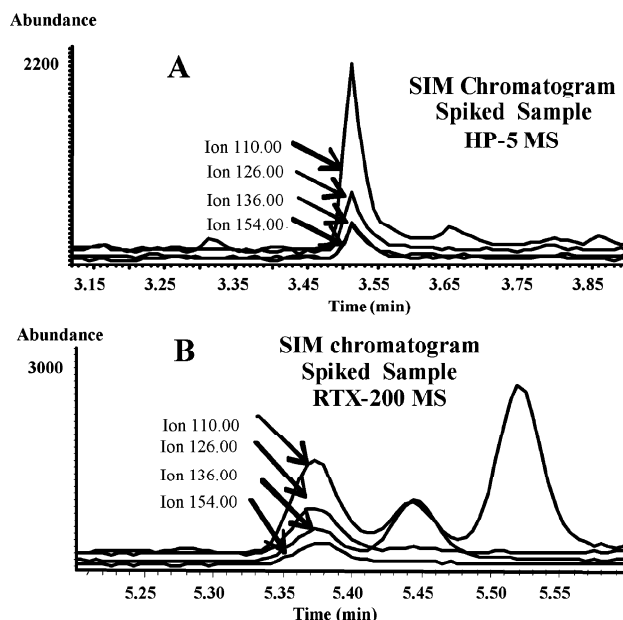


Figure 4. SIM chromatograms corresponding to a spiked sample with 6 $\mu\text{g/L}$ of patulin analyzed **A)** (HP-5 MS) and **B)** (RTX-200 MS chromatographic columns, respectively). The abundance of each single ion chromatogram is shown. A zoom of where patulin is expected is presented. The arrow linked to m/z 110 indicates patulin retention time.

Table 3. Regression Parameters for the Different Curves Obtained Using m/z 126 to Quantify Patulin and the Four ISs Tested in a 5% Diphenylmethylpolysiloxane Stationary Phase

	regression parameters/HP-5 MS			
	$Y = [\text{area } m/z 126 / \text{area IS}]$			
	IS - 1	IS - 2	IS - 3	IS - 4
slope ($\hat{\beta}$)	0.02	0.03	0.02	0.02
standard deviation of the slope ($S_{\hat{\beta}}$)	0.0005	0.001	0.001	0.000
intercept ($\hat{\alpha}$)	-0.03	-0.03	-0.04	-0.02
standard deviation of the intercept ($S_{\hat{\alpha}}$)	0.01	0.02	0.02	0.01
residual standard deviation ($S_{y,x}$)	0.02	0.03	0.03	0.02
correlation coefficient (r^2)	0.998	0.996	0.996	0.998
calibration range (g/L)	1-50.0	1-50.0	1-50.0	1-50.0
LOD ($\mu\text{g/L}$)	3.7	3.8	3.8	4.0

^a $N = 5$; each calibration point is the average of two series of standards.

Table 4. Predicted Concentration in Spiked Samples Deduced from Calibration Curves Described Table 3

spiked concn ($\mu\text{g/L}$)	HP-5 MS m/z 126			
	predicted concn (g/L)			
	IS - 1	IS - 2	IS - 3	IS - 4
9.9	1.02 ± 0.79	1.0 ± 0.39	1.0 ± 0.49	1.0 ± 0.5
29.8	3.08 ± 0.72	3.0 ± 0.39	3.0 ± 0.29	2.9 ± 0.5
49.8	6.00 ± 0.78	6.0 ± 0.09	5.9 ± 0.19	5.9 ± 0.5

^a Each value is the mean $\pm 3 S_x$, the standard error for predicted concentration.

using a more selective stationary phase. The uses of this phase for patulin GC-MS analysis had previously been proposed by Roach et al. (11). When this column was used, no matrix interference was observed in the m/z 110 quantification ion for

Table 5. Regression Parameters for the Different Curves Obtained Using *m/z* 110 to Quantify Patulin and the Four ISs Tested in a Trifluoropropylmethylpolysiloxane Stationary Phase

	regression parameters Rtx-200 MS $Y = [\text{area } m/z 110 / \text{area IS}]$		
	IS - 1	IS - 2	IS - 3
slope (<i>b</i>)	0 . 0 7	0 . 0 6	0 . 0 5
standard deviation of the slope (S_b)	0 . 0 0 1	0 . 0 0 2	0 . 0 0 2
intercept (<i>a</i>)	0 . 0 1	0 . 0 5	0 . 0 0
standard deviation of the intercept (S_a)	0 . 0 2	0 . 0 5	0 . 0 3
residual standard deviation ($S_{y,x}$)	0 . 0 2	0 . 0 5	0 . 0 3
correlation coefficient (<i>r</i>)	0 . 9 9 9	0 . 9 9 6	0 . 9 9 7
calibration range ($\mu\text{g} / \text{L}$)	0 . 0 0	0 . 0	0 . 0
LOD ($\mu\text{g} / \text{L}$)	1 . 0	2 . 2	

^a *N* = 5; each calibration point is the average of two series of standards.

Table 6. Predicted Concentration in Spiked Samples Deduced from Calibration Curves Described Table 5

spiked concn ($\mu\text{g} / \text{L}$)	Rtx-200 MS predicted concn ($\mu\text{g}/\text{L}$)	
	IS - 1	IS - 2
6 . 0	± 06.29	± 50.65
10 . 0	± 09.28	± 90.15
30 . 0	± 28.21	± 60.45

^a Each value is the mean $\pm 3 S_x$, the standard error for predicted concentration.

Table 7. Precision of Replications Determined at Each Spiked Level in an HP-5 MS Using the Ion 126 to Quantify Patulin, Indicated by the RSD %

spiked concn ($\mu\text{g} / \text{L}$)	HP-5 MS <i>m/z</i> 126 RSD % (<i>n</i> = 3)	
	IS - 1	IS - 2
9 . 9	8 . 7 6	4 . 3 0
29 . 8	7 . 6 6	2 . 3 4
49 . 8	1 . 6 2	1 . 7 8

patulin (Figure 3B). This apparently indicates that the specificity of the method could be improved by changing the stationary phase. In that case, all spiked samples meet the criteria stated on the Experimental Section for patulin identification. Figure 4B represents a visual confirmation of the ratio agreement.

Table 5 shows the regression parameters for each of the putative ISs assayed when a trifluoropropylmethylpolysiloxane stationary phase was used. IS-1 displayed the best parameters in this case. A correlation coefficient of 0.999 was obtained, and this IS was also associated with the lowest standard errors when comparing slope, intercept, and regression calculations with other ISs. The highest level of accuracy was also achieved in the prediction of the patulin content of spiked samples, with a prediction error of $S_x = \pm 0.2$ (Table 6). Table 8 summarizes the results of the precision of the replications determined at each spiked level calculated when the Rtx-200 MS chromatographic column was used. In all cases, the RSD % did not exceed 15%.

The lower calibration point achieved 6 $\mu\text{g}/\text{L}$ was slightly better than the limit of quantification of 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ described by Sheu et al. (7). The authors proposed a GC-MS method that involves one derivatization step and a diphasic dialysis extraction

Table 8. Precision of Replications Determined at Each Spiked Level in a RTX-200 MS Using the Ion 110 to Quantify Patulin, Indicated by the RSD %

spiked concn ($\mu\text{g} / \text{L}$)	Rtx-200 MS <i>m/z</i> 110 RSD % (<i>n</i> = 3)		
	IS - 1	IS - 2	IS - 3
6 . 0	9 . 5 0	13 . 4	9 . 4 9
10 . 0	8 . 8 8	5 . 5 1	13 . 1
30 . 0	1 . 0 7	7 . 7 2	7 . 9 8

prior to mass spectrometric determination and suggested using nitrobenzene as the IS. A derivatization step was also proposed by Rychlik et al. (21) that reported a very low LOD, 12 ng/L, using an isotopomer of patulin as the IS. Although this detection limit is much lower than our own—1 $\mu\text{g}/\text{L}$ using a trifluoropropylmethylpolysiloxane column—it was achieved using a HRGC/HRMS system, involving 100 mL of sample and a more extensive clean-up procedure. Consequently, their procedure would be difficult to use for a routine quantification analysis of patulin in apple juice. Finally, although Roach et al. (11) used on-column injection mode of underivatized patulin by GC-MS-SIM, this was only done for the purpose of confirmation, as quantification was carried out by LC-UV.

In conclusion, the proposed analytical strategy combines the extractive step of an AOAC official method and a GC-MS determination. No extra cleanup is applied, and no derivatization step is required prior to GC determination, so errors due to incomplete reactions can be prevented. It shows a good level of calibration agreement; slope and intercept values calculated with data obtained from the matrix matched calibration standards and spiked samples. Following this approach, two ISs, IS-4 and IS-1, can be proposed for quantifying the presence of patulin in apple juice by GC-MS-SIM. (5-Oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)-methyl acetate (IS-1) is preferable when trifluoropropylphenyl polysiloxane, a more selective GC stationary phase, is used. The use of IS-1 as an IS represents a new alternative for the quantification of trace levels of patulin in apple juice by GC-MS-SIM at low levels (6–30 $\mu\text{g}/\text{L}$).

Polymer-assisted reaction can be regarded as a quick and simple strategy to obtain sufficiently pure, structurally closely related compounds. Some of these compounds can be useful ISs and valid alternatives to ILAs. By using structurally closed related compounds as ISs, with extraction and fragmentation properties that are very similar to those of patulin, it is possible to overcome some of the drawbacks associated with the use of IS with properties whose differences are chemically significant.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to the Mass Spectrometer Center of CSIC Barcelona, Spain, for high resolution MS analyses. We also thank Indulleida, S.A., a Spanish manufacturer, for providing apple juice samples.

Supporting Information Available: Analytical and spectroscopic data for synthesized compounds. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

LITERATURE CITED

- Gökmen, V.; Acar, J. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1999, 847, 69–74.

- (2) MacDonald, S.; Long, M.; Gilbert, J.; Felgueiras, I. Liquid Chromatographic method for determination of patulin in clear apple juice and apple puree: collaborative study. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 1387–1394.
- (3) Llovera, M.; Viladrich, R.; Torres, M.; Canela, R. Analysis of underivatized patulin by a GC/MS technique. *J. Food Prot.* **1999**, *62*, 202–205.
- (4) Sewram, V.; Nair, J. J.; Nieuwoudt, T. W.; Leggott, N. L.; Shephard, G. S. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2000**, *897*, 365–374.
- (5) Takino, M.; Daishima, S.; Nakahara, T. Liquid chromatography/mass spectrometric determination of patulin in apple juice using atmospheric pressure photoionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 1965–1972.
- (6) Ito, R.; Yamazaki, H.; Inoue, K.; Yoshimura, Y.; Kawaguchi, M.; Nakazawa, H. Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination level in Japan. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7464–7468.
- (7) Sheu, F.; Shyu, Y. T. Analysis of patulin in apple juice by diphasic dialysis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2711–2714.
- (8) Rupp, H. S.; Turnipseed, S. B. Confirmation of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in apple juice by gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 612–620.
- (9) Melchert, H. U.; Pabel, E. Reliable identification and quantification of trichothecenes and other mycotoxins by electron impact and chemical ionization-gas chromatography-mass spectrometry, using an ion-trap system in the multiple mass spectrometry mode—Candidate reference method for complex matrices. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1056*, 195–199.
- (10) Tarter, E. J.; Scott, P. M. Determination of patulin by capillary gas chromatography of the heptafluorobutyrate derivative. *J. Chromatogr.* **1991**, *538*, 447–451.
- (11) Roach, J. A. D.; White, K. D.; Trucksess, M. W.; Thomas, F. S. capillary gas chromatography/mass spectrometry with chemical ionisation and negative ion detection for confirmation of identity of patulin in apple juice. *J. AOAC Int.* **2000**, *38*, 104–112.
- (12) Liu, R. H.; Lin, D. L.; Chang, W. T.; Liu, C. R.; Tsay, W. I.; Li, J. H.; Kuo, T. L. Isotopically labeled analogues for drug quantitation. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 618A–626A.
- (13) Sabzevari, O.; Abdi, K.; Amini, M.; Shafiee, A. Application of a simple and sensitive GC-MS method for determination of morphine in the hair of opium abusers. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379*, 120–124.
- (14) Bentley, P. H.; McRae, W. An efficient synthesis of symmetrical 1,3-diglycerides. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2082–2083.
- (15) Gadir, S. A.; Smith, Y.; Taha, A. A.; Thaller, V. Synthesis of 4-hydroxymethylfuran-2(5H)-one, a metabolite of the Celastraceae *Siphonodon australe*. *J. Chem. Res. (S)* **1986**, 222–223.
- (16) Brause, A. R.; Trucksess, M. W.; Thomas, F. S.; Page, S. W. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: collaborative study. *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 451–455.
- (17) Danzer, K.; Currie, L. L. Guidelines for calibration in analytical Chemistry Part 1. Fundamentals and single component calibration. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 993–1014.
- (18) Egea González, F. J.; Hernández Torres, M. A.; Almansa López, E.; Cuadros-Rodríguez, L.; Martínez Vidal, J. L. *J. Chromatogr. A* **2002**, *966*, 155–165.
- (19) Matisová, E.; Simekova, M.; Hrouzkova, S.; Korytar, P.; Dömötörová, M. Factors influencing chromatographic data in fast gas chromatography with on-column injection. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 1325–1331.
- (20) Rantakokko, P.; Yrityis, M.; Vartianen, T. Matrix effects in the gas chromatographic-mass spectrometric determination of brominated analogues of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 179–188.
- (21) Rychlik, M.; Schieberle, P. Quantification of the mycotoxin patulin by a Stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3749–3755.

Received for review June 3, 2005. Revised manuscript received July 4, 2005. Accepted July 5, 2005. This research was financially supported by the Secretaría de Estado de Política Científica y Tecnológica of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (CAL00-006-C2-2) and DURSI (2001SGR00309).

JF0513157

Supporting Information

Parallel synthesis: a new approach for developing analytical internal standards. Application to the analysis of patulin by GC-MS

*Montserrat Llovera, Mercè Balcells, Mercè Torres and Ramon Canela**

Characterization data for the synthetic internal standards

¹H and ¹³C NMR spectra were measured at 25°C on a Varian Unity spectrometer at 300 MHz. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm, δ) from tetramethylsilane. Coupling constants are reported in Hertz (Hz). Spectral splitting patterns are designated as s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, m: complex multiplet (chemically non-equivalent H's).

(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl) methyl acetate (IS-1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.15 (s, 3H), δ 4.84 (m, J=1.87, 0.88, 0.76 Hz, 2H), δ 4.97 (m, J=1.53, 0.76 Hz, 2H), δ 6.06 (m, J=3.55, 1.81 Hz 1H); ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 20.41, 59.29, 71.02, 117.10, 163.17, 170.03, 172.56; HRMS (EI⁺) m/z calcd for C₇H₈O₄ 156.047226 found 156.047902.

(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl) methyl butyrate (IS-2). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.98 (t, J=7.40 Hz 3H), δ 1.69 (m, J=14.76, 7.40 Hz, 2H), δ 2.39 (t, J=7.40 Hz, 2H), δ 4.84 (s, 1H), δ 4.98; (s, 1H), δ 6.06 (m, J=3.51, 1.75, 1.75 Hz, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 13.60, 18.30, 35.67, 59.12, 71.08, 117.05, 163.46, 172.75, 173.75; HRMS (EI⁺) m/z calcd for C₉H₁₂O₄ 184.073559 found 184.072065.

(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl) methyl propionate(IS-3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.22 (d, $J=7.0, 2$ Hz 6H), δ 2.65 (m, $J=6.98, 6.98, 6.98, 6.98$ Hz, 1H), δ 4.85 (m, $J=1.87, 0.88, 0.76$ Hz, 2H), δ 4.99; (m, $J=1.56, 0.82, 0.82$, 2H), δ 6.05 (m, $J=3.55, 1.81, 1.81$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 18.78, 33.70, 59.14, 70.97, 116.77, 163.66, 172.63, 176.11; HRMS (EI^+) m/z calcd for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 184.073559 found 184.072996.

(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl) methyl chloroacetate(IS-4). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4.15 (s, 2H), δ 4.87 (m, $J=1.91, 0.88, 0.88$ Hz, 2H), δ 5.10 (m, $J=1.64, 0.78$ Hz, 2H), δ 6.12 (m, $J=3.51, 1.75, 1.75$ Hz 1H); ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 40.19, 60.63, 70.87, 117.66, 161.90, 166.60, 172.26; HRMS (EI^+) m/z calcd for $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClO}_4$ 190.003287 found 190.001701.

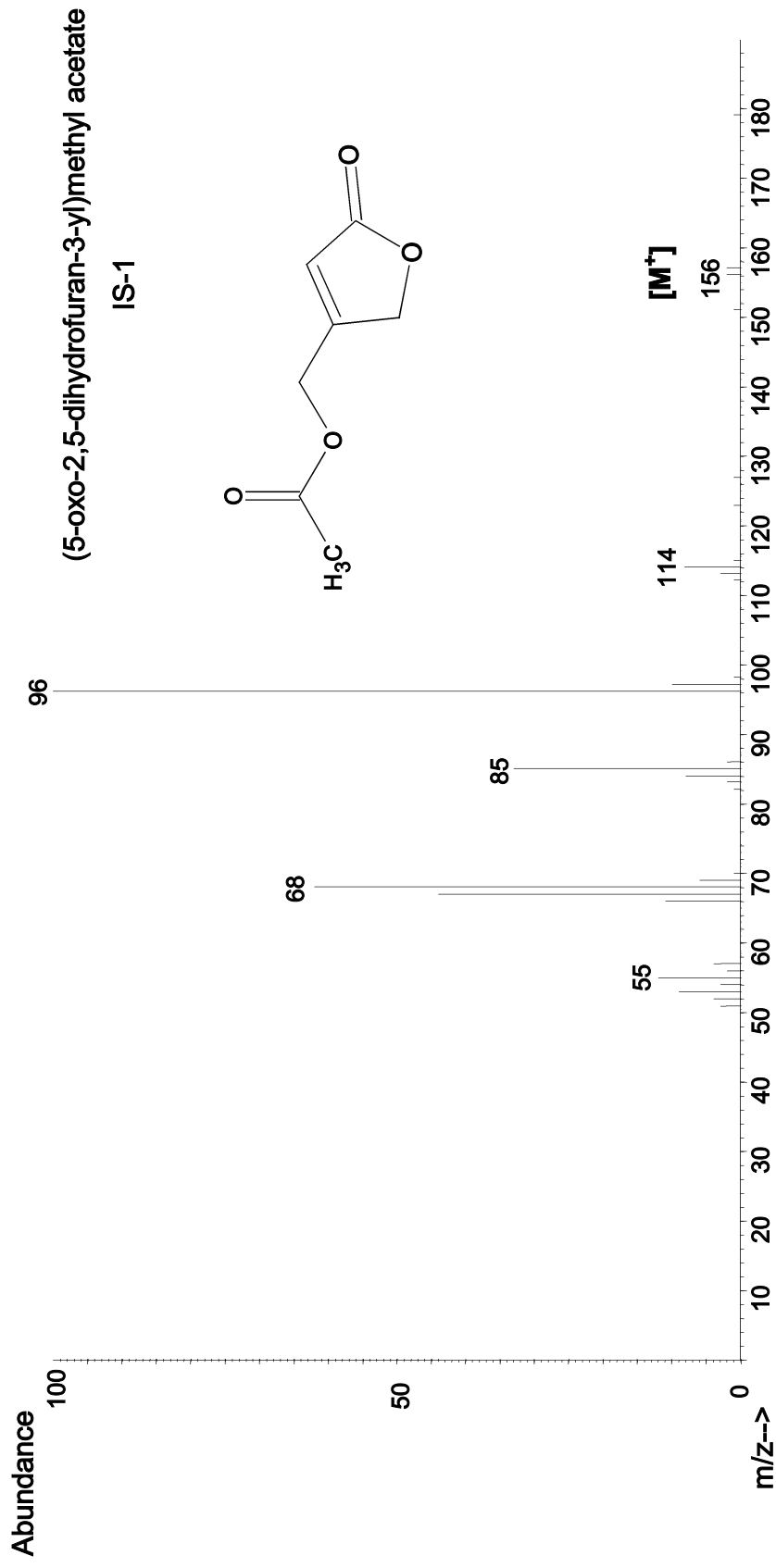
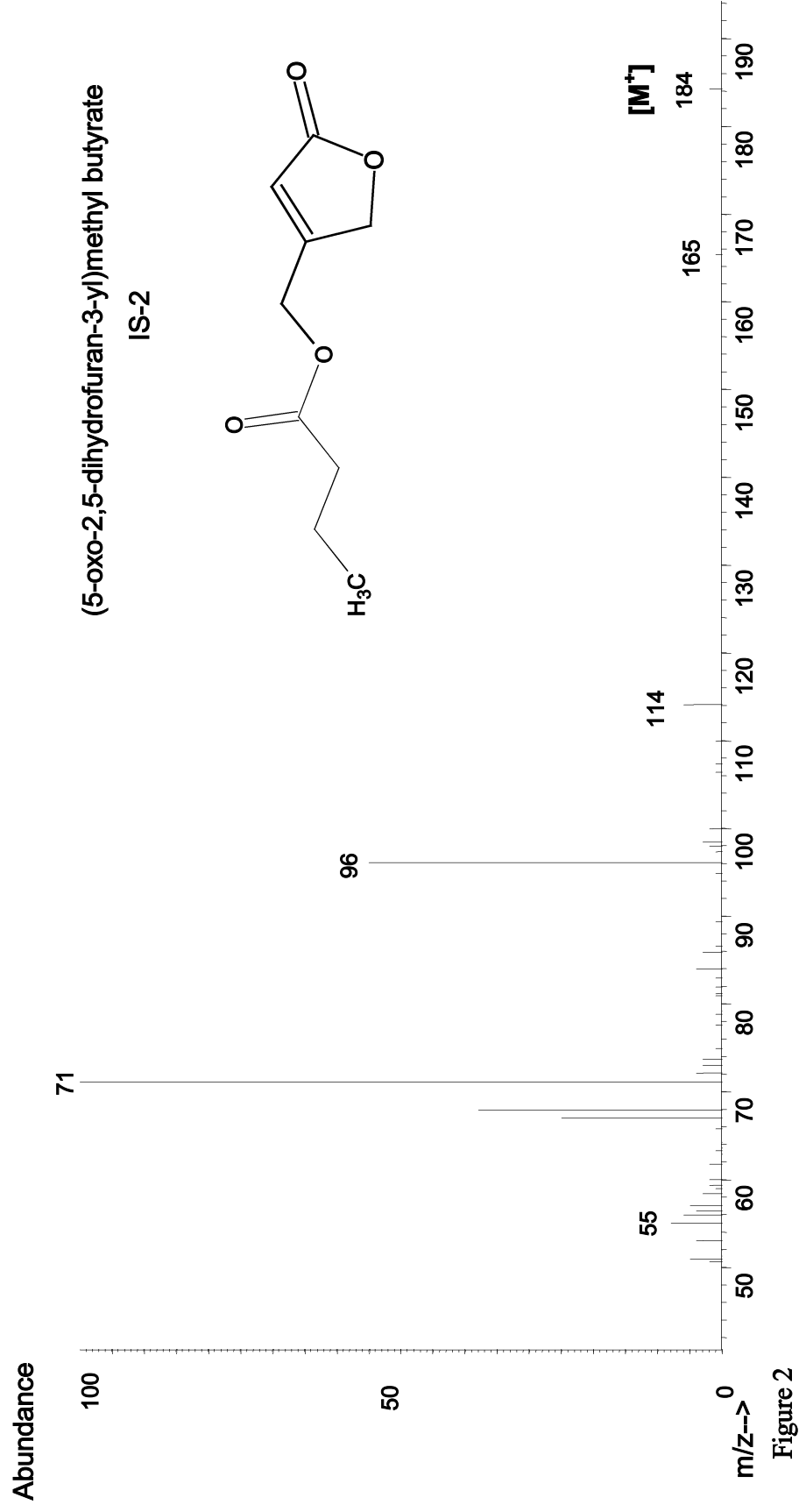


Figure 1

Structure and EI⁺ mass spectra of (5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl) methyl acetate (IS-1). m/z: 55 (12), 67 (45), 68 (63), 85 (33), 96 (100), 114 (8) 156, [M⁺] (2).



Structure and EI⁺ mass spectra of (5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl) methyl butyrate (IS-2). m/z: 55 (6), 67 (26), 68 (32), 71 (100), 96 (49), 114 (4) 184, [M⁺] (2).

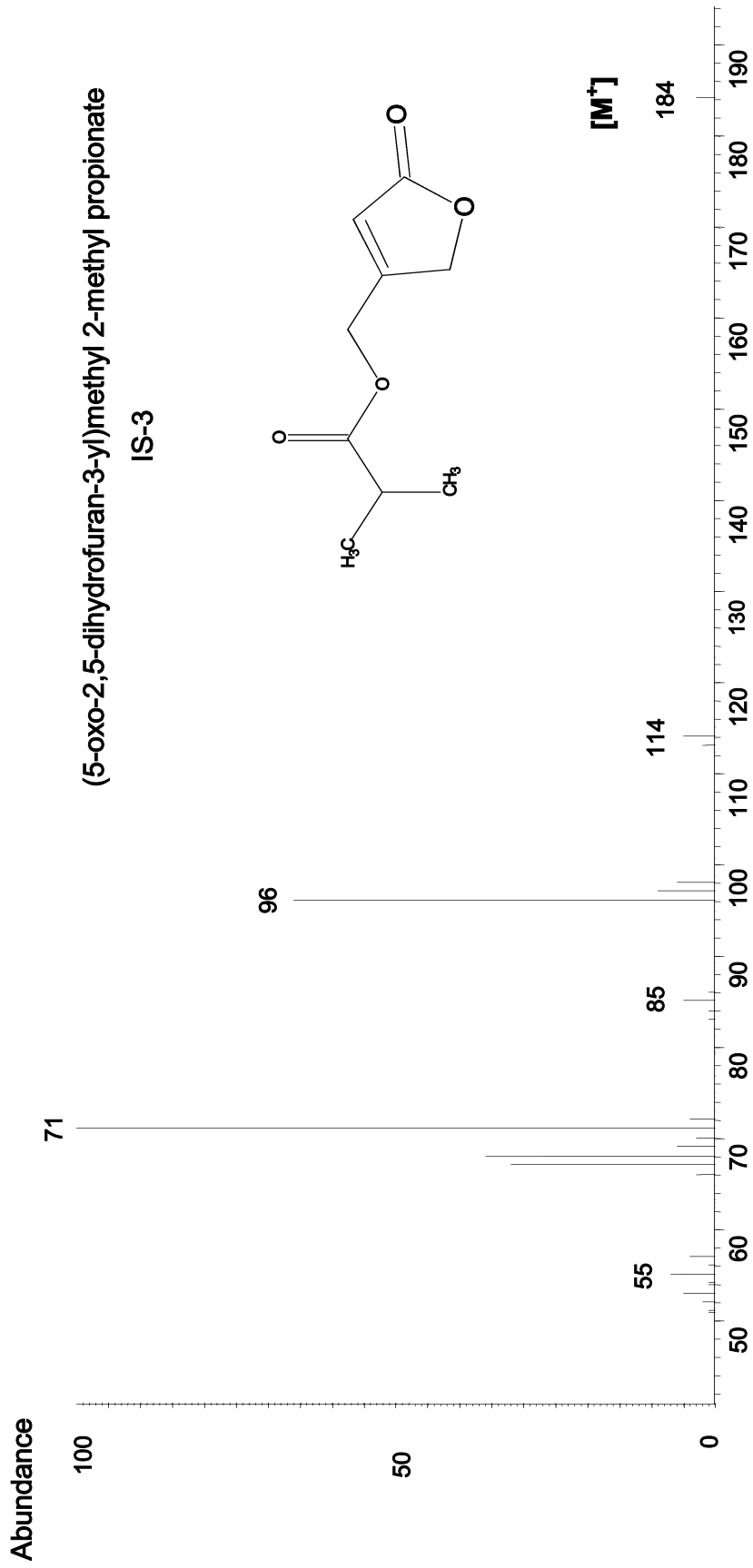


Figure 3

Structure and EI⁺ mass spectra of (5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl) methyl propanoate (IS-3). m/z: 55 (7), 67 (32), 68 (36), 69 (6), 71 (100), 96 (66), 114 (5) 184, [M⁺] (3).

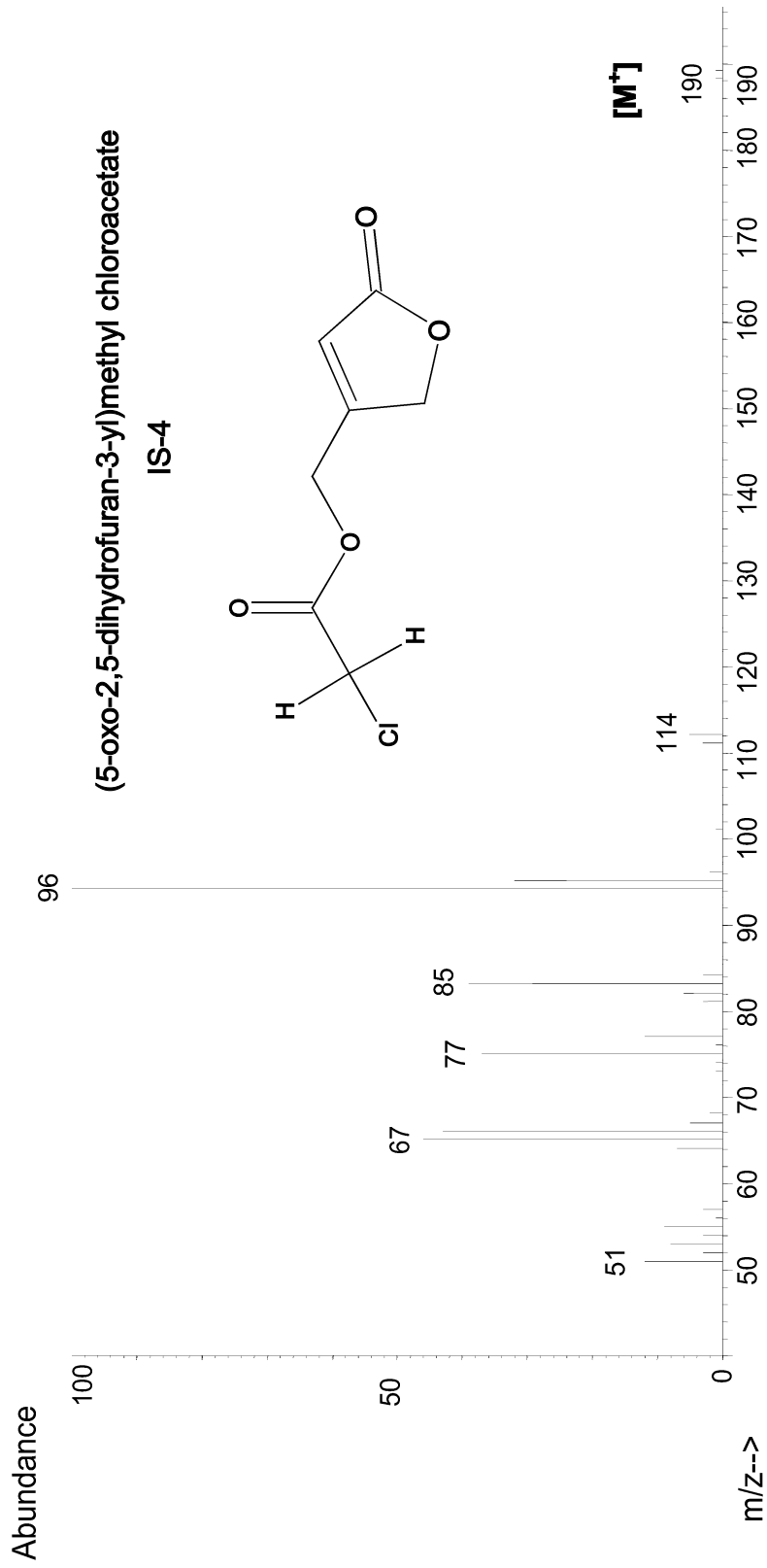


Figure 4

Structure and EI⁺ mass spectra of (5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl) methyl chloroacetate (IS-4). m/z: 51 (12), 55 (9), 67 (46), 68 (42), 77 (37), 85 (39), 96 (100), 97 (32), 114 (5) 190, [M⁺] (3).

