

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 980**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**A23L 5/20** (2006.01)

**A23B 9/00** (2006.01)

**G01N 1/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2014 PCT/IB2014/065461**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16063104**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2014 E 14805666 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3209145**

54 Título: **Ensayo cuantitativo para micotoxinas en muestras de grano de cereal**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.02.2020**

73 Titular/es:

**FOSS ANALYTICAL A/S (100.0%)**

**Foss Allé 1**

**3400 Hillerød, DK**

72 Inventor/es:

**BISGAARD, CHRISTER ZOFFMANN;**

**DAHL, MALIN y**

**HOLM, CLAUS**

74 Agente/Representante:

**PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén**

ES 2 740 980 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Ensayo cuantitativo para micotoxinas en muestras de grano de cereal

5 La presente invención se refiere a un método para la determinación de analitos en una matriz de muestra, en particular de niveles de micotoxina en granos de cereal, y en particular a un método que implica la extracción de analito usando disolventes.

10 Las micotoxinas tienden a ser muy estables y pueden producir enfermedades graves cuando se ingieren, se inhalan o se introducen en el cuerpo por cualquier otro medio. Por ejemplo, se sabe que las micotoxinas son tóxicas o cancerígenas cuando son consumidas por seres humanos o animales. Las micotoxinas son producidas por mohos y hongos durante su crecimiento en alimentos y piensos y pueden permanecer en alimentos y piensos mucho después de que el moho u hongo que las produjo haya muerto. Por lo tanto, los productos que no están visiblemente enmohecidos o que no son positivos para recuento de mohos pueden contener niveles potencialmente peligrosos de micotoxinas.

15 En la actualidad varios países han establecido o propuesto reglamentos para el control de micotoxinas (principalmente las aflatoxinas) en alimentos y piensos para animales. Para armonizar estos reglamentos, el organismo *Food and Drug Administration*, por ejemplo, ha establecido directrices para los niveles de aflatoxina permitidos en los productos básicos para su procesamiento posterior. Los niveles permitidos varían según el uso final previsto del producto básico. La Unión Europea, por ejemplo, también ha establecido reglamentos para los niveles de ocratoxina A (OTA), Desoxinivalenol (DON); Zearalenona (ZEA) y varias otras micotoxinas.

20 La aplicación de estos reglamentos requiere una monitorización precisa de los productos básicos sospechosos. Sin embargo, dado que las micotoxinas tienden a distribuirse de forma no homogénea en todo un lote de cereal, la realización de análisis de laboratorio sobre la cantidad de muestras que se requieren para ser representativas de un lote en particular llega a tener un coste prohibitivamente caro. Por lo tanto, existe la necesidad continua de un método rápido y económico para detectar la presencia de micotoxinas en un lote de grano de cereal de modo que se pueda identificar rápidamente un lote que contiene micotoxinas para permitir que se lleve a cabo un análisis adicional más preciso en un laboratorio.

25 La extracción con disolvente es una etapa vital en la mayoría de las metodologías de detección. De hecho, muchas autoridades no prescriben requisitos específicos para el método de determinación; más bien se establecen ciertos criterios de rendimiento: por ejemplo, con el Reglamento (CE) N.º 401/2006 de la Comisión de la Unión Europea de 23 de febrero de 2006, se establecen criterios que incluyen requisitos de eficacia de extracción que estipulan una recuperación de entre un 50 % y un 120 % dependiendo de la micotoxina. Generalmente, estos requisitos se seleccionan para garantizar que cualquier metodología de ensayo alcance niveles aceptables de precisión, exactitud y niveles de detección. Si la extracción no se puede realizar de manera confiable y consistente, entonces los resultados del análisis serán imprecisos. Por lo tanto, generalmente se acepta que la extracción se debería realizar durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo como para alcanzar el equilibrio para el proceso de extracción; en el caso de los métodos de referencia para análisis de micotoxinas, este periodo de tiempo es del orden de una hora. Evidentemente, esto aumenta considerablemente el tiempo de análisis general y lo aleja de la provisión de una metodología de ensayo rápido.

30 Sin embargo, se sabe que Zabe *et al.*, ('Ethanol Extraction Method for a Rapid Test for Aflatoxin in Corn', páginas 297- 305, ACS Symposium Series 1001 - Food Contaminants - Mycotoxins and Food Allergens) proporcionan un método que incluye la extracción rápida con disolvente de una micotoxina. Aquí se desvela que con el uso de una mezcla en volumen de un 80 % de etanol y un 20 % de agua, la extracción de aflatoxina a partir de maíz para cumplir con las exigencias reglamentarias se puede conseguir en un minuto. Desafortunadamente, este nivel de etanol representa un riesgo de incendio pequeño pero aún inaceptable, además de proporcionar una solución de disolvente que es peligrosa tanto para la salud como para el medio ambiente.

35 Otra metodología de extracción se describe en el documento WO 2011/023230 de FOSS Analytical AB. Aquí se desvela que la extracción adecuada de micotoxina a partir de grano de cereal se puede conseguir usando una mezcla de disolvente en volumen de un 20 % de etanol y un 80 % de agua. Esto reduce de forma significativa los aspectos de riesgo y peligro asociados con la concentración más elevada de etanol u otros disolventes orgánicos (tales como metanol o acetonitrilo), pero desafortunadamente, la extracción adecuada requiere aproximadamente una hora, lo que no se presta para su uso en una técnica de determinación rápida.

40 En la técnica se conocen otras técnicas de extracción con disolvente: A. Pittett ('Modern Methods and Trends in Mycotoxin Analysis', Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, Bundesamt fuer Gesundheit, Berna, Ch, vol. 96, n.º 6, 1 de enero de 2005, páginas 424-444) proporciona una revisión de las técnicas de extracción que incluyen una técnica de extracción de alta velocidad que implica la mezcla de alta velocidad con disolvente, tal como se desvela en el documento WO99/32886; A. Rahmani *et al.*, ('Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins' Comprehensive Reviews in Food Safety, vol. 8, n.º 3, 1 de julio de 2009, páginas 202-251) desvela técnicas de extracción con disolventes en general y en común con técnicas de extracción desveladas por Mulders Ed J *et al.*,

("Gas chromatographic Determination of Deoxynivalenol in Cereals, Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und -forschung. A, European Food Research and Technology, Springer, Heidelberg, DE, vol. 183, n.º 6, 1 de diciembre de 1986, páginas 406-409) y en el documento US 2008/00227221 y en el documento WO 99/32886 permiten solamente la extracción con disolventes en equilibrio usando técnicas de extracción convencionales.

5 El objeto de la presente invención es mitigar al menos uno de los problemas asociados con las técnicas de extracción conocidas.

10 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para el ensayo cuantitativo de uno o más analitos como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Esto, así como los objetos, características y ventajas adicionales de la presente invención, se entenderán mejor a través de la siguiente descripción detallada ilustrativa y no limitante de realizaciones de la presente invención, realizadas con referencia a los dibujos de las figuras adjuntas, de las cuales:

15 **Descripción de las Figuras**

- Fig.1 muestra a un diagrama de flujo que ilustra una realización del método de acuerdo con la presente invención;
- 20 Fig. 2 muestra un diagrama de flujo que ilustra una segunda realización del método de acuerdo con la presente invención y que se usa en los estudios experimentales;
- Fig.3 muestra recuperaciones dependientes del tiempo de DON con diferentes disolventes;
- Fig. 4 muestra recuperaciones dependientes del tiempo de OTA con diferentes disolventes;
- 25 Fig. 5 muestra la correlación entre concentraciones de DON encontradas por HPLC y concentraciones de referencia;
- Fig. 6 muestra la correlación entre concentraciones de OTA encontradas por HPLC y concentraciones de referencia;
- Fig. 7 muestra de forma esquemática una disposición de citómetro de flujo adecuada para medir el nivel de analito en el método de acuerdo con la presente invención; y
- 30 Fig. 8 muestra una ilustración gráfica del equilibrio de extracción de definición.

Un método a modo de ejemplo para el análisis de analitos de acuerdo con la presente invención se ilustra en general con el diagrama de flujo de la Fig. 1. En la etapa 110 se realiza la extracción del analito. Esto implica la mezcla de una matriz de muestra con un disolvente, posiblemente incluyendo agitación u otro tipo de agitación para asegurar una buena mezcla, seguido por la separación de la matriz de muestra del disolvente después de un periodo de extracción que es más corto que el necesario para alcanzar el equilibrio, pero durante ese periodo el analito que se va a extraer de la matriz se mueve hacia el disolvente en una cantidad que se puede medir.

40 Una vez separado, en la etapa 120 se mide el nivel de analito en el disolvente. La técnica de medición usada en esta determinación dependerá, por supuesto, de los analitos en investigación. Las etapas 110 y 120 se repetirán para cada una de una pluralidad de matrices de muestras de referencia que tengan un nivel de analito de referencia diferente y los resultados para cada matriz de muestras se ponen a disposición de un ordenador. Los valores de referencia del nivel de analito contenido en cada matriz de referencia se obtienen (etapa 130) y también se ponen a disposición del ordenador. Estos valores de referencia se pudieron obtener a partir del conocimiento de un nivel de analito introducido deliberadamente en las matrices de referencia o de una medición de referencia realizada en las matrices. En este último caso, es ventajoso si se usa la misma técnica de medición que la usada para obtener el nivel de analito en el disolvente. En la etapa 140, un modelo matemático ejecutable por ordenador se construye a partir de los valores de nivel de referencia (conjunto de datos de referencia) y de los medidos en el elemento separado (conjunto de datos de disolvente) para la misma matriz de muestra que relaciona una cantidad de analito medido en un disolvente hasta un nivel de analito presente en la matriz de muestra. El análisis de regresión de los conjuntos de datos se usa para modelar la relación entre las variables de una manera conocida. En particular, se puede realizar una regresión lineal simple en los conjuntos de datos para determinar la relación matemática que se expresará en el modelo de calibración ejecutable por ordenador. A continuación este modelo se pone a disposición del mismo ordenador o de uno diferente para su uso en la determinación de un nivel de analito en una matriz de muestra de ensayo.

55 En la etapa 150 se realiza una extracción de analito usando una matriz de muestra de ensayo que tiene un nivel de analito desconocido. El procedimiento de extracción usado en esta etapa 150 necesariamente es básicamente similar al usado en la etapa 110 para extraer el analito de las matrices de muestra de referencia. Se debe entender que 'básicamente' se debe tomar para que incluya un procedimiento de extracción que varía desde el usado en la etapa 110 hasta un punto que no influye de forma mensurable en la cantidad de analito extraído en el disolvente de una misma matriz de referencia. Una vez separados, se realiza una medición (etapa 160) de un nivel de analito presente en el disolvente separado usando una técnica de medición y un proceso básicamente similares a los usados para medir el nivel de analito extraído de las matrices de muestra en la etapa 120. Este nivel medido se proporciona al ordenador al que se le ha proporcionado acceso al modelo de calibración ejecutable por ordenador y en la etapa 170 el ordenador aplica la calibración con respecto al nivel medido y se realiza una determinación

cuantitativa de la cantidad de analito presente en la matriz de muestra desconocida que a continuación se puede enviar desde el ordenador en máquina o, preferentemente, en un formato comprensible para el ser humano.

5 Se observará que las etapas del proceso que se han descrito anteriormente no necesariamente se deben realizar en el orden proporcionado con respecto a esta realización particular y que no todas las etapas del proceso deben ser realizadas por la misma persona o con la misma frecuencia para estar dentro del alcance de la invención tal como se reivindica. De hecho, es muy probable que una persona (legal o real) pueda realizar las etapas hasta e incluyendo la generación del modelo de calibración (etapas 110 a 140) y otra persona (legal o real) pueda realizar mediciones de extracción y nivel en matrices de muestra que tengan un nivel desconocido de analito y aplique el modelo de calibración a estas mediciones (etapas 150 a 170).

15 Generalmente, las etapas implicadas en el ensayo de muestras desconocidas (etapas 150 a 170) se pueden realizar una gran cantidad de veces, mientras que las etapas implicadas en la generación del modelo de calibración (etapas 110 a 140) se pueden realizar de forma relativamente rara. Por lo tanto, de acuerdo con otro método a modo de ejemplo para el análisis de uno o más analitos en una matriz de muestra, las etapas que se van a realizar comprenden la extracción del analito en la matriz de muestra 150, dicha extracción de analito comprendiendo la combinación de la matriz de muestra con un disolvente durante un periodo de extracción la combinación de la función. que es menor que el requerido para alcanzar el equilibrio y separar el disolvente que contiene el analito de la matriz de muestra; medición de un nivel de analito presente en el disolvente separado (etapa 160); y, en la etapa 20 170, aplicación de una calibración en un ordenador mediante la cual se establece una relación matemática entre los niveles de analito extraído de cada una de una pluralidad de muestras de referencia mediante el proceso usado anteriormente en la extracción de la matriz de muestra y un valor de referencia de los niveles de analito para cada muestra de referencia para obtener de ese modo una medida del nivel de analito en la matriz de muestra.

25 La medición del nivel de analito en la etapa 160 (en una realización también en la etapa 120) se puede realizar de manera ventajosa usando una disposición de citómetro de flujo convencional 710 que se ilustra en la Fig. 7 usando microperlas 770 que tienen en su superficie moléculas con una afinidad de unión preferente para analitos objetivo en el disolvente separado. Las moléculas de ese tipo pueden ser anticuerpos, aptámeros, polímeros de impresión molecular o cualquier molécula conocida que tenga una afinidad de unión preferente por uno de los analitos cuyo nivel se va a someter a ensayo. La disposición 710 de la presente realización a modo de ejemplo comprende una celda de flujo 720; una fuente de luz 730; uno o más detectores ópticos (aquí dos, 740 a, b); y un procesador de señales 750 conectado de forma operativa para recibir las salidas de los detectores 740a, b.

35 El disolvente separado obtenido en la etapa 150 se mezcla con una cantidad conocida de moléculas de analito marcadas con fluorescencia y las microperlas revestidas 770. El analito del disolvente separado y las moléculas de analito marcadas con fluorescencia compiten por el sitio de unión disponible en las microperlas y una vez que se ha alcanzado el equilibrio, la fluorescencia de las perlas reflejará su concentración relativa. Tradicionalmente, se permite que esta reacción se equilibre usando 30 - 60 minutos de incubación de los reactivos, pero los inventores han descubierto que la información cuantitativa se puede extraer después de unos minutos de incubación, aunque con mayor incertidumbre. La robustez de las predicciones basadas en mediciones tempranas se puede aumentar mediante el rastreo de la cinética de la reacción, en lugar de midiendo en una ventana temporal fija.

45 Una solución que contiene los reactivos incubados se inyecta en la celda de flujo 720 a través del puerto de entrada de la muestra 700 y está rodeada por un líquido de vaina sin partículas 790. La solución fluye a través de la celda de flujo 720 como una corriente de muestra centrada hidrodinámicamente 760 dentro de la cual se encuentra suspendidas las microperlas 770. Un haz de luz 780 de luz básicamente monocromática se genera con la fuente de luz 730, por ejemplo una fuente de luz láser o un diodo emisor de luz, y se hace incidente sobre la corriente de muestra enfocada 760 en la celda de flujo 720. Al enfocar el haz de luz en un punto pequeño, las perlas individuales se pueden dirigir ópticamente y la fluorescencia de los analitos marcados en las perlas se puede distinguir de la de los analitos marcados en solución. Una parte de la luz emitida se recoge, por ejemplo con una lente, se filtra para seleccionar un intervalo específico de longitudes de onda y se dirige hacia uno o más detectores ópticos 740 apropiados. La salida de cada uno de los detectores ópticos 740 se envía a un procesador de señales 750, configurado de un modo tal que, por ejemplo, la fluorescencia total y/o máxima de las perlas individuales se puede leer y almacenar para su análisis posterior.

55 En una modificación de la disposición de medición del citómetro de flujo 710 que se ha descrito anteriormente, las microperlas 770 pueden comprender diferentes conjuntos de microperlas, y cada conjunto consiste en microperlas revestidas con moléculas que tienen una afinidad de unión por un analito que es específico para ese conjunto y diferente a los otros conjuntos. La marca fluorescente unida a la molécula de analito también se puede seleccionar para que proporcione una señal de fluorescencia de longitud de onda diferente (cuyo término incluye una banda estrecha de longitudes de onda) para cada tipo de analito. De esta manera, se pueden analizar fácilmente múltiples analitos de forma simultánea mediante diferenciación entre las longitudes de onda de la fluorescencia detectada por el detector o detectores 740. Como se sabe bien, esto se puede conseguir usando una pluralidad de detectores en los que cada uno de la pluralidad está configurado (por ejemplo mediante la adición de un filtro apropiado antes de cada detector) para detectar una longitud de onda de fluorescencia diferente. Alternativamente, la misma marca fluorescente se une a los diferentes analitos. A continuación las microperlas 770 se tiñen con un colorante que emite

en una banda de longitud de onda diferente y la intensidad de la fluorescencia de la perla se usa como una marca para indicar el tipo de analito al que se une esta perla. De forma ventajosa cualquiera de los dos métodos permite la detección simultánea de múltiples analitos de la matriz de muestra.

- 5 Una definición operativa del tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en un conjunto dado de condiciones se puede expresar como sigue a continuación (véase también la Figura 8):  $R_m$  es la recuperación máxima obtenida después de periodos de tiempo de extracción muy largos, por ejemplo, varias horas, y  $S$  es la desviación estándar de mediciones repetidas de recuperación,  $R$ . Además, una escala de tiempo característica para la extracción,  $T$ , se puede definir como el tiempo necesario para la recuperación,  $R$ , para alcanzar la mitad de  $R_m$ . El tiempo,  $T_e$ , necesario para alcanzar el equilibrio, se puede definir como el tiempo cuando la recuperación medida,  $R$ , ha cambiado menos en una desviación estándar,  $S$ , dentro de un periodo de tiempo predeterminado mayor que la escala de tiempo característica,  $T$  ( $3^*T$ , por ejemplo). Una definición de cuando la extracción no ha alcanzado el equilibrio puede ser las veces anteriores a este periodo predeterminado ( $3^*T$ , por ejemplo) desde el equilibrio.
- 10
- 15 Se debe entender que 'básicamente'; 'básicamente similar' y términos similares como se usan en el presente documento se van a tomar para que incluyan cualquier procedimiento usado con respecto a matrices de muestra desconocidas que varían de las usadas en las etapas 110 y 120 con respecto a las matrices de muestra de referencia en una medida hasta un alcance que no influya de forma mensurable con la cantidad de analito que se podría extraer en el disolvente de una misma matriz de referencia.
- 20

### Estudios experimentales

Las muestras usadas en la demostración de los efectos de diferentes tiempos de extracción y tipos de disolvente consistieron en una matriz de muestra de trigo con niveles de micotoxinas de referencia de: DON: 1987 ppb  $\pm$  123 ppb y OTA: 18 ppb  $\pm$  3 ppb.

25

Las muestras usadas en la demostración de extracción con un 30 % de etanol en 2 minutos consistieron en cinco matrices de muestras de trigo, cada una con una concentración de micotoxinas diferente de acuerdo con la tabla que sigue a continuación:

30

Concentraciones de Micotoxina			
OTA		DON	
Conc. [ppb]	$\pm$ [ppb]	Conc. [ppb]	$\pm$ [ppb]
< 1		ND	
4,3	1,1	900	100
21,5	5,8	1400	100
54,2	15,1	2100	200
101,8	12,2	3500	300

Los disolventes de extracción usados fueron soluciones acuosas de etanol (30 % en V/V), acetonitrilo (60 % en V/V) y metanol (80 % en V/V). La elección del componente orgánico del disolvente se basó en lo que normalmente se usa en estudios científicos.

35

Se eligieron tiempos de extracción de 1, 2, 4 y 30 min. Los tiempos de extracción de 30 minutos se usaron como referencia y una medida de la recuperación máxima,  $R_m$ , de cada disolvente de extracción. Para obtener extracciones precisas, se realizó una separación rápida filtrando en una prensa francesa antes de un filtrado fino. La prensa francesa es similar en construcción y funcionamiento a la bien conocida prensa francesa de café y comprende un vaso de precipitados cilíndrico estrecho equipado con un émbolo que encaja de manera firme pero deslizante en el cilindro y que tiene un filtro de malla en un extremo. A medida que el émbolo se mueve a través de la mezcla que consiste en una matriz de muestra y un analito que contiene disolvente, el disolvente se fuerza a través del filtro y se separa de la matriz de muestra. Esta separación mejorada por la presión aumentó la velocidad desde la extracción hasta el extracto separado en gran medida, y normalmente no necesitó más de 30 segundos. En una realización alternativa, la extracción se puede realizar usando una centrifugadora convencional para separar el disolvente y la matriz de muestra, por ejemplo mediante filtración o sedimentación.

40

45

En la Fig.2 se ilustra una descripción general de los procedimientos de extracción y limpieza de muestras para DON y OTA en relación con el análisis por HPLC en un método de acuerdo con la presente invención que se usa en los estudios experimentales.

50

En la preparación de la muestra de DON para el método de referencia de un ensayo VICAM DON, se usó una columna WB de inmuno afinidad (IAC) como una etapa de limpieza. El método de referencia sigue el procedimiento

de preparación de muestras descrito por VICAM (DONtest HPLC & DONtest WB, Manual de instrucciones (para uso de HPLC), Rev. B, VICAM). Los ajustes de HPLC usados fueron: 1 ml/min de flujo de acetonitrilo/agua a 10/90. 50 µl inyectados con 500 µl/min de velocidad de extracción e inyección. Columna: Synergi 4 µm fase inversa, Hydro-RP 250 x 4,6 mm, con precolumna, de Phenomenex. Sección de columna calentada a 30 °C. Detección de UV-VIS a 218 nm ± 2 nm con referencia a 500 nm ± 50 nm.

El procedimiento de extracción y limpieza seguido es:

1. Tomar una muestra de 5 g de trigo molido fino (etapa 210 a))
2. Extraer con 20 ml de agua desm., a la vez que la mezcla se agita en un recipiente sellado. (etapa 210 b))
3. Filtrar rápidamente en prensa francesa y tomar una muestra de 5 ml de la fase líquida (usar jeringa). (etapa 210 c))
4. Filtrar a través de un filtro Whatman GF/A. La fracción filtrada debe ser transparente (DO600 < 0,02). (etapa 210 d))
5. Dejar la temperatura de la IAC a temperatura ambiente (5 min.)
6. Pasar el tampón de almacenamiento a través de la IAC. (etapa 220)
7. Lavar la IAC con 1 ml de agua desm.
8. Añadir 1 ml de extracto filtrado a la IAC y dejar que pase a través de la misma con aprox. 1 gota/s.
9. Lavar la IAC con 5 ml de agua desm. (1 gota/s.). Aplicar presión de aire hasta que el aire pase a través de la columna y secar la punta con papel.
10. Eluir con 2 ml de metanol durante un periodo mínimo de 5 minutos (< 1 gota/s). Aplicar presión de aire hasta que el aire pase a través de la columna.
11. Evaporar el metanol de la muestra y reconstituir con una fase móvil de HPLC de 500 µl. (etapa 230)
12. Transferir al vial de HPLC y hacer un análisis de HPLC. (etapa 240).

Para la cuantificación de DON extraído con disolventes orgánicos, en la preparación de la muestra se incluye una etapa de dilución (etapa 215a). Esto se debe a que la VICAM IAC está optimizada para extractos de agua. Si a la columna se le aplica un extracto con un alto contenido de disolvente orgánico, DON no se unirá en la columna y se consigue una recuperación baja. Cuando la extracción se realiza con disolventes orgánicos, la etapa de dilución comprende:

- El extracto filtrado se diluye 10 veces con agua: 500 µl de extracto + 4500 µl de agua desm. (punto 4a).
- Todo el extracto diluido (5 ml) se aplica a la IAC, dejarlo pasar con 1 gotas/s. (incluye al punto 8 mencionado anteriormente).

Evaporar el metanol de la muestra y reconstituir con 300 µl de fase móvil de HPLC (sustituye al punto 11 mencionado anteriormente).

#### Soluciones Usadas

Descripción	Componente	Peso en moles [g/mol]	Concentración	Medición
				Volumen total 100 ml (140 muestras)
Fase móvil de HPLC	Acetonitrilo		10 % en Vol.	10 ml
	Agua desm.		90 % en Vol.	90 ml

Para la extracción y limpieza de OTA el procedimiento seguido fue:

1. Tomar una muestra de 5 g de trigo molido homogéneo. (etapa 210 a))
2. Extraer en 1 min. con 20 ml de solución A, a la vez que la mezcla se agita en un recipiente sellado. (etapa 210 b))
3. Filtrar rápidamente en prensa francesa y tomar una muestra de 5 ml de la fase líquida (usar jeringa). (etapa 210 c))
4. Filtrar a través de un filtro Whatman GF/A. La fracción filtrada debe ser transparente. (etapa 210 d))
5. Tomar una muestra de 500 µl del extracto y diluir a 2,5 ml con la solución B. (etapa 215b)
6. Dejar la temperatura de la IAC a temperatura ambiente (5 min.)
7. Pasar el tampón de almacenamiento a través de la IAC. (etapa 220)
8. Lavar la IAC con 1000 µl de solución B.
9. Añadir 1 ml de extracto diluido a la IAC, dejar que pase a través de la misma con 1 gota/s.
10. Lavar la IAC con 700 µl de solución B (1 gota/s.). Aplicar presión de aire hasta que el aire pase a través de la columna y secar la punta con papel.
11. Eluir con 500 µl de solución C (< 1 gota/s). Aplicar presión de aire hasta que el aire pase a través de la columna.
12. Transferir al vial de HPLC y hacer un análisis de HPLC. (etapa 240).

Soluciones Usadas				
Descripción	Componente	Peso en moles [g/mol]	Concentración	Medición
				Volumen total 600 ml (30 muestras)
A	Acetonitrilo		60 % en Vol.	360 ml
	Agua Desm.		40 % en Vol.	800 ml
				Volumen total 1 l (250 muestras)
B	Tris	121,14	12,5 mM	1,5143 g
	NaCl	58,44	150 mM	8,7660 g
	KCl (Sal Cero de Líquidos P/N 1015912)	74,55	6,25 mM	0,4659 g
	MgCl (anhidrato)	95,21	6,25 mM	0,5951 g
	Agua Desm.			Hasta 1 l
				Volumen total 100 ml (140 muestras)
C	Acetonitrilo		49,5 % en Vol.	49,5 ml
	Agua Desm.		49,5 % en Vol.	43,5 ml
	CH <sub>3</sub> COOH		1 % en Vol.	1 ml

5 En la Fig. 3 se ilustran los resultados del experimento con diferentes disolventes de extracción y tiempos usando una muestra de trigo contaminada de forma natural (1987 ppb de DON y 18 ppb de OTA).

10 En la Fig. 3 se ilustran representaciones de las recuperaciones para la extracción de DON con un 60 % de acetonitrilo (conjunto de datos con triángulo), un 80 % de metanol (conjunto de datos con círculo) y un 30 % de etanol (conjunto de datos con cuadrado) en agua a diferentes tiempos de extracción. Las recuperaciones son inusualmente elevadas, lo que se origina a partir de problemas de limpieza de la muestra. Lo que se puede deducir a partir de la Fig. 3 es que, para los tres disolventes, el aumento más elevado de DON por minuto se produce en los primeros cuatro minutos y que el contenido de agua del disolvente parece tener un efecto positivo en la recuperación.

15 Lo mismo es evidente cuando se representan las recuperaciones de OTA en función del tiempo de extracción para diferentes disolventes; la cantidad más elevada de micotoxina se extrae durante los primeros cuatro minutos (Fig. 4). El disolvente de referencia para la extracción es un 60 % de acetonitrilo (conjunto de datos con triángulo) y proporciona una recuperación de aproximadamente un 50 % en los tiempos de extracción cortos, un 30 % de etanol (conjunto de datos con cuadrado) proporciona una recuperación de aproximadamente un 30 %, o un 40 % menor que un 60 % de acetonitrilo. Un 80 % de metanol (conjunto de datos del círculo) proporciona recuperaciones entre un 60 % de acetonitrilo y un 30 % de metanol. El límite inferior de incertidumbre para el valor de referencia de OTA se ilustra mediante la línea discontinua y, como se puede observar, después de 30 minutos, la extracción con acetonitrilo se aproxima a este valor.

25 Generalmente, la OTA extraída con un 60 % de acetonitrilo en 1 - 4 minutos proporcionó recuperaciones de un 45 - 55 %. En el mismo intervalo, un 30 % de etanol proporcionó recuperaciones de un 28 - 29 %. Un 80 % de metanol proporcionó recuperaciones entre un 33 - 39 %. A partir del tiempo y los experimentos con disolvente para DON se puede deducir que la cantidad más elevada de DON se extrae en los primeros 4 minutos y que el contenido de agua del disolvente tiene un efecto positivo en la recuperación.

30 Como se ha demostrado anteriormente, se observará que un 30 % de etanol en agua podría ser un disolvente factible para una extracción rápida tanto de DON como de OTA, y se elige para experimentos adicionales. De hecho, se puede conseguir una extracción rápida pero incompleta tanto de DON como de OTA usando una concentración de etanol entre un 20 % y un 40 % en agua. En la Fig. 5, se representa gráficamente la correlación entre las concentraciones de DON encontradas por HPLC y concentraciones de referencia de 5 muestras. Una repetición se elimina debido a un error de extracción (triángulo); se descubrió un grumo de harina después de la extracción

35

llevando a una menor recuperación de esa muestra. Otra muestra fue un valor atípico inexplicable (círculo) y se excluyó. Se observa una clara correlación lineal, con un promedio de recuperación de un 70 % y un CV de recuperación de un 5 %. En la Fig. 6 se observa la representación correspondiente para cinco muestras de referencia diferentes, que tienen diferentes concentraciones de OTA. También se observa una correlación lineal entre las concentraciones encontradas por HPLC y los valores de referencia. El promedio de recuperación fue de un 44 % con un CV de recuperación de un 27 %. El alto valor de CV podría deberse a que la extracción fue realizada por tres personas diferentes.

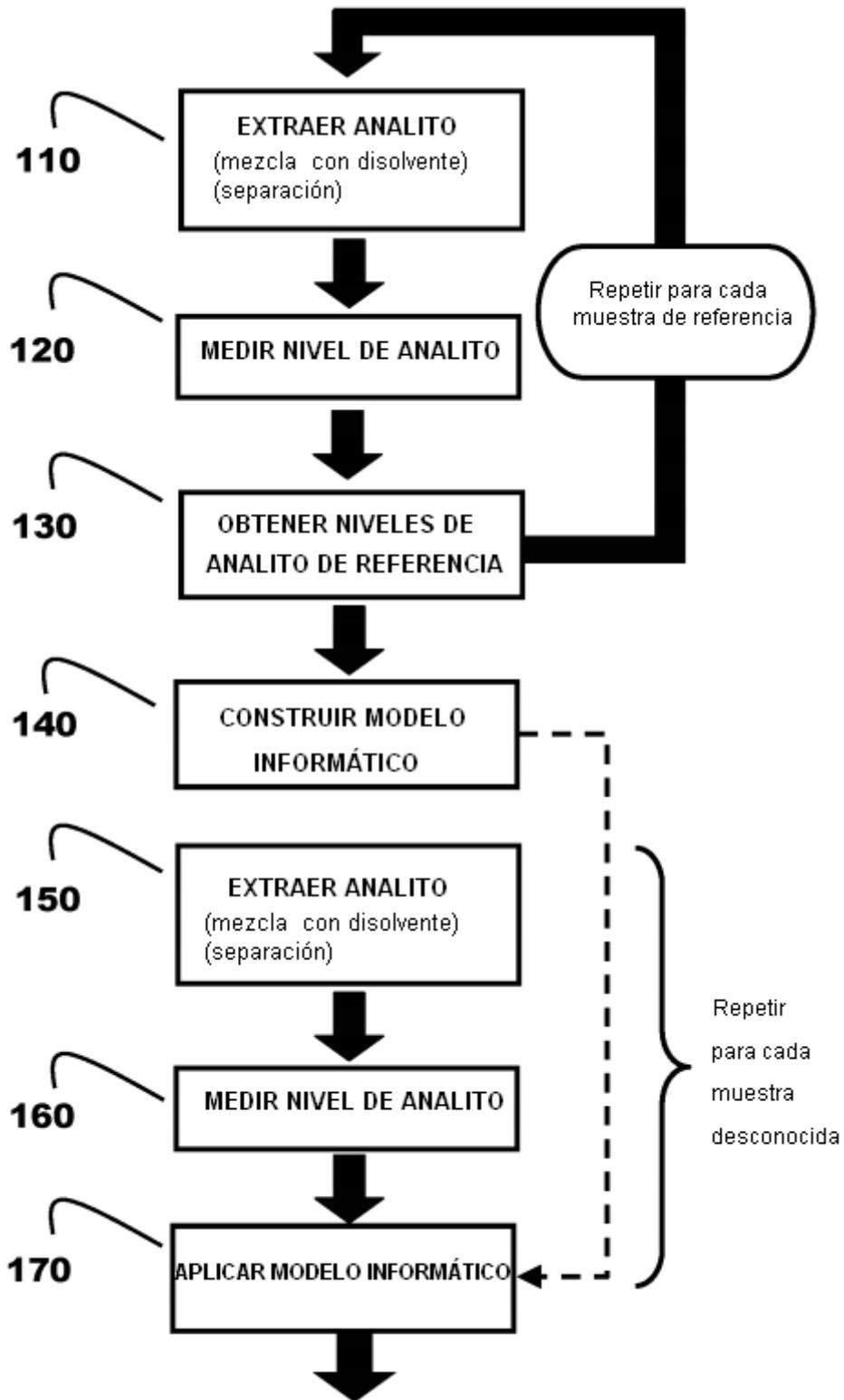
El análisis de regresión lineal, aquí, por ejemplo, en forma de ajuste por mínimos cuadrados, se realizó en los conjuntos de datos de DON y los conjuntos de datos de OTA y los ajustes de línea recta resultantes se muestran en la Fig. 5 y en la Fig. 6 respectivamente.

Como se observará a partir de una consideración de los estudios experimentales mencionados anteriormente, se ha establecido un método de extracción rápida para micotoxinas, ilustrado aquí para Desoxinivalenol (DON) y Ocratoxina A (OTA). Es posible extraer micotoxinas con un 30 % de etanol en 2 minutos con un promedio de recuperación de un 70 % para DON y de un 44 % para OTA. Para concentraciones encontradas por HPLC y concentraciones de referencia, se pudieron obtener regresiones lineales para las diferentes micotoxinas, a partir de las cuales se pudo establecer una calibración ejecutable por ordenador que expresa cada regresión para su uso en la determinación de cantidades de analitos en una matriz de muestra desconocida (por ejemplo, trigo) a partir de niveles presentes en el disolvente extraído usando técnicas básicamente similares a las que se han descrito anteriormente. Para DON en el intervalo de 0 - 3500 ppb se encontró un valor de R cuadrado de 0,99, y para OTA en el intervalo de 0 - 101,8 ppb el R cuadrado fue de 0,96.

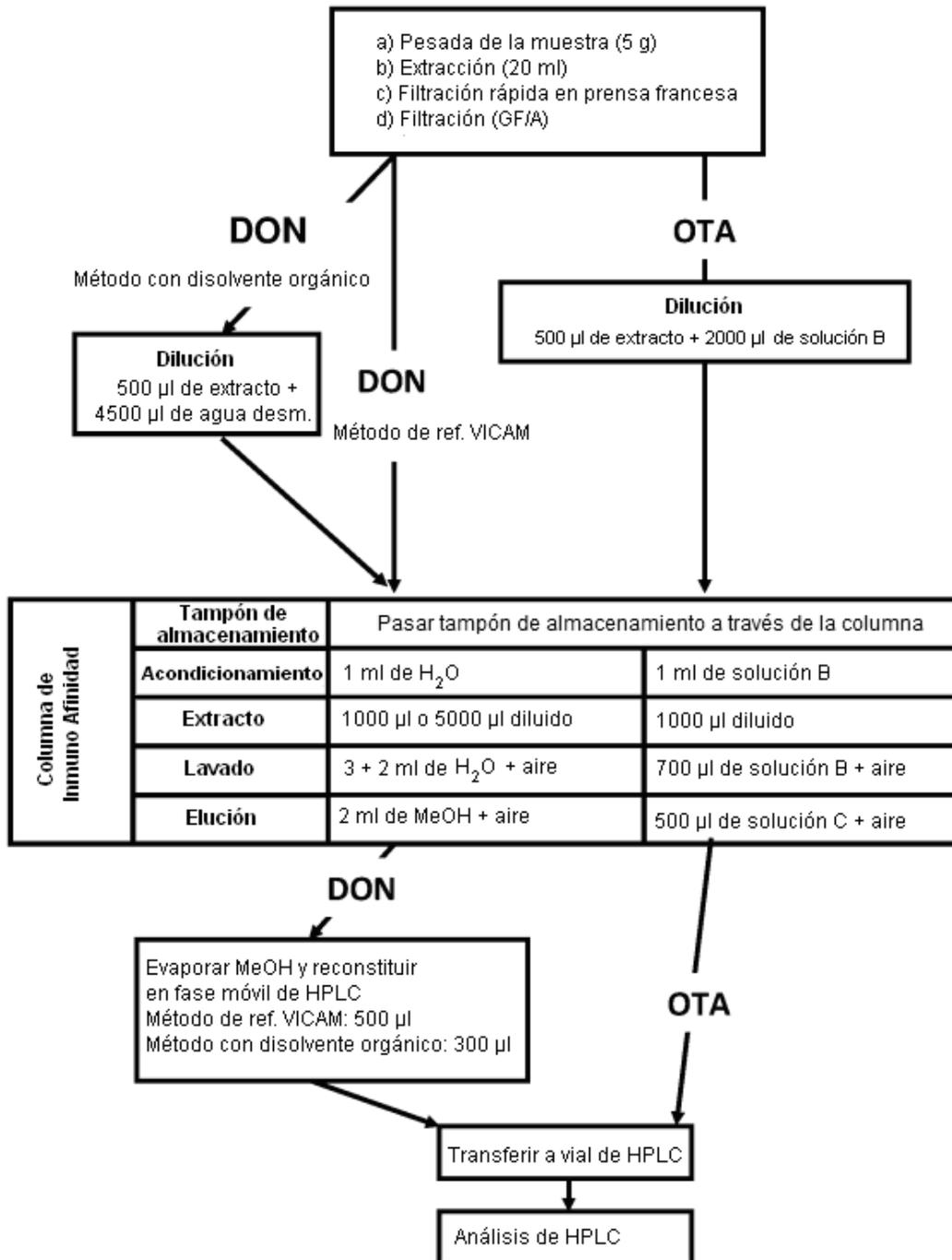
Se observará que el método de acuerdo con la presente invención es adecuado para su uso para extraer otras micotoxinas, tales como fumonisinas, ZEA, toxina T2 y aflatoxinas, de los mismos u otros tipos de granos de cereal y se puede aplicar más generalmente a otros ensayos basados en extracción que tradicionalmente dependen de la recuperación completa. Se pretende que el alcance de la protección proporcionada a la invención esté limitado solo por la redacción de las reivindicaciones y no por las realizaciones a modo de ejemplo y los estudios experimentales que se han proporcionado anteriormente.

**REIVINDICACIONES**

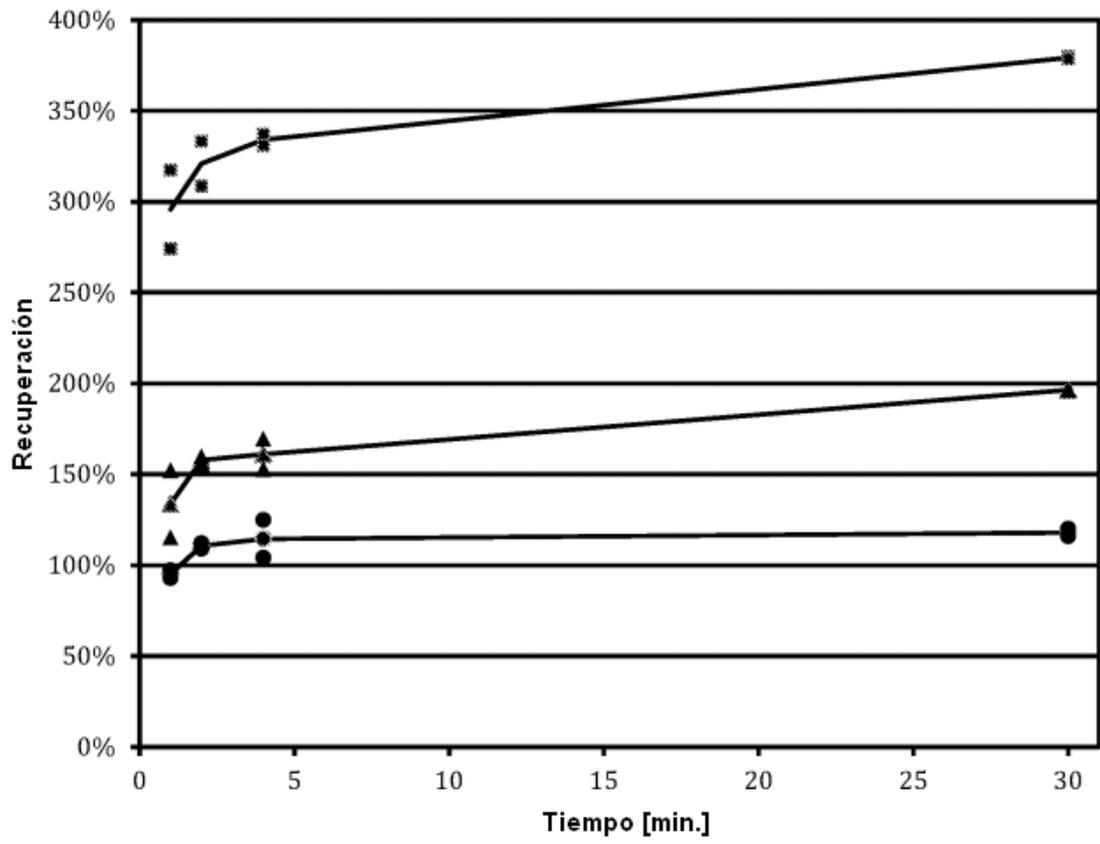
1. Un método para el ensayo cuantitativo de una o más micotoxinas en una matriz de muestra de grano de cereal que comprende las etapas de A) realizar un proceso de extracción de micotoxina en la matriz de muestra de grano de cereal, comprendiendo dicho proceso de extracción de micotoxina la combinación de la matriz de muestra de grano de cereal con un disolvente durante un periodo de extracción que es inferior a un periodo de tiempo en el cual una recuperación medida de la micotoxina ha cambiado menos que una desviación estándar de mediciones repetidas para la recuperación dentro de un periodo predeterminado que es superior a un periodo de tiempo en el cual la recuperación alcanza la mitad de una recuperación máxima y la separación de la micotoxina que contiene disolvente de la matriz de muestra de grano de cereal; B) medir un nivel de micotoxina presente en el disolvente separado; y C) aplicar una calibración en un ordenador mediante la cual se establece una relación matemática entre los niveles de micotoxina extraída de cada una de una pluralidad de muestras de referencia de grano de cereal por medio del proceso de extracción usado en la etapa A) y un valor de referencia de los niveles de micotoxina para cada muestra de referencia de grano de cereal para obtener de ese modo una medida del nivel de micotoxina en la matriz de muestra de grano de cereal.
2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la etapa B) comprende mezclar el disolvente separado con una cantidad conocida de moléculas de micotoxina marcadas con fluorescencia y con microperlas provistas en su superficie con moléculas que tienen una afinidad de unión preferente hacia la micotoxina; y medir, después de la mezcla, la fluorescencia usando un citómetro de flujo como medida del nivel de micotoxina.
3. Un método como se reivindica en la reivindicación 2, en el que la mezcla del disolvente separado comprende la incubación con las microperlas durante un periodo de tiempo que es menor que el requerido para que la reacción de unión alcance el equilibrio antes de medir la fluorescencia.
4. Un método para generar una calibración para su uso en el método de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho método las etapas de:
- A) realizar un proceso de extracción de micotoxina en una pluralidad de matrices de muestra de referencia de grano de cereal, cada una teniendo una micotoxina de nivel de valor de referencia diferente, comprendiendo dicho proceso de extracción de micotoxina la combinación de cada matriz de muestra de referencia de grano de cereal con un disolvente para un mismo periodo de extracción que es inferior a un periodo de tiempo en el cual una recuperación medida de la micotoxina ha cambiado menos que una desviación estándar de mediciones repetidas para la recuperación dentro de un periodo predeterminado que es superior a un periodo de tiempo en el cual la recuperación alcanza la mitad de una recuperación máxima y la separación de la micotoxina que contiene disolvente de la matriz de muestra de referencia de grano de cereal;
- B) medir un nivel de micotoxina presente en el disolvente separado obtenido a partir de cada matriz de muestra de referencia de grano de cereal; y
- C) generar una calibración ejecutable por ordenador mediante la cual se establece una relación matemática entre los niveles medidos de micotoxina extraída de cada una de las matrices de muestra de referencia de grano de cereal y el nivel de referencia de micotoxina para una misma matriz entre las diferentes matrices de muestra de referencia de grano de cereal.



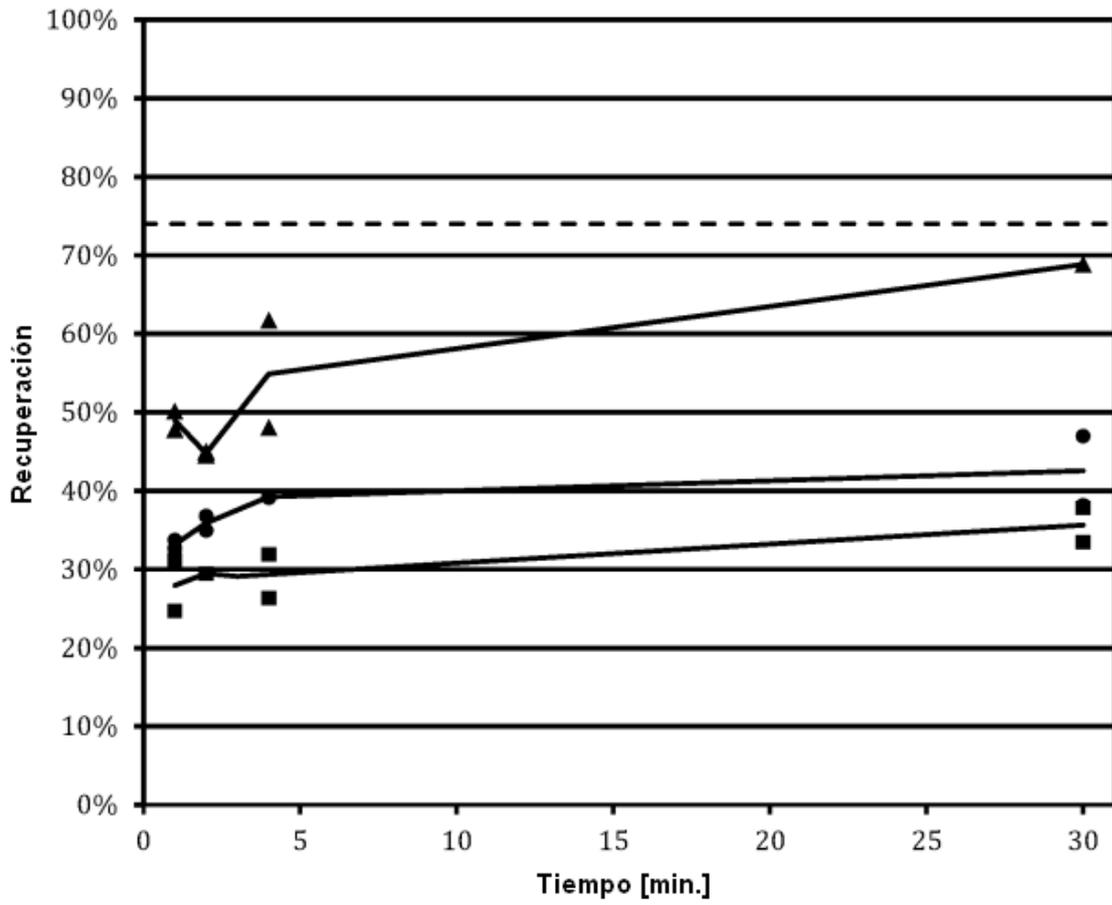
**Fig. 1**



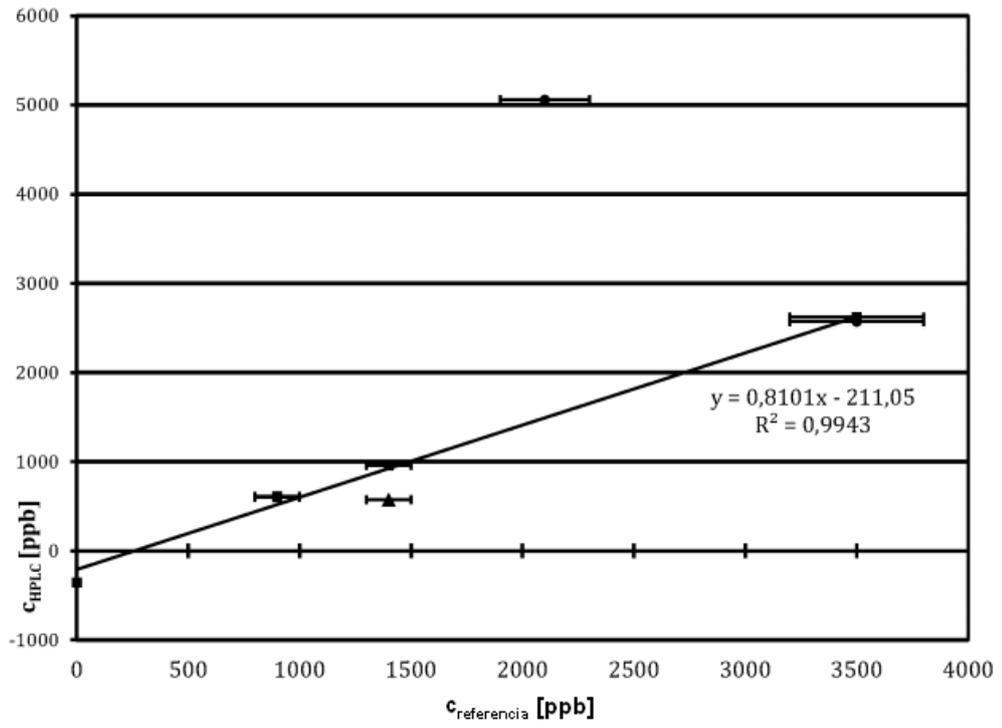
**Fig. 2**



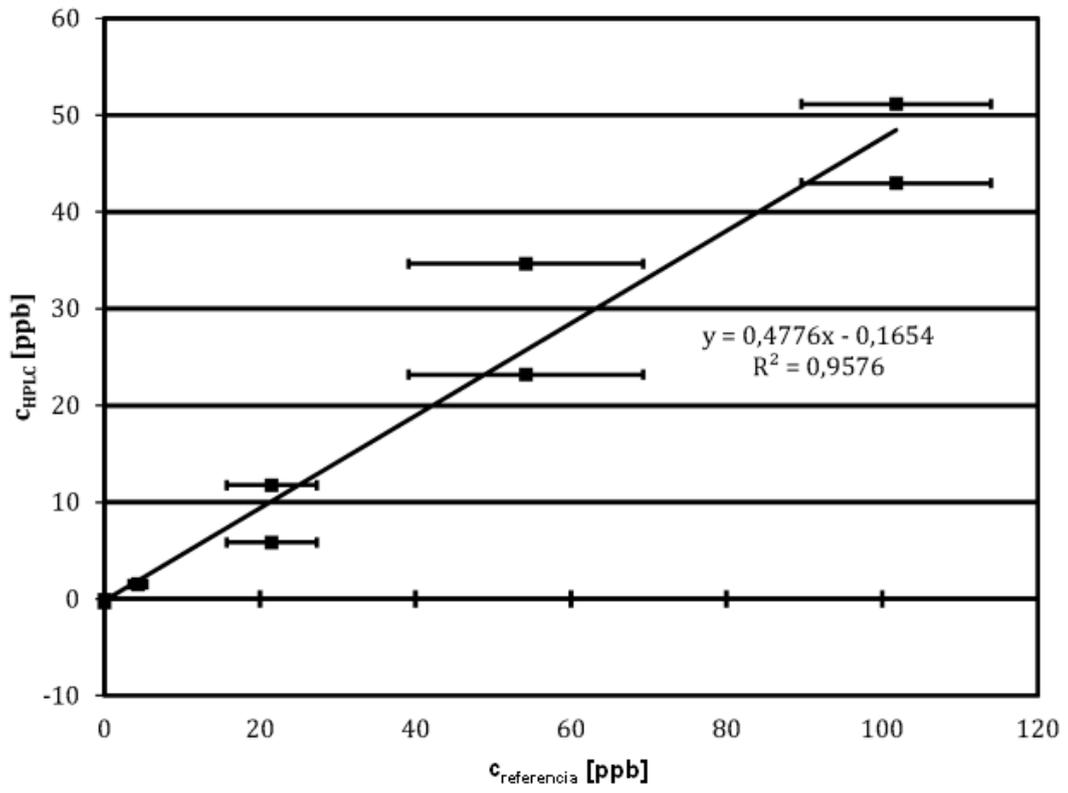
**Fig. 3**



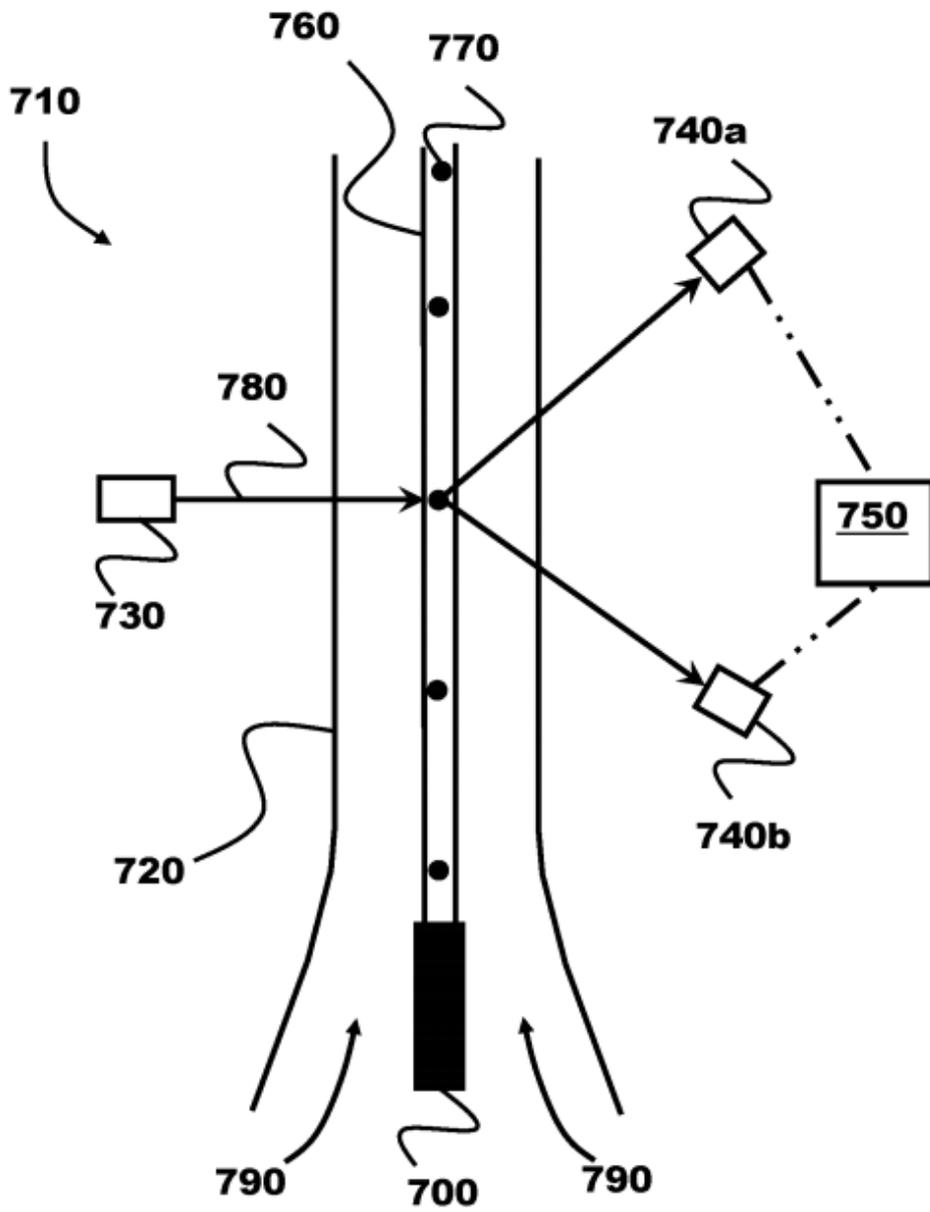
**Fig. 4**



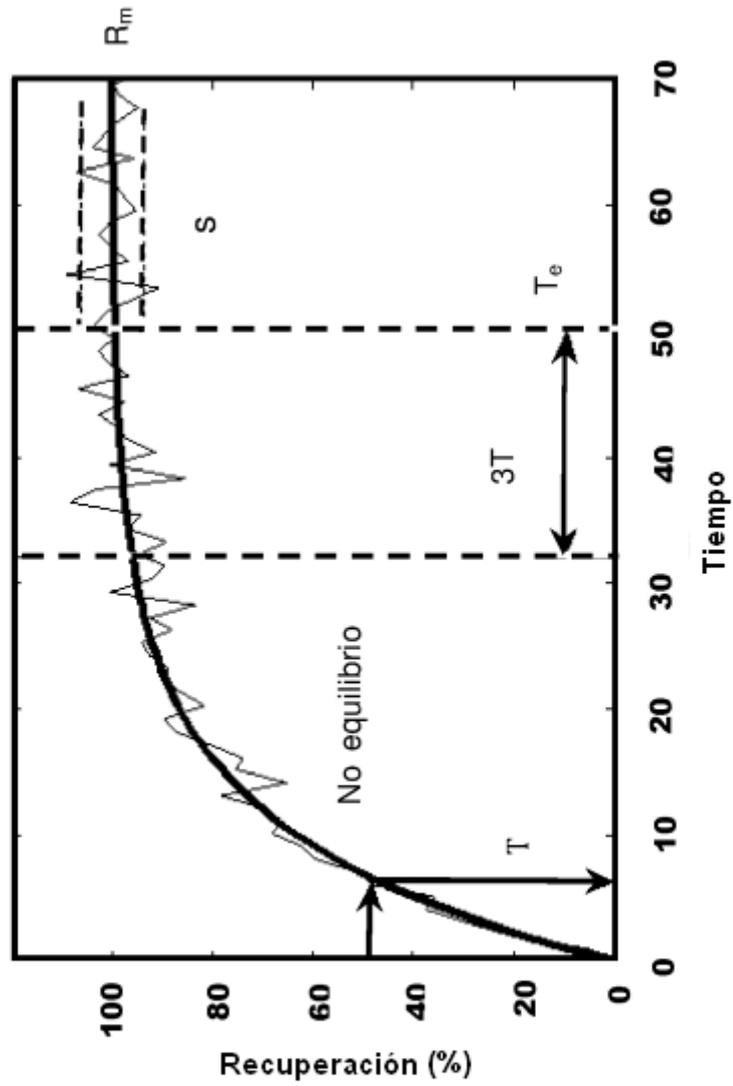
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**