

ANALISI DI MICOTOSSINE E TOSSINE VEGETALI IN ALIMENTI E MANGIMI: COSA E COME DOVREMMO MONITORARE?

Emiliano De Dominicis (a), Michela Casarotto (b), Carmela Martire (b), Claudia Finotello (b),
Simone Carron (b), Samim Saner (a), Fernando Formaggio (c)
(a) *Mérieux NutriSciences R&D Dept., Resana, Treviso, Italia*
(b) *Mérieux NutriSciences Contaminant Dept., Resana, Treviso, Italia*
(c) *Università di Padova, Dipartimento di Chimica, Padova, Italia*

Introduzione

Le micotossine sono metaboliti secondari tossici prodotti da funghi, che entrano nella filiera alimentare attraverso colture contaminate con cui sono prodotti alimenti e mangimi: la contaminazione può avvenire in campo e/o durante lo stoccaggio. In alcuni casi le micotossine possono essere trasferite agli animali attraverso i mangimi e da qui ai prodotti di origine animale. Le micotossine possono causare malattie e morte sia nell'uomo che negli animali.

Anche le piante possono produrre sostanze, le tossine vegetali, che hanno effetti avversi sulla salute dell'uomo e degli animali. Le tossine vegetali sono molecole bioattive prodotte principalmente dalle piante come difesa naturale contro insetti, animali ecc. Le tossine vegetali entrano nella filiera alimentare, perché sono presenti in colture alimentari oppure a causa della contaminazione con infestanti; alcune possono essere trasferite agli animali attraverso i mangimi e da qui ai prodotti di origine animale.

L'Autorità Europea di Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA), altre agenzie e organizzazioni internazionali e la comunità scientifica in generale si occupano da tempo dell'analisi del rischio connesso con l'assunzione di micotossine e tossine vegetali attraverso la dieta per l'uomo e gli animali: dalle risultanze di questa analisi sono derivati alcuni limiti massimi tollerabili negli alimenti e nei mangimi, che, per quanto riguarda l'Unione Europea, sono indicati nel Regolamento (CE) 1881/2006 (1) e nella Direttiva 2002/32/CE (2), rispettivamente per alimenti e alimenti per animali e sono stati più volte aggiornati nel corso del tempo. In molti casi l'analisi del rischio è ancora in corso o sono in corso i processi decisionali di gestione del rischio, che porteranno a stabilire nuovi limiti massimi tollerabili per tossine ancora non inserite nella legislazione oppure per nuove combinazioni tossina-alimento (3).

Da queste considerazioni si deduce l'importanza di precorrere i tempi dell'implementazione normativa, sviluppando e applicando metodi analitici idonei alla rilevazione e quantificazione di tossine, quali ad esempio alcaloidi dell'ergot, tossine dell'alternaria, alcaloidi pirrolizidinici, ecc.

Sono stati sviluppati metodi multiresiduali per la determinazione di micotossine e tossine vegetali in conformità ai regolamenti e alle raccomandazioni di riferimento (4-15). In particolare è stato studiato l'uso di standard marcati isotopicamente per massimizzare le prestazioni in termini di accuratezza e precisione a livello di quantificazione.

In Tabella 1 sono elencate le micotossine e tossine vegetali che sono analizzate in alimenti ad uso umano e zootecnico.

Tabella 1. Tossine analizzate e validati in alimenti ad uso umano e zootecnico

Gruppo	Tossina	Gruppo	Tossina
Micotossine e metaboliti	Aflatossina B ₁	Alcaloidi pirrolizidinici	Echimidina
	Aflatossina B ₂		Echimidina-N-ossido
	Aflatossina G ₁		Erucifolina
	Aflatossina G ₂		Erucifolina-N-ossido
	Ocratossina A		Europina
	Fumonisinina B ₁		Europina-N-ossido
	Fumonisinina B ₂		Eliotrina
	Tossina T-2		Eliotrina-N-ossido
	Tossina HT-2		Indicina
	Deossinivalenolo		Indicina-N-ossido
	3-Acetildeossinivalenolo		Intermedina
	Deossinivalenol-3-glucoside		Intermedina-N-ossido
	Nivalenolo		Jacobina
	Zearalenone		Jacobina-N-ossido
	Alfa-zearalenolo		Lasiocarpina
	Beta-zearalenolo		Lasiocarpina-N-ossido
	Fusarenone X		Licopsamina
Neosolanolo	Licopsamina-N-ossido		
Diacetossiscirpenolo	Monocrotalina		
Acido Tenuazoico	Monocrotalina-N-ossido		
Tossine Alternaria	Tentossina	Retrorsina	
	Alternariolo	Retrorsina-N-ossido	
	Alternariolo-9-metil etere	Senecionina	
	Altenuene	Senecionina-N-ossido	
Alcaloidi dell'ergot	Ergocornina	Senefillina	
	Ergocorninina	Senefillina-N-ossido	
	Ergocristina	Senecivernina	
	Ergocristinina	Senecivernina-N-ossido	
	Ergocriptina	Senkirkina	
	Ergocriptinina	Tricodesmina	
	Ergometrina	Scopolamina	
	Ergometrinina	Atropina	
	Ergosina	Anisodamina	
	Ergosinina	Atropina N-ossido	
Alcaloidi dell'ergot	Ergotamina	Alfa-solanina	
	Ergotaminina	Alfa-Caconina	

Materiali e metodi

Preparazione del campione

Considerando quanto riportato nella recente letteratura scientifica a livello di sviluppo di metodi per la determinazione di tossine e alcaloidi (10, 16-39), la preparazione del campione sviluppata prevede una fase di estrazione con solvente e/o miscela di solventi appropriati. Ad esempio, mentre la maggior parte delle micotossine sono estraibili da ambienti acquosi con solventi organici basso pH, gli alcaloidi dell'ergot necessitano di soluzioni a pH basico per poter essere efficacemente estratti in solventi organici (10).

In funzione della categoria di tossine e della matrice in esame, l'estratto del campione viene quindi sottoposto a diversi tipi di purificazione: liquido/liquido, *Dispersive Solid Phase Extraction*, *Solid Phase Extraction*, filtrazioni o colonnine di immunoaffinità. Il campione estratto

e purificato viene infine solubilizzato e sottoposto ad analisi strumentale in cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) e/o cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (*Liquid Chromatography- High Resolution Mass Spectrometry*, LC-HRMS).

Spettrometria di massa tandem a bassa risoluzione

La spettrometria di massa è la tecnica analitica di elezione per contaminanti come micotossine e alcaloidi (molecole a bassi livelli di concentrazione) in matrici alimentari, in quanto permette di ottenere elevate performances in termini di selettività e di sensibilità in matrici complesse, sia a livello qualitativo, che a livello quantitativo. Il recente approccio multi-residuale consente, rispetto al passato, maggiore sostenibilità generale a livello di tempi di esecuzione e di costi correlati, oltre che maggiore affidabilità dei risultati. Questo significa, in termini industriali, possibilità di azione/reazione sul mercato efficace, tempestiva e rapida.

Un aspetto tecnico-scientifico importante legato all'utilizzo della spettrometria di massa è quello relativo all'utilizzo di standard interni marcati, che possono essere di prima generazione, quindi con deuterio al posto di idrogeno, oppure di seconda generazione, quindi con C_{13} e/o N_{15} al posto di C_{12} e/o N_{14} .

Tali standard consentono di affrontare in maniera opportuna due punti importanti correlati alle analisi residuali: l'effetto matrice e l'efficacia estrattiva in termini di recupero (40-47). Complessivamente questo significa analisi residuali sempre più precise e più accurate, quindi in generale più affidabili, soprattutto in matrici complesse e difficili, sia in termini di prodotti destinati ad uso umano (per adulti, ma soprattutto per l'infanzia), che ad alimentazione animale.

Spettrometria di massa ad alta risoluzione

Nei casi di matrici complesse, dove è sorta la necessità di migliorare ulteriormente la selettività, ci si è approcciati all'analisi in spettrometria di massa ad alta risoluzione (HMRS): con tale tecnica è stato possibile studiare gli spettri di massa esatta, utilizzandoli sia per l'analisi quantitativa, che qualitativa, a livello di screening mirato e a livello di screening non mirato (*Non Targeted Screening*), che ha consentito l'identificazione a posteriori di tossine e/o metaboliti/prodotti correlati non attesi e/o non noti (48-50).

In Figura 1 si riporta un esempio relativo a due estratti di prodotti da forno la cui analisi mirata aveva subito evidenziato la presenza di deossinivalenolo (DON) in uno dei due campioni.

Successivamente l'approccio HRMS aveva consentito di rilevare nel campione in cui era stata rilevata la presenza di DON, anche la presenza del metabolita deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-glucoside) successivamente confermato e quantificato.

Risultati e discussione

Metodi di estrazione e di purificazione del campione efficaci combinati con opportuni utilizzi della spettrometria di massa e con l'impiego di materiali di riferimento isotopicamente marcati di prima e seconda generazione, portano a buoni risultati in termini di selettività e sensibilità in matrici complesse, oltre che a livello di accuratezza e precisione.

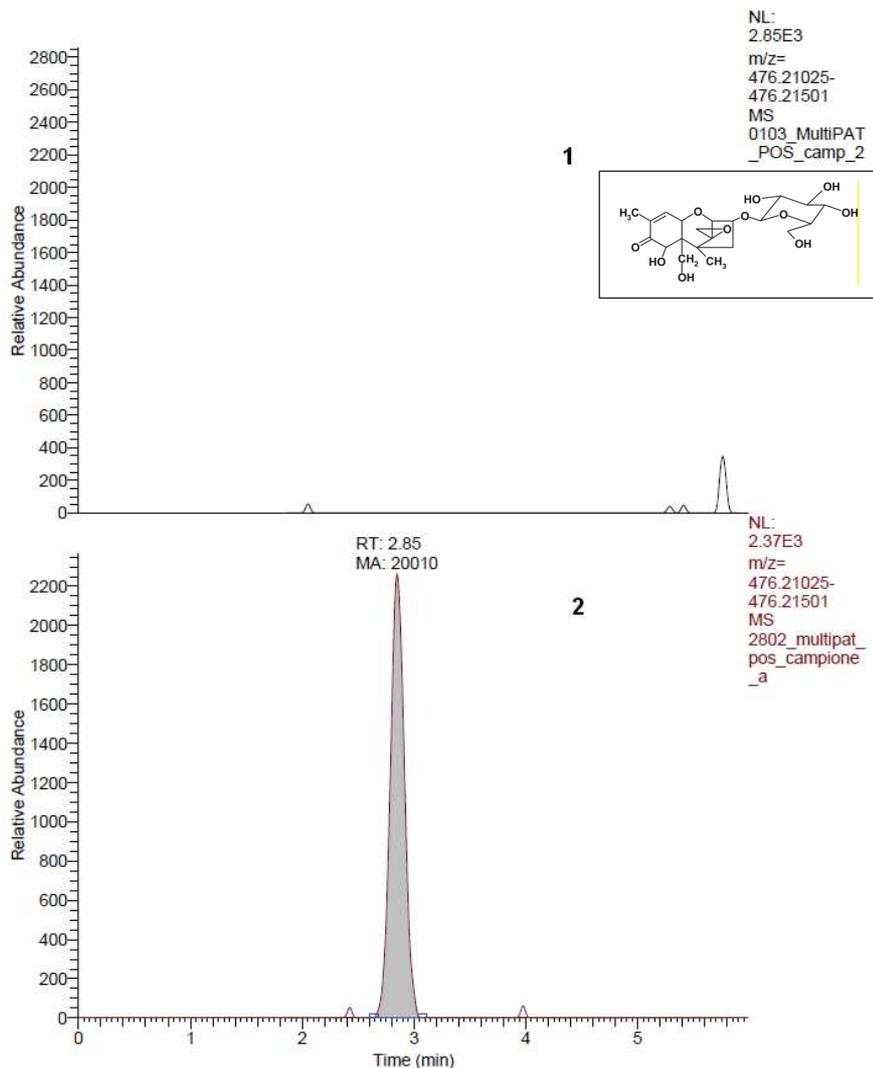


Figura 1. Cromatogrammi HRMS di deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-glucoside) in prodotti da forno: la parte alta (1) mostra assenza di DON-3-glucoside mentre il tracciato in basso (2) consente di ipotizzare la presenza di DON-3-glucoside

In Figura 2 sono riportati due campioni: un peperoncino con un'alta concentrazione di fumonisina B₁ (> 300 µg/kg) e una paprika avente una concentrazione < LOQ (*Limit of Quantification*) (con LOQ = 10 µg/kg).

Il protocollo di validazione utilizzato ha previsto l'esecuzione di test a livello di: linearità, recupero (a diversi livelli di concentrazione), effetto matrice, precisione, accuratezza, limiti di quantificazione e rilevabilità. I risultati della validazione e dei controlli di qualità confermano l'efficacia complessiva dei metodi sviluppati e applicati.

Nelle Tabelle da 2 a 7 si riportano esempi/estratti dell'analisi dei dati di validazione per 2 micotossine e 4 alcaloidi in diverse matrici (principalmente cereali, farine, prodotti da forno e di gastronomia ed estratti secchi) a diversi livelli di concentrazione, vale a dire il LOQ e 10xLOQ.

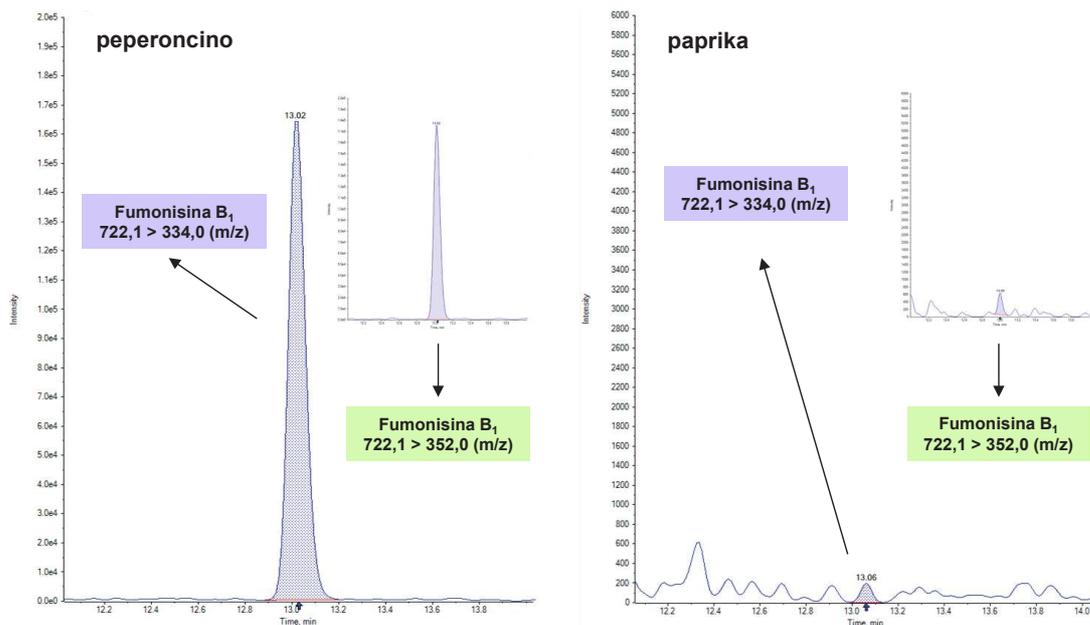


Figura 2. Fumonisin B₁: cromatogramma LC-MS/MS in peperoncino e paprika

Tabella 2. Analisi di dati di validazione del deossinivalenolo

Dati statistici			
CV	9,8%	Recupero _m	69,7%
r	27,1%	s(Recupero)	6,8%
N	28	N	28
Gradi di libertà	14	s(Recupero _m)	1,3%
N medio	14	Recupero <> 100%	TRUE

Tabella 3. Analisi di dati di validazione della tossina T2

Dati statistici			
CV	10,7%	Recupero _m	79,5%
r	29,6%	s(Recupero)	10,6%
N	28	N	28
Gradi di libertà	14	s(Recupero _m)	2,0%
N medio	14	Recupero <> 100%	TRUE

Tabella 4. Analisi di dati di validazione dell'atropina

Dati statistici			
CV	10,4%	Recupero _m	65,1%
r	28,7%	s(Recupero)	13,5%
N	103	N	103
Gradi di libertà	78	s(Recupero _m)	1,3%
N medio	25	Recupero <> 100%	TRUE

Tabella 5. Analisi di dati di validazione della scopolamina

Dati statistici			
CV	11,4%	Recuperom	78,0%
r	31,7%	s(Recupero)	13,2%
N	103	N	103
Gradi di libertà	78	s(Recuperom)	1,3%
N medio	25	Recupero <> 100%	TRUE

Tabella 6. Analisi di dati di validazione echimidina

Dati statistici			
CV	14,6%	Recuperom	88,5%
r	40,4%	s(Recupero)	19,0%
N	64	N	64
Gradi di libertà	45	s(Recuperom)	2,4%
N medio	19	Recupero <> 100%	TRUE

Tabella 7. Analisi di dati di validazione senecionina

Dati statistici			
CV	17,1%	Recuperom	86,5%
r	47,3%	s(Recupero)	21,2%
N	64	N	64
Gradi di libertà	45	s(Recuperom)	2,7%
N medio	19	Recupero <> 100%	TRUE

Particolare importanza riveste il ruolo della robustezza del metodo in relazione alle diverse matrici che vengono sottoposte ad analisi: tale parametro viene costantemente monitorato, anche grazie alla partecipazione a circuiti interlaboratorio (*Proficiency Test*, PT) e utilizzo di Matrici di Riferimento Certificate (CRM).

L'applicazione in routine del metodo validato viene monitorata e verificata con regolarità mediante Campioni di Controllo di Processo (*Process Control Sample*, PCS) e analisi di campioni bianchi di processo opportunamente inseriti in ogni lotto di campioni.

Oltre alle tossine validate ed elencate in Tabella 1, è previsto, per il prossimo futuro, un continuo lavoro di sviluppo/validazione/accreditamento di metodi per la determinazione di tossine non ancora monitorate: un esempio è l'attività di ricerca e sviluppo per l'analisi di enniatine e beauvericina. Parallelamente è in atto un processo costante di ricerca e messa a punto di metodi sempre più performanti, sia in termini tecnico-scientifici (a livello di selettività e sensibilità), che in termini di sostenibilità economica (costo/prezzo e tempo di esecuzione). Infine attraverso la diffusione e l'utilizzo di approcci di screening non mirati basati su HRMS e MS/HRMS si migliorerà sempre di più la capacità di rilevare e identificare metaboliti e relativi prodotti di degradazione.

Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 364 del 20.12.2006.

2. Europa. Direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 7 maggio 2002 relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 140 del 30 maggio 2002.
3. Food Standard Agency. *June 2019 Stakeholder Update on Rapidly Developing Policy on Food Contaminants*. London: FSA; 2019. Disponibile all'indirizzo <https://www.food.gov.uk/news-alerts/consultations/june-2019-stakeholder-update-on-rapidly-developing-policy-on-food-contaminants?navref=breadcrumb>; ultima consultazione 19/09/2019.
4. Europa. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 70 del 9 marzo 2006.
5. Europa. Regolamento (UE) n. 519/2014 che modifica il Regolamento (CE) 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 147 del 17 maggio 2014.
6. Muldera PPJ, López Sánchez P, Theseb A, Preiss-Weigertb A, Castellaric M. Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in food. *EFSA Supporting Publications* 2015:EN-859.
7. Agenzia Italiana del Farmaco, Ufficio Autorizzazioni Officine. Richiesta di verifica del contenuto di Alcaloidi Pirrolizidinici nei medicinali contenenti sostanze attive di origine vegetale. AIFA/UAO/P/53321 del 19 maggio 2016.
8. Europa. Raccomandazione della Commissione del 15 marzo 2012 sul controllo della presenza di alcaloidi della *Claviceps* spp. in alimenti e mangimi. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 77 del 16 marzo 2012.
9. Europa. Regolamento (UE) 2015/1940 della Commissione, del 28 ottobre 2015, che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi di sclerozidi di *Claviceps* spp. in taluni cereali non trasformati e le disposizioni in materia di monitoraggio e relazioni. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 283 del 29 ottobre 2015.
10. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* 2012;10(7):2798.
11. Europa. Regolamento (UE) 2016/239 della Commissione, del 19 febbraio 2016, recante modifica del regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi di alcaloidi tropanici in determinati alimenti a base di cereali destinati ai lattanti e ai bambini. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 45 del 20 febbraio 2016.
12. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* 2013;11(10):3386.
13. European Food Safety Authority-Unit on Biological Hazards and Contaminants. *Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain. Minutes of the 85th Plenary meeting*. Parma: EFSA; 2017. Disponibile all'indirizzo: <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/event/170704-m.pdf>; ultima consultazione: 15/05/2019.
14. European Commission, Health and Food Safety Directorate-General. *Summary report of the Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed held in Brussels on 23 June 2015*. Disponibile all'indirizzo: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/reg-com_toxic_20150623_sum.pdf; ultima consultazione: 09/05/2019.
15. European Medicines Agency. *Public statement on contamination of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products with pyrrolizidine alkaloids*. London: EMA; 2016. (EMA/HMPC/328782/2016). Disponibile all'indirizzo: https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-contamination-herbal-medicinal-products/traditional-herbal-medicinal-products-pyrrolizidine-alkaloids_en.pdf; ultima consultazione: 09/05/2019.

16. Turner NW, Bramhmbhatt H, Szabo-Vezse M, Poma A, Coker R, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Anal Chim Acta* 2015;901:12-33.
17. Winkler J, Kersten S, Valenta H, Meyer U, Engelhardt UH, Dänicke S. Development of a multi-toxin method for investigating the carryover of zearalenone, deoxynivalenol and their metabolites into milk of dairy cows. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2015;32(3):371-80.
18. De Baere S, Osselaere A, Devreese M, Vanhaecke L. Development of a liquid–chromatography tandem mass spectrometry and ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry method for the quantitative determination of zearalenone and its major metabolites in chicken and pig plasma. *Anal Chim Acta* 2012;756:37-48.
19. Walravens J, Mikula H, Rychlik M, Asam S, Ediage EN, Di Mavungu JD, Van Landschoot A, Vanhaecke L, De Saeger S. Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuffs. *J Chromatogr A* 2014;1372C:91-101.
20. De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Russo S, Marchegiani F, Moracci G, Brera C. Development of a LC-MS/MS Method for the multi-mycotoxin determination in composite cereal-based samples. *Toxins (Basel)* 2017;9(5):E169.
21. Capriotti AL, Caruso G, Cavaliere C, Foglia P, Samperi R, Laganà A. Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2012;31(4):466-503.
22. Breidbach A, Bouten K, Kroeger-Negiota K, Stroka J, Ulberth F (Ed.). *LC-MS based method of analysis for the simultaneous determination of four mycotoxins in cereals and feed*. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2013.
23. Wang S, Kong WJ, Yang MH. Simultaneous determination of 11 mycotoxins in malt by isotope internal standard-UPLC-MS/MS. *Acta Pharm Sin.* 2016;51(01):110-5.
24. Vukovic G, Kos J, Bursic V, Colovic R. Determination of multiple mycotoxins in maize using QuEChERS sample preparation and LC-MS/MS detection. *Matica Srpska J Nat Sci* 2017;133:123-30.
25. Qian M, Yang H, Li Z, Liu Y, Wang J, Wu H, Ji X, Xu J. Detection of 13 mycotoxins in feed using modified QuEChERS with dispersive magnetic materials and UHPLC–MS/MS. *J Sep Sci* 2018;41(3):756-64.
26. Kim DH, Hong SY, Kang JW, Cho SM, Lee KR, An TK, Lee C, Chung SH. Simultaneous determination of multi-mycotoxins in cereal grains collected from South Korea by LC/MS/MS. *Toxins (Basel)* 2017;9(3): E106.
27. Berthiller F, Brera C, Iha MH, Krska R, Lattanzio VMT, MacDonald S, Malone RJ, Maragos C, Solfrizzo M, Stranska-Zachariasova M, Stroka J, Tittlemier SA. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2015-2016. *World Mycotoxin J* 2017;10(1): 5-29.
28. Zhou J, Xu JJ, Cai ZX, Huang BF, Jin MC, Ren YP. Simultaneous determination of five *Alternaria* toxins in cereals using QuEChERS-based methodology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017;1068-9:15-23.
29. Saldan NC, Almeida RTR, Avíncola A, Porto C, Galuch MB, Magon TFS, Pilau EJ, Svidzinski TIE, Oliveira CC Development of an analytical method for identification of *Aspergillus flavus* based on chemical markers using HPLC-MS. *Food Chem* 2018;241:113-21.
30. Varga E, Glauner T, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R, Sulyok M. Development and validation of a semi-quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. *Anal Bioanal Chem* 2013;405(15):5087-104.
31. Rodríguez-Carrasco Y, Mañes J, Berrada H, Juan C. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of *Alternaria* toxins alternariol, alternariol methyl-ether and tentoxin in tomato and tomato-based products. *Toxins (Basel)* 2016;8(11):E328.

32. Malachová A, Stránská M, Václavíková M, Elliott CT, Black C, Meneely J, Hajšlová J, Ezekiel CN, Schuhmacher R, Krska R. Advanced LC–MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Anal Bioanal Chem* 2018;410(3):801-25.
33. Schenzel J, Forrer HR, Vogelgsang S, Bucheli TD. Development, validation and application of a multi-mycotoxin method for the analysis of whole wheat plants. *Mycotoxin Res* 2012;28(2):135-47.
34. Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A* 2014;1362:145-56.
35. Trufelli H, Palma P, Famigliani G, Cappiello A. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2011;30(3):491-509.
36. Marschik S, Hepperle J, Lauber U, Schnauffer R, Maier S, Kühn C, Schwab-Bohnert G. Extracting fumonisins from maize: efficiency of different extraction solvents in multi-mycotoxin analytics. *Mycotoxin Res* 2013;29(2):119-29.
37. Lacina O, Zacharišová M, Urbanová J, Václavíková M, Cajka T, Hajšlová J. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012;1262:8-18.
38. Sun J, Li W, Zhang Y, Hu X, Wu L, Wang B. QuEChERS purification combined with ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of 25 mycotoxins in cereals. *Toxins (Basel)* 2016;8(12):E375
39. De Saeger S, Audenaert K, Croubels S. Report from the 5th International symposium on mycotoxins and toxigenic Moulds: challenges and perspectives (MYTOX) held in Ghent, Belgium, May 2016. *Toxins (Basel)* 2016;8(5):E146
40. Rychlik M, Asam S. Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *Anal Bioanal Chem* 2008;390(2):617-28
41. Varga E, Glauner T, Köppen R, Mayer K, Sulyok M, Schuhmacher R, Krska R, Berthiller F. Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2012;402(9):2675-86.
42. Zhang K, Wong JW, Krynitsky AJ, Trucksess MW. Determining mycotoxins in baby foods and animal feeds using stable isotope dilution and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2014;62(36):8935-43.
43. Gao B, Jiang D, Yang Y. Simultaneous determination of five mycotoxins in various grains and their products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope internal standard. *Se Pu* 2017;35(6):601-7.
44. Zhang K, Liao CD, Prakash S, Conway M, Cheng HF. Interlaboratory Validation of a Stable Isotope Dilution and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Aflatoxins in Milk, Milk-Based Infant Formula, and Feed. *J AOAC Int* 2018;101(3):677-85.
45. Zhang K, Schaab MR, Southwood G, Tor ER, Aston LS, Song W, Eitzer B, Majumdar S, Lapainis T, Mai H, Tran K, El-Demerdash A, Vega V, Cai Y, Wong JW, Krynitsky AJ, Begley TH. A Collaborative Study: determination of mycotoxins in corn, peanut butter, and wheat flour using Stable Isotope Dilution Assay (SIDA) and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *J Agric Food Chem* 2017;65(33):7138-52.
46. Asam S, Rychlik M. Recent developments in stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis with special regard to *Alternaria* toxins. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(25):7563-77.
47. Habler K, Gotthardt M, Schüller J, Rychlik M. Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC–MS/MS method for *Fusarium* toxins in beer. *Food Chem* 2017;218:447-54.

48. De Dominicis E, Commissati I, Suman M. Targeted screening of pesticides, veterinary drugs and mycotoxins in bakery ingredients and food commodities by liquid chromatography-high-resolution single-stage Orbitrap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2012;47(9):1232-41.
49. De Dominicis E, Commissati I, Gritti E, Catellani D, Suman M. Quantitative targeted and retrospective data analysis of relevant pesticides, antibiotics and mycotoxins in bakery products by liquid chromatography-single-stage Orbitrap mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2015;32(10):1617-27.
50. Righetti L, Paglia G, Galaverna G, Dall'Asta C. Recent advances and future challenges in modified mycotoxin analysis: why HRMS has become a key instrument in food contaminant research. *Toxins (Basel)* 2016;8(12):E361.