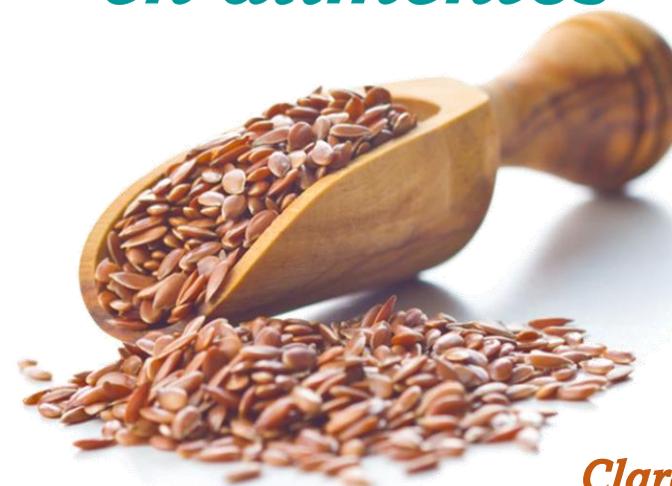




JORNADAS DE REFERENCIA CNA
4 y 5 JUNIO 2024

Un tema al día

Determinación de glucósidos cianogénicos en alimentos



Clara Ibáñez
Unidad de Toxinas y Contaminantes del Procesado
4 de junio de 2024



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Glucósidos cianogénicos o cianógenos

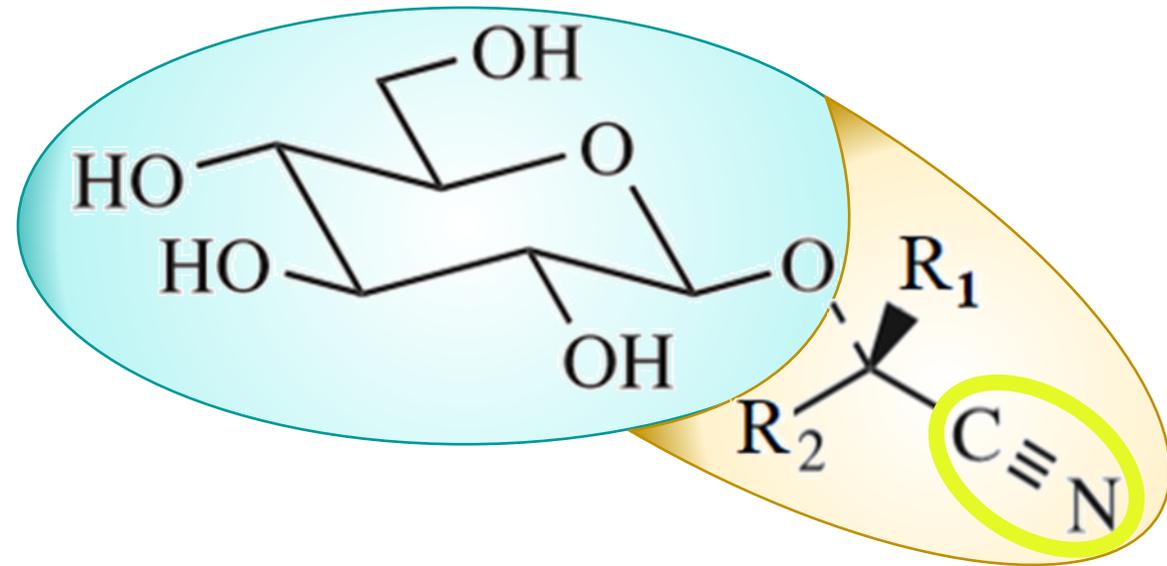
Toxinas producidas por las plantas de manera **natural**

Se han descrito **más de 75** glucósidos cianogénicos diferentes en más de 2500 plantas de 130 familias.

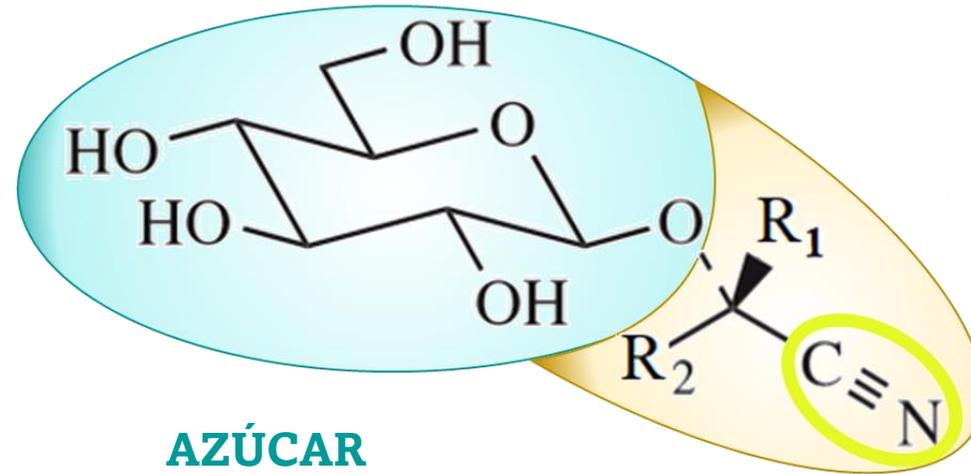
Compuestos orgánicos

estructura de **GLUCÓSIDO**

AZÚCAR
+
AGLICONA



Glucósidos cianogénicos o cianógenos



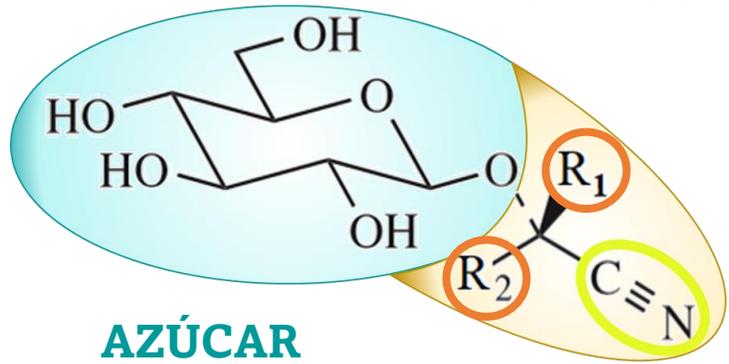
AZÚCAR

AGLICONA

- ✓ CN
- ✓ R1
- ✓ R2

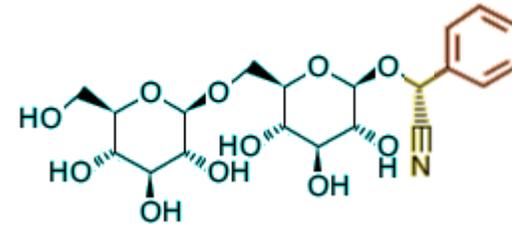


Glucósidos cianogénicos o cianógenos

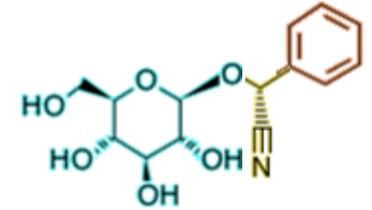


AZÚCAR
(D-Glucosa)

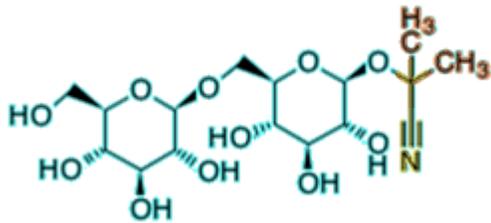
AGLICONA



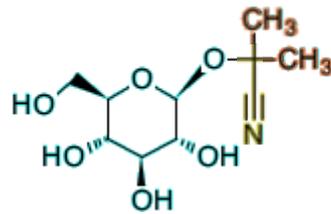
Amigdalina



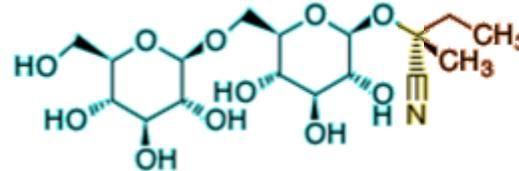
Prunasina



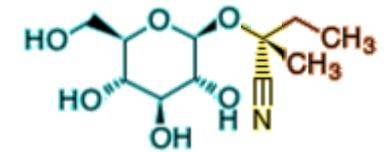
Linustatina



Linamarina



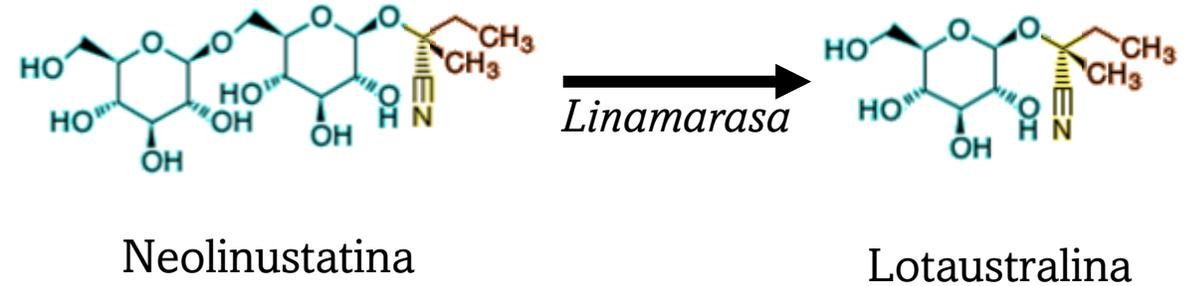
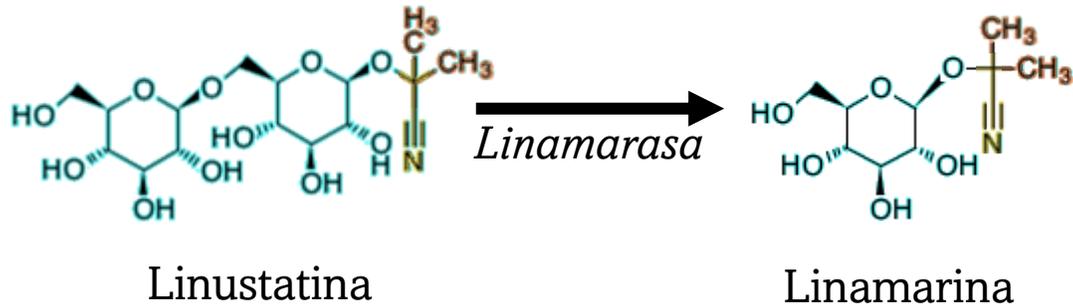
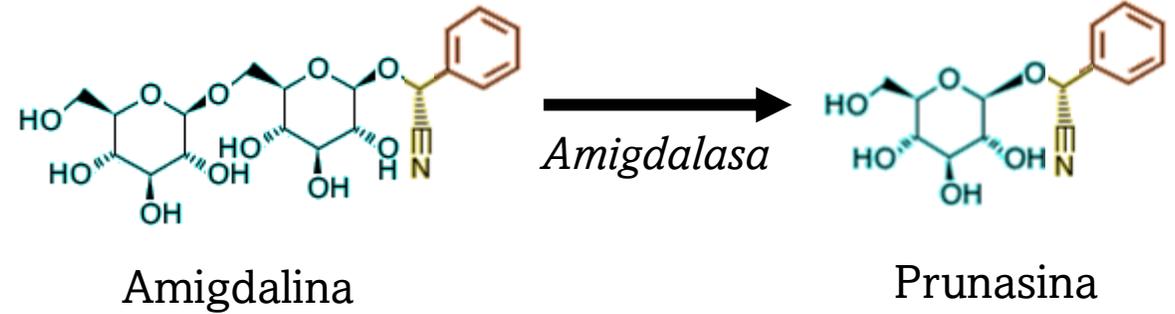
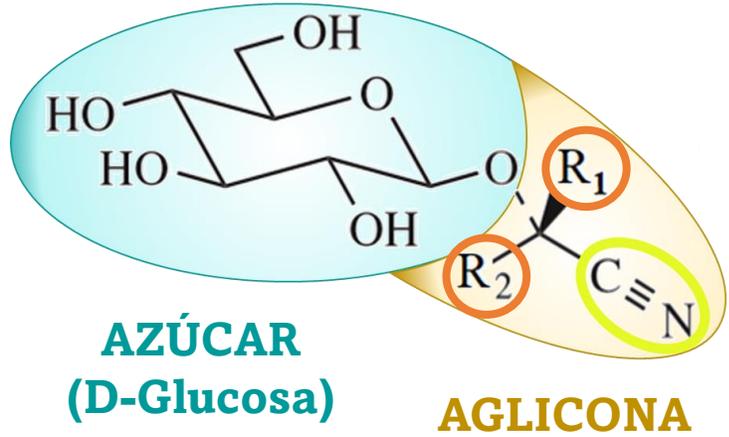
Neolinustatina



Lotaustralina

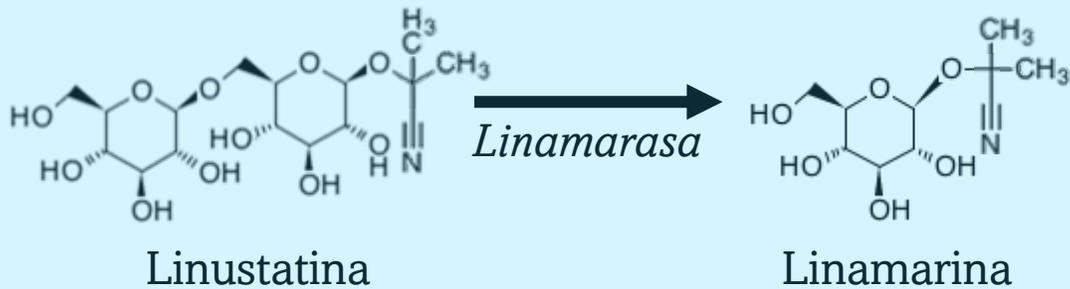


Glucósidos cianogénicos o cianógenos

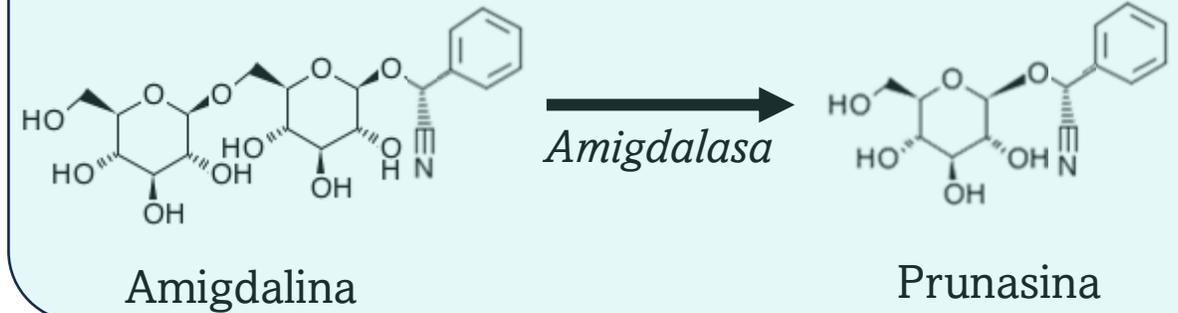


Clasificación según su procedencia

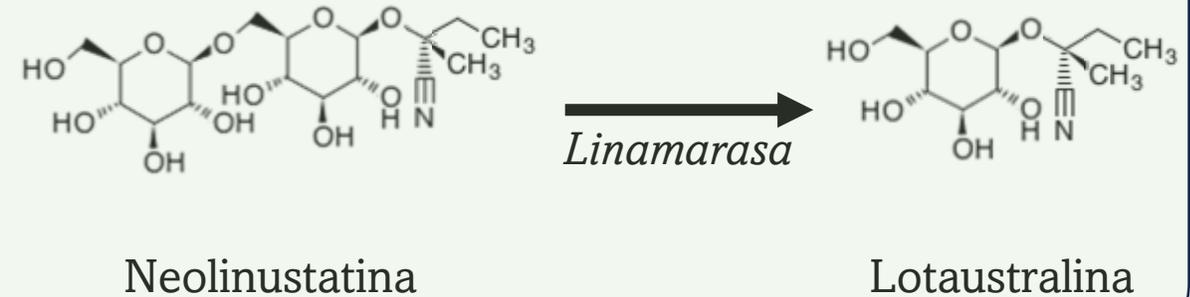
Derivados de Val



Derivados de Phe



Derivados de Ile



No son tóxicos por sí solos

Daño mecánico

Procesado industrial

Digestión



Golpes



Molienda



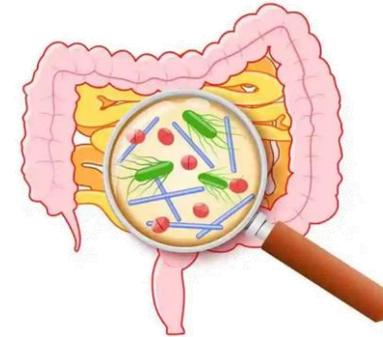
Marchitado



Agua (remojo)



Masticación



Microorganismos tracto digestivo

Alteración de estructuras celulares de la planta

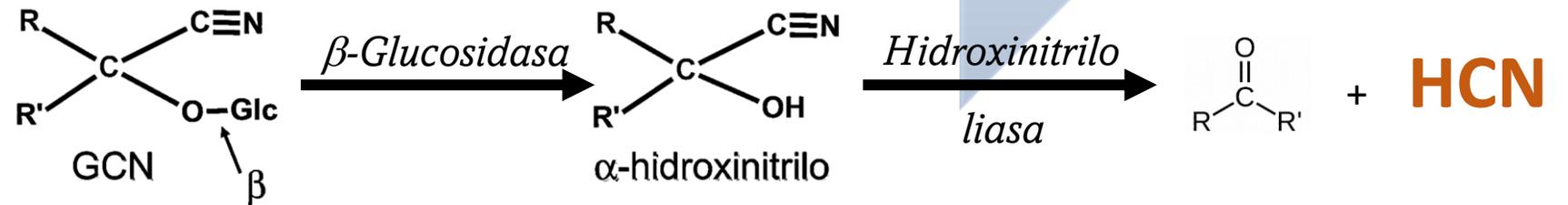
No son tóxicos por sí solos

Alteración de estructuras celulares de la planta

Glucósido cianogénico + enzima hidrolítica

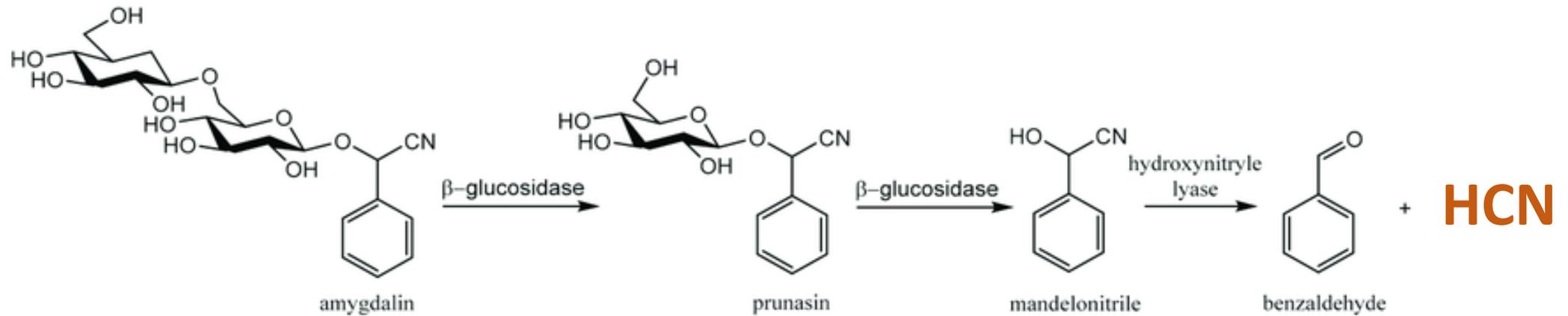
La cianhidrina
HCN +
aldehído/cetona.

HCN



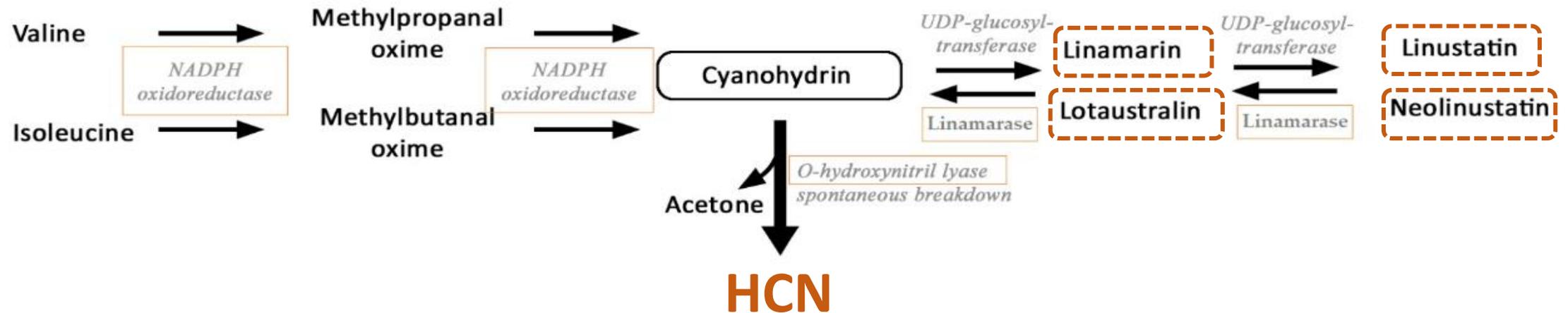
No son tóxicos por sí solos

La amigdalina como ejemplo



No son tóxicos por sí solos

El lino como ejemplo



Toxicidad

Cantidad de enzimas
(linamarasa/amigdalasa) en
el tejido vegetal

Alcance de la alteración
celular (masticado,
golpeado, etc) en el tejido

Acidez
(alimento, digestión,
procesos de fabricación, etc)

Tratamiento
térmico



Toxicidad

Gravedad de la toxicidad depende

- ✓ La **cantidad ingerida**
- ✓ El **peso** del ser vivo que lo ingiera

Los **principales contribuyentes a la exposición** son las galletas, el zumo o el néctar y los pasteles que potencialmente pueden contener glucósidos cianogénicos

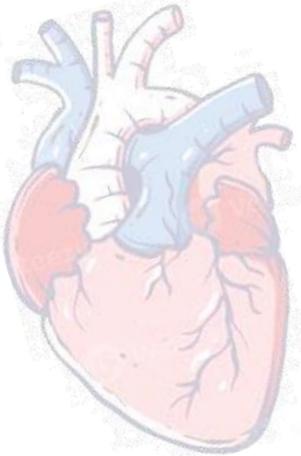


Toxicidad

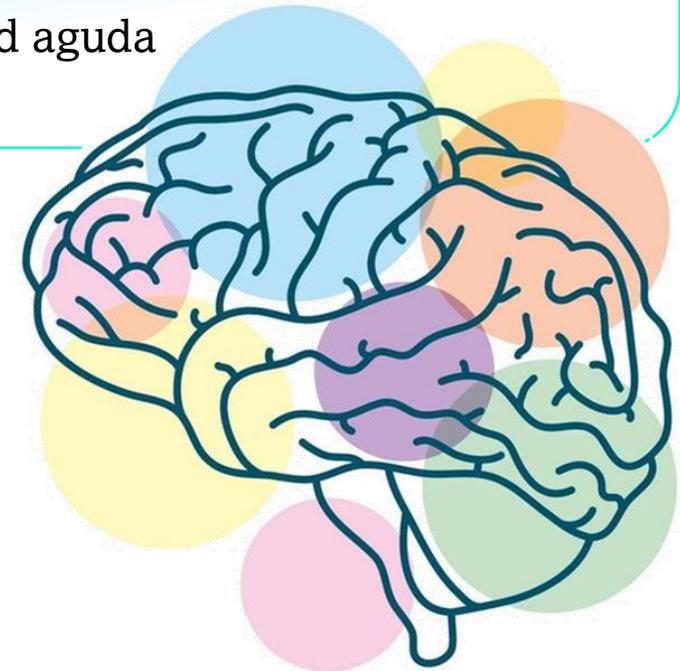
Alteración de la fosforilación oxidativa (oxígeno \rightarrow ATP)  **Impide que las células utilicen O₂**

El cianuro inhibe la enzima terminal en esta reacción (**citocromo oxidasa a3**)

Inhibe \uparrow nº otras enzimas: mecanismos adicionales que contribuyen a su toxicidad aguda



El corazón y el cerebro son particularmente propensos a la toxicidad del cianuro \rightarrow \uparrow suministro ATP generado por la fosforilación oxidativa.



La dosis oral aguda LD50 para el cianuro: 0.5–3.5 mg/kg pc.

>2500 especies vegetales



Evaluación del riesgo

2004:105

HCN en saborizantes e ingredientes alimenticios

2007:551

Etilcarbamato y HCN en alimentos y bebidas



2016:4424

Riesgos agudos para la salud de CNG en huesos de albaricoque crudos y derivado

2019:5662

Riesgos agudos para la salud de CNG en alimentos distintos a huesos de albaricoque

En 2016, la EFSA:

La cantidad máxima estimada de semillas de albaricoque (o materia prima de albaricoque) que se puede consumir sin exceder la dosis de referencia aguda (**ARfD**) es de **0,06 g en niños y 0,37 g en adultos**.

La dosis oral aguda **DL50** para el cianuro: **0.5–3.5 mg/kg pc**.



- **Conclusión:** ARfD se superaría con el contenido de
 - Un hueso pequeño en niños y
 - 3 huesos pequeños o de un hueso grande en adultos

Se requieren **datos sobre el consumo de productos** preparados a partir de semillas de albaricoque crudas.

En 2019, la EFSA: Actualización del **dictamen científico sobre la evaluación de los riesgos** para la salud relacionados con la presencia de glucósidos cianogénicos en los alimentos distintos de los huesos de albaricoque crudos.



➤ **Conclusión:** exposición humana < la dosis aguda de referencia de **20 µg de cianuro/kg pc** no debe producir efectos adversos agudos.

- ✓ Si se consumen alimentos con ↑niveles CNG (**semillas de lino, almendras y mandioca**) la **ARfD de cianuro podría superarse**.
- ✓ Se deben establecer **contenidos máximos** de ácido cianhídrico, incluido el ácido cianhídrico fijado en CNG en estos alimentos.

- Biodisponibilidad HCN semillas lino

semillas de lino trituradas > semillas de lino enteras/tratadas térmicamente.

Deben fijarse **contenidos más estrictos para las semillas de lino enteras**



Reglamento (UE) 2022/1364, aplic. 1 de enero de 2023 *modifica el Reglamento (CE) n.o 1881/2006*

Reglamento (UE) 2023/915 de la Comisión de 25 de abril de 2023 (entró en vigor el 25 de mayo de 2023)

2.3.	Ácido cianhídrico, incluido el ácido cianhídrico presente en los glucósidos cianógenos	Límite máximo (mg/kg)
2.3.1.	Semillas de lino enteras, trituradas, molidas, machacadas o picadas sin transformar no comercializadas para el consumidor final	250
2.3.2.	Semillas de lino enteras, trituradas, molidas, machacadas o picadas sin transformar comercializadas para el consumidor final	150
2.3.3.	Almendras enteras, trituradas, molidas, machacadas o picadas sin transformar comercializadas para el consumidor final	35
2.3.4.	Huesos de albaricoque enteros, triturados, molidos, machacados o picados sin transformar comercializados para el consumidor final	20
2.3.5.	Raíz de mandioca (fresca, pelada)	50
2.3.6.	Harina de mandioca y harina de tapioca	10



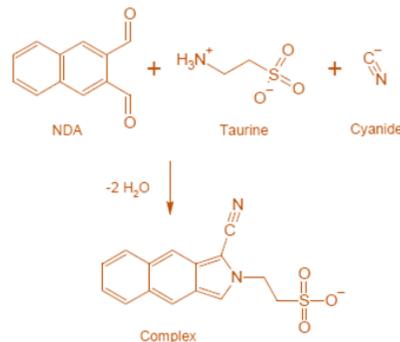
Determinación de ácido hidrocianico mediante HPLC

HCN libre y unido (en piensos)



Método:

- i. Extracción acídica de los CNG de la matriz
- ii. Hidrólisis enzimática (β -glucosidasa)
- iii. Destilación vapor del HCN en una solución de NaOH
- iv. Derivatización con taurina y NDA
- v. Análisis HPLC-FLD



norma española		UNE-EN 16160
		Julio 2012
TÍTULO	Alimentos para animales Determinación de ácido hidrocianico mediante HPLC	
	<i>Animal feeding stuffs. Determination of Hydrocyanic acid by HPLC.</i> <i>Aliments pour animaux. Dosage de l'acide cyanhydrique par CLHP.</i>	
CORRESPONDENCIA	Esta norma es la versión oficial, en español, de la Norma Europea EN 16160:2012.	
OBSERVACIONES		
ANTECEDENTES	Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico AEN/CTN 34 <i>Productos alimentarios</i> cuya Secretaría desempeña FIAB.	



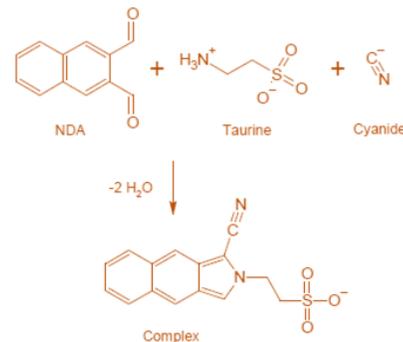
Determinación de ácido hidrocianico mediante HPLC

HCN libre y unido (en piensos)



Método:

- i. Extracción acídica de los CNG de la matriz
- ii. **Hidrólisis enzimática (β -glucosidasa)**
- iii. Destilación vapor del HCN en una solución de NaOH
- iv. Derivatización con taurina y NDA
- v. Análisis HPLC-FLD



norma española		UNE-EN 16160
		Julio 2012
TÍTULO	Alimentos para animales Determinación de ácido hidrocianico mediante HPLC	
	<i>Animal feeding stuffs. Determination of Hydrocyanic acid by HPLC.</i> <i>Aliments pour animaux. Dosage de l'acide cyanhydrique par CLHP.</i>	
CORRESPONDENCIA	Esta norma es la versión oficial, en español, de la Norma Europea EN 16160:2012.	
OBSERVACIONES		
ANTECEDENTES	Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico AEN/CTN 34 <i>Productos alimentarios</i> cuya Secretaría desempeña FIAB.	



Determinación de ácido hidrocianico mediante HPLC



Algunos inconvenientes

- Todos los **tipos de β-glucosidasas** no disponibles

Amigdalasa disponible pero Linamarasa?
Amigdalasa poco eficiente para otros CNG

- Alimentos que se hayan **calentado** durante el procesado

↓ actividad enzimática intrínseca → infraestimación?

- Para **mandioca** no se obtienen buenos resultados

Determinación de glucósidos cianogénicos en alimentos y piensos mediante LC-MS/MS



EURL-MP-method_010 (version 1)
Determination of cyanogenic glycosides in food and feed by LC-MS/MS

Analyte group: Plant toxins – cyanogenic glycosides
Analyte(s): Amygdalin
Linamarin
Linustatin
Lotaustralin
Neolinustatin
Prunasin

Commodity group: Food and feed
Commodities validated: Linseed (flax seed), linseed cake, almond and apricot kernels, cassava flour, and products containing these ingredients



Determinación de glucósidos cianogénicos en alimentos y piensos mediante LC-MS/MS



EURL-MP-method_010 (version 1)
Determination of cyanogenic glycosides in food and feed by LC-MS/MS

Analyte group: Plant toxins – cyanogenic glycosides
Analyte(s): Amygdalin
Linamarin
Linustatin
Lotaustralin
Neolinustatin
Prunasin

Commodity group: Food and feed
Commodities validated: Linseed (flax seed), linseed cake, almond and apricot kernels, cassava flour, and products containing these ingredients



Matriz	Amigdalina	Prunasina	Linustatina	Neolinustatina	Linamarina	Lotaustralina
Semillas de lino 			✓	✓	✓	✓
Almendras 	✓	✓				
Huesos de albaricoque 	✓	✓				
Raíz de mandioca Harina de mandioca y harina de tapioca 					✓	✓



Determinación de glucósidos cianogénicos en alimentos mediante LC-MS/MS

CNA

Método basado en el del EURL

Analitos: Amigdalina, prunasina, linamarina, lotaustralina, linustatina y neolinustatina

Matrices: semillas de lino y almendras



Determinación de glucósidos cianogénicos en alimentos mediante LC-MS/MS

EXTRACCIÓN



0,4-1 g muestra

Cva: Los estándares de calibración se preparan añadiendo soluciones estándar a una matriz blanca.

Si no se dispone de muestra blanca se podrá usar una alternativa (“surrogate”)

Linaza

Sésamo o soja

Harina de yuca o tapioca

Harina de maíz

Almendras/hueso albaricoque

Avellanas

Mazapanes y turrone

Pasta de judías blancas



Determinación de glucósidos cianogénicos en alimentos mediante LC-MS/MS

Conversión a equivalentes de HCN

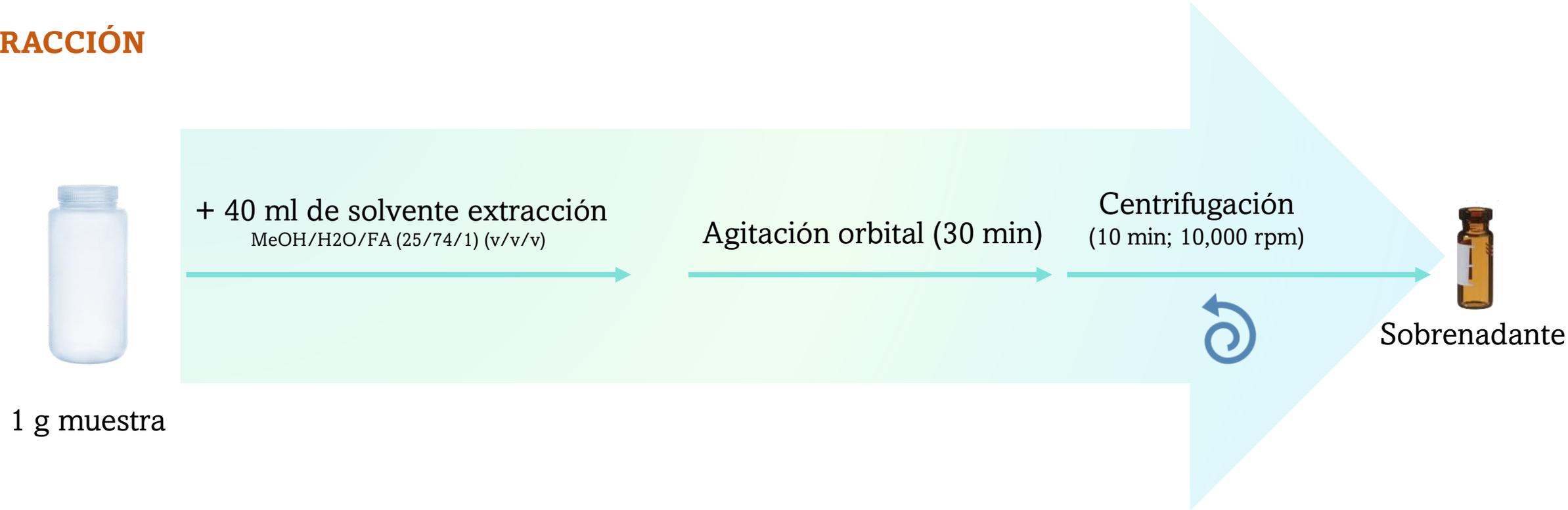
CNG	Factor (M _w CNG/M _w HCN)
<i>Amigdalina</i>	16,92
<i>Linamarina</i>	9,14
<i>Linustatina</i>	15,14
<i>Neolinustatina</i>	15,66
<i>Lotaustralina</i>	9,66
<i>Prunasina</i>	10,92
<i>Durrina (IS)</i>	11,51

[CNG] en 1 µg HCN eq/mL disolución



Determinación de glucósidos cianogénicos en alimentos mediante LC-MS/MS

EXTRACCIÓN



Determinación de glucósidos cianogénicos en alimentos mediante LC-MS/MS

Preparación del extracto para inyección UPLC-MS/MS



20 μ l sobrenadante
+ 20 μ l durrina (IS)
+ 60 μ l MeOH
+ 400 μ l Solvente de dilución
(ácido fórmico al 1%)

Filtración



UPLC-MS/MS

Mini-Uniprep™ PTFE filter vial, 500 μ l

Determinación de glucósidos cianogénicos en alimentos mediante LC-MS/MS

Condiciones UPLC-MS/MS



Fases móviles:

- A: 0,1% FA en agua
- B: MeOH

Columna: Waters BEH C18 1.7 μm , 100*2.1 mm

V inyección de 5 μL

Flujo 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$

Gradiente →

Tiempo (min)	A%	B%
0	100	0
2	100	0
7	85	15
9	20	80
9,2	20	80
9,4	100	0
11,5	100	0



Determinación de glucósidos cianogénicos en alimentos mediante LC-MS/MS

Condiciones UPLC-MS/MS

MS/MS ESI +



Voltaje capilar: 3,0 kV

Temp desolv: 600°C

Temp. Fuente: 150°C

Flujo de gas de cono: 150 L/h

	Ión madre (m/z)	Volt. Cono (V)	E col (eV)	Ión hijo (m/z)	E col (eV)	Ión hijo (m/z)	E col (eV)
Linamarin	265,2	20	20	180,0	10	163,0	10
Lotaustralin	279,2	20	20	163,0	10	85,0	20
Prunasin	313,2	20	20	163,0	10	180,0	10
Durrina (IS)	329,2	20	25	85,0	20	180,0	10
Linustatina	427,2	20	25	85,0	25	325,0	10
Neolinustatina	441,2	20	25	145,0	20	325,0	10
Amigdalina	475,2	20		85,0	25	325,0	10



2023-09 EURLPT MP 11 Hydrocyanic acid in food and feed

- ✓ Almendra molida
- ✓ Semillas de lino molidas



Esperando resultados...



VALIDACIÓN COMPLETA



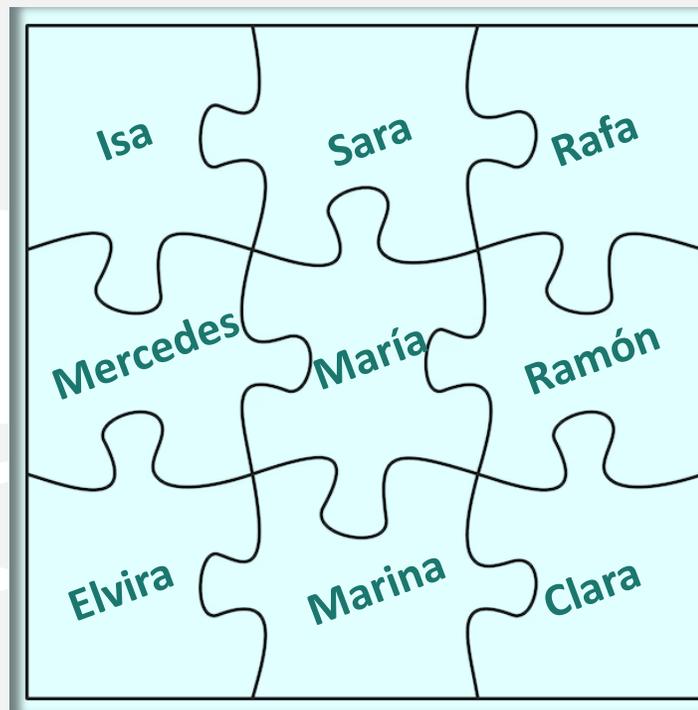
LC aprox. 1 mg/Kg

MUCHAS GRACIAS



cibanez@aesan.gob.es

Gracias al mejor equipo



*Unidad de Toxinas y Contaminantes del Procesado
Centro Nacional de Alimentación*

50

50 ANIVERSARIO CENTRO NACIONAL DE ALIMENTACIÓN

*Cuidando de ti
desde el laboratorio*



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



Centro
Nacional de
Alimentación