



MINISTERIO  
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES  
E IGUALDAD

**aecosan**

agencia española  
de consumo,  
seguridad alimentaria y nutrición

**CENTRO NACIONAL DE ALIMENTACIÓN**



**NOVEDADES ANALÍTICAS  
RELACIONADAS CON  
MICOTOXINAS Y  
COMPONENTES TÓXICOS  
DE LAS PLANTAS**

María Nogueiras  
Unidad de Toxinas y HAP  
CENTRO NACIONAL DE ALIMENTACIÓN



I. UN TEMA AL DÍA: Determinación de morfina en semillas de adormidera

II. Determinación de alcaloides tropánicos en alforfón, sorgo, mijo y productos derivados.

III. Participación en ejercicios de aptitud organizados por el EURL de Micotoxinas.

IV. Documento guía criterios de identificación de Micotoxinas.

**NOVEDADES ANALÍTICAS- I**

**UN TEMA AL DÍA:**

---



**DETERMINACIÓN DE  
MORFINA EN SEMILLAS DE  
ADORMIDERA**



*Papaver rhoeas*



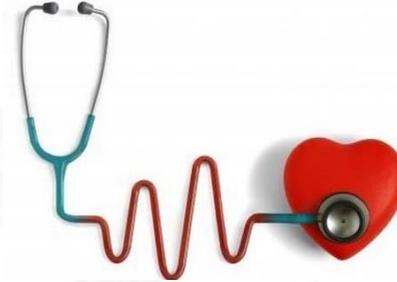
*Papaver somniferum*



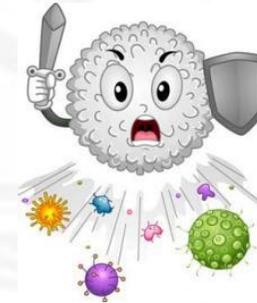
## PROPIEDADES SEMILLAS ADORMIDERA

- RICAS EN NUTRIENTES ESENCIALES

- Ácidos grasos omega-3 y omega-6
- Fibra
- Vitaminas del grupo B, E y C
- Minerales: calcio, manganeso, potasio, fósforo, hierro, zinc y cobre



- AYUDAN A REFORZAR EL SISTEMA INMUNE



- EFECTO SEDANTE



# USOS SEMILLAS ADORMIDERA

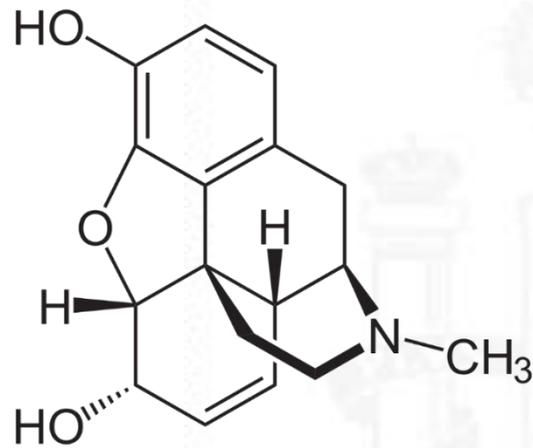
## PANADERIA

- Pan
- Bagels
- Bizcochos
- Magdalenas
- Monhstrüdel

- ENSALADAS
- YOGURES
- ACEITES COMESTIBLES
- En países de Oriente: en platos salados.







- Látex cápsulas inmaduras ≈ OPIO
- 20-25% de alcaloides
- Alcaloide más activo y en mayor cantidad:  
**MORFINA**
- Otros alcaloides importantes: CODEINA  
PAPAVERINA  
NOSCAPINA

## BREVE HISTORIA DE LA MORFINA

- Antecedentes: **OPIO**
- **1804**: sintetizada por Friedrich Sertürner
- **1817**: comercializada como analgésico



## EFECTOS ADVERSOS DE LA MORFINA

### AGUDOS:

- Náuseas y/o vómitos.
- Somnolencia, desorientación, mareos, inestabilidad, visión borrosa.
- Sudoración, boca seca y estreñimiento.
- Alteraciones respiratorias
- Astenia.



### ALARGO PLAZO:

- Dependencia (puede ocurrir si su uso es prolongado).
- Puede agravar el estado del paciente
- Dependencia física en el feto y [síndrome de abstinencia](#) en el bebé





## EVALUACIÓN RIESGOS



Risiken erkennen – Gesundheit schützen

**BfR recommends provisional daily upper intake level and a guidance value for morphine in poppy seeds**

BfR Health Assessment No. 012/2006, 27 December 2005



**VALOR REFERENCIA PROVISIONAL**  
**4 mg/Kg**

## EVALUACIÓN RIESGOS

EFSA Journal 2011;9(11):2405

### SCIENTIFIC OPINION

## Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of opium alkaloids in poppy seeds<sup>1</sup>

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM)<sup>2,3</sup>

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy



**DOSIS DE REFERENCIA AGUDA**  
**10 mg/Kg peso corporal**

L 271/96

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

12.9.2014

## RECOMENDACIÓN DE LA COMISIÓN

de 10 de septiembre de 2014

sobre buenas prácticas para prevenir y reducir la presencia de alcaloides opiáceos en las semillas de adormidera y los productos que contienen semillas de adormidera

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2014/662/UE)



**REDUCCIÓN MÍNIMA DE  
10 % CONTENIDO ALCALOIDES**

# EFSA- CALL FOR DATA



## EFSA- CALL FOR DATA

Contaminants	Target date for the adoption of the opinion
Opium alkaloids	March 2018
Hydrocyanic acid	November 2018
Glycoalkaloids	July 2019
Chlorinated paraffins	May 2019
Quinolizidine alkaloids	November 2019

# PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

HOMOGENEIZACIÓN

Trituración y homogenización muestra

EXTRACCIÓN

Extracción con MeOH ligeramente acidificado

HPLC- MSMS

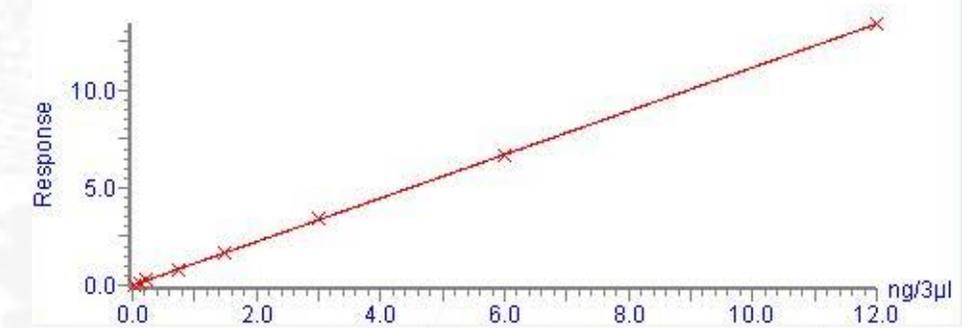
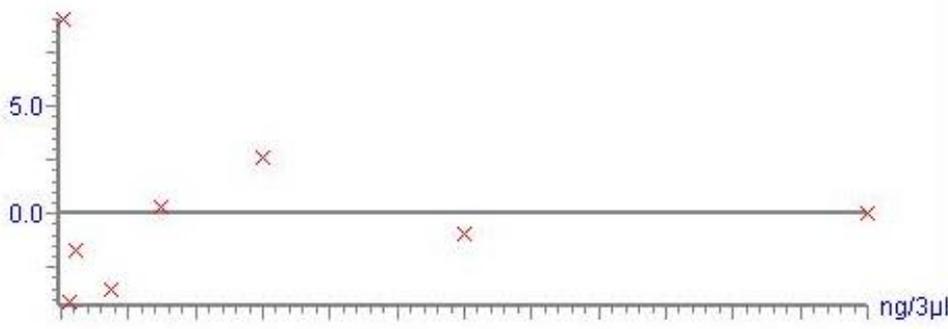
HPLC con Espectrometría de Masas/Masas

- Triple cuadrupolo; ESI positivo
- Patrón interno D3- morfina



**% RECUPERACIÓN ~ 90 %**

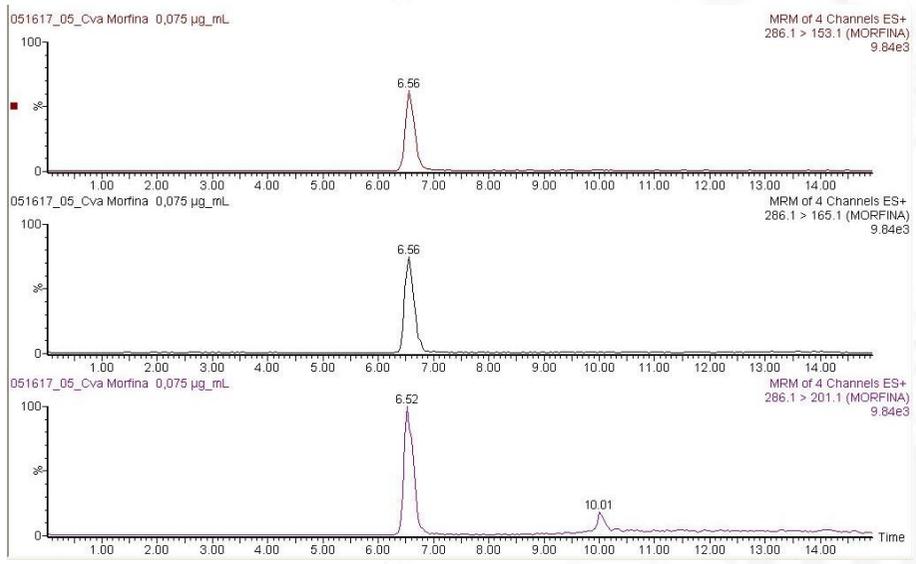
# CURVA DE CALIBRACIÓN CON PATRÓN INTERNO



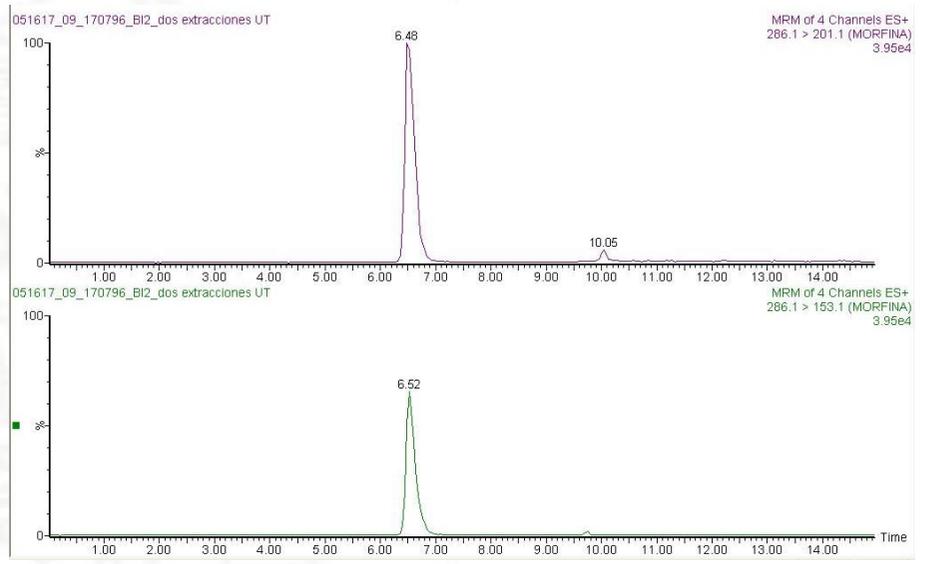
Compound name: Morfina  
Correlation coefficient:  $r = 0.999909$ ,  $r^2 = 0.999818$   
Calibration curve:  $1.11759 * x + 0.00073511$   
Response type: Internal Std ( Ref 1 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None

Rango curva de calibración: 0,2 – 60 mg/kg

# CROMATOGRAMAS (MRM)



Patrón de morfina



Muestra semillas adormidera naturalmente contaminada

## Contenido en Morfina en muestras de semillas de adormidera



- La muestras comerciales de semilla de adormidera están **CONTAMINADAS** con morfina
- Hasta ahora **DIFICULTAD** para encontrar muestras blancas





I. UN TEMA AL DÍA: Determinación de morfina en semillas de adormidera

**II. Determinación de alcaloides tropánicos en alforfón, sorgo, mijo y productos derivados.**

III. Participación en ejercicios de aptitud organizados por el EURL de Micotoxinas.

IV. Documento guía criterios de identificación de Micotoxinas.

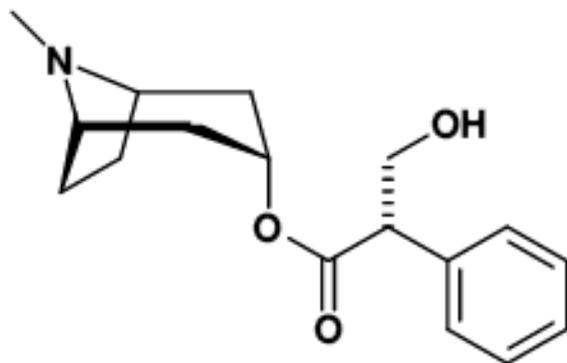


## NOVEDADES ANALÍTICAS- II

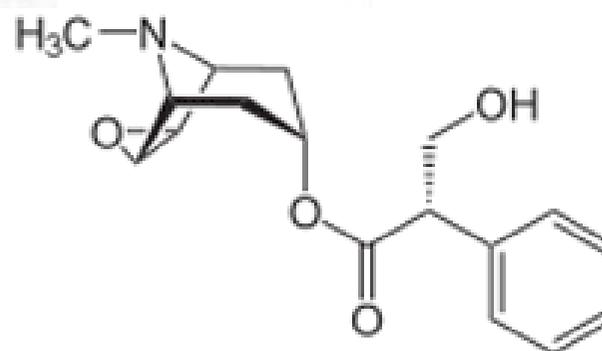
# DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES TROPÁNICOS EN ALFORFÓN, SORGO, MIJO Y PRODUCTOS DERIVADOS



## ALCALOIDES TROPÁNICOS



Atropine

**CAS:** 51-55-8**Formula:**  $C_{17}H_{23}NO_3$ **MW:** 289.369 g/mol

Scopolamine

**CAS** 51-34-3**Formula**  $C_{17}H_{21}NO_4$ **MW** 303.353 g/mol

# ALCALOIDES TROPÁNICOS - LEGISLACIÓN

## ANEXO

En la sección 8 del anexo del Reglamento (CE) n.º 1881/2006, se añade la siguiente entrada:

Productos alimenticios <sup>(1)</sup>		Contenido máximo (µg/kg)	
«8.2.	<b>Alcaloides tropánicos (*)</b>		
		Atropina	Escopolamina
8.2.1.	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos para lactantes y niños de corta edad que contengan mijo, sorgo, alforfón o sus productos derivados <sup>(29)</sup>	1,0 µg/kg	1,0 µg/kg

(\*) Los alcaloides tropánicos a que se hace referencia son la atropina y la escopolamina. La atropina es la mezcla racémica de (-)-hiosciamina y (+)-hiosciamina; de ellos, solo el enantiómero (-)-hiosciamina presenta actividad anticolinérgica. Los contenidos máximos se han establecido para la atropina y para escopolamina, ya que por motivos analíticos no siempre es posible distinguir entre los enantiómeros de la hiosciamina.»

## ALCALOIDES TROPÁNICOS – matrices validadas



- Harina de alforfón
- Papillas de cereales
- Galletas a base de cereales

<i>Matriz</i>	<i>Atropina (µg/kg)</i>	<i>Escopolamina (µg/kg)</i>
<i>Harina de alforfón</i>	≥ 0,40	≥ 0,36
<i>Papillas de cereales</i>	≥ 0,25	≥ 0,36
<i>Galletas a base de cereales</i>	≥ 0,25	≥ 0,36

## ALCALOIDES TROPÁNICOS- METODO ANALÍTICO

HOMOGENEIZACIÓN

EXTRACCIÓN

2 g + 8 ml MeOH/H<sub>2</sub>O/ Ac. Fórmico (60:40:0,4)  
3 min ultraturrax + 15 min agitación + 20 min sonicación

centrifugación  
filtro 0,2 µm

HPLC- MSMS

## ALCALOIDES TROPÁNICOS- METODO ANALÍTICO

- Fase móvil A: Amoniacó 6 mM en agua
- Fase móvil B: Amoniacó 6 mM en acetonitrilo
- Flujo Fase Móvil = **0,4 ml / min**
- Volumen inyección = **10 µl.**



### GRADIENTE:

Tiempo	A%	B%
0.00	90	10
2,00	65	35
12,00	10	90
12,10	90	10
25,00	90	10

COLUMNA: Xbridge C18, 5 µm, 3 x 150 mm (Waters)

## ALCALOIDES TROPÁNICOS- METODO ANALÍTICO

- T fuente: 125 °C
- T desolvatación: 400 °C
- **Electrospray en modo positivo**
- Voltaje capilar 2,00 Kv
- Voltaje cono 40 V



<i>Analito</i>	<i>Ion Padre</i>	<i>Iones Hijos</i>	
<i>Atropina</i>	290,16	93,17	124,24
<i>D<sub>3</sub>-Atropina</i>	293,30	127,20	
<i>Escopolamina</i>	304,21	138,25	156,25
<i>D<sub>3</sub>-Escopolamina</i>	307,30	141,20	

	Atropina	D <sub>3</sub> -Atropina	Escopolamina	D <sub>3</sub> -Escopolamina
lón cuantificador	124,24	127,2	138,25	141,2
lón confirmación	93,17	-	156,25	-

## ALCALOIDES TROPÁNICOS – ESTUDIO PROSPECTIVO 2017

### EP 03 17 TRO

Determinación alcaloides tropánicos en ALIMENTOS INFANTILES

30 muestras

Muestreo en minorista y en fábrica

- La Rioja
- Madrid
- Cantabria
- Murcia





I. UN TEMA AL DÍA: Determinación de morfina en semillas de adormidera

II. Determinación de alcaloides tropánicos en alforfón, sorgo, mijo y productos derivados.

**III. Participación CNA en ejercicios de aptitud organizados por el EURL de Micotoxinas.**

IV. Documento guía criterios de identificación de Micotoxinas.

**NOVEDADES ANALÍTICAS- III**



**PROFICIENCY  
TESTING**

**PARTICIPACIÓN DEL CNA EN  
EJERCICIOS DE APTITUD  
ORGANIZADOS POR EL  
EURL DE MICOTOXINAS  
2016-2017**



**2016**

- DETERMINACIÓN DE **ALCALOIDES TROPÁNICOS** EN CEREALES
- DETERMINACIÓN DE **ALCALOIDES TROPÁNICOS** EN TE Y HIERBAS PARA INFUSIONES
- DETERMINACIÓN **MULTITOXINAS** EN MAIZ (las legisladas + eniانتinas y beuverricina)
- DETERMINACIÓN DE **AFLATOXINAS** EN CACAHUETE EN POLVO DESGRASADO



2017

## EJERCICIO DE APTITUD PARA LA DETERMINACIÓN DE **ALCALOIDES DE LA PIRROLICIDINA** EN TE Y MIEL

- Una muestra de te naturalmente contaminada
- Una muestra de miel adicionada

Los participantes deberán dar resultados del mayor número posible de analitos de la siguiente lista:

*Echimidine, Erucifoline, Europine, Heliotrine, Indicine, Integerrimine, Intermedine, Jacobine, Lasiocarpine, Lycopsamine, Monocrotaline, Retrorsine, Senecionine, Seneciphylline, Senecivernine, Senkirkine, Trichodesmine.*





2017

## EJERCICIO DE APTITUD PARA LA DETERMINACIÓN DE **DEOXINIVALENOL** (DON) EN TRIGO

- Cuatro muestras de harina de trigo naturalmente contaminadas



2017

## EJERCICIO DE APTITUD PARA LA DETERMINACIÓN DE **ALCALOIDES DEL ERGOT** EN CEREALES

- Una muestra de harina de centeno naturalmente contaminada
- Analitos a determinar:
- Los 6 alcaloides del ergot (y sus correspondientes –ininas) mencionados en la Recomendación de la Comisión: 2012/154/EU





I. UN TEMA AL DÍA: Determinación de morfina en semillas de adormidera

II. Determinación de alcaloides tropánicos en alforfón, sorgo, mijo y productos derivados.

III. Participación en ejercicios de aptitud organizados por el EURL de micotoxinas.

**IV. Documento guía criterios de identificación de micotoxinas.**

**NOVEDADES ANALÍTICAS- IV**

**DOCUMENTO GUÍA  
CRITERIOS DE  
IDENTIFICACIÓN DE  
MICOTOXINAS**





- IDENTIFICACIÓN

- Este documento se ha realizado teniendo en cuenta criterios existentes para otros campos y datos bibliográficos.



- CRITERIOS VALIDACION Y ANALISIS MICOTOXINAS

# LEGISLACIÓN SOBRE CRITERIOS LC-MS/MS

CEN/TR 16059:2010



**Food analysis - Performance criteria for single laboratory validated methods of analysis for the determination of mycotoxins**



## LEGISLACIÓN SOBRE CRITERIOS LC-MS/MS

- **Decision 2002/657**

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 12 de agosto de 2002

por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados

[notificada con el número C(2002) 3044]

- **SANCO/2015/11945**: Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residue analysis in food and feed.

**Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.**

SANTE/11945/2015

Supersedes

SANCO/12571/2013

Implemented by 01/01/2016

- **FDA ORA-LAB 10 y FDA guidance for industry 118**: utilizados en USA

## LEGISLACIÓN SOBRE CRITERIOS LC-MS/MS

## Criterios empleados en Europa

● Decision 2002/657:

1.- Obligatorio un padre y dos hijos.

2.- Ion ratio (lowest response/ highest response):

> 50% → tolerancia  $\pm$  20%

>20% - 50% → tolerancia  $\pm$  25%

>10-20% → tolerancia  $\pm$  30%

$\leq$  10% → tolerancia  $\pm$  50%

3.- S/N de todos los iones  $\geq$  3



**INCLUYENDO EL  
CUALIFICADOR**



4.- Tiempo de retención:  $RT \geq 2 \times t_0$ ;  $RRT \leq \pm 2,5 \%$



# GUIDANCE DOCUMENT ON IDENTIFICATION OF MYCOTOXINS IN FOOD AND FEED

SANTE/12089/2016



## REQUISITOS IDENTIFICACIÓN MICOTOXINAS

- **HPLC-MSMS** → MÉTODO RECOMENDADO



- **HPLC-FLD** → COMBINADO CON INMUNOAFINIDAD!!!

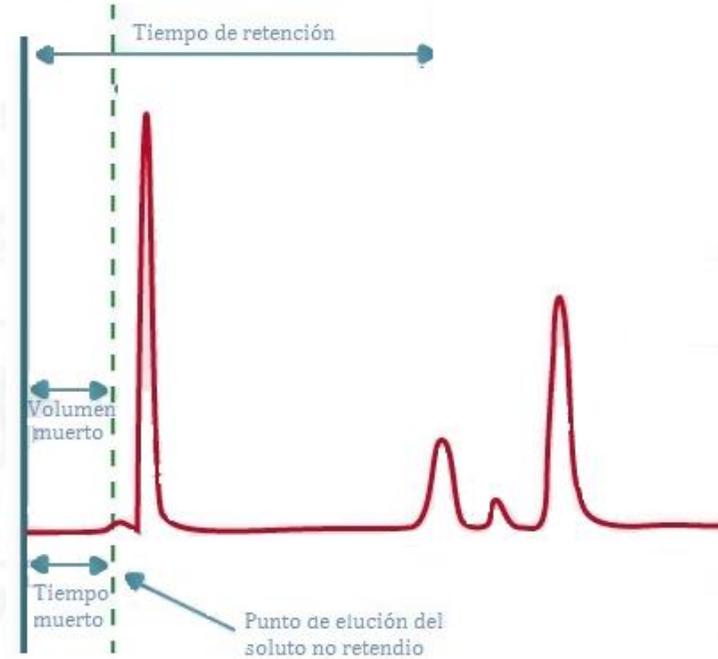


- **HPLC-UV** → DESACONSEJADO



## REQUISITOS CROMATOGRAFÍA

- $t_R$  mínimo = 2 x volumen muerto columna

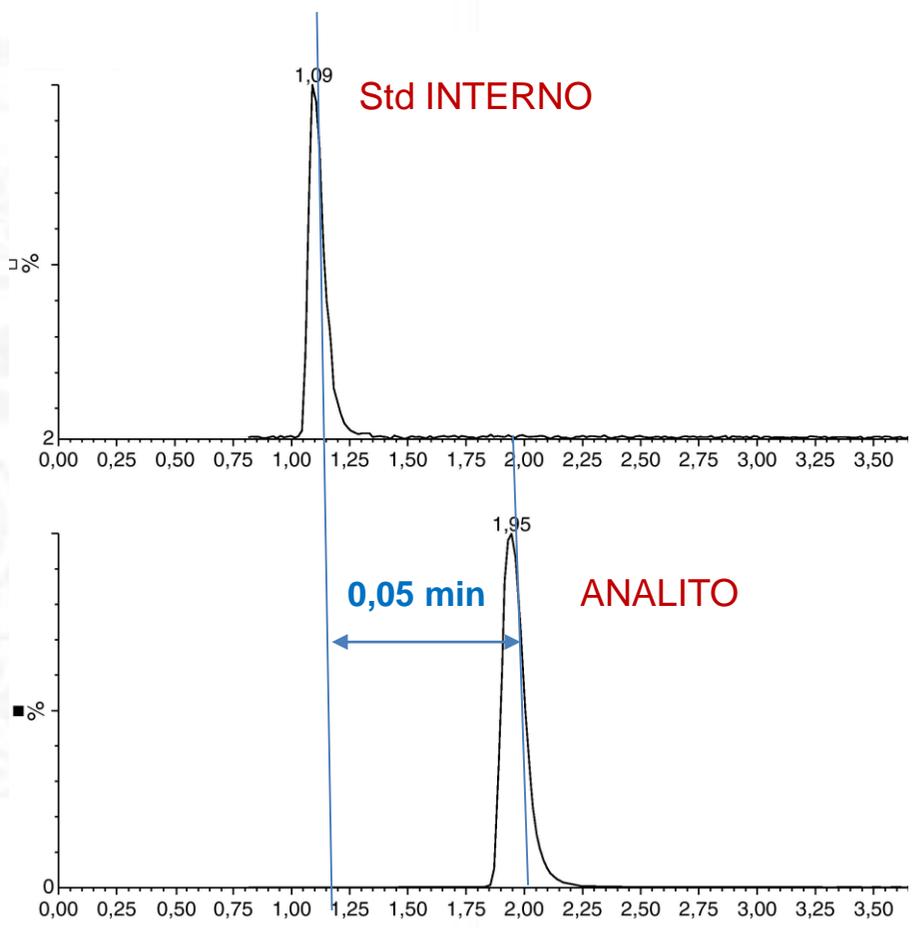


- **HPLC:**  $t_R$  muestras =  $t_R$  medio patrones  $\pm 0, 2$  min
- **CG y UPLC:**  $t_R$  muestras =  $t_R$  medio patrones  $\pm 0, 1$  min

# REQUISITOS CROMATOGRAFÍA

- **PATRÓN INTERNO:**

$$t_R \text{ analito} = t_R \text{ std interno} \pm 0,05 \text{ min}$$



# REQUISITOS DETECCIÓN FLUORESCENCIA

**FLUORESCENCIA**

FLUORESCENCIA NATURAL

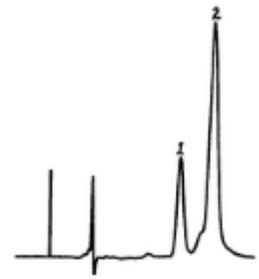
DERIVATIZACIÓN

$\lambda$  EMISIÓN

$\lambda$  EXCITACIÓN

Condiciones cromatográficas

Minimizar interferencias



# REQUISITOS ESPECTROMETRÍA DE MASAS

MS detector / characteristics	Typical systems (examples)	Acquisition	Requirements for identification	
			minimum number of ions	other
Unit mass resolution	quadrupole, ion trap, TOF	full scan, limited m/z range, SIM	3 ions	
MS/MS	triple quadrupole, ion trap, Q-trap, Q-TOF, Q-Orbitrap	selected or multiple reaction monitoring (SRM, MRM), mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 product ions	S/N ≥ 3 <sup>0</sup>
Accurate mass measurement	High resolution MS: (Q-)TOF (Q-)Orbitrap FT-ICR-MS sector MS	full scan, limited m/z range, SIM, fragmentation with or without precursor-ion selection, or combinations thereof	2 ions <sup>2</sup> with mass accuracy ≤ 5 ppm for m/z ≥ 200 ≤ 1 mDa for m/z ≤ 200	Analyte peaks in the extracted ion chromatograms must fully overlap.  ion ratio within ±30% (relative)
		combined single stage MS and MS/MS with mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 ions: 1 molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion with mass accuracy ≤ 5 ppm (or ≤ 1mDa for m/z ≤ 200)  <u>plus</u> 1 MS/MS product ion <sup>2</sup>	of average of calibration standards from same sequence

← O muestra adicionada



## REFERENCIAS

- [1] Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. J. Eur. Communities L221 (17.8.2002) 8–36.
- [2] SANTE/2015/11945 Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residue analysis in food and feed.
- [3] S.J. Lehotay, Y. Sapozhnikova, H.G.J. Mol, Current issues involving screening and identification of chemical contaminants in foods by mass spectrometry, Trends in Analytical Chemistry 69 (2015) 62–75.
- [4] H.G.J. Mol, P. Zomer, M. García López, R.J. Fussell, J. Scholten, A. de Kok, A. Wolheim, M. Anastassiades, A. Lozano, A. Fernandez Alba. Identification in residue analysis based on liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Experimental evidence to update performance criteria, Analytica Chimica Acta 873 (2015) 1–13.
- [5] B.J.A. Berendsen, T. Meijer, R. Wegh, H.G.J. Mol, W.G. Smyth, S.A. Hewitt, L. van Ginkel, M.W.F. Nielen, A critical assessment of the performance criteria in confirmatory analysis for veterinary drug residue analysis using mass spectrometric detection in selected reaction monitoring mode, Drug Test. Analysis 8 (2016) 477–490.



*¡Muchas gracias!*

# MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN

