**APENDICE NORMATIVO A**

**A.** De los límites permitidos para consumo animal.

Los cereales con una concentración mayor de 20 µg/kg de aflatoxinas y que se destinen para consumo directo o como parte de alimentos procesados, deberán ajustarse a lo dispuesto en la siguiente tabla.

|  |  |
| --- | --- |
| **Especie/etapa de producción** | **Límite máximo**  **µg/kg** |
| Aves (excepto pollos de engorda) | 100 |
| Cerdos en engorda: |  |
| Entre 25 y 45 kg | 100 |
| Mayores de 45 kg | 200 |
| Maduros destinados a reproducción | 100 |
| Rumiantes: |  |
| Maduros destinados a reproducción | 100 |
| De engorda en etapa de finalización | 300 |

**APENDICE NORMATIVO B**

**B.1** Del etiquetado de muestras.

**B.1.1** Para muestras de bodega.

Tipo de producto

Centro:

Ubicación:

Bodega No.: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Sección:

Fecha toma de muestra: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Hora:

Observaciones:

Identificación de la muestra:

**B.1.2** Para muestras durante la movilización.

Tipo de producto:

Centro de envío:

Ubicación:

Centro de destino:

Ubicación:

Nombre o Cía.:

Fecha y hora de la toma de muestra:

Datos del vehículo:

Identificación de la muestra:

**B.2** Reporte de laboratorio.

Identificación de la muestra:

Centro:

Ubicación:

Tipo de producto:

Nombre de bodegas muestreadas:

Número de muestras compuestas por bodega:

Concentración en cada muestra compuesta:

Concentración promedio de AF en cada bodega:

Identificación de la muestra:

Fecha de realización del análisis:

Vehículo muestreado: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Centro de origen: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Centro de destino: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Concentración de AF: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

En caso de resultar la concentración de AF mayor o igual a 20 µg/kg reportar a:

Fecha de realización del análisis:

**APENDICE NORMATIVO C**

**C.** Del método de prueba para la determinación de aflatoxinas en cereales.

**C.1** Preparación de la muestra.

Moler la totalidad de la muestra compuesta hasta que pase por un tamiz con una abertura de 850 µm (No. 20).

**C.2** Extracción por columnas de inmunoafinidad.

**C.2.1** Fundamento.

Las AF son extraídas de la muestra, con metanol al 80%, el extracto es filtrado y diluido con agua, filtrado y pasado a través de una columna de inmunoafinidad la cual contiene un anticuerpo monoclonal específico para AF. En este estado la aflatoxina se liga al anticuerpo de la columna. La columna es entonces lavada con agua para eliminar impurezas. Posteriormente, después de pasar metanol a través de la columna, las AF son removidas del anticuerpo, esta solución es medida en un fluorómetro previa derivatización con solución diluida de bromo. Las AF son cuantificadas en forma total.

**C.2.2** Materiales.

**C.2.2.1** Columnas de inmunoafinidad.

**C.2.2.2** Papel filtro aflautado de 24 cm Ø Whatman No. 1 o equivalente.

**C.2.2.3** Papel filtro fibra de vidrio de 11 cm Ø Whatman No. 934AH o equivalente.

**C.2.2.4** Matraces Erlenmeyer de 125 mL.

**C.2.2.5** Vasos de precipitados de 100 mL.

**C.2.2.6** Embudos de plástico de 100 mm Ø.

**C.2.2.7** Embudos de plástico de 60 mm Ø.

**C.2.2.8** Dosificador de 1 a 5 mL.

**C.2.2.9** Dosificador de 5 a 10 mL.

**C.2.2.10** Dosificador de 20 a 100 mL.

**C.2.2.11** Probeta de 1000 mL.

**C.2.2.12** Pipetas volumétricas de 10 mL.

**C.2.2.13** Pipetas volumétricas de 5 mL.

**C.2.2.14** Pipetas volumétricas de 1 mL.

**C.2.2.15** Auxiliar de macropipeteado.

**C.2.2.16** Jeringas de vidrio de 10 mL.

**C.2.2.17** Estándares de calibración de 3 niveles.

**C.2.2.18** Celdas de borosilicato de 12x75 mm.

**C.2.2.19** Gradilla de plástico para celdas de 12x75 mm.

**C.2.2.20** Preparación de patrones de calibración. De no contar con los estándares provistos por el fabricante, preparar el estándar de calibración de la siguiente manera: use como testigo ácido sulfúrico (H2SO4) 0.1N. Como patrón de AF de 20 ng, use 34 mg de sulfato de quinina dihidratada/mL de H2SO4 0.1N.

**C.2.3** Equipo.

**C.2.3.1** Licuadora de alta velocidad con vaso de acero inoxidable o de vidrio de 250 mL.

**C.2.3.2** Bomba manual.

**C.2.3.3** Mezclador tipo vórtex.

**C.2.3.4** Fluorómetro con lámpara pulsada de Xenón o cuarzo-halógeno y filtros de excitación de 360 nm y de emisión de 450 nm.

**C.2.4** Reactivos.

**C.2.4.1** Solución de metanol al 80%.

Medir 800 mL de metanol grado analítico y mezclar con 200 mL de agua destilada en probeta graduada de 1000 mL.

**C.2.4.2** Cloruro de sodio.

**C.2.4.3** Metanol grado HPLC.

**C.2.4.4** Solución reveladora de bromo al 0,03%.

**C.2.4.5** Solución de bromo al 0,03%.

Se mide 1 mL de solución reveladora de concentración al 0,03% y se añaden 9 mL de agua destilada. Preparar el día de su uso.

**C.2.4.6** Solución PBS pH 7.3 \*.

\* En caso que se requiera por parte del fabricante de la columna.

**C.2.4.6.1** Preparación PBS pH 7.3. En caso de ser necesaria la preparación de la solución se tienen las siguientes alternativas:

**a)** Pesar las siguientes sales:

Cloruro de potasio 1 g.

Ortofosfato dihidrogenado de potasio 1 g.

Ortofosfato hidrogenado de sodio (anhidro) 5,8 g.

Cloruro de sodio 40,0 g.

Disolver las sales en aproximadamente 4,5 litros de agua destilada.

Ajustar el pH de la solución a 7.3 utilizando ácido clorhídrico (HCI) o hidróxido de sodio (NaOH), según corresponda.

Completar el volumen final a 5 litros y volver a verificar el pH.

**b)** Tomar una tableta de PBS y disolver en 100 mL de agua destilada.

Las soluciones permanecen estables durante un mes.

**C.2.5** Preparación de la muestra analítica.

**C.2.5.1** Pesar 50 g de la muestra molida e introducirla en el vaso de la licuadora.

**C.2.5.2** Adicionar 5 g de cloruro de sodio y 100 mL de metanol al 80%.

**C.2.5.3** Licuar durante un minuto a alta velocidad.

**C.2.5.4** Filtrar a través de papel aflautado de 24 cm de Ø. (Filtrado 1).

**C.2.6** Extracción de las AF por medio de columnas de inmunoafinidad.

**C.2.6.1** Medir 10 mL del filtrado 1 y adicionar 40 mL de agua destilada. Mezclar y filtrar a través de papel fibra de vidrio (filtrado 2).

**C.2.6.2** Medir 5 mL del filtrado 1 y adicionar 35 mL de agua destilada. Mezclar y filtrar a través de papel fibra de vidrio (filtrado 2).

**C.2.6.3** Conectar una columna de inmunoafinidad a la punta de una jeringa de vidrio colocada en la bomba manual. En caso de ser necesario pasar a través de la columna 20 mL de PBS.

**C.2.6.4** En el caso de seguir el procedimiento descrito en C.2.6.1, medir 10 mL filtrado 2 en la jeringa.

**C.2.6.5** En el caso de seguir el procedimiento descrito en C.2.6.2, medir 15 mL del filtrado 2 en la jeringa.

**C.2.6.6** Quitar la tapa de la columna de inmunoafinidad y pasar el filtrado2 a través de ella a razón de un flujo de dos gotas por segundo. Colectar en el frasco para residuos.

**C.2.6.7** Lavar la columna dos veces, con 10 mL de agua cada vez.

**C.2.6.8** Pasar aire por la columna llevándola a sequedad.

**C.2.6.9** En caso de seguir el procedimiento descrito en C.2.6.4., añadir 1 mL de metanol grado HPLC, eluir y recibir en una celda de borosilicato.

**C.2.6.10** En caso de seguir el procedimiento descrito en C.2.6.5., añadir 2,3 mL de metanol grado HPLC, eluir y recibir en una celda de borosilicato.

**C.3** Cuantificación por fluorometría.

**C.3.1** Calibración de los fluorómetros.

La calibración del fluorómetro debe hacerse de acuerdo con la que señale el "Manual del fabricante".

**C.3.2** Procedimiento de cuantificación.

**C.3.2.1** Una vez separadas las AF de conformidad con lo señalado en el punto C.2.6, proceder con los siguientes pasos:

**C.3.2.1.1** Adicionar solución reveladora 1 mL (si se siguió el procedimiento C.2.6.1) o 2 mL (si se siguió el procedimiento C.2.6.2).

**C.3.2.1.2** Agitar la celda en el agitador tipo vórtex (eliminar las burbujas que se forman).

**C.3.2.1.3** Colocar la celda en el fluorómetro previamente calibrado.

**C.3.2.1.4** Leer la concentración de AF totales después de 60 segundos, directamente en µg/kg.

**C.4** Método HPLC.

**C.4.1** Fundamento.

Las AF son extraídas de la muestra, con metanol al 80%, el extracto es filtrado, diluido con agua y pasado a través de una columna de inmunoafinidad la cual contiene un anticuerpo monoclonal específico para AF B1, B2, G1 y G2. Las AF son aisladas, purificadas y concentradas en la columna y posteriormente son eluidas con acetonitrilo. El eluido es derivatizado con ácido trifluoroacético. Las AF son cuantificadas en forma individual por cromatografía en fase reversa y detectadas por fluorometría.

**C.4.2** Materiales.

**C.4.2.1** Columnas de inmunoafinidad.

**C.4.2.2** Papel filtro aflautado de 24 cm Ø.

**C.4.2.3** Papel filtro fibra de vidrio de 11 cm Ø.

**C.4.2.4** Matraces Erlenmeyer de 125 mL.

**C.4.2.5** Vasos precipitados de 100 mL.

**C.4.2.6** Embudos de plástico de 100 mm Ø.

**C.4.2.7** Embudos de plástico de 60 mm Ø.

**C.4.2.8** Dosificador de 1 a 5 mL.

**C.4.2.9** Dosificador de 10 a 50 m.

**C.4.2.10** Micropipetas digitales de 10 a 100 µL; 100 a 1000 µL.

**C.4.2.11** Filtros para solventes orgánicos de 47 mm y poro de 0,45 µm.

**C.4.2.12** Filtros para solventes acuosos de 47 mm y poro de 0,45 µm.

**C.4.2.13** Equipo de filtración Millipore o similar.

**C.4.2.14** Dosificador de 20 a 100 mL.

**C.4.2.15** Probeta de 1000 mL.

**C.4.2.16** Pipetas volumétricas de 10 mL.

**C.4.2.17** Pipetas volumétricas de 5 mL.

**C.4.2.18** Pipetas volumétricas de 1 mL.

**C.4.2.19** Auxiliar de macropipeteado.

**C.4.2.20** Jeringas de vidrio de 10 mL.

**C.4.2.21** Probeta graduada de 100 mL.

**C.4.2.22** Frascos vial de vidrio ámbar con tapón de rosca capacidad de 4 mL.

**C.4.2.23** Frascos de vidrio de 1 litro para almacenamiento de fase móvil.

**C.4.2.24** Viales de vidrio ámbar de 1,8 mL con septum de rosca.

**C.4.2.25** Filtros para muestras de politetrafluoretileno de 13 mm y poro de 0,45 µm.

**C.4.2.26** Matraces aforados color ámbar de 50 y 100 mL.

**C.4.2.27** Matraces volumétricos de 1 y 2 L.

**C.4.2.28** Jeringas desechables de 5 mL con aguja.

**C.4.2.29** Frascos color ámbar de 100 mL con tapón.

**C.4.2.30** Celdas de cuarzo para espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz.

**C.4.2.31** Pipetas Pasteur.

**C.4.2.32** Pipetas volumétricas de 25 mL.

**C.4.3** Equipo.

**C.4.3.1** Sistema de degasificación de solventes por membrana de vacío, inyección de helio u otro equivalente.

**C.4.3.2** Bombas de gradiente con válvula para mezclado de cuatro solventes o sistema isocrático de bombas.

**C.4.3.3** Inyector automático o manual de muestras con loop de 50 µL o más y sistema de autolimpieza.

**C.4.3.4** Columna HPLC C-18 de 4,6 x 250 mm o 4,6 x 150 mm, 5 µm de tamaño partícula.

**C.4.3.5** Detector de fluorescencia con lámpara pulsada de Xenón y filtros de excitación a 360 nm y de emisión de 450 nm.

**C.4.3.6** Graficador, integrador de datos o computadora personal con el software adecuado para el control del equipo y procesamiento de datos.

**C.4.3.7** Balanza granataria con una precisión de 0,1 g.

**C.4.3.8** Baño de agua con temperatura controlada 65°C.

**C.4.3.9** Molino para granos.

**C.4.3.10** Licuadora a alta velocidad con jarra de acero inoxidable de 250 mL.

**C.4.3.11** Espectrofotómetro de Ultravioleta - visible capaz de hacer barrido de 330 a 370 nm.

**C.4.4** Preparación de reactivos.

**C.4.4.1.** Agua grado HPLC filtrada a través de poro de 0,45µm.

**C.4.4.2** Acetonitrilo grado HPLC filtrado a través de poro de 0,45µm.

**C.4.4.3** Metanol grado HPLC filtrado a través de poro de 0,45µm.

**C.4.4.4.** Fase móvil: agua 60%, acetonitrilo 20%, metanol 20%, para columna de 4,6 x 250 mm y agua 70%, acetonitrilo 12% y metanol 18% para columna de 4,6 x 150 mm. Las proporciones de la fase móvil pueden ajustarse a fin de obtener una buena resolución de las AF.

**C.4.4.5** Acido trifluoroacético.

**C.4.4.6** Agua destilada.

**C.4.4.7** Acido acético glacial.

**C.4.4.8** Solución derivatizadora.

Mezclar 10 mL de ácido trifluoroacético, 5 mL de ácido acético glacial y 35 mL de agua destilada. Filtrar a través de poro de 0,45µm.

**C.4.4.9** Benceno grado espectrométrico.

**C.4.4.10** Acetonitrilo grado espectrométrico.

**C.4.4.11** Patrones individuales certificados de AFB1, B2, G1 y G2 en cristales o películas.

**C.4.4.12** Mezcla de benceno-acetonitrilo (98+2).

Medir 98 mL de benceno y mezclar con 2 mL de acetonitrilo. Guardar en frasco color ámbar bien tapado.

**C.4.4.13** Acido sulfúrico concentrado.

**C.4.4.14** Dicromato de potasio.

**C.4.4.15** Solución de ácido sulfúrico 0,018 N.

Disolver 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y aforar a 2 L con agua.

Soluciones patrón de dicromato de potasio.

Aproximadamente 0,25 mM. Pesar exactamente 78 mg de dicromato de potasio previamente secado en estufa a 100 - 105C durante 2 h, y aforar a 1 L con ácido sulfúrico 0,018 M.

**C.4.4.16.1** Aproximadamente 0,125 mM. Diluir 25 mL de la solución de 0,25 mM a 50 mL con ácido sulfúrico 0,018 M.

**C.4.4.16.2** Aproximadamente 0,0625 mM. Diluir 25 mL de la solución de 0,125 mM a 50 mL con ácido sulfúrico 0,018 M.

**C.4.5** Preparación de soluciones patrón de AF.

**C.4.5.1 I**nyectar con jeringa desechable y sin abrir los frascos que contienen la aflatoxina, aproximadamente 4 mL de mezcla de benceno: acetonitrilo 98+2. Agitar en mezclador vórtex hasta completar disolución.

**C.4.5.2** Abrir con mucho cuidado cada uno de los frascos y, trasvasar analíticamente a un matraz aforado de 100 mL. Aforar con mezcla de benceno: acetonitrilo (concentración aproximada de 100 µg/mL).

**C.4.5.3** Medir exactamente 10 mL de esta solución y aforar a 100 mL con benceno: acetonitrilo 98+2 (concentración aproximada de 10 µg/mL).

**C.4.5.4** Trasvasar las soluciones anteriores a un frasco color ámbar con tapón y debidamente identificado, y guardar en congelación hasta su uso.

**C.4.6** Obtención del espectro de absorción.

**C.4.6.1** Dejar equilibrar a temperatura ambiente cada una de las soluciones estándar de aproximadamente 10 µg/mL.

**C.4.6.2** Calibrar el espectrofotómetro a 0 de absorbancia utilizando una solución de benceno: acetonitrilo 98+2 como blanco.

**C.4.6.3** Efectuar un barrido de 330 a 370 nm de cada una de las soluciones y obtener el valor de absorbancia a la longitud de máxima absorción, la cual debe estar cercana a 350 nm.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Aflatoxina** | **Absorbancia máxima (A)** | **Peso molecular (PM)** | **Coeficiente de extinción ()** |
| B1 |  | 312 | 19,800 |
| B2 |  | 314 | 20,900 |
| G1 |  | 328 | 17,100 |
| G2 |  | 330 | 18,200 |

**C.4.6.4** Regresar las soluciones de cada una de las AF a su frasco original.

**C.4.6.5** Cálculo de la concentración.

g AF/mL = A x PM x 1000 x FC

donde:

FC = Factor de corrección (confrontar instrucciones para el cálculo de factor de corrección).

Cada una de las soluciones debe presentar una concentración entre 8 y 10 µg/mL.

**C.4.7** Cálculo del factor de corrección (FC).

**C.4.7.1** Calibrar el espectrómetro a 0 de absorbancia utilizando ácido sulfúrico 0,018 N como blanco.

**C.4.7.2** Leer la absorbancia de las tres soluciones de dicromato de potasio de menor a mayor concentración, a la longitud de onda de máxima absorción, la cual debe ser cercana a 350 nm.

**C.4.7.3** Llenar la siguiente tabla con los valores de absorbancia obtenidos y los cálculos realizados:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Sol. Dicromato de potasio (mM)** | **Absorbancia a 350 nm (A)** | **= Ax 1000/mM** |
| 0,25 |  |  |
| 0,125 |  |  |
| 0,0625 |  |  |
|  |  | promedio = |

**C.4.7.4** Calcular el factor de corrección (FC) aplicando la siguiente ecuación:



donde:

3160 es el coeficiente de extinción () para soluciones de dicromato de potasio.

El valor de FC debe estar en el intervalo de 0,95 a 1,05, de no ser así verificar el instrumento o la técnica para determinar y eliminar la causa.

**C.4.8** Preparación de la solución madre de AF de 1000 ng/mL.

De las soluciones madre de AF individuales y de concentración conocida (10 µg/mL), medir las cantidades en microlitros que correspondan a 500 ng de B1, 300 ng de B2, 100 ng de G1 y 100 ng de G2 para preparar 50 mL de la misma. Aforar a 50 mL con solución de benceno: acetonitrilo (98+2) y agitar. Guardar en frasco vial de vidrio color ámbar perfectamente identificado y en congelación. Cada µL de solución equivale a un ng de AF totales.

**C.4.9** Preparación de las soluciones patrón de trabajo.

Medir 20, 50, 100, 150 y 200 µL de la solución madre (1000 ng/mL) en viales de vidrio ámbar. Evaporar a sequedad con nitrógeno. Añadir 1 mL de acetonitrilo grado HPLC. Agitar y guardar en congelación hasta su uso.

**C.4.10** Curva estándar de AF en ng/mL.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **AF** | **B1** | **B2** | **G1** | **G2** | **Totales** |
| Conc. 1 | 10 | 2 | 6 | 2 | 20 |
| Conc. 2 | 25 | 5 | 15 | 5 | 50 |
| Conc. 3 | 50 | 10 | 30 | 10 | 100 |
| Conc. 4 | 75 | 15 | 45 | 15 | 150 |
| Conc. 5 | 100 | 20 | 60 | 20 | 200 |

**C.4.11** Preparación de las muestras.

Una vez separadas las AF de conformidad con lo señalado en el punto C.2.6, proceder con los siguientes pasos:

**C.4.11.1** Añadir acetonitrilo 1 mL (si se siguió el procedimiento descrito en C.2.6.1) o 1,5 mL (si se siguió el procedimiento descrito en C.2.6.2).

**C.4.11.2** Eluir y colectar en un frasco vial color ámbar. Guardar en congelación hasta su uso.

**C.4.12** Derivatización de las AF B1 y G2.

**C.4.12.1** Sacar del congelador las mezclas patrón de trabajo y las muestras preparadas. Llevar a temperatura ambiente.

**C.4.12.2** Medir 200 µL de cada una de ellas y adicionar 700 µL de solución derivatizadora, todo en un frasco vial de 1,8 mL. Mezclar por 30 seg.

**C.4.12.3** Incubar a 65°C durante 10 min en baño de agua.

**C.4.12.4** Enfriar al chorro de agua. Filtrar a través de filtro para muestras de 0,45 L.

**C.4.12.5** Guardar en congelación hasta su uso.

**C.4.13** Acondicionamiento del cromatógrafo de líquidos.

**C.4.13.1** Encender todos los componentes del sistema de cromatografía.

**C.4.13.2** Fijar los siguientes parámetros cromatográficos de acuerdo con las instrucciones de operación del equipo:

Fase móvil:

Para columna de 4,6 x 250 mm: agua 60%, acetonitrilo 20%, metanol 20%.

Para columna de 4,6 x 150 mm: agua 70%, acetonitrilo 12%, metanol 18%.

Flujo: 1 mL/min.

Volumen de inyección: 50 L.

Tiempo de análisis: 15 min.

Detector de fluorescencia:

Excitación: 360 nm.

Emisión: 440 nm.

**C.4.13.3** Ajustar la atenuación y el factor de respuesta del detector a fin de obtener una sensibilidad óptima.

**C.4.13.4** Purgar las bombas del sistema con cada uno de los componentes de la fase móvil usando un flujo de 10 mL/min. Colectar aproximadamente 20 mL.

**C.4.13.5** Correr la fase móvil a través de todo el sistema a un flujo de 1 mL/min, hasta obtener una línea base estable (aproximadamente 30 min).

**C.4.14** Acondicionamiento del método.

**C.4.14.1** Inyectar 50 µL de la mezcla estándar de trabajo derivatizada equivalente a 100 ng/mL de AF totales.

**C.4.14.2** Verificar una buena resolución de las 4 AF así como optimizar el tiempo de corrida (aproximadamente 15 min). Las AF eluyen en el siguiente orden: G1, B1, G2 y B2. Considerar el tiempo de retención de cada aflatoxina.

**C.4.14.3** Inyectar por triplicado 50 L de cada una de las cinco mezclas patrón de trabajo.

**C.4.14.4** Obtener e imprimir el cromatograma de cada una de ellas.

**C.4.14.5** Graficar la concentración de cada aflatoxina contra el área promedio del pico obtenida. Calcular mediante regresión lineal la pendiente, el factor de correlación y la ordenada al origen de cada uno de los gráficos.

1. L solución madre de 1000 ng/mL totales.

2. Cantidad de AFG1 en ng.

3. Area promedio de pico de AFG1 en ng.

4. Cantidad de AFB1 en ng.

5. Area promedio de pico de AFB1 en ng.

6. Cantidad de AFG2 en ng.

7. Area promedio de pico de AFG2 en ng.

8. Cantidad de AFB2 en ng.

9. Area promedio de pico de AFB2 en ng.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** |
| 20 | 6 |  | 10 |  | 2 |  | 2 |  |
| 50 | 15 |  | 25 |  | 5 |  | 5 |  |
| 100 | 30 |  | 50 |  | 10 |  | 10 |  |
| 150 | 45 |  | 75 |  | 15 |  | 15 |  |
| 200 | 60 |  | 100 |  | 20 |  | 20 |  |

**C.4.15** Inyección de muestras.

**C.4.15.1** Inyectar 50 L de cada una de las muestras derivatizadas.

**C.4.15.2** Obtener e imprimir el cromatograma de cada una de ellas.

**C.4.15.3** Identificar cada una de las AF comparando el tiempo de retención contra el obtenido para cada uno de los patrones.

**C.4.15.4** Obtener el valor del área de cada AF en la muestra.

**C.4.16** Expresión de resultados.

g/kg de AF en la muestra =

Area de pico - ordenada al origen x 1 o 1,5 x dilución

pendiente

Se utilizará 1 o 1,5 dependiendo de la cantidad de acetonitrilo que se agregó al eluato.

El resultado será la sumatoria de los valores de las distintas AF.

**C.4.17** Limpieza del sistema de cromatografía.

**C.4.17.1** Al terminar los análisis, apagar el detector y el inyector automáticos.

**C.4.17.2** Bombear acetonitrilo o metanol por espacio de media hora.

**C.4.17.3** Posteriormente apagar el sistema de bombas y la computadora.

**C.4.18** Descontaminación de material.

Para la descontaminación del material y equipo utilizado en la determinación de AF, se recomienda seguir el procedimiento establecido en el Apéndice informativo B.