



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN), León
Tesis para optar a la Maestría en Gestión de la Calidad y Química
Analítica

30 de julio
2009.

Evaluación de Parámetros de
Calidad al análisis de
Aflatoxinas en Alimento
Formulados llevada por
Cromatografía Líquida de Alta
resolución

Autora: Lic. Indiana Lucia Zapata Acosta

Tutor: MSr. Fabio
Palavishini

	Índice	
	Contenido	Página
1	1. Resumen	4
2	2. Introducción	5
3	Objetivos	6
4	Marco Teórico	7-15
4.1.	Incidencia sobre la Salud	8-9
4.2.	Técnica de Muestreo	9-12
4.3.	Identificación de la Muestra	12-13
4.4.	Conservación y Transporte	13
4.5.	Cromatografía Liquida de Alta Resolución	14-15
5	Análisis	16
5.1.	Desecho	16
6	Datos Evaluados en la Validación	17-24
6.1.	Selectividad	17-19
6.2.	Linealidad y Rango	18-20
6.3.	Precisión	20
6.4.	Repetibilidad	20-21
6.5.	Intervalos de Confianza	21
6.6.	Precisión Intermedia	21
6.7.	Reproducibilidad	22
6.8.	Exactitud	22
6.9.	Relación Señal Ruido	22-23
6.10.	Parámetros Cromatograficos evaluados en la Validación	23-24
7.	Procedimiento analítico del Método de ensayo	24-28
7.1.	Tendencia de Trabajo durante la realización y montaje de la determinación de Aflatoxinas por Cromatografía Liquida de Alta Resolución	24-28
8.	Procedimiento de Validación	28-34
8.1.	Relación Señal Ruido	28
8.2.	Selectividad	28
8.3.	Numero de Platos Teóricos	29
8.4.	Linealidad y Rango	29
8.5.	Precisión	29-30

8.6. Repetibilidad	30
8.7. Precisión Intermedia	30
8.8 Exactitud	30-31
9. Resultados	32-56
9.1.1. Etapas de optimización de las condiciones Cromatográficas	32-33
9.1.2. Evaluación de los estándares individuales de la mezcla por separado	33-35
9.1.3. Determinación de las condiciones optimas de trabajo en la determinación de las Aflatoxinas	35-38
9.2 Carta de Control para la evaluación del numero de platos teóricos de la columna C18	39-41
9.3. Evaluación del limite de detección y Cuantificación para las Aflatoxinas	42
9.4. Repetibilidad de las Toxinas	43-47
9.5. Repetibilidad y las medias por día de los estándares de las Aflatoxinas	47-52
9.6. Linealidad y Rango	53-56
9.7. Análisis de los residuales	57-58
9.8. Recuperación de los estándares de Aflatoxinas	58
9.9. Determinación de la Incertidumbre	59-71
9.9.1. Estimación de la Incertidumbre para la Concentración de la muestra	59-64
9.9.2. Estimación de la incertidumbre para el Porcentaje de recuperación en las muestras	64-71
10. Conclusiones	72-74
11. Recomendaciones	74
12. Definiciones	75-76
13. Anexos	75-83
14. Bibliografía	84-85

1. RESUMEN

Dentro de las toxinas que por lo general se pueden desarrollar en los alimentos balanceados son propensos a este tipo de contaminaciones por diferentes agentes dentro de los que se destaca principalmente la humedad de almacenamiento y mala limpieza al contenerlo además de poco o ningún control de análisis preventivos para este tipo de contaminación.

Por lo que el estudio de las Aflatoxinas es de gran importancia para la inocuidad de los Alimento, en esta monografía se evalúan todas las posibles causas que ocasionarían controles de rutina al momento de realizar una jornada de trabajo que represente la cuantificación de estas Aflatoxinas en muestras de alimento. A medida que se fue desarrollando el estudio se determinaron diferentes puntos que se considerarían como críticos para la cuantificación.

El ensayo se valido haciendo diferentes pruebas que ocasionarían de alguna manera fuentes de cambios o inferencias al momento de la cuantificación, a los que serian sometido el ensayo como rutina y bajo los cuales se evaluaron previendo cualquier errores en la determinación. Los estándares de rutina en esta determinación vienen expuestos para su cuantificaciones en presentaciones de ampolla de 1.5 ml las cuales se encuentran conformada por una mezcla de Aflatoxinas de diferentes concentraciones (Aflatoxina B1=990 ppb, Aflatoxina B2 287 ppb, Aflatoxina G1=0.940 ppb, Aflatoxina G2=0.285 ppb),

Se decidió primero inyectar cada uno de los estándares individuales los cuales se evaluó sus tiempos de retención así como su comportamiento individual (simetría de pico, pico único), las diferencias fueron significativas y se determino en que tiempo cada toxina quedaba retenida en la columna sin temor a equivocaciones.

Las demás pruebas (como ruido, estabilidad de la fase móvil, resolución de la mezcla y buena separación) fueron realizadas con inyecciones sucesivas de estándares en las condiciones optimas de trabajo, las cuales determinaron mejor selectividad sin sacrificar en el proceso la simetría de los picos, luego fueron evaluados el ámbito lineal de cada una de las Aflatoxinas en la mezcla así como tendencia a diferentes niveles de concentración (el aumento o decenso simétrico de las áreas de los estándares de las aflatoxinas vs concentración de los estándares), una vez determinada la concentración de lineal para las cuantificaciones se procedió a realizar diluciones del estándar del nivel primario.

Se inyectó diferentes concentraciones de la mezcla de Aflatoxinas siempre en concentraciones descendente hasta tener una diferencia significativa con relación a la señal del ruido producido por los solventes que arrastran el analito de la columna, produciendo de esta manera los limites de detección y cuantificación de la técnica de análisis (HPLC).

Los parámetros cromatograficos como el número de platos teóricos se programo mediante el software para así saber como era el comportamiento de la columna al momento de la separación de la mezcla. Un punto de la curva ya predeterminada fue inyectado consecutivamente a lo largo de una semana para evaluar la repetibilidad de las aéreas de los

estándares así como su estabilidad en diferentes días, también por diferentes analistas dando como resultado estos factores de cambios poca significancia.

Se evaluó la incertidumbre tanto para la concentración de la muestra como para el porcentaje de recuperación el cual se realizó mediante la adición controlada de una concentración conocida del estándar de las Aflatoxinas a una muestra en blanco previsto para esta concentración bajo la técnica de análisis de HPLC, dando buenos resultados y evaluando todos los puntos críticos que intervienen en las extracciones y cuantificaciones de los mismos.

2. INTRODUCCION

Las aflatoxinas son un grupo de compuestos tóxicos producidos principalmente por algunas especies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nominus*). Los mohos toxigénicos son capaces de desarrollarse en gran variedad de sustratos, pudiendo contaminar los alimentos cuando éstos son cultivados, procesados, transformados o almacenados en condiciones adecuadas que favorezcan su desarrollo.

El crecimiento de los mohos y la producción de toxinas dependen de muchos factores tales como el sustrato, la temperatura, el pH, la humedad relativa y la presencia de microflora competidora.

Aunque las aflatoxinas pueden encontrarse en muchos productos agrícolas, los mayores niveles de contaminación se han encontrado en semillas de algodón y maíz, cacahuetes, nueces, avellanas y otros frutos secos. Las condiciones climáticas de las zonas tropicales favorecen la formación de aflatoxinas, sin embargo, también pueden producirse en zonas más templadas.

Las aflatoxinas son un grupo de derivados difuranocumarínicos relacionados estructuralmente. Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales las más frecuentes en los alimentos son la B1, B2, G1, G2, M1 y M2.

Las aflatoxinas poseen actividad mutágena y carcinógena y por tanto su presencia en los alimentos ha de reducirse al mínimo. La más tóxica es la AB1, y en orden decreciente le siguen AM1, AG1, AB2, AG2. El IARC (International Agency for Research on Cancer) incluye las aflatoxinas dentro del grupo 1, considerándolas cancerígenas para el hombre. Asimismo, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios calificó las aflatoxinas como potentes carcinógenos humanos, pero consideró que no existía suficiente información para establecer una cifra del grado de exposición tolerable, recomendando que se rebajaran al mínimo las ingestas dietéticas para reducir el riesgo potencial.

Los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos para consumo humano están regulados por el RD 475/198883 y son los siguientes: 10 µg/kg para la suma de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 y 5 µg/kg para la aflatoxina B1.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

3.1.1. Evaluar parámetros de validación y la incertidumbre para el análisis de Aflatoxinas en muestras de Alimentos Formulados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.2.1. Seleccionar las condiciones óptimas para realizar la cuantificación de Aflatoxinas en alimentos por HPLC con ayuda del detector de Fluorescencia tales como: composición de la fase móvil, flujo, fase estacionaria.

3.2.2. Estudiar algunos parámetros de validación como: respetabilidad, exactitud, linealidad, efecto de matriz, limite de detección y de cuantificación, sensibilidad.

3.2.3. Evaluar la incertidumbre de las concentraciones de Aflatoxinas usando la guía ISO GUM 1995.

3.2.4. Aplicar el método a diferentes muestras de alimentos para la determinación de Aflatoxinas.

4. MARCO TEORICO

Los hongos son organismos eucariotas, es decir poseen núcleo verdadero, están rodeados de membrana celular y son portadores de varios cromosomas. Pueden ser unicelulares y pluricelulares las levaduras por ejemplo, son hongos unicelulares que se reproducen primariamente por gemación. Sin embargo la mayor parte de los hongos están formados por largas cadenas de células denominadas hifas, al conjunto o masa de las células se denomina micelo.

Los hongos miceliales o filamentosos incluyen todos los denominados mohos, como *Penicillium*, *Aspergillus*, o el moho negro del pan, así como las setas en general. Esta forma de cuerpos fructíferos multicelulares aunque la mayor parte de vegetativa de las plantas es micelias y cuando se cultivan en el laboratorio su aspecto es muy parecida al de los mohos. Como organismo sin clorofila los hongos, a diferencia de las plantas verdes, no poseen la capacidad de realizar la fotosíntesis, por lo que necesitan el suministro del carbono fijado orgánicamente. Muchos hongos utilizan la materia orgánica muerta como alimento por liberación de enzimas que digieren sustancias que contienen compuestos que los hongos usan como energía (azúcares por ejemplo) y metabolitos secundarios, la mayoría de los cuales son tóxicos para las células humanas y animales y se denominan micotoxinas. Algunos de estos de estos compuestos secundarios, que son tóxicos para las células bacterianas, denominan antibióticos, como en el caso de la Penicilina.

El papel de la Micotoxina en la vida de los hongos no ha sido establecido claramente, aunque una importante función parece ser la competición reguladora con otros organismos. Las micotoxinas son muy diferentes en estructura molécula, desde simples moniliformes (cuya disposición similar a las cuentas de un collar) hasta complicados polipéptidos de peso molecular alrededor de 2000. En general estos compuestos (las Aflatoxinas) no son volátiles y permanecen asociados a la estructura de los hongos, esporas o en el sustituto en el que crecen los hongos. Aunque la formación de toxinas por parte de los hongos no es un proceso totalmente generalizado, se parte de la idea de que si un hongo que produce toxinas esta presente en el ambiente, probablemente su toxina también lo estará.

Las Aflatoxinas son un grupo de sustancias producidas por algunos hongos en pequeña cantidad, como metabolitos secundarios. Actualmente se conoce unos 2 compuestos químicamente similares, de elevada toxicidad y carcinogenicidad. Las aflatoxinas fueron descubiertas en 1960 por un grupo de investigadores británicos. Su nombre procede de las toxinas del *Aspergillus flavus* y fue propuesta en 1962 por sus descubridores.

Se han clasificado con el nombre de tricotésenos mas de 40 micotoxinas derivadas de un compuesto terpenico de cuatro ciclos, el escirpen, caracterizado por la presencia en posición 12-13 de un ciclo aproximadamente estable, implicado en enfermedades humanas y animales. Entre los tricotésenos que han sido detectados en cereales contaminados se encuentra la toxina T-2 (un tricoteceno producido por *Fusarium*). Las diferentes formas de micotoxinas, los tricotocenos se encuentran entre las

bioquímicamente mas activas, son muy solubles en aguas y pueden hallarse en forma de aerosoles en el medio ambiente; en solución diluida son estables bajo la acción de la luz, al contrario de las aflatoxinas, que se degradan.

4.1 INCIDENCIAS SOBRE LA SALUD

Los efectos nocivos de la Micotoxinas sobre la salud humana son conocidos desde hace tiempo. La enfermedad de “La Feria de San Antonio”, por ejemplo, adquirida por los espigadores de centro (contaminado por hongos toxicogenicos) en los campos después de la cosecha se halla documentado desde la Edad Media. A principio de los años 60 murieron cerca de 100.000 pavos en Inglaterra después de haber comido pienso contaminado con hongos *Aspergillus*. Desde entonces se ha publicado estudios sobre la toxicología de las micotoxinas, que suelen afectar, parte de los órganos como el hígado, estomago, etc, a los sistemas inmunes y nerviosos y presenta carácter carcinogénicos.

Las aflatoxinas fueron aisladas a partir de los años sesenta, cuando la extensión del tumor del hígado e los animales de crianza ingleses y estadounidenses alcanzo niveles espectaculares. Los estudios que se iniciaron rápidamente llevaron a la identificación de los agentes etiológicos que producían dichas alteraciones y que estaban contenidos en alimentos contaminados con *Aspergillus Flavus* y *Aspergillus Parasitticus*. Las Aflatoxinas mas importantes que se conocen son las B (B1, B2, B2a) y G (G1, G2, G2a) denominadas así por la fluorescencia azul y verde respectivamente emitida por excitación a 365nm, las M (M1 y M2) aisladas de la leche del cultivo de *A. Flavus* y de los mini enmohecidos y la aflatoxina Ro también llamada aflatoxido. El aspecto más importante a destacar es que algunos de estos compuestos son potentes carcinogénicos asociándose a la etiología del cáncer de hígado en algunos países tropicales. La mas toxica de las Aflatoxinas es la B, denominada comúnmente B1, que da una respuesta muy positiva en el test de Ames y al de Carcinogenicidad sobre ratas y ratas, considerándose que es una de las sustancias conocidas con mayor poder mutágeno y carcinogénico.

4.1.1. INHALACION

La inhalación de materia contaminada con micotoxinas, tiene como consecuencia su transporte al tejido superficial alveolar donde, en el caso de otras micotoxinas interfiere en la eliminación normal de partículas por el sistema mecrafago. Puede producirse, además un incremento de las infecciones por bacterias oportunistas.

Aunque la mayor parte de los hongos producen micotoxinas, los más conocidos y posiblemente, los metabolitos mas tóxicos están producidos por las especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillum*, *Stachybotrus*, y *Myrothecium*. Sin embargo, aunque ninguno de estos hongos es abundante en el aire exterior y solo adquiere niveles muy alto durante la actividad agrícola, puede ser contaminantes habituales en ambientes interiores.

Dado que las micotoxinas no son sustancias volátiles, normalmente solo existe la exposición por inhalación cuando pasan al medio ambiente parte de los hongos, las esporas, en las

cuales se ha comprobado que existen concentraciones elevadas de toxinas o de substratos contaminadas (por ejemplo, polvo de grano)

4.2. TECNICA DE MUESTREO [14.1-14.7]

Para este estudio se realizara un plan de muestreo basado en Atributos el cual es un plan de muestreo para la inspección por atributos este es un método para evaluar la calidad de un lote consiste en clasificar cada porción de muestreo como una característica o atributo conforme o no conforme según se cumpla o no una especificación, esta puede ser cualitativa o cuantitativa. Se cuenta luego con un número de porciones de muestreo que pertenecen al atributo de no conforme y, si no se sobrepasa el número de aceptación establecido por el plan, se acepta el lote en caso contrario se rechaza.

Dentro del plan de muestreo por atributos se determino que su línea más segura para este tipo de estudio era:

- ✓ ***El Plan de Muestreo Doble;*** Este plan se basa en la medición de una muestra. Si cumple un límite se acepta el Lote. Pero si queda en una zona de duda entre dos límites especificados se toma otra muestra. Dependiendo del resultado de la evaluación de la segunda muestra se decide la aceptación o rechazo definitivo del lote. Este tipo de plan de muestreo tiene dos ventajas:
 - La primera muestra tomada es menor que la se requiere para un plan simple de muestreo y si en todo caso es aceptado o rechazado el lote con la primera muestra hay un considerable ahorro.
 - Por otro lado tiene la conveniencia psicológica de que en ciertas ocasiones se le da al evaluado una segunda oportunidad de aceptación.

4.2.1. MUESTRA DE ALIMENTO

Muestra se define como “una porción o atributo que indica la calidad de todo lo que ha sido tomado”.

El objetivo del muestreo, como se indico anteriormente, es seleccionar una porción o un número de recipientes o de unidades de producto que sea representativo de un lote de alimentos determinado. Cabe aclarar que la mayoría de alimentos que hay que muestrear no son homogéneos por lo tanto es imposible tomar una muestra representativa perfecta.

Es importante la coordinación entre los responsables de la toma de muestra y de laboratorio con el fin de garantizar que las muestras tomadas sean analizadas con prontitud y determinar la capacidad del laboratorio, sus métodos de análisis y la cantidad de muestra necesaria. Los laboratorios pueden estar limitados por fallas de equipos, personal capacitado, etc.

Puede no ser necesario el análisis de las muestras cuando haya claros indicios de que los resultados del laboratorio confirmaran los resultados de la inspección. Sin embargo, si existe la posibilidad de pleito, congelación de productos o algún otro tipo de acción judicial, es necesario el apoyo analítico.

[14.1-14.7] Bibliografía seleccionada, mas información del documento, ver bibliografía en el capítulo 14.

El plan de muestreo tiene el principio estadístico de que todas las unidades o porciones de materiales tienen la misma probabilidad de ser tomadas de forma tal que la muestra obtenida es lo mas representativo posible. Además estamos enfocados a verificar la calidad de los productos lo que esto incluye características como olor, sabor, tamaño, textura, aspectos, defectos, inocuidad y unidades defectuosas por lote.

Estas unidades defectuosas no son aplicables a para los factores que constituyen peligro para la salud o que por calidad sean altamente objetables para el consumidor, tales como presencia de sustancias contaminantes, insectos, materias extrañas, etc.

4.2.1.1.CRITERIOS PARA LA TOMA DE MUESTRA

- ✓ Los alimento expuestos al aire libre y a otras contaminaciones, no requieren restricciones estrictas asépticas.
- ✓ Cuando se requiera tomar muestras asépticamente, estas no deben tomarse en áreas donde las condiciones sanitarias puedan dar lugar a la contaminación de la misma.
- ✓ Es necesario que el personal que lleva acabo el muestreo se lave las manos antes de desarrollar este. Para muestreo aséptico debe utilizar: bata, cofia y cubre boca. E ser necesario el contacto directo de las manos con el producto deberá usarse guantes estériles.
- ✓ La toma de muestra debe hacerse con rapidez, pero cuidadosamente. Los recipientes para la toma de muestra deben abrirse únicamente al momento de introducir esta y cerrarlos de inmediato. No tocar el interior de los envases y evitar que la tapa se contamine.
- ✓ Para alimentos preparados sin envasar de consumo, se recomienda que la persona que elabora estos alimentos sea la que introduzca la muestra a los recipientes o bolsas estériles con los utensilios que emplea normalmente. Los alimentos que se encuentran en caliente se deben de conservar y trasladar a temperatura en que se muestrearon, esto únicamente si el traslado en menor a una hora, de los contrario debe enfriarse a temperatura ambiente y trasladarse en condiciones de refrigeración.
- ✓ Los productos a granel, se toma la muestra de varios puntos del contenedor para obtener una muestra representativa.

- ✓ Cuando la toma de la muestra se realice en un conducto de salida o una compuerta de partida a granel, antes de obtener la muestra se debe de dejar pasar las primeras fracciones del producto para limpiar dicha salida con el flujo.

4.2.1.2.MANEJO DE LA MUESTRA

En gran parte del éxito o fracaso de la evaluación de un lote usando un plan de muestreo depende de la adecuada selección de la muestra, la toma correcta, los medios de conservación y su transporte al laboratorio. Esto implica el considerar la naturaleza de las muestras y que la cantidad sea representativa del lote o partida de donde proviene.

Un plan de muestreo de aceptación es un conjunto de normas con arreglo a las cuales se inspección y clasifica un lote. El plan estipula el número de elementos, que habrá de ser seleccionados en forma aleatoria en un lote objeto de inspección, que constituirá la muestra. Un conjunto de planes y esquema de muestreo constituye un “sistema de muestreo”.

Para que el sistema de muestreo sea aceptable hay que considerar lo siguiente:

- Que la recolección de la muestra se efectuó evitando toda contaminación externa, tanto ambiental como humana, para asegurara la integridad de la misma.
- Que se indique en el informe del resultado lo datos pertinente que pudieran afectar la prueba o el significado del resultado, a fin de que el Laboratorio lo tome en consideración.

En ciertas circunstancias hay que considerar que las condiciones de conservación y transporte, tiempo comprendido entre la recolección de la muestra, su entrega al Laboratorio, así como la realización del análisis influye notablemente en los resultados obtenidos.

El análisis físico y químico tiene como finalidad de evidenciar si un alimento cumple los criterios de calidad aceptable para su composición física.

4.2.1.3.BUENAS PRÁCTICAS

✓ Material para la Toma de Muestra

Todo el material e instrumento que se utilice para la toma, manejo y transporte de muestra, que van a estar en contacto directo con el alimento, debe estar limpio para evitar contaminación indeseadas.

El Material para la toma de muestra que requiera de esterilización, se envolverá de forma individual, debidamente identificado, con papel de estraza antes de esterilizado. Una vez

esterilizado el material debe de ser protegido para evitar contaminación posterior. De ser necesario si se requiere de mayor numero de utensilios, limpiar los que hayan sido usados y empararlos con etanol o isopropanol al 70%, posteriormente flamearlos y colocarlos en recipientes estériles para evitar su contaminación o inmediatamente utilizarlos. Procedimientos para la toma de muestra a ser analizada por el laboratorio al momento de la determinación.

- 4.2.1.3..1. Este dependerá del tipo de producto y de la finalidad del examen.
- 4.2.1.3..2. El muestreo consiste en separar una serie de muestras representativas del lote para someterlas al análisis toxicológico.
- 4.2.1.3..3. Una vez decidido el número de muestras que hay que tomar mediante un plan de muestreo previamente establecido.
- 4.2.1.3..4. La toma de la muestra será selectiva esta es utilizada cuando se quiere aumentar la posibilidad de detectar productos defectuosos o que cumplen con las normas vigentes. Las muestras que se toman para atender reclamos se suelen seleccionar y de esta forma hay mayor posibilidad de confirmar hechos conocidos por esto se denomina muestra selectivas. Es selectiva porque se orienta a aumentar la probabilidad de tomar productos sospechosos.
- 4.2.1.3..5. Por regla general cada una de las unidades que constituye la muestra debe pertenecer al mismo lote, ya que las muestras pertenecientes al mismo lote han sido procesadas bajo condiciones idénticas (equipos, día, turno y materias primas entre otros).
- 4.2.1.3..6. Si los lotes del producto para exportación se encuentran entremezclados y no se pueden separar, se puede convidar que constituye un solo lote. Sin embargo se tiene el inconveniente de que los defectos hallados en uno de los lotes harán que todo el envío resulte sospechoso. La muestra será mezclada previamente de seleccionar el peso adecuado para dicha determinación, luego lo sobrante será almacenados en embases de vidrio y sellados con tapas además de envolver las tapas con parafina, para evitar contaminaciones cruzadas y tener la muestra testigo lo mas inalterada posible en caso de una no conformidad con el resultado obtenido por parte del cliente.
- 4.2.1.3..7. Una vez que se toma la porción de muestra necesaria para la determinación se a tomado para la realización del análisis, se procede al almacenamiento de alimento en bodega por un periodo de no menor de un meses y no mayor de dos meses.

4.3. IDENTIFICACION DE LA MUESTRA [14.8.1]

En la toma de muestra es indispensable identificar el recipiente claramente, inmediatamente antes o después de colocar la muestra, mediante rotulo o etiqueta (indelebles) con los siguientes datos:

- 4.3.1.** Identificación única
- 4.3.2.** Lugar de muestreo
- 4.3.3.** Fecha de muestreo
- 4.3.4.** Hora de Muestreo
- 4.3.5.** Descripción genérica del Producto
- 4.3.6.** Numero de lote
- 4.3.7.** Parámetros a analizar
- 4.3.8.** Nombre y firma del Muestreador.
- 4.3.9.** La etiqueta deberá colocarse entre la tapa y el cuerpo del frasco, la caja o el nido o cierre de la bolsa en forma que se evite que la muestra sea alterada o violada.

4.4. CONSERACION Y TRANSPORTE [14.7]

El manejo y transporte de la muestra deberá efectuarse de tal manera que se impida su ruptura, alteración o contaminación, evitando su exposición a la luz solar directa.

La muestra es entregada al Laboratorio lo más rápidamente posible. Los alimentos perecederos se transportan bajo condiciones de temperatura de 2 a 8°C y deberán mantenerse a esa temperatura hasta el momento de realizar las pruebas, las cuales deben de realizarse dentro las 24 horas después e su recolección.

En el caso de muestras no perecederas, evitar que se dan en, humedezcan o contaminen con otras.

Para la conservación, durante el transporte de la muestra no esta permitido el empleo de sustancias químicas.

Las muestras que se entregan al Laboratorio deberán acompañarse de un informe que además de contener la información de la muestra, incluya los siguientes datos:

- 4.4.1.** Numero de unidades y/o cantidad.
- 4.4.2.** Clave única que permita la identificación del domicilio del fabricante, representante y/o distribuidor.
- 4.4.3.** Observaciones, en donde se señale las condiciones sanitarias en las que se encontraron los productos antes de efectuar la toma de la muestra o algún otro

dato que sea significativo para determinar los análisis toxicológicos que sean necesarios.

4.4.4. La muestra testigo podrá eliminarse una vez que se obtengan resultados oficiales que indiquen el cumplimiento de las especificaciones sanitarias y el particular no decida llevar acabo su impugnación.

4.4.5. En el Laboratorio existe una zona específica para el almacenamiento de muestras. Esta área tiene las siguientes condiciones:

- ✓ Área Cerrada
- ✓ Temperatura ambiente y fresca
- ✓ Limpio y libre de espacio
- ✓ Libre de Corrientes de aire
- ✓ Con anaqueles adecuados para el almacenamiento de las muestras.
- ✓ Con refrigerador para muestras que requieren ser almacenadas a bajas temperaturas.
- ✓ Bien iluminado.

4.5 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN [14.10]

La **Cromatografía líquida de alta Resolución**o *High performance liquid chromatography* (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en química analítica. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En la *HPLC isocrática* el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como *elución en gradiente*. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas por tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.

4.5.1. Cromatografía de fase reversa

La HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste en una fase inmóvil apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe_2SiCl , dónde la R es una cadena alquil tal como

$C_{18}H_{37}$ ó C_8H_{17} . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos.

La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar.

El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Aparte de la hidrofobicidad de la fase móvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como que la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio para controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquiera resto de silica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

Las columnas de fase reversa se echan a perder con menor facilidad que las columnas de silica normales. Aun así, muchas columnas de fase reversa están formadas por silica modificada con cadenas alquil y no se deben utilizar nunca con bases en medio acuoso

puesto que éstas podrían dañar el esqueleto de silica subyacente. Las columnas se pueden utilizar en ácidos en medio acuoso pero no deberían estar expuestas demasiado tiempo al ácido porque puede corroer las partes metálicas del aparato de HPLC.

5. ANALISIS

Hay que establecer los procedimientos para asegura la integridad de la muestra en el análisis. Generalmente las condiciones se establecen en el proceso de diseño y validación del ensayo o análisis.

Para el caso de ensayos de toxinas dado que los tratamientos tecnológicos pueden producir daños sublatelares se requiere someter a la muestra a tratamiento de recuperación. En ocasiones es necesario comparar los resultados con valores de referencia. Estos valores de referencia no son formulaciones teóricas de la carga microbiana aceptable, sino los valores obtenidos cuando la producción del alimento se ajustado a las BPE (Buenas Practicas de Elaboración).

En el caso de que se realicen los análisis, las muestras pueden ser conservadas si se requiere para futura reevaluaciones. Siempre y cuando el parámetro a realizar sea entable, es decir una vida útil larga. Para esto introduzca el alimento en un recipiente adecuado y sellado.

La determinación de las toxinas se realiza mediante la técnica de análisis de Cromatografía Líquida de Alta resolución debido a la sensibilidad que se obtiene para esta determinación, pues la naturaleza toxica de las Micotoxina según se evidencia, es a concentraciones muy bajas, indetectables en otro tipo de técnica de análisis, además las normas internacionales, establecen limites de aceptación de concentraciones de ppb, por lo que las concentraciones detectables es a niveles de trazas. El método de extracción utilizado es por medio de columnas de inmonoafinidad la cual es selectiva para las Aflatoxinas, cada test es único e irrepitable para cada muestra, ya que una vez que la columna es utilizada no puede volver a ser reutilizada, las enzimas que se encuentran dentro de la columna es específica para capturar a las toxinas de interés.

5.1. DESECHO DE LOS ALIMENTOS UNA VEZ REALIZANDO EL ANALISIS DE LAS AFLATOXINAS [14.8.9-14.8.14]

El desecho de alimento es un actividad poco documentada. Sin embargo, es importante definir procedimientos que aseguren la eliminación adecuada de los residuos de las muestras analizadas. Sobre todo para aquellas muestras que presentan riesgos para la salud.

Para esto se consideran los siguientes criterios:

5.1.1. Nunca eliminar los residuos en un contenedor de basura o drenaje municipal.

- 5.1.2. Al terminar el análisis guardar el residuo en un envase o bolsa sellada.
- 5.1.3. Si el residuo es sólido y cuenta con los medio, incinere periódicamente. En el caso contrario envíe a un deposito de residuos industriales..
- 5.1.4. Si el residuo es líquido almacénelos y periódicamente enviarlos a un deposito de residuos industriales.
- 5.1.5. Los desechos líquidos son vertidos en recipientes de vidrio ámbar que luego son enviados al basurero municipal.

[14.8.9] Ver detalle de la bibliografía capitulo 14

6. DATOS EVALUADOS EN LA ETAPA DE VALIDACIÓN [14.9]

Validar un método de medición es la obtención y resensación de evidencia objetiva de que se cumplan con los requisitos establecidos (ISO). El requisito de una medición, el cumplimiento de una exactitud establecida dentro de un intervalo de medición de una característica física o química.

Para demostrar que un método de medición es valido, se realiza un proceso de estudio y valoración del mismo con el objeto de conocer su comportamiento, sus errores típicos, su trazabilidad, sus características de linealidad, recobro limites de detección, selectividad, identificaron, etc. que afectan al resultado en condiciones normales de medición. Una vez que se conoce el comportamiento del proceso de medición y se cuenta con la información técnica derivada del proceso de validación. Entonces es posible establecer las variables aleatorias involucradas, definir una función física, cuantificar la incertidumbre normal correspondiente de cada variable, establecer un modelo para combinar las incertidumbres normales y calcular la incertidumbre normal y calcular la incertidumbre expandida. Si la incertidumbre expandida, al nivel de confianza establecido, encontrada dentro del intervalo de medición validado es menor o igual a la incertidumbre requerida, entonces se dice que el método es valido.

Es importante considerar la importancia de la validación para expresar la incertidumbre del resultado. Antes de iniciar actividades para encontrar un modelo para encontrar la incertidumbre de la medición se consideraron lo siguiente puntos:

- Obtener toda la información experimental y documental relacionada con proceso de validación del método de medición.
- Estudiar y entienda las bases físicas sobre las cuales esta establecido el proceso de medición.
- Definir su trazabilidad.
- Comprender el comportamiento del proceso de medición en las condiciones normalizadas establecidas.
- Definir las variables de influencia sobre el resultado de la medición.

6.1. SELECTIVIDAD

Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

Frecuentemente el termino especificidad se utiliza como sinónimo del anterior, aunque debería reservarse para aquellas situaciones donde la respuesta obtenida solo se puede producir con una única entidad química, algo que no es posible cuando se refiere a procedimientos analíticos que emplean instrumentación no especifica. Como existen muy pocos métodos que den respuesta solo a un único analito, el termino selectividad es normalmente mas apropiado.

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como:

- Imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos).
- Distorsionar la respuestas del analito (afectan normalmente a la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibrado). Este efecto puede delatar la presencia de recuperaciones no lineales.

La Selectividad de este método analítico será determinada antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro cromatográfico, dado que se debe de conocer en que grado la respuesta del método únicamente proporcionada por el analito, sin interferencias de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma.

Se determinara que el método de análisis es capaz de discriminar sin interferencias entre el analito, sustancias de composición similar y otros productos que puedan estar presentes en la muestra.

El método garantizara que permite una evaluación de las impurezas y los productos de degradación definidos en los estudios previos, sin interferencias de otras sustancias que puedan estar presentes en la muestra.

6.2. LINEALIDAD Y RANGO.

La linealita es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Siempre que sea posible se busca una repuesta de tipo lineal que facilitara su trazado, interpolación e interpretación.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

Aunque el proceso lógico consistirá en evaluar cuales son los limites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, normalmente se toma como punto de partida de un intervalo de concentraciones ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y principalmente en fusión de las especificaciones.

Con los resultados del estudio de la linealidad se preparó una tabla relacionando las cantidades o concentraciones x (variables independiente o predictiva) y la respuesta (variable dependiente) la relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y = b \times x + a$, obtenida por el método de ajuste (por lo general el de mínimos cuadrados).

La presentación grafica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste.

Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar esta afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta significa que la linealidad no es buna (existe falta de ajuste) o bien que el error experimental es importante y los intervalos de confianza serán amplios.

TERMINOS	ECUACIONES
	Formulas Matemáticas Comunes
Ecuación de la Recta	$y = b \times x + a \quad (1)$
Termino Independiente	$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum y - b \sum x}{n} \quad (2)$
Pendiente	$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2} \quad (3)$
Coefficiente de Correlación	$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} \quad (4)$
Coefficiente de determinación	$r^2 = \frac{SC_{REG}}{SC_T} \quad (5)$

Calculo de la Varianza Residual	$S_{x,y}^2 = \frac{\sum y^2 - a\sum y - b\sum xy}{n-2}$ $= \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-2} (1 - r^2) = \frac{\sum (y_i - y_{pon})^2}{n-2} \quad (6)$
Varianza de la Pendiente	$S_b^2 = \frac{S_{x,y}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad (7)$
Varianza del termino independiente	$S_a^2 = \frac{S_{x,y}^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \times \frac{\sum x^2}{n} \quad (8)$

6.2.1. TEST DE LINEALIDAD

Se trata de comprobar que existe una significativamente distinta de cero mediante una prueba t student.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b} \quad (9)$$

S_b se obtiene a partir del calculo de la varianza residual $S_{x,y}^2$

La pendiente tiene que ser estadísticamente distinta de cero para un grado de significación α igual a 0.05.

También es habitual calcular los intervalos de confianza a partir de la expresión $b \pm t \times S_b$, siendo en este caso t el valor de la distribución Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación α igual a 0.05.

Estos intervalos de confianza no deberían de incluir el cero.

6.3. PRECISIÓN

La precisión es el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

La procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión es de muestras reales y preparadas en el laboratorio.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el mas-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los

resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.

6.3. REPETIBILIDAD

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

Es expresada matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas.

Uno de los factores que más pueden influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito.

6.4. Repetibilidad del Método

El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se realiza independientemente desde el principio (preparación de muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista.

Se debe de realizar con un mínimo de 5 estándares a niveles de concentraciones de manera que cubran el intervalo especificado (en total 15 lecturas).

La estimación de la repetibilidad del método se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza a cada nivel de concentración estudiada.

6.5. INTERVALOS DE CONFIANZA

Los intervalos de confianza son incluidos en el estudio de la precisión. Estos intervalos son determinados para cada nivel de confianza.

$$\bar{x} \pm t \times \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (11)$$

Donde:

\bar{x} : media de una serie de resultados en un mismo nivel de concentración

t: valor de t Student de la tabla para n-1 grados de libertad y $\alpha=0.05$

n: numero de análisis

s: desviación estándar

6.6. PRECISION INTERMEDIA

El objeto de estudio de la precisión intermedia es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes.

En el estudio de la precisión intermedia se deben aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El análisis debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día; el analista, el instrumento, etc. No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores esta dentro de los límites establecidos.

6.7. REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad estudia la variabilidad de los resultados inter-laboratorio. El objetivo de este estudio es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios. La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas pero siguiendo el procedimiento descrito en el método.

Estas condiciones operativas y ambientales diferentes pueden ser:

- 6.7.1. Humedad y temperatura ambiente diferente
- 6.7.2. Analista con diferentes experiencias
- 6.7.3. Instrumentos de carácter diferentes
- 6.7.4. Variación de Condiciones instrumentales
- 6.7.5. Variación de detalles experimentales no especificados en el método
- 6.7.6. Disolventes y reactivos de diferente calidad.

6.8. EXACTITUD

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como el valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

Cuando se dispone de patrones de referencia certificados el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón.

La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los niveles de confianza.

Porcentaje de Recuperación:

$$R = \frac{x_m}{\mu} \times 100 \quad (12)$$

μ = Concentración Teórica

X_m = Concentración Experimental

6.9. RELACIÓN SEÑAL-RUIDO

Este método es el más utilizado, requiere que el procedimiento de análisis sea instrumental y que proporcione una señal blanco, un ruido de fondo o una línea de base, es decir una señal residual a concentración cero de analito.

El límite de Detección y de Cuantificación se puede cuantificar teóricamente mediante el siguiente procedimiento:

Se establece la señal ruido que proporciona un blanco (matriz de muestra contenido todos los ingredientes a excepción del analito a estudiar) a partir del análisis reiterado de dicho blanco (se recomienda un mínimo de 6-10 análisis consecutivos). Para métodos cromatográficos el calculo de señal-ruido es mas costoso, pero una vez establecido este valor puede concluirse de forma teórica y aproximada que el LC será igual a la concentración del analito que proporcione una señal de 10 veces superior (en ocasiones se admite hasta un valor de 20) a dicho ruido de fondo y que el de LD será igual a la concertación de analito que proporcione una señal 3 veces suprior a este. La justificación a estos valores fue establecida de acuerdo a los intervalos de confianza de una distribución normal.

Resulta evidente que una vez establecida esta concentración no se puede escapar a la comprobación experimental de que el análisis de muestras conteniendo la concentración de analito correspondiente al LD y LC teóricos conducen a los resultado esperados, y para ello se preparan un número adecuado de muestras (habitualmente un mínimo de 6) a dichas concentraciones y se analizarán de forma que puedan obtenerse los datos para calcular la precisión y la exactitud en el LC, tal como recomienda la guía tripartita.

Este procedimiento presenta la desventaja de que en numerosas ocasiones al llevar acabo la comprobación experimental del LC calculado, se observa que es posible obtener resultados igualmente precisos y exactos aun cuando se descende mas en la concentración limite, es decir que en ocasiones una señal inferior a 10 veces el ruido de fondo proporciona resultados exactos y precisos, con lo que parte del trabajo realizado debe ser reconducido si se quiere llegar realmente al conocer el limite del método.

Es importante recordar que una vez establecidos estos limites y como cualquier otro parámetro de validación, será necesario recalcularlos siempre que se introduzcan variaciones en el método que puedan afectar a su valor.

6.10. PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS EVALUADOS EN LA VALIDACIÓN

6.10.1. Número de Platos Teóricos

El número de platos teóricos es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo y, por lo tanto, de la capacidad del sistema de proporcionar bandas de elusión estrechas.

El cálculo del número de platos teóricos se basa en la relación entre el tiempo de retención y la anchura del pico cromatográfico.

$$N = 16 \times \left(\frac{R_t}{W} \right)^2 \quad (14)$$

Donde:

R_t = el tiempo de retención

W = la anchura del pico en la línea de base determinado por la tangente ajustada a un % de la altura de pico.

El número de platos teóricos depende del tiempo de elusión por lo general se recomienda que sea superior a 2000. Este parámetro tiene especial interés en las pruebas de idoneidad del sistema donde existe un solo pico de interés dentro del cromatograma y en el estudio de trazas como complemento a la comprobación del límite de detección. En otros casos es más recomendable el estudio de la resolución.

7. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO DEL MÉTODO DE ENSAYO

7.1. TENDENCIA DE TRABAJO DURANTE LA REALIZACIÓN Y MONTAJE DE LA DETERMINACIÓN DE AFLATOXINA POR HPLC

7.1.1. LIMPIEZA DEL MATERIAL DE VIDRIO

El proceso de limpieza manual del material de vidrio del laboratorio es muy habitual. Además, en muchos casos suele ser llevado a cabo por personal no especialista (empresas de limpieza) que debe ser puntualmente informado de las características de esta operación, la manera de llevarla a cabo adecuadamente y los riesgos que presenta, que pueden ser debidos a: los propios productos de limpieza, como intoxicación, dermatitis y quemaduras cutáneas y oculares; al material de vidrio, como cortes y heridas debido a su rotura, y a los residuos de productos contenidos en el material.

Las medidas de prevención adecuadas frente a estos riesgos son:

- Formación e información del personal encargado de la limpieza.
- Ventilación del local destinado a la limpieza de material. La ventilación debe ser la suficiente para garantizar una atmósfera saludable.

Con el fin de reducir al mínimo el riesgo de contacto o de inhalación de sustancias peligrosas es necesario vaciar completamente los recipientes antes de entregarlos para lavar.

7.1.1.1. **Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en pH ácido**

Limpia y no genera residuos. Se autodestruye y no es tóxico, pero sí corrosivo.

7.1.1.2. **Mezcla crómica**

Mezcla de ácido sulfúrico (mayoritario) y trióxido de cromo o dicromato potásico. Se trata de un preparado tóxico, comburente, corrosivo y peligroso para el medio ambiente. Su utilización para destruir la materia orgánica, que es de gran eficacia, debe ser descartada excepto para aquellos casos en que no exista alternativa, empleándolo siempre en la mínima concentración necesaria. Debe tenerse en cuenta que el dicromato potásico está clasificado como compuesto cancerígeno, categoría 2. La clasificación de la mezcla crómica es: Producto tóxico y peligroso para el medio ambiente. Puede causar cáncer por inhalación y alteraciones genéticas hereditarias. Provoca quemaduras graves y puede causar sensibilización en la piel. Es muy tóxico para los organismos acuáticos y puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.

Es recomendable su sustitución por **permanganato potásico**, por ejemplo, que es una sustancia clasificada como nociva por ingestión y comburente (peligro de fuego con materias combustibles).

7.1.1.3. **Metanol**

Es un alcohol tóxico por inhalación e ingestión y fácilmente inflamable. A corto plazo produce un efecto narcótico típico de todos los alcoholes. A largo plazo, provoca problemas visuales pudiendo entrañar la ceguera total. Para el aclarado y secado del vidrio se puede reemplazar por isopropanol que es menos tóxico.

7.1.2. **Determinación de Aflatoxina mediante el uso de Aflatest, para Maíz, Granos y Alimentos Balanceados (Muestra equivalente a 1 g)**

7.1.2.1. **Condiciones Experimentales del HPLC**

Columna: Fase Inversa C 18

Fase Móvil: Metanol: Agua : Acetonitrilo (30:20:50)

Velocidad de Flujo: 1 mL/min con reactor fotoquímico.

Detector de Fluorescencia: λ emisión: 440 nm, λ excitación: 360 nm.

7.1.2.2. **Reactivos**

7.1.2.3. Estándar de Aflatoxinas B1, B2, G1, G2

7.1.2.4. Cloruro de Sodio (NaCl)

7.1.2.3.Solventes

7.1.2.4.Metanol grado HPLC

Marca: MERCK

Frase R: 11-23/24/25-39/23/24/25

Frase S: 7-16-36/37-45

7.1.2.5.Acetonitrilo Grado HPLC

Marca: Fisher Scientific

7.1.2.6.Agua Desionizada

7.1.3. Materiales

Sistema de Extracción en fase Sólida

Marca: VICAM

7.1.3.3.Volumétrico

7.2.5.1.1. Pipeta de 1 mL clase A

7.2.5.1.2. Recipientes Phalcon de 50 MI

7.2.5.1.3. Balones de 10 mL clase A

7.2.5.1.4. Viales ámbar de 1,5 mL

7.2.5.1.5. Tubos de ensayo de 2.5 MI

7.2.5.2. Sistema de Extracción

7.2.5.2.2. Columnas de afinidad AflaTest-P

Marca: VICAM

Código: 12022

7.2.5.3. Filtros

7.2.5.3.2. Filtros de Microfibra de Vidrio

Marca: Whatman (schleicher and Schuell)

Código: 934-AH

Numero de Catalogo: 1827900646

7.2.5.3.3. Papel Aflautado

Marca: VICAM (24 cm)

Código: 31240

Diámetro de poro: MN615 ¼ * ø 240 mm

Numero de Catalogo: 531024

7.2.6. Preparación de Soluciones

7.2.6.1. Metanol al 80%

Tomar 80 mL de Metanol grado HPL y aforar con agua desionizada en un matraz de 100 ml. Esta solución debe de ser filtrada con un papel de nylon con poros de 25µm mediante el uso de vacio.

7.2.6.2. Acetonitrilo al 25%

Tomar 25 ml de Acetonitrilo grado HPLC y aforar con agua desionizada un matraz de 100 ml. Esta solución debe de ser filtrada con un papel de nylon con poros de 25µm mediante el uso de vacío.

7.2.6.3. Preparación de Estándares

Los estándares de las aflatoxinas vienen preparados en mezclas en las cuales viene las 4 aflatoxinas con diferentes concentraciones con el fin de igualar la simetría de sus áreas en los cromatogramas. Las Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 vienen en ampollas con una concentración de 1000 ppb (Aflatoxinas G1 y B1) y de 300 ppb (Aflatoxinas G2, B2) por lo que se diluye en 1 ml en un matraz de 10 ml para crear la solución madre de 100 y 30 ppb en la mezcla.

7.2.6.3.2. Nivel 1

Aflatoxina G1 y B1 [1 ppb]; Aflatoxinas B2 y G2 [0.3 ppb]

Tomar 0.1 ml de estándar madre y aforar en un matraz de 10 ml.

7.2.6.3.3. Nivel 2

Aflatoxina G1 y B1 [2 ppb]; Aflatoxinas B2 y G2 [0.6 ppb]

Tomar 0.2 ml de estándar madre y aforar en un matraz de 10 ml.

7.2.6.3.4. Nivel 3

Aflatoxina G1 y B1 [3 ppb]; Aflatoxinas B2 y G2 [1 ppb]

Tomar 0.3 ml de estándar madre y aforar en un matraz de 10 ml.

7.2.6.3.5. Nivel 4

Aflatoxina G1 y B1 [5 ppb]; Aflatoxinas B2 y G2 [1.5 ppb]

Tomar 0.5 ml de estándar madre y aforar en un matraz de 10 ml.

7.2.6.3.6. Nivel 5

Aflatoxina G1 y B1 [10 ppb]; Aflatoxinas B2 y G2 [3 ppb]

Tomar 1 ml de estándar madre y aforar en un matraz de 10 ml.

7.2.6.3.7. Nivel 6

Aflatoxina G1 y B1 [20 ppb]; Aflatoxinas B2 y G2 [30 ppb]

Tomar 2 ml de estándar madre y aforar en un matraz de 10 ml.

7.2.6.3.8. Nivel 7

Aflatoxina G1 y B1 [30 ppb]; Aflatoxinas B2 y G2 [10 ppb]

Tomar 3 ml de estándar madre y aforar en un matraz de 10 ml.

7.2.7. Extracción de la Muestra

7.2.7.1. Pesar 50 g de muestra molida con 5 g de sal (NaCl) y colocarlo en un vaso de licuadora.

7.2.7.2. Agregarle al vaso 100 mL de Metanol: Agua (80:20)

7.2.7.3. Cubrir el vaso de la licuadora y licuar a alta velocidad por 1 minuto.

7.2.7.4. Retire la tapa del vaso y vacíe el extracto dentro de un filtro de papel afluado. Recolecte lo filtrado en un recipiente limpio.

7.2.8. Dilución del Extracto

7.2.8.1. Pipetee o vacíe 10 mL de extracto filtrado dentro de un recipiente limpio.

7.2.8.2. Diluya el extracto con 40 mL de agua purificada. Mezcle bien.

7.2.8.3. Filtre el extracto diluido a través de un filtro de micro fibra de vidrio dentro de un recipiente limpio o directamente dentro de una jeringa de vidrio utilice su graduación para medir 10 mL.

7.2.9. **Cromatografía de Columna**

7.2.9.1. Pase 10 mL del extracto diluido filtrado (10 mL= muestra equivalente a 1 g) completamente a través de la columna de afinidad Aflatest-P a razón de 1 a 2 gotas/segundo hasta que el aire pase a través de la columna.

7.2.9.2. Pase 10 mL de agua purificada a través de la columna a razón de 2 gotas/segundo aproximadamente.

7.2.9.3. Eluya la columna de afinidad pasando 1 mL de metanol grado HPLC a través de la columna a razón de 1 a 2 gotas/segundo y recolecte toda la muestra de eluato (1mL) en un tubo de vidrio.

7.2.9.4. Agregue 1 mL de agua purificada al eluato. Inyecte 20-100 µL en el HPLC.

7.2.10. **Curva de Calibración**

La curva de Calibración se realiza con los 7 niveles de concentración que están descritos, estos niveles fueron seleccionados en base a pruebas preliminares de linealidad además de rangos de concentraciones en los cuales normalmente son regidos los niveles de concentraciones permisibles internacionalmente como nacionalmente.

Los niveles empiezan a inyectarse de acuerdo a las concentraciones ascendente, para evitar las contaminaciones de concentraciones acumulativas, o sobre estimación en los cromatogramas.

Además entre inyección e inyección se limpia de forma periódica la jeringa de inyección.

8. PROCEDIMIENTO DE VALIDACION

8.1. RELACIÓN SEÑAL-RUIDO

Este procedimiento de análisis es instrumental y proporciono una señal del blanco, un ruido de fondo o una línea de base, es decir una señal residual a concentración cero de analito.

Generalmente en el laboratorio cuando se realiza el montaje de un nuevo método de análisis se realizan los estudios del ruido, este consiste en determinar corridas de no inyección en las que la fases móvil es la misma del método de las Aflatoxinas con las que se realizaran luego las condiciones de trabajo, al ser este un método de ensayo nuevo, todo el material utilizado para este método de ensayo es nuevo, por lo que al iniciar esta evaluación, primero se tuvo que realizar un pre acondicionamiento de la columna, luego se evaluó el parámetro del ruido para observar la tendencia de la línea base.

La tendencia del ruido sea ascendente, o descendente hasta que se estabilice, debido a múltiples corridas de acondicionamiento.

Por esta razón es el primer parámetro que se realizó, cuando el método así como sus accesorios son nuevos, se espera que la línea base se establezca, luego se realizaron no inyecciones de prueba, un número de inyecciones de 10 en total.

Los datos registrados en cada uno de los cromatogramas de las no inyecciones se evalúa el ruido, los límites de detección y cuantificación, evaluados por el tamaño y la altura del ruido en forma de promedio, y los picos a través de la deriva del ruido, para lo que se hará con el respaldo de un software auxiliar de Galaxie llamado ATP. Lo que a su vez nos permitirá evaluar las variaciones que se dieron al momento de realizar las no inyecciones.

8.2. SELECTIVIDAD

La Selectividad de este método analítico será determinada, dado que se debe de conocer en que grado la respuesta del método únicamente proporcionada por el analito, sin interferencias de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma.

Se determinará que el método de análisis es capaz de discriminar sin interferencias entre el analito, sustancias de composición similar y otros productos que puedan estar presentes en la muestra. Los estándares individuales fueron inyectados de manera individual para determinar las particularidades de cada toxina, su tiempo de retención específico además de la simetría del pico, y revisar si en las concentraciones de trabajo, cual de las toxinas necesitaba el reactor fotoquímico para ser detectado y visto en el cromatograma.

8.3. NUMERO DE PLATOS TEORICOS

Una vez que se realizaron las evaluaciones anteriores, se realizaron una serie de inyecciones de acondicionamiento de los parámetros óptimos en los que las toxinas tenían mejor respuesta, las inyecciones se realizaron 5 por días consecutivos, además de evaluar las repuestas de estos mismos estándares incluyendo las etapas de su preparación en Diciembre del 2008. Cada nivel de los estándares fue inyectado periodo de 15 días consecutivos y en 4 meses en un promedio de unas 10 inyecciones por mes en los cuales se tomaron los datos que ofrecía el programa del equipo para los que se programó con anticipación que en el momento de ofrecer los resultados de los cromatogramas se evidenciara el número de platos teóricos de cada uno de los estándares por separado por lo que se cuantificaron alrededor de unos 100 datos que se utilizaron para la formación de la carta de control así como para la evaluación de su tendencia.

8.4. LINEALIDAD Y RANGO.

Para elaborar la curva de calibración normal de la Aflatoxina G1, G2, B1 y B2 se empezó con 2 puntos clave, los cuales fueron formulados al inicio del estudio:

8.4.1. Las concentraciones a las cuales las normas internacionales tienen delimitados como aceptables son a niveles de trazas, pues según las normas Nicaragüenses la concentración total permitida para un alimento o materia prima con fines de comercialización debe de tener concentraciones totales de Aflatoxinas que no superen los 20 ppb.

8.4.2. Las concentraciones del estándar puro es de 1000 ppb, por lo que niveles muy altos saturarían la columna cromatograficas, además de ser irrelevante para la determinación.

Los niveles fueron determinados en concentraciones de 30 (para las Aflatoxinas G1 y B1) y 10 ppb (para las Aflatoxinas G2 y B2) para el nivel superior, de aquí se partió, hacia niveles inferiores, los cuales fueron preparados siempre a partir del estándar madre, evitando errores de diluciones. Las alícuotas fueron calculadas independientemente, para evitar errores sistemáticos, así como se evaluó cual sería el volumétrico que ocasionaría menor dispersión de los datos, por lo que se utilizaron macro y micropipetas previamente calibradas.

Para cada una de estas soluciones se le realizó la corrida correspondiente, con el fin de evaluar las tendencias que tenían en el trayecto ascendente al ir aumentando las concentraciones. Pero en ningún momento se evidenciaron parábolas o tendencias no lineales que pudieran comprometer el ámbito lineal destinado para las cuantificaciones respectivas.

8.5. PRECISIÓN

La precisión fue evaluada en un periodo de cinco días por medio de inyecciones sucesivas de un nivel de la curva de calibración elegido aleatoriamente, estos estándares fueron inyectados por quintuplicado además, con el fin de respaldar que cualquier punto de la curva debía de presentar el menor grado de dispersión en un tiempo estimado.

Además del tiempo en que se realizaron las pruebas fueron evaluados estos mismos estándares meses después de su preparación para evidenciar dispersiones en las cuales el tiempo influiría eran significativas al momento de evaluar los controles por eventos de trabajos en esta determinación.

8.6. REPETIBILIDAD

Se evaluó la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

Las inyecciones fueron realizadas en días diferentes así como en una semana de trabajo, los estándares fueron evaluados por quintuplicados, estas evaluaciones fueron realizadas y evaluadas a la par de la curva de calibración por lo que el tiempo de trabajo resulto evidente y contundente.

8.7. PRECISION INTERMEDIA

En el análisis se evaluó los efectos causados al variar los días de inyección de los estándares, además de que las inyecciones fueron realizadas por otro analista. Estos cambios se estudiaron en conjunto con el objetivo de comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores esta dentro de los límites establecidos.

Los procedimientos fueron los mismos que para la curva de Calibración, los estándares por quintuplicados a diferentes niveles de concentraciones en el lapso de 15 días de trabajo.

8.8. EXACTITUD

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como el valor verdadero, ósea que se determina que al inicio se tiene un valor teórico y al analizarlo se tendrá el real en base a la depresión del teórico se mide la exactitud del ensayo.

La exactitud de este método de ensayo se evaluó mediante la recuperación del estándar, los estándares fueron adicionados a muestras negativas que con anterioridad se les había determinado Aflatoxinas y las cuatro habían dado concentraciones menores a los límites de cuantificación. Las muestras fueron enriquecidas con 5 ml de las Aflatoxinas con concentraciones de 50 ppb para las Aflatoxinas G1 y B1 y con concentraciones de 15 ppb para las Aflatoxinas G2 y B2.

Estas inyecciones fueron realizadas por quintuplicados en días diferentes a lo largo de 5 días consecutivos. Los cálculos se realizaron mediante la las formulas 15, 16 y a17 repectivamente.

Gramos de Muestras Inyectadas

$$50 \text{ g de muestra} \times \frac{10 \text{ ml (vol. inicial tomado)}}{100 \text{ ml de MeOH}} \times \frac{10 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 1 \text{ g} \quad (15)$$

8.8.1. RECUPERACIÓN

$$\text{Concentración}_{\text{Teórica}} = V_{\text{agregado a la muestra}} \times \frac{C_{\text{del Std}}}{100} \times \frac{10}{50} \times 10$$
$$\text{Concetración}_{\text{Teórica}} = 5 \text{ ml} \times \frac{50 \text{ ppb aflatoxinas G1 y B1}}{100} \times \frac{10}{50} \times 10 = 5 \text{ ppb} \quad (16)$$

$$\text{Concetración}_{\text{Teórica}} = 5 \text{ ml} \times \frac{15 \text{ ppb aflatoxinas G2 y B2}}{100} \times \frac{10}{50} \times 10 = 1.5 \text{ ppb}$$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{C_{\text{experimental}}}{C_{\text{teórica}}} \times 100 \quad (17)$$

9.1. RESULTADOS

9.1. ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

En esta etapa de la optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación de Aflatoxinas se realizaron una serie de pruebas con el fin de definir aquellos puntos en los cuales las inyecciones de los estándares cumplieran con todas aquellas necesidades descritas para una buena selectividad de la mezcla y por consiguiente una cuantificación efectiva. Dentro de los puntos que se evaluaron fueron:

- ✓ Evaluación del Ruido Frente a los solventes con las condiciones iniciales del método.
- ✓ Tiempo de estabilización de la Línea Base.
- ✓ Tiempo de limpieza por eventos.
- ✓ Tiempo de Corrida Aceptable, mediante el uso de diferentes flujos del equipo.
- ✓ Separación de cada Estándar en la mezcla.
- ✓ Condiciones Cromatográficas y Proporciones optimas de la Fase Móvil

9.1.1. EVALUACION DEL RUIDO DE LOS CROMATOGRAMAS CON LOS BLANCOS Y LA FASE MOVIL UNICAMENTE

El ruido fue evaluado desde el momento en que la columna se empezó a utilizar con esta determinación, con el fin de optimizar su rendimiento y observar su comportamiento bajo las condiciones de trabajo del método de ensayo. El fin es evitar que cualquier suciedad pudiera ser arrastrada en el proceso de inyección y cuantificación. Las tendencias iniciales de los cromatograma fueron ascendente y descendente, una tendencia aceptable tomando en cuenta que la columna C18 era nueva y la figura 1 muestra la inyección quinta que se obtuvo cuando las condiciones del equipo ya se encontraban estables y se habían tomado las consideraciones adecuadas con relación a los solventes.

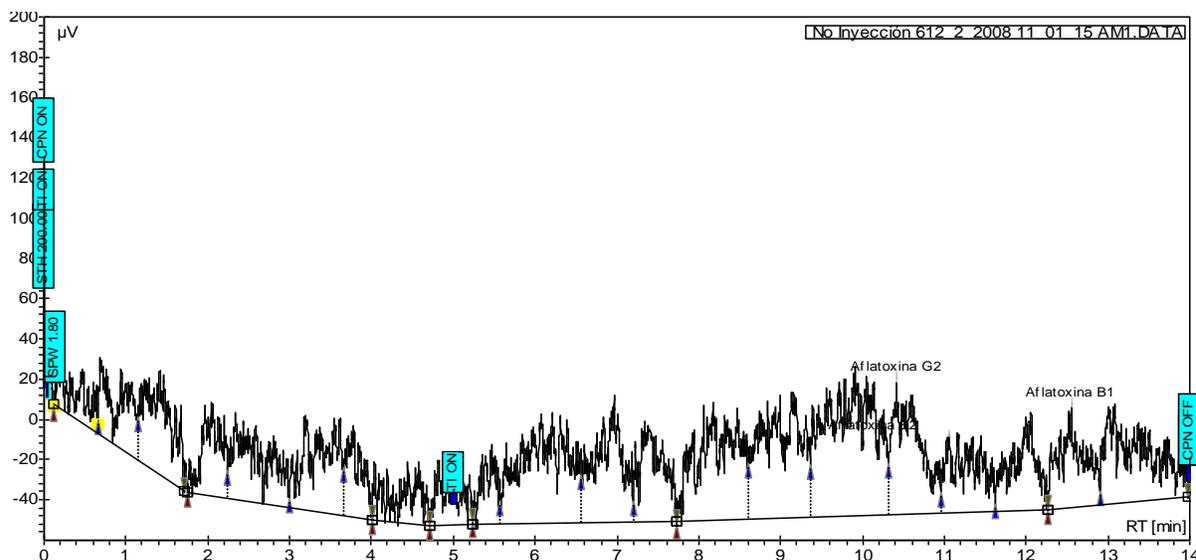


Figura 1. Evaluación del Ruido del equipo con las condiciones cromatografías del método de las Aflatoxinas

Bajo estas condiciones se tomaron ciertos parámetros cromatograficos que posteriormente serian de utilidad al momento de determinar la incertidumbre las concentraciones de las muestras problemas al igual que la recuperación de los estándares. Mostrando que en estas condiciones, ni los solventes ni la columna presentaban picos falsos que son normales al momento de un acondicionamiento inicial de las columnas, el ruido experimental obtenido con la fase móvil del método de Aflatoxinas, con el uso del detector de Fluorescencia, en conjunto con el reactor fotoquímico no hay presencia de picos que pudieran representar interferencias o falsos positivos.

En base a esta no inyección llamada así por la ausencia de analito, se evaluo el ruido además de la deriva, datos calculados de manera directa por el software ATP, que demuestra que la deriva promedio este ruido tiene un valor de $-12.46 \mu\text{V}/\text{min}$ y un ruido promedio de $8.28 \mu\text{V}$, demostrando un ruido bastante aceptable para un ruido que respalda que las fluctuaciones de las inyecciones solo con fase móvil, no tienen muchas impurezas. (Ver resultados en Anexo, Tabla 1).

9.1.2 EVALUACIÓN DE LOS ESTÁNDARES INDIVIDUALES DE LA MEZCLA POR SEPARADO

Las toxinas fueron inyectadas de forma individual estas se pueden observar en las figuras numero 2, 3, 4 y 5 con el propósito de evaluar la selectividad, por lo que se determino en que tiempo salían cada una con el propósito de evitar confusiones al momento de las inyecciones en mezcla. Cada una tiene un tiempo de retención diferente que permite determinar inequívocamente el comportamiento de cada toxina de forma individual.

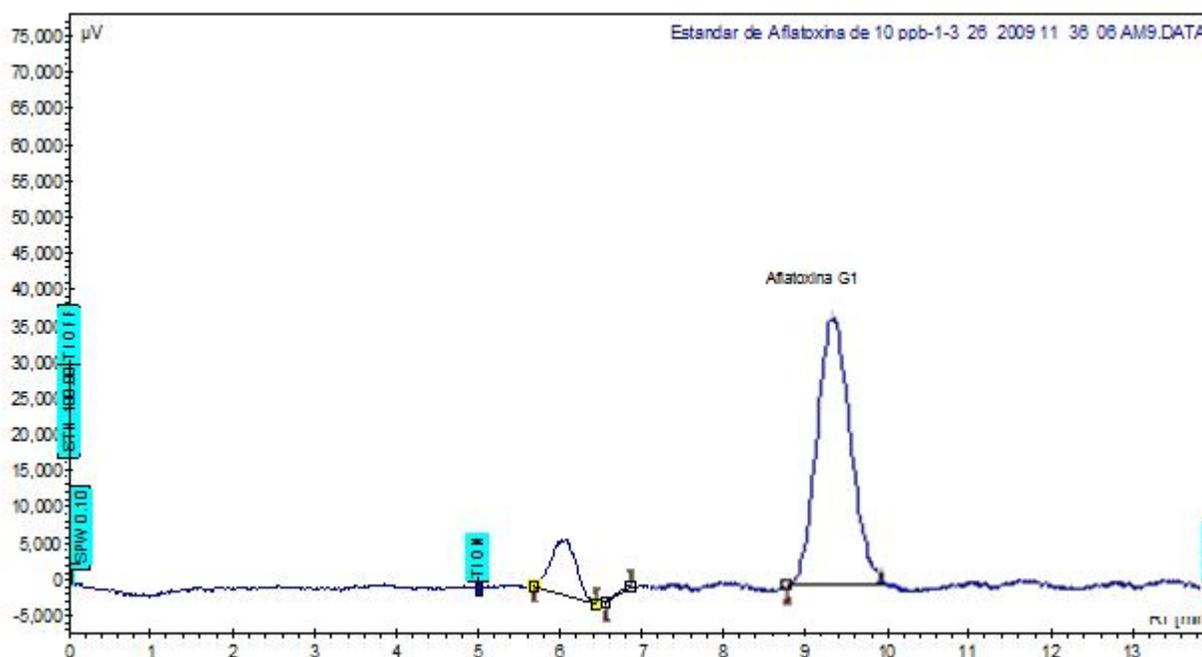


Figura 2. Estándar de la Aflatoxina G1

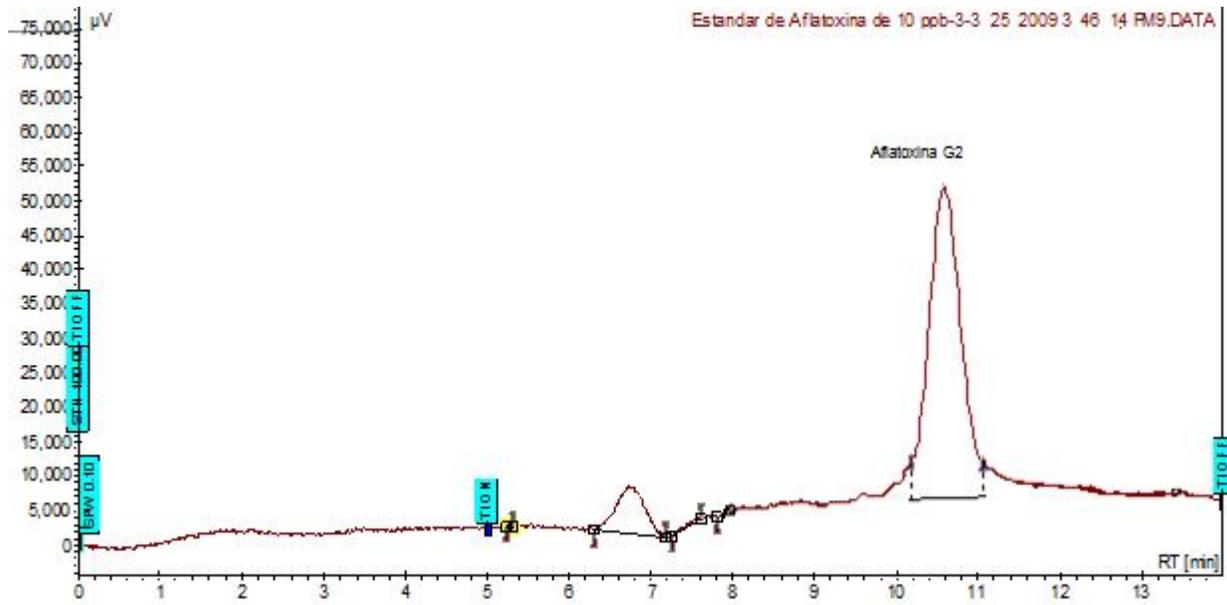


Figura 3. Estándar de la Aflatoxina G2 individual

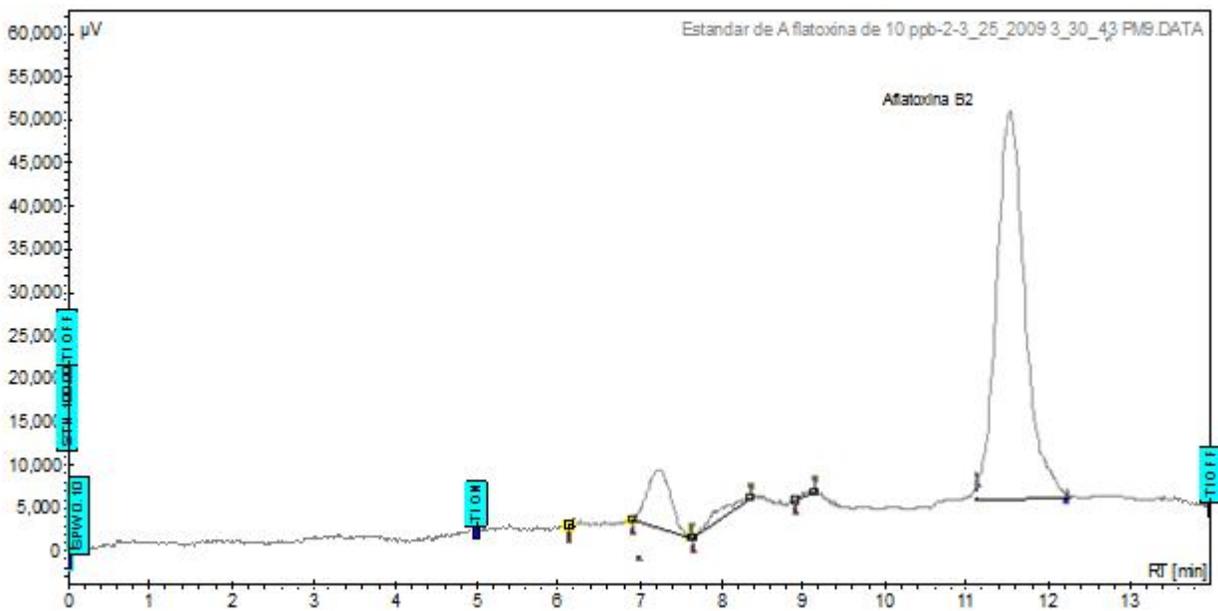


Figura 4. Estándar de la Aflatoxina B2 individual



Figura 5. Estándar de la Aflatoxina B1 individual

Cada toxina sale en cromatograma individuales pero en un tiempo de corrida de 14 minutos, que es el tiempo promedio en el cual son retenidas las Aflatoxinas de la mezcla. Estas toxinas tienen buena separación al momento de realizar la corrida pues la simetría de los picos y la distancia entre uno es evidente por lo que no hay solapamiento ni superposición, que pudiese ocasionar falsos positivos o errores al momento de la determinación.

Aflatoxina	Tiempo de Retención (min)
G1	9.05
G2	10.25
B1	11.66
B2	12.40

Tabla 1. Tiempo de Retención de las Aflatoxinas Individuales

Estas pruebas preliminares se realizaron posteriores a las optimizaciones del método de manera cromatográfica, y los estándares individuales fueron preparados de manera individual.

9.1.3. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO PARA LA DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS

En este cromatograma de la figura 6 se observa que al realizar inyecciones de los estándares con las condiciones que describía inicialmente el método, por lo que constantemente se realizaron cambios con el propósito de optimizar las condiciones cromatográficas a lo largo de las pruebas. En esta inyección se puede observar que el tiempo de estabilización para iniciar una jornada de trabajo es

mínimo de 30 minutos, sino la estabilidad de la línea base es variable. Por lo que se demuestra que la línea base tiene una tendencia ascendente. Al ser la columna C18 nueva para esta determinación es aceptable cromatográficamente las primeras inyecciones, pues cuando se inicia con las mezclas de estándares por primera vez asciende o desciende la línea base hasta que con posteriores inyecciones se estabiliza y estos datos se registran para determinar los cambio que ocurrieron en este periodo de acondicionamiento.

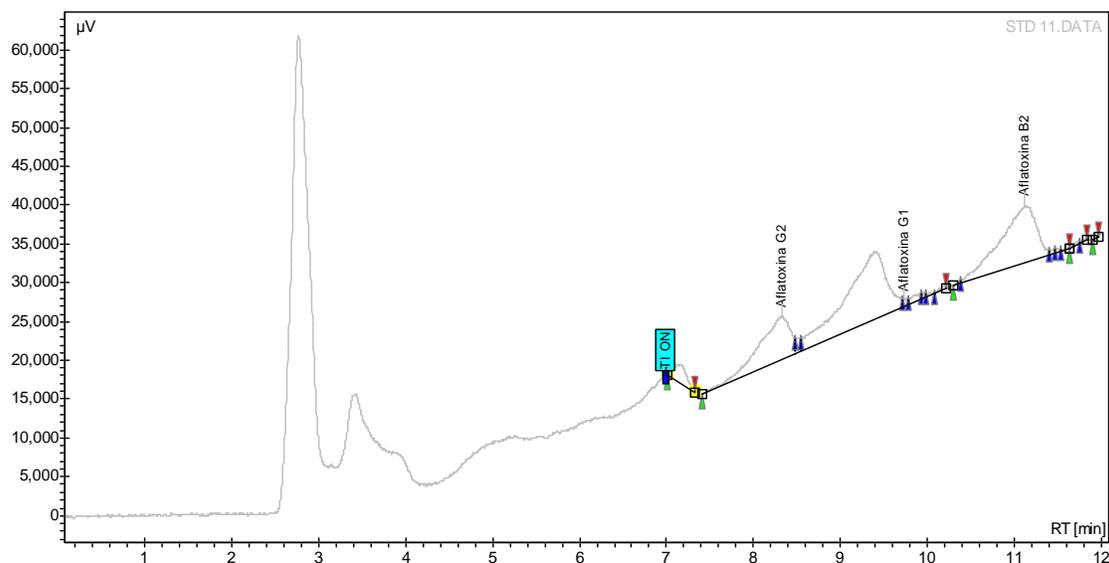


Figura 6. Condiciones Piloto para el montaje del metodo

En la figura Numero 7 se evaluó las proporciones de Fase móvil y se determino que en las condiciones descritas el tiempo de corrida era bastante largo a demás que los picos de los cromatograma se encuentran bien separados por lo que se evaluó nuevamente las condiciones de la fase móvil para unir los picos de las Aflatoxinas por lo que las concentraciones de acetonitrilo se fueron aumentando y las concentraciones de metanol se fueron disminuyendo hasta tener los parámetros de 60 % acetonitrilo y 40% metanol además de cambiar las proporciones de los solventes hasta obtener las proporciones y flujo de las mismas óptimos

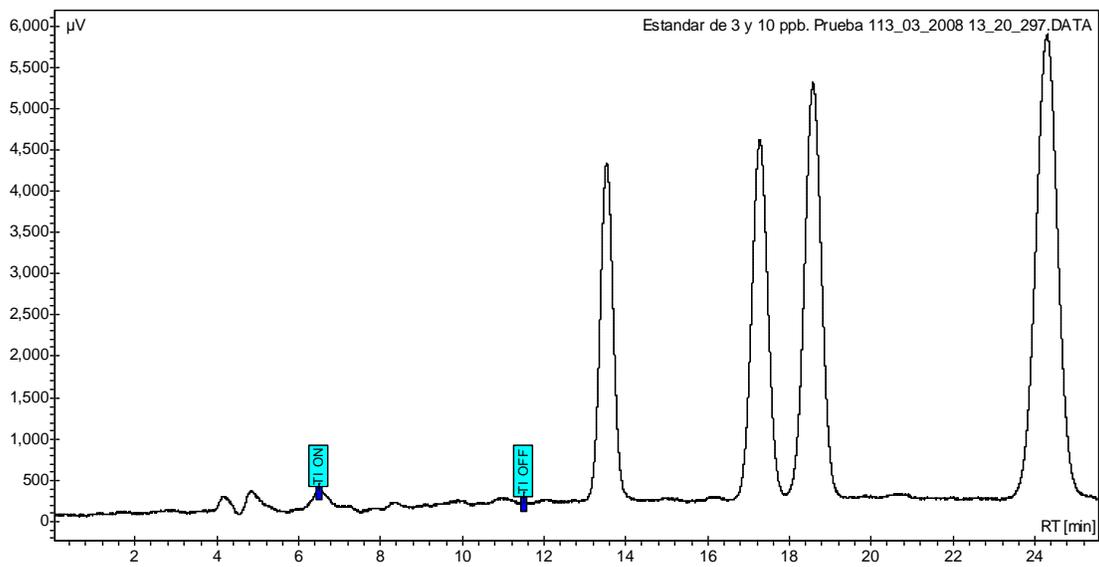


Figura 7. Tiempo de Corrida Prolongado y separación evidente de los pico de los estandares en la mezcla

En la figura numero 8 se determinó que los picos de los cromatogramas carecían de simetría debiéndose a una suciedad en la columna C18 producida por una sobre concentración y una mala limpieza realizada despues de las multiples inyecciones de prueba, lo que dio como resultado una tecnica de limpieza despues de cada jornada de trabajo, que finalizaria en dejar la columna con metanol grado HPLC 50%. Si no se tomaban los cuidados necesarios de limpieza se tendria preconcentraciones dando areas erroneas, ademas de esto se integro en cada evento un periodo de limpieza por cada inyeccion que se realizara.

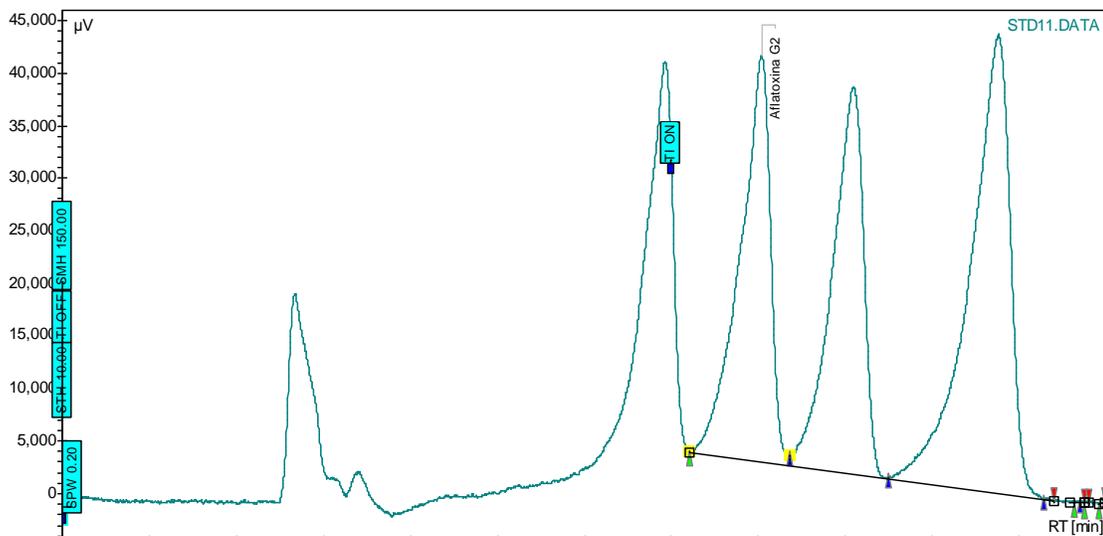


Figura 8. Preconcentracion de las Toxinas en la Columna Cromatografica

En esta prueba expresada en la figura número 9 se inyectan la mezcla de los estándares sin la presencia del acoplamiento del reactor fotoquímico a la columna C 18 por lo que en estas condiciones no fluorescieron las Aflatoxinas: G2, B1.

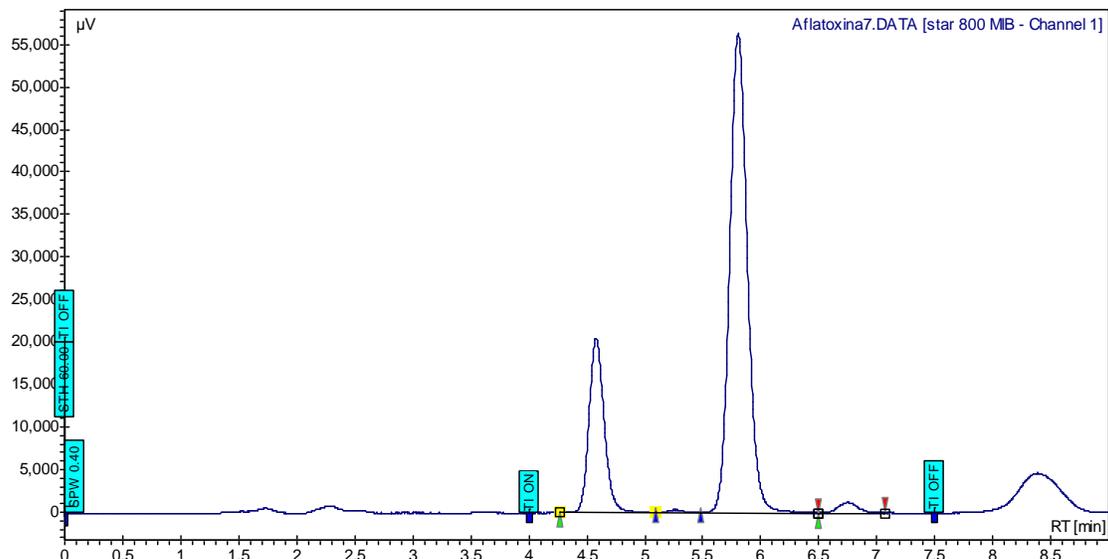


Figura 9. Prueba de la fluorescencia d los estandares de Aflatoxinas sin el reactor fotoquímico

Además de la evaluación de las proporciones de la fase móvil se empezaron a evaluar el flujo de los solventes con el fin de unir más los picos del cromatograma además de disminuir el tiempo de corrida, pero sin sacrificar la separación de los picos de la mezcla Como se muestra en la figura 10.

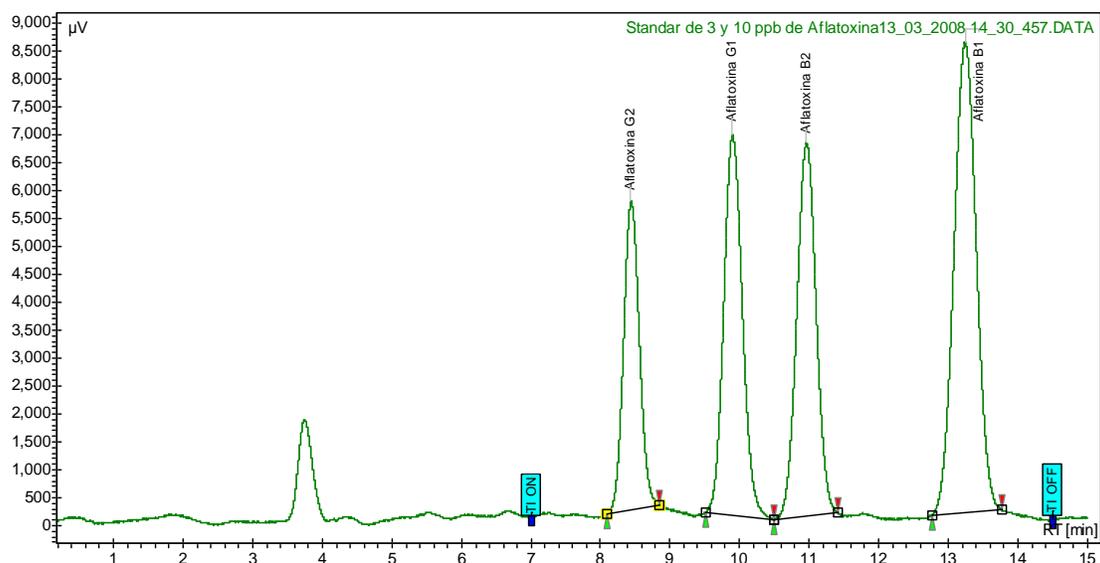


Figura 10. Evaluación de las Aflatoxinas a un flujo de 1ml/min.

9.2. CARTAS CONTROL PARA LA EVALUACION DE EL NÚMERO DE PLATOS TEORICOS DE LA COLUMNA C18

El numero de platos teóricos fue determinado de manera individual para cada uno de los estándares de las Aflatoxina en las inyecciones que se realizaron para las distintas pruebas cromatográficas o de evaluación de parámetros de validación, estos valores fueron obtenidos mediante la formula No. 14 que el software del equipo la utiliza para emitir estos valores, lo cual se ve reflejado en el reporte de los resultados de los cromatogramas por lo que la población de datos es abundante, dando un numero de platos teóricos de la columna como condiciones de trabajo de hasta 2000, de manera eficiente.

Como se puede ver de la figura numero 11 a la 14 se determina que las cartas de control para cada estándar de las aflatoxinas que se encuentra dentro de la columna, es eficiente, aunque hay momentos en que se salen dentro la s áreas de control no son con tendencias periódicas o puntos que demuestren que se están teniendo problemas significativos al momento de la separación o su retención. Por lo que las 4 toxinas tienen buenas tendencias ofreciendo resultados dentro de control estadístico y una periodicidad normal y aceptable para esta técnica de ensayo. El comportamiento normal o aceptable para esta carta de control en la que se evalúa la capacidad que tiene la columna para retener y separa los estándares de las Aflatoxinas debe de ser ascendente y descendente a lo largo de su evaluación, pudiendo observar esta tendencia repetida a lo largo de las bitácoras de la columna para las que se determino en este método de ensayo.

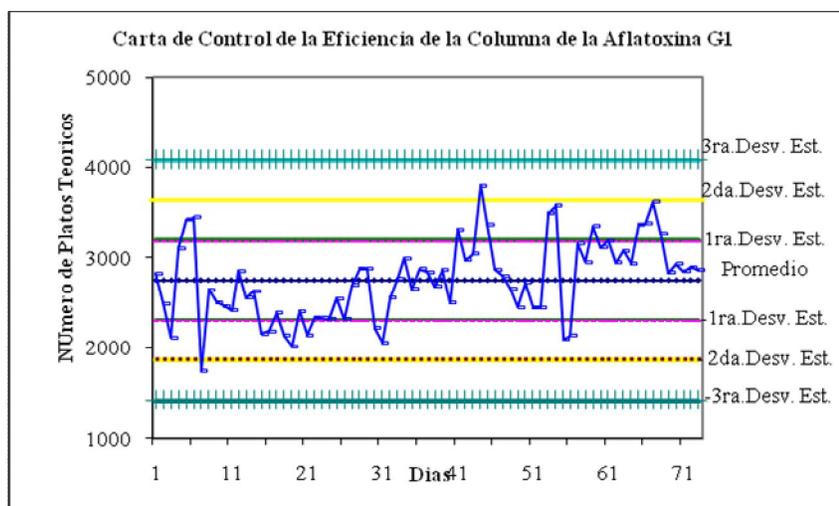


Figura 11. Carta Control del número de platos teóricos del estándar de Aflatoxina G1 presente en la mezcla

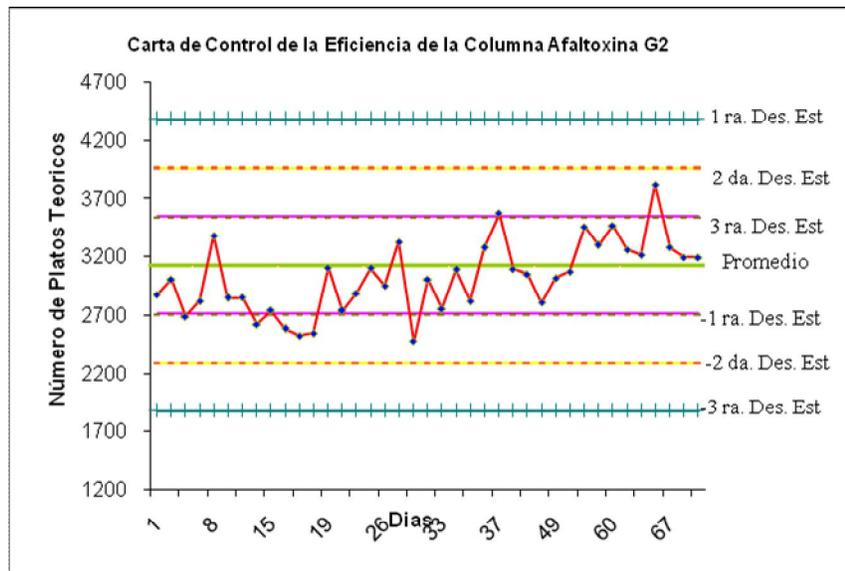


Figura 12. Carta Control del número de platos teóricos del estándar de Aflatoxina G2 presente en la mezcla

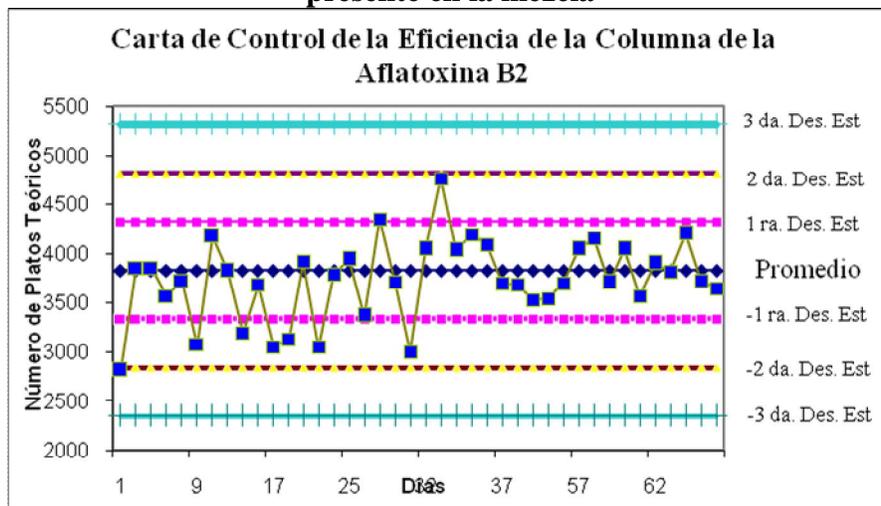


Figura 13. Carta Control del número de platos teóricos del estándar de Aflatoxina B2 presente en la mezcla

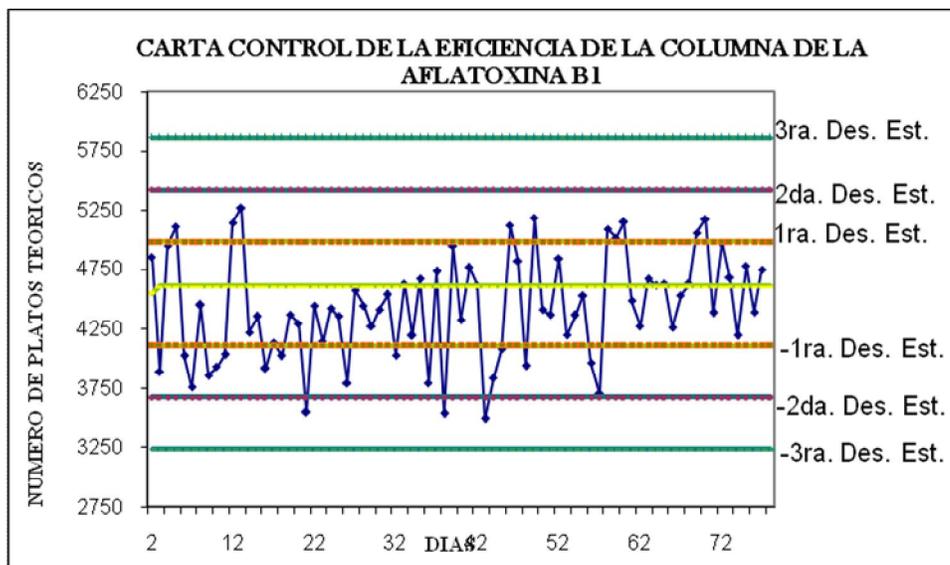


Figura 14. Carta Control del número de platos teóricos del estándar de Aflatoxina B1 presente en la mezcla

9.3. EVALUACION DEL LÍMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION PARA LAS AFLATOXINAS

La determinación de los límites de detección y cuantificación se realizaron con inyecciones consecutivas las cuales se basaron en la concentración mínima detectada según la bibliografía, las diversas inyecciones se realizaron con concentraciones 100 veces menor que los estándares madres que es de 1000 y 300 ppb respectivamente, lo cual se fueron realizando diluciones consecutivas hasta llegar a un punto que el ruido no comprometiera los picos de los estándares además de que el ruido fuese tres veces menor que el cromatograma el cual se puede apreciar en la figura numero 11. Según lo descrito en la figura y respaldado con la tabla que esta a continuación el área del ruido no es superada en 3 veces el área de los picos de los estándares y esto se debió a que concentraciones menores los picos de los estándares perdían la simetría de los asensos y expresaban tendencias que comprometían la buena simetría, por lo que se procedió a tomar como estándar primario de la curva con el que se determino los límites de detección y cuantificación determinados a continuación.

Área de las Aflatoxinas		Área del ruido en promedio
Aflatoxina B1	144.4	13.42
Aflatoxina B2	115.4	
Aflatoxina G1	87.9	
Aflatoxina G2	102.9	

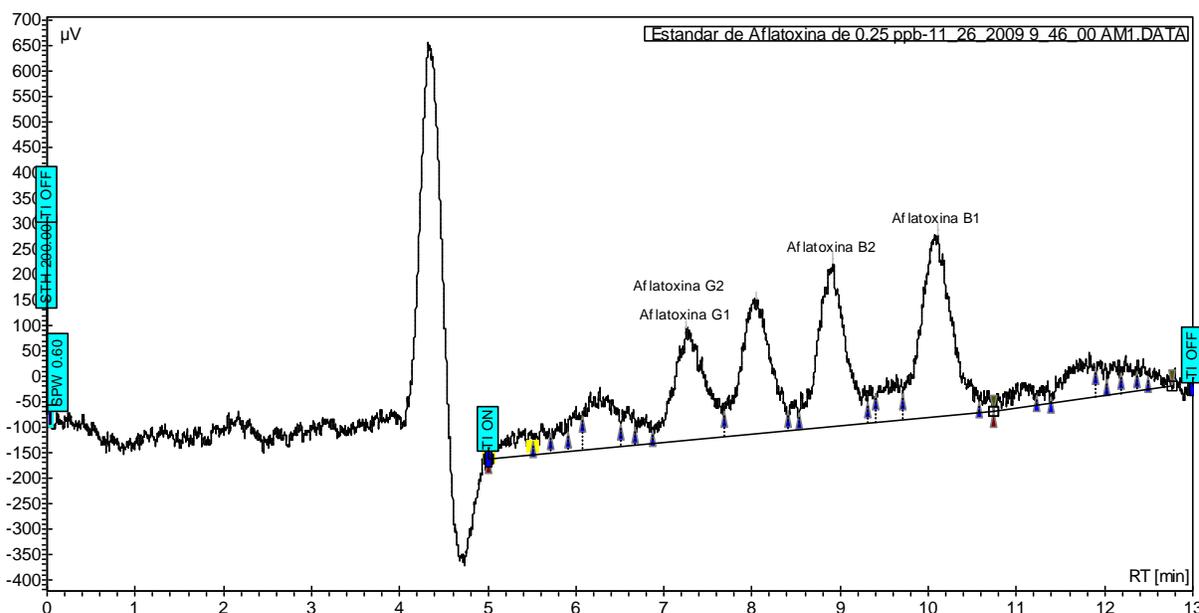


Figura 15. Estándar de Aflatoxina de 0.25 y 0.08 ppb siendo el nivel mas bajo para la determinación del limite de detección y Cuantificación

$$LD = \frac{3.29Sbo}{b1} \quad (15)$$

$$LC = \frac{10Sbo}{b1} \quad (16)$$

Tabla 2. Datos para la evaluación de los limites de detección y cuantificación de las Aflatoxina teóricamente, en base a inyecciones preliminares.

	Aflatoxina G1	Aflatoxina G2	Aflatoxina B1	Aflatoxina B2
Intercepto	99.53	118.95	136.01	114.29
Pendiente	161.13	710.01	344.30	903.400
Sb₀	14.94	25.36	23.64	33.74
Sb₁	5.88	33.55	9.31	44.64
LD	0.30	0.12	0.23	0.12
LC	0.93	0.36	0.69	0.037

Este calculo se realizo con las formulas 15 y 16 respectivamente que coinciden favorablemente con las condiciones experimentales. Según el cromatograma expuesto en la figura No. 10 el ruido no cumple con la particularidad de tener una altura de 3 veces menor, pero si se continuaban inyectando concentraciones menores a esta el ruido aumentaba y no se apreciaba de manera tan inequívoca cada estándar individual en la mezcla. Por lo que se tiene que sacrificar un limite de detección menor para favorecer la selectividad de cada pico y evitar falsos positivos en las cuantificaciones.

Las inyecciones fueron realizadas con replicas de 5 inyecciones al igual que las distintas diluciones que se fueron preparando hasta llegar a estas concentraciones.

9.4. REPETIBILIDAD DE LAS TOXINAS

La repetibilidad de las toxinas se determinó en 5 días consecutivos de trabajo a concentraciones diferentes pero siempre dentro del rango lineal preestablecido de manera practica además de involucrando los parámetros internacionales óptimos y críticos de las toxinas para fines de inocuidad.

La inyecciones por día fueron de 5 replicas respectivamente fue evaluada las varianzas de los resultados de los estándares a estos 3 diferentes niveles a través del test de Barlett. Que se compara mediante la X tabla para determinar si existe o no repetibilidad entre las varianzas de los estándares. Los datos experimentales de estas inyecciones serian descritos a continuación en las siguientes tablas:

Tabla 3. Determinación de la Repetibilidad de los estándares de la Aflatoxina G1 a diferentes niveles de concentración

Aflatoxina G1 1 ppb					
	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	173.00	1703.08	1704.16	1702.62	1703.74
S²	5.11	7.57	12.85	2.39	6.14
n	5	5	5	5	5

Aflatoxina G1 2 ppb

	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	3063.18	3071.8	3073.04	3065.28	3071.26
S²	27.48	60.61	35.06	37.70	22.92
n	5	5	5	5	5

Aflatoxina G1 3 ppb

	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	6063.4	6066.4	6057.7	6064.3	6070.4
S²	24.26	116.65	93.50	76.98	69.34
n	5	5	5	5	5

	1 ppb	2ppb	3ppb
Mc	2.54	1.03	2.16
X²	9.49	9.49	9.49
Conclusiones	M < $\chi^2_{0.95}$ Hay homocedasticidad en las Varianzas		

El Criterio que se tomo en cuenta para determinar si efectivamente estas inyecciones consecutivas tenían repetibilidad lo comparamos de la siguiente manera si $M < \chi^2_{0.95}$ por lo que las varianzas en este caso son homogéneas, quedando evaluado que existe repetibilidad entre las distintas inyecciones de los estándares en días diferentes además que se determino en 3 puntos distintos del ámbito lineal. Por lo que la aflatoxina G1 si tiene repetibilidad entre sus varianzas ya que no existen diferencias significativas entre los distintos días en que se realizaron las inyecciones habiendo homocedasticidad.

Tabla 4. Determinación de la Repetibilidad de los estándares de la Aflatoxina G2 a diferentes niveles de concentración

Aflatoxina G2 0.3 ppb

	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	2466.32	2471.54	2471.78	2472.52	2465.48
S²	8.46	38.83	24.57	34.32	22.87
n	5	5	5	5	5

Aflatoxina G2 0.6 ppb

	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	4067.06	4066.86	4068.86	4068.06	4066.40
S²	26.56	9.96	15.4	11.75	22.01
n	5	5	5	5	5

Aflatoxina G2 1 ppb

	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	6773.88	6769.92	6770.86	6774.02	6772.10
S²	1.52	16.49	22.73	9.72	8.10
n	5	5	5	5	5

	0.3 ppb	0.6 ppb	1 ppb
Mc	2.16	1.24	5.79
X²	9.49	9.49	9.49
Conclusiones	M < $\chi^2_{0.95}$ Hay homocedasticidad en las Varianzas		

El Criterio que se tomo en cuenta para determinar si efectivamente estas inyecciones consecutivas tenían repetibilidad lo comparamos de la siguiente manera si $M < \chi^2_{0.95}$ por lo que las varianzas en este caso son homogéneas, quedando evaluado que existe repetibilidad entre las distintas inyecciones de los estándares en días diferentes además que se determino en 3 puntos distintos del ámbito lineal. Por lo que la aflatoxina G2 si tiene repetibilidad entre sus varianzas ya que no existen diferencias significativas entre los distintos días en que se realizaron las inyecciones habiendo homocedasticidad.

Tabla 5. Determinación de la Repetibilidad de los estándares de la Aflatoxina B1 a diferentes niveles de concentración

Aflatoxina B1 1 ppb

	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	4406.52	4405.02	4404.60	4403.78	4408.02
S²	6.62	10.00	5.15	7.00	2.84
n	5	5	5	5	5

Aflatoxina B1 2 ppb

	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	7254.72	7257.32	7256.3	7260.44	7258.02
S²	2.24	33.61	6.01	26.67	4.70
n	5	5	5	5	5

Aflatoxina B1 3 ppb

	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	32924.66	32926.36	32924.30	32926.88	32928.7
S²	2.38	4.14	4.69	5.77	5.03
n	5	5	5	5	5

	1 ppb	2ppb	3ppb
Mc	1.45	9.35	2.72
X ²	9.49	9.49	9.49
Conclusiones	M < $\chi_{0.95}^2$ Hay homocedasticidad en las Varianzas		

El Criterio que se tomo en cuenta para determinar si efectivamente estas inyecciones consecutivas tenían repetibilidad lo comparamos de la siguiente manera si $M < \chi_{0.95}^2$ por lo que las varianzas en este caso son homogéneas, quedando evaluado que existe repetibilidad entre las distintas inyecciones de los estándares en días diferentes además que se determino en 3 puntos distintos del ámbito lineal. Por lo que la aflatoxina B1 si tiene repetibilidad entre sus varianzas ya que no existen diferencias significativas entre los distintos días en que se realizaron las inyecciones habiendo homocedasticidad.

Tabla 6. Determinación de la Repetibilidad de los estándares de la Aflatoxina B2 a diferentes niveles de concentración

Aflatoxina B2 0.3 ppb

	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	3487.26	3482.32	3487.98	3470.68	3479.56
S ²	15.77	70.24	173.90	157.93	64.24
n	5	5	5	5	5

Aflatoxina B2 0.6 ppb

	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	6762.66	6762.44	6760.10	6765.24	6768.40
S ²	29.55	35.78	23.89	75.32	17.81
n	5	5	5	5	5

Aflatoxina B2 1 ppb

	Día1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
Promedio	12326.76	12325.04	12326.30	12326.90	12321.10
S ²	6.60	5.56	2.24	1.16	10.91
n	5	5	5	5	5

	0.3 ppb	0.6 ppb	1 ppb
Mc	5.26	2.34	5.01
X ²	9.49	9.49	9.49
Conclusiones	M < $\chi_{0.95}^2$ Hay homocedasticidad en las Varianzas		

El Criterio que se tomo en cuenta para determinar si efectivamente estas inyecciones consecutivas tenían repetibilidad lo comparamos de la siguiente manera si $M < \chi^2_{0.95}$ por lo que las varianzas en este caso son homogéneas, quedando evaluado que existe repetibilidad entre las distintas inyecciones de los estándares en días diferentes además que se determino en 3 puntos distintos del ámbito lineal. Por lo que la aflatoxina B2 si tiene repetibilidad entre sus varianzas ya que no existen diferencias significativas entre los distintos días en que se realizaron las inyecciones habiendo homocedasticidad.

9.5. REPETIBILIDAD Y LAS MEDIAS POR DÍA DE LOS ESTANDARES DE LAS AFLATOXINAS

Para la validación de la repetibilidad deben de estudiarse mínimo en un periodo de tiempo de 5 días consecutivos , para lo que se prepararon 5 replicas de un patrón determinado para la mezcla que se encuentra definido dentro del ámbito de trabajo del método.

Una vez que se realizaron las inyecciones y se generaron los datos se calculo se realizo la prueba estadística de Anova de 1 factor, y se calcula el RSD y el RSD_I.

9.5.1. Datos de la repetibilidad para la Aflatoxina G1

Tabla 7. Análisis de Anova de 1 factor para la Aflatoxina G1 a una concentración de 1 ppb

VARIANZA	SC	GL	X DE C	F	SD ²	SI ²	X MEDIA
Entre Días	74.98160172	4	18.7454	2.1215764	16.97828	8.1426804	16325.171
Dentro de los días	176.7119989	20	8.8356	F _{crítico}	RSD	RSD _I	
				2.86	0.018207917	0.017479	
Total	251.6936007	24					

Leyenda:

SC= Suma de Cuadrados

GL= Grados de Libertad

X de C= Promedio de los Cuadrados

X_{Media}= Promedio de las Medias

RSD= Desviación Estándar Relativa de la repetibilidad

RSD_I= Precisión Intermedia de los residuales

SD²= Desviación estándar

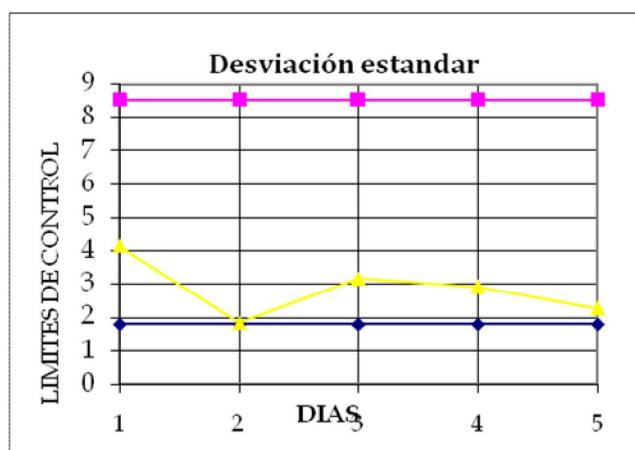
SI²= Desviación intermedia

No existen diferencias significativas entre los diferentes días de análisis. Porque F_{cal} es menor que el F_{tabla}, por lo que queda demostrado que existe repetibilidad en las distintas inyecciones realizadas en distintos días de trabajo, bajo las mismas condiciones cromatograficas y ambientales. . Por lo que existe homocedasticidad en los datos de las áreas de los cromatogramas.

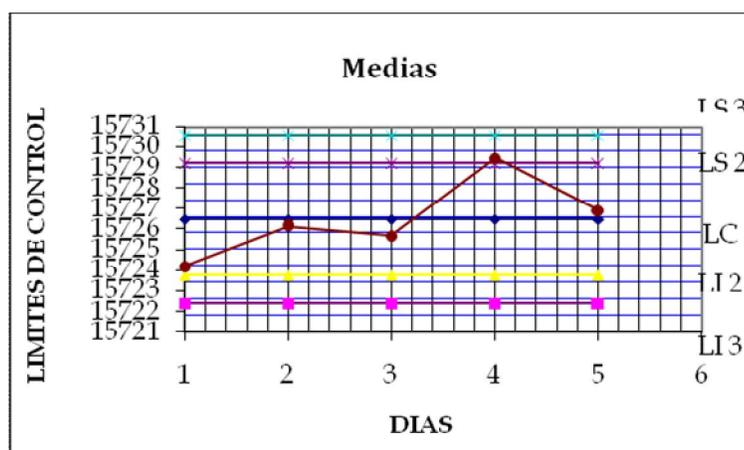
Otra forma de evaluar la repetibilidad es por medio de los gráficos de control expuestos a continuación:

Tabla 8. Limites de Control de las Medias y las Desviaciones Estándares de la Aflatoxina G1

Repetibilidad de las Desviación Estándar		Repetibilidad para las Medias	
Limite Central	2.86	Limite Central	15726.48
Limite Inferior	1.78	Limite Inferior 3σ	15722.40
Limite Superior	8.54	Limite Inferior 2σ	15723.76
		Limite Superior 3 σ	15730.57
		Limite Superior 2σ	15729.21



Gráfica 1. Repetibilidad de las Desviación estandar de la Aflatoxina G1



Gráfica 2. Repetibilidad e las medias de la Aflatoxina G1

En las Graficas 1 y 2 se puede observar que la carta de control evaluado para la desviaciones estandar del estandar de Aflatoxina G1 sigue una tendencia peridiocidad demostrando que hay incrementos y descensos que contribuye a una baja dispersion de los resultados, ademas de que se encuantran dentro de los limites de control aunque en la grafica 2 se ve que 1 punto se incremneteta y sube al limite de alerta, luego se restringe al area de control ademas que hay un descenso que demuetra que es aceptable y que tiene buena repetibilidad en las inyecciones.

Además el RSD% permitido para HPLC en este tipo de ensayo debe de estar por debajo de 5 para que los errores cometidos durante estos ensayos sean poco significativos. Y el RSD esta por debajo de este valor por lo que los estándares tienen buena repetibilidad.

9.5.2. Datos de la repetibilidad para la Aflatoxina G2

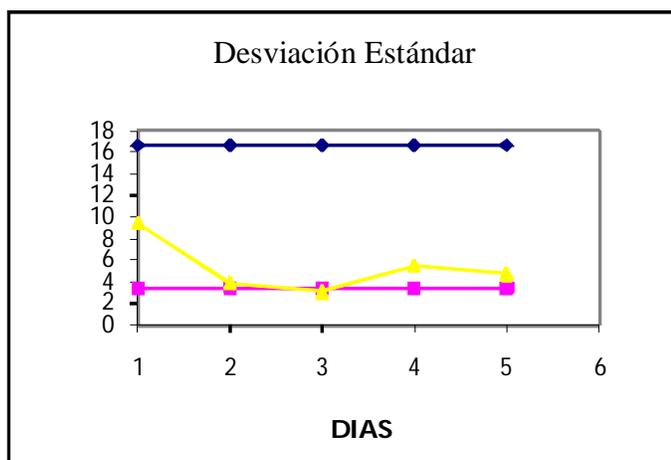
Tabla 9. Análisis de Anova de 1 factor para la Aflatoxina G2 a una concentración de 0.3 ppb

VARIANZA	SC	GL	X DE C	F	SD ²	SI ²	X MEDIA
Entre Dias	23.36	4	5.839999	0.17426	5.5348	0.9477	36520
Dentro de los Días	670.28	20	33.514	F _{critico}	RSD	RSD_I	
				2.86	0.0159	0.002666	
Total	693.64	24					

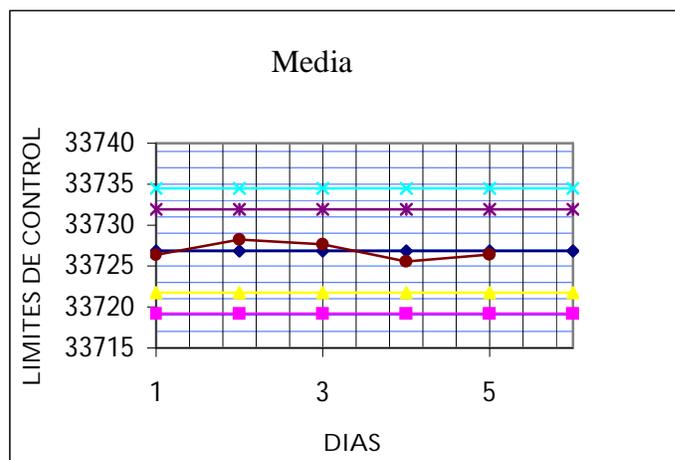
No existen diferencias significativas entre los diferentes días de análisis. Porque F_{cal} es menor que el F_{tabla} , por lo que queda demostrado que existe repetibilidad en las distintas inyecciones realizadas en distintos días de trabajo, bajo las mismas condiciones cromatograficas y ambientales. Por lo que existe homocedasticidad en los datos de las áreas de los cromatogramas.

Tabla 10. Limites de Control de las Medias y las Desviaciones Estándares de la Aflatoxina G2

Repetibilidad de las Desviación Estándar		Repetibilidad para las Medias	
Limite Central	5.3464	Limite Central	33727
Limite Inferior	3.4685	Limite Inferior 3 σ	33719
Limite Superior	16.635	Limite Inferior 2 σ	33722
		Limite Superior 3 σ	33734
		Limite Superior 2 σ	33732



Gráfica 3. Repetibilidad de las Desviación estandar de la Aflatoxina G2



Gráfica 4. Repetibilidad e las medias de la Aflatoxina G2

En las Graficas 3 y 4 se puede observar que la carta de control evaluado para la desviaciones estandar del estandar de Aflatoxina G2 sigue una tendencia peridiocidad demostrando que hay incrementos y descensos que contribuye a una baja dispersion de los resultados, ademas de que se encuantran dentro de los limites de control aunque en la grafica 2 se ve que 1 punto se incremneteta y sube al limite de alerta, luego se restringe al area de control ademas que hay un descenso que demuetra que es aceptable y que tiene buena repetibilidad en las inyecciones.

Además el RSD% permitido para HPLC en este tipo de ensayo debe de estar por debajo de 5 para que los errores cometidos durante estos ensayos sean poco significativos. Y el RSD esta por debajo de este valor por lo que los estándares tienen buena repetibilidad.

9.5.4. Datos de la repetibilidad para la Aflatoxina B1

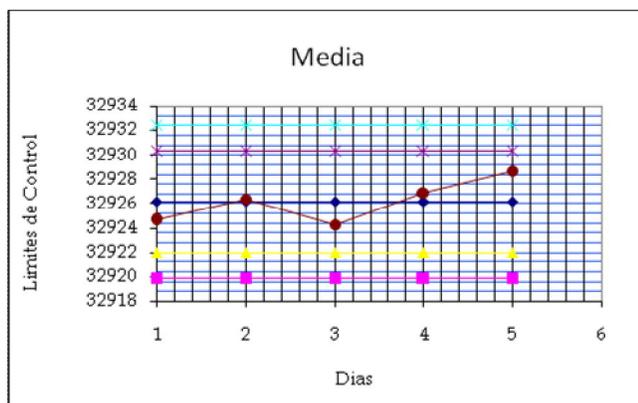
Tabla 11. Análisis de Anova de 1 factor para la Aflatoxina B1 a una concentración de 1 ppb

VARIANZA	SC	GL	X DE C	F	SD ²	SI ²	X MEDIA
Entre días	63.588	4	15.897	0.7686	0.9571	21.64	34019
Dentro de los días	413.65	20	20.6826	F _{critico}	RSD	RSD _I	
				2.86	0.0134	0.013674	
Total	477.24	24					

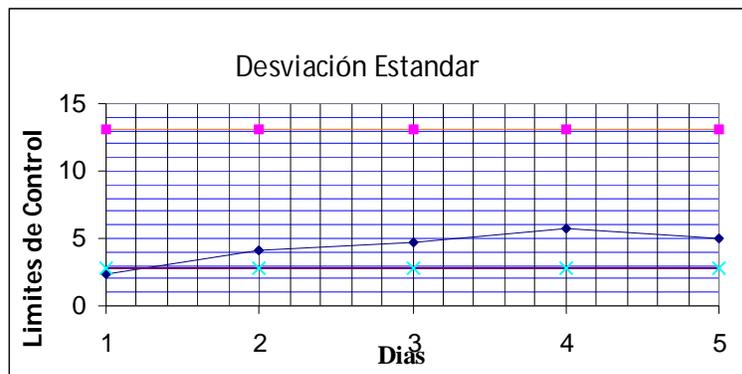
No existen diferencias significativas entre los diferentes días de análisis. Porque F_{cal} es menor que el F_{tabla} , por lo que queda demostrado que existe repetibilidad en las distintas inyecciones realizadas en distintos días de trabajo, bajo las mismas condiciones cromtograficas y ambientales. Por lo que existe homocedasticidad en los datos de las áreas de los cromatogramas.

Tabla 12. Limites de Control de las Medias y las Desviaciones Estándares de la Aflatoxina B1

Repetibilidad de las Desviación Estándar		Repetibilidad para las Medias	
Limite Central	4.4018	Limite Central	32926
Limite Inferior	2.7247	Limite Inferior 3 σ	32920
Limite Superior	13.068	Limite Inferior 2 σ	32922
		Limite Superior 3 σ	32932
		Limite Superior 2 σ	32930



Gráfica 5. Repetibilidad de las Desviación estandar de la Aflatoxina B1



Gráfica 6. Repetibilidad e las medias de la Aflatoxina B1

En las Gráficas 5 y 6 se puede observar que la carta de control evaluado para la desviaciones estandar del estandar de Aflatoxina G2 sigue una tendencia peridiocidad demostrando que hay incrementos y descensos que contribuye a una baja dispersion de los resultados, además de que se encuentran dentro de los límites de control aunque en la grafica 2 se ve que 1 punto se incrementa y sube al límite de alerta, luego se restringe al área de control además que hay un descenso que demuestra que es aceptable y que tiene buena repetibilidad en las inyecciones.

Además el RSD% permitido para HPLC en este tipo de ensayo debe de estar por debajo de 5 para que los errores cometidos durante estos ensayos sean poco significativos. Y el RSD esta por debajo de este valor por lo que los estándares tienen buena repetibilidad.

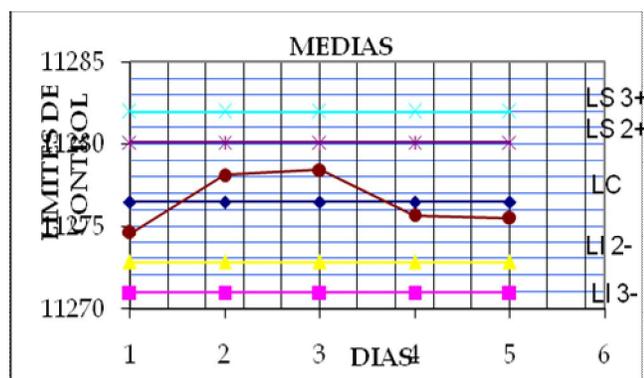
Tabla 13. Análisis de Anova de 1 factor para la Aflatoxina B2 a una concentración de 0.3 ppb

VARIANZA	SC	GL	X DE C	F	SD ²	SI ²	X MEDIA
Entre días	63.588	4	15.897	0.7686	0.9571	21.64	34019
Dentro de los días	413.65	20		F _{critico}	RSD	RSD _I	
				2.86	0.0134	0.013674	
Total	477.24	24					

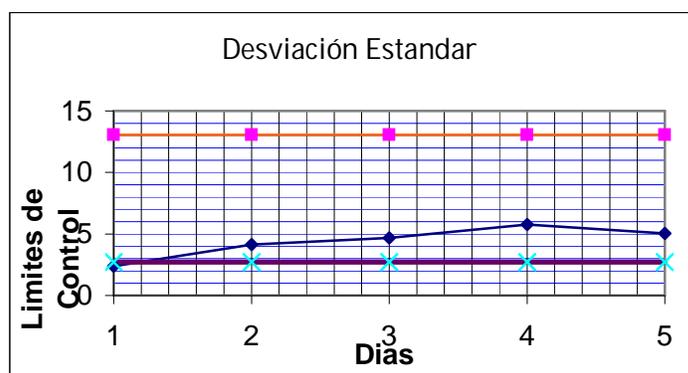
No existen diferencias significativas entre los diferentes días de análisis. Porque F_{cal} es menor que el F_{tabla} , por lo que queda demostrado que existe repetibilidad en las distintas inyecciones realizadas en distintos días de trabajo, bajo las mismas condiciones cromatograficas y ambientales. Por lo que existe homocedasticidad en los datos de las áreas de los cromatogramas.

Tabla 14. Limites de Control de las Medias y las Desviaciones Estándares de la Aflatoxina B2

Repetibilidad de las Desviación Estándar		Repetibilidad para las Medias	
Limite Central	3.83396	Limite Central	11276.5
Limite Inferior	2.35999	Limite Inferior 3σ	11271
Limite Superior	11.319	Limite Inferior 2σ	11272.8
		Limite Superior 3 σ	11281.9
		Limite Superior 2σ	11280.1



Gráfica 7. Repetibilidad de las Desviación estandar de la Aflatoxina B2



Gráfica 8. Repetibilidad e las medias de la Aflatoxina B2

En las Graficas 5 y 6 se puede observar que la carta de control evaluado para la desviaciones estandar del estandar de Aflatoxina G2 sigue una tendencia peridiocidad demostrando que hay incrementos y descensos que contribuye a una baja dispersion de los resultados, ademas de que se encuantran dentro de los limites de control aunque en la grafica 2 se ve que 1 punto se incremneteta y sube al limite de alerta, luego se restringe al area de control ademas que hay un descenso que demuestra que es aceptable y que tiene buena repetibilidad en las inyecciones.

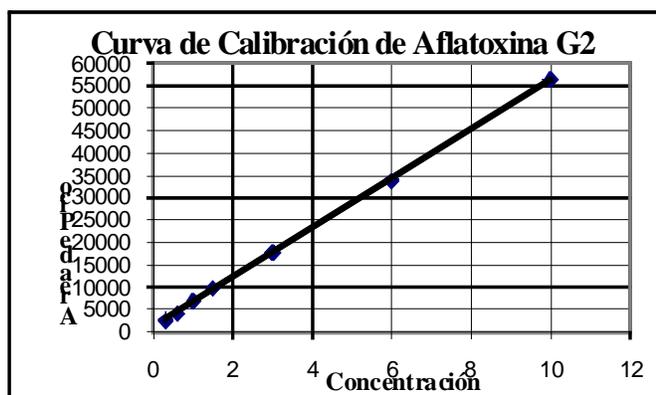
Además el RSD% permitido para HPLC en este tipo de ensayo debe de estar por debajo de 5 para que los errores cometidos durante estos ensayos sean poco significativos. Y el RSD esta por debajo de este valor por lo que los estándares tienen buena repetibilidad.

9.6. LINEALIDAD Y RANGO DE LAS AFLATOXINAS

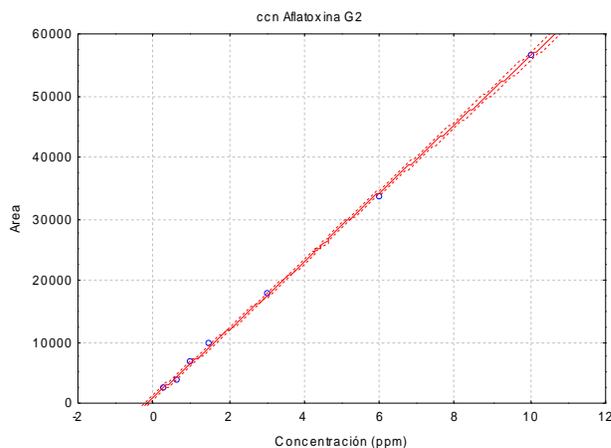
Tabla 14. Datos de las areas de los cromatogramas de cada Aflatoxina ara la realizacion de la Curva de Calibración a diferentes Niveles.

Conc.	Área de Pico		Conc.	Área de Pico	
	G1	B1		G2	B2
1	1703.32	4405.6	0.3	2469.7	3481.56
2	3068.912	7257.4	0.6	4067.4	6763.77
3	6064.444	10729	1	6772.3	11276.5
5	8562.876	17765	1.5	9664.2	12325.2
10	15726.484	32926	3	17726	23407.4
20	31419.248	61057	6	33727	49247.1
30	45667.1596	91588	10	56424	84268.2
Ecuación	$y = 1511.2x + 702.16$	$y = 2988.7x + 1932.7$		$y = 5524.6x + 1014.1$	$y = 8215.9x + 961.85$
R ²	0.9989	0.9995		0.9998	0.9975

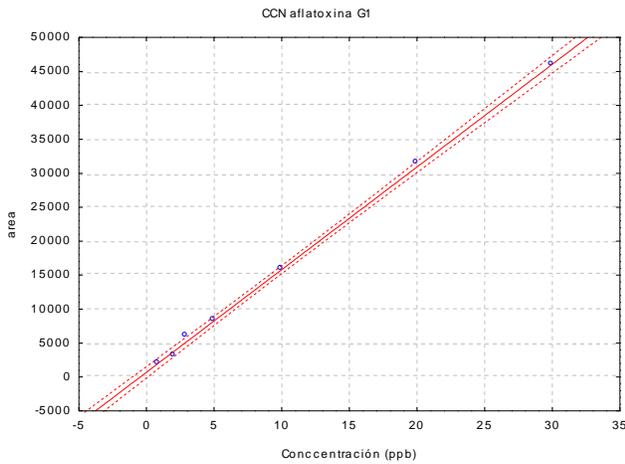
Los datos expuestos en esta tabla surgieron como resultado de promedios que se realizaron en múltiples inyecciones, cada estándar de diferente nivel (mezcla de Aflatoxinas) los que fueron inyectados por quintuplicado, completando 7 niveles para cada curva de Calibración, la trayectoria de las inyecciones siempre fue lineal, ya que estas evaluaciones se realizaron en diferentes días de trabajo, además de ser expuesto el estándar a diferentes procesos de pre acondicionamiento como fueron tiempo de temperado diferente entre los distintos días, además que los estándares por distintas horas de inyecciones no sufrían degradaciones o cambios significativos en la rutina de trabajo.



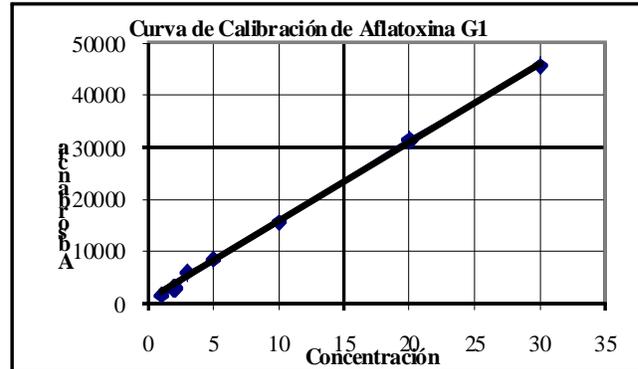
Grafica 10. Curva de Calibración de la Aflatoxina G2



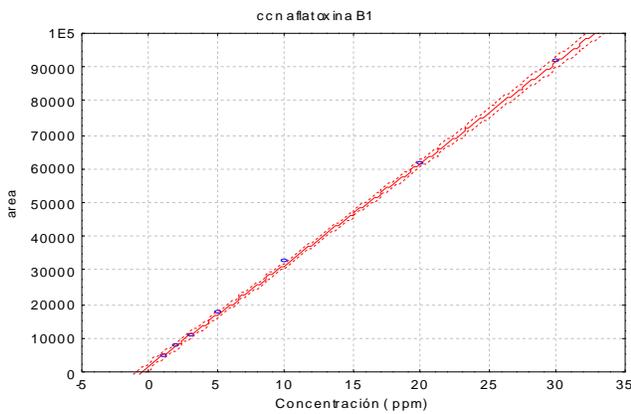
Grafica 11. Intervalo de la Curva de Calibración de la Aflatoxina G2



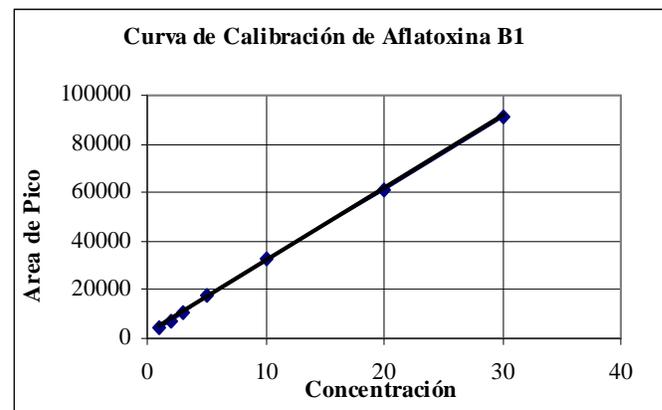
Gráfica 12. Curva de Calibración de la Aflatoxina G1 con los Intervalos



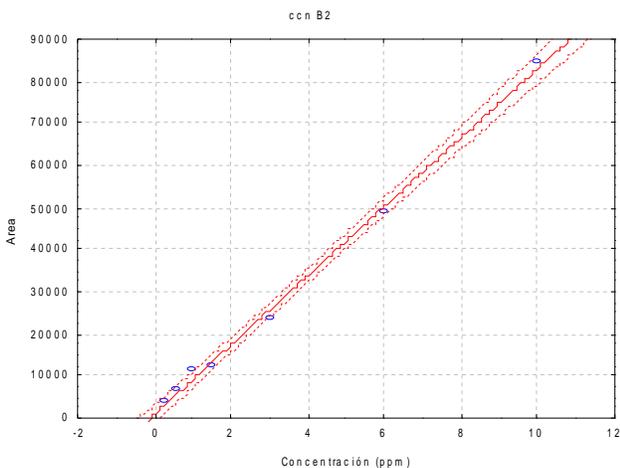
Gráfica 13. Curva de Calibración de la Aflatoxina G1



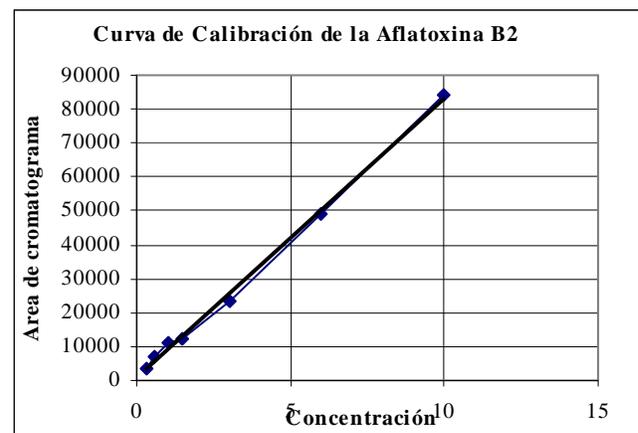
Gráfica 14. Curva de Calibración de la Aflatoxina B1 con los Intervalos



Gráfica 15. Curva de Calibración de la Aflatoxina B1



Gráfica 16. Curva de Calibración de la Aflatoxina B2 con los Intervalos



Gráfica 17. Curva de Calibración de la Aflatoxina B2

La linealidad de los estándares fue determinada en un ámbito de concentraciones de 1-30 ppb en los estándares de Aflatoxinas de G1 y B1 y de 0.3 -10 ppb de Aflatoxinas B2 y G2, el cual se estableció por motivos de demanda las mayores incidencias de concentraciones de nuestro clientes además de los limites que deben de regir la presencia de estas toxinas a nivel internacional, pues estas concentraciones deben de encontrarse dentro de la linealidad en la cual se evaluaran en jornadas de trabajo de rutina que satisfacen la necesidades de los demandantes de este servicio en el laboratorio.

Pero la linealidad también fue evaluada a concentraciones menores y mayores demostrando que la tendencia de las aflatoxinas tanto a concentraciones mayores como menores siempre sigue teniendo linealidad, esto demuestra que en un periodo de tiempo además que las concentraciones no se ven alteradas, siempre se siguió la misma rutina de trabajo con el propósito de siempre seguir una jornada de trabajo sin alteraciones que pudieran comprometer la veracidad de las inyecciones. Los estándares son mantenidos en frizer para evitar que se degraden o que el metano se evapore por no tener los viales cierre completamente herméticos y así se preconcentren lo cual ocasionaría malas cuantificaciones para este servicio sabiendo la responsabilidad que es emitir concentraciones alteradas para este ensayo.

Tabla 15. Estadística de Regresión de las Aflatoxinas evaluada en la mezcla de los Estándares.

<i>Estadísticas de la regresión</i>				
	<i>Aflatoxina G1</i>	<i>Aflatoxina G2</i>	<i>Aflatoxina B1</i>	<i>Aflatoxina B2</i>
Coefficiente de correlación múltiple	0.999434602	0.99988714	0.99946797	0.99872553
Coefficiente de determinación R²	0.998869523	0.9997743	0.99893621	0.99745268
R² ajustado	0.998643428	0.99972916	0.99872346	0.99694321
Error típico	609.5977306	325.791143	1134.09241	1629.55517
Observaciones	7	7	7	7

La estadística de regresión se realizaron mediante los datos obtenidos para la determinación de la linealidad de cada uno de los estándares de Aflatoxina por lo que estas inyecciones fueron realizadas en distintos días bajo las mismas condiciones de trabajos, un total de replicas de 5. Mostrando que la dispersión de los resultados no era significativa por los que las toxinas tenían una buena linealidad, y poca dispersión entre los distintos días en los que fueron evaluadas sus áreas. Siguiendo las Aflatoxinas un modelo lineal en el ámbito de concentraciones seleccionados para las cuantificaciones ya que los R² se encuentran dentro de los valores de 0.99, además de esto la grafica de los residuales corrobora que las dispersiones en cada uno de los estándares no es significativa pues la tendencia que tienen son regulares.

Tabla 16. Evaluación de Anova de un factor para Cada una de las Aflatoxinas contenida en las mezcla de Estándares.

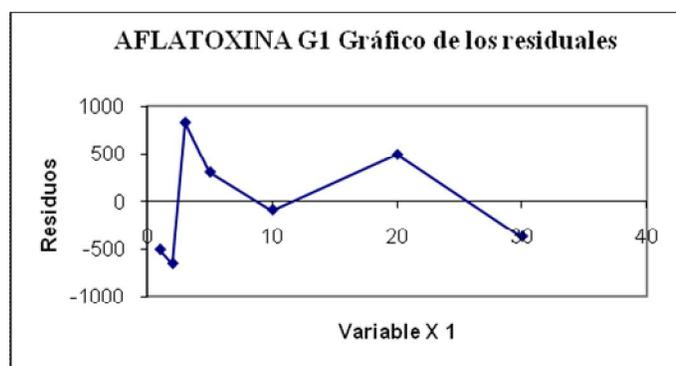
		<i>GL</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Promedio de los Cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>F critico</i>
AFLATOXINA G1	Regresión	1	1641738066	1641738066	4417.913263	1.4595E-08
	Residuos	5	1858046.97	371609.3931		
	Total	6	1643596113			
AFLATOXINA G2	Regresión	1	2350780822	2350780822	22147.9529	2.5987E-10
	Residuos	5	530699.345	106139.869		
	Total	6	2351311521			
AFLATOXINA B1	Regresión	1	6038792841	6038792841	4695.19081	1.2537E-08
	Residuos	5	6430827.93	1286165.59		
	Total	6	6045223669			
AFLATOXINA B2	Regresión	1	5198960599	5198960599	1957.84537	1.113E-07
	Residuos	5	13277250.3	2655450.05		
	Total	6	5212237849			

Por medio de ANOVA podemos observar que al ser el F calculado menor que el F critico se acepta la hipótesis nula la cual se planteo al inicio de los ensayos que exponía que no había diferencia significativa entre las medias de las distintas inyecciones de los diferentes niveles de las concentraciones de los estándares de Aflatoxina, la cual fue definida como la variable critica el tiempo, ya que el estudio se realizo en un tiempo estimado de variación así como también se realizaron las inyecciones por diferentes analistas con el propósito de evaluar la eficiencia con distintos inyectores ya que el sistema de inyección del HPLC con el que se realizo el estudio es manual, por o que el factor humano era una variable de evaluación significativa.

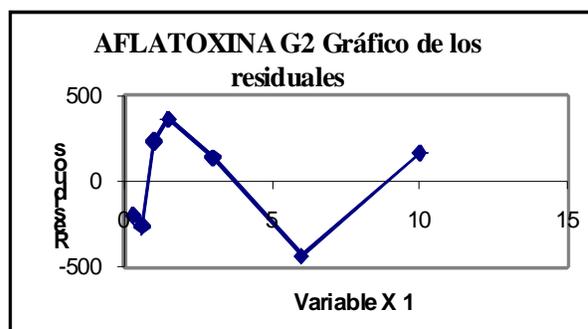
9.7. ANALISIS DE RESIDUALES

Los residuales son referencias estadísticas que nos permiten evaluar en que medida los estándares tienen tendencias de dispersiones aceptables, por lo que estos estudios se evaluaron con los promedios de las inyecciones de los estándares de las Aflatoxinas en cada día, aunque en cada día se hayan realizado 5 inyecciones por cada nivel, por lo que se puede apreciar en cada uno de los gráficos a continuación del 18 al 21 que realmente la tendencia del grafico es simétrica pues hay un comportamiento ascendente y descendente si mostrar ninguna anomalía que demuestre que las dispersiones entre las diferentes concentraciones de los estándares son significativas en un corte de tiempo estimado.

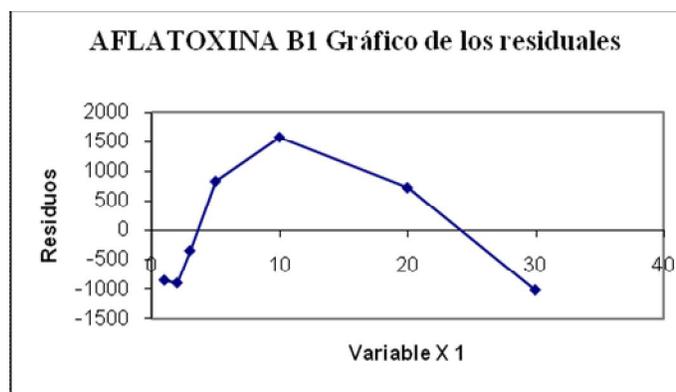
GRAFICO DE LOS RESIDUELES DE LOS ESTANDARES DE AFLATOXINAS



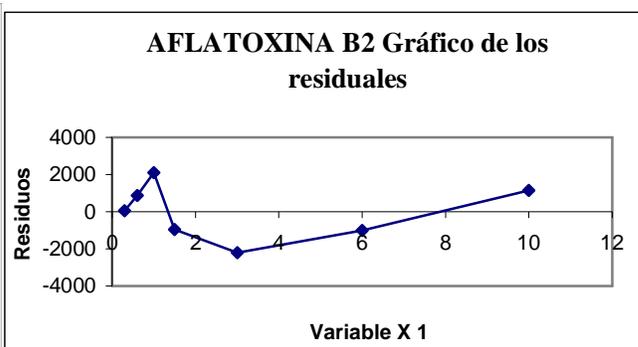
Grafica 18. Grafico de los Residuales de Aflatoxina G1



Grafica 19. Grafico de los Residuales de Aflatoxina G2



Grafica 20. Curva de Calibración de la Aflatoxina B2 con los Intervalos



Grafica 21. Curva de Calibración de la Aflatoxina B2

Las Aflatoxinas presentan tendencias aceptables en el transcurso del tiempo experimental que fue el que se estimo para realizar todos los tratamientos de validación, cada uno dentro de su intervalos de concentraciones con lo que se construyeron las curvas de calibración presentan tendencias aceptables y normales sin anomalías que pudieran demostrar desviaciones que sugirieran problemas en las cuantificaciones de las áreas de los estándares en sus concentraciones ascendentes.

Cada Aflatoxina se evaluó por separado aunque las inyecciones hayan sido en mezcla pues al momento de realizar cuantificaciones o reportes cada una de ellas presentan particularidades distintas por lo que cada una de ellas tienen sus particularidades.

9.8. RECUPERACIÓN DEL ESTANDAR DE AFLATOXINAS

La recuperación que se realizaron a lo largo de los ensayos fue realizada con concentraciones teóricas de 5 y 1.5 ppb de Aflatoxinas, estas concentraciones fueron adicionadas desde el principio del tratamiento de la muestra con el fin de evaluar cualquier punto crítico que pudiera ocasionar perdidas al momento de la cuantificación de las concentraciones encontradas en muestras de rutina, estableciendo como parámetro de referencia de este ensayo una recuperación aceptable en por ciento de 80 a 120, por lo que cada una de las Aflatoxinas presentaron estar dentro de este intervalo de manera satisfactoria. (Ver lo datos en detalle en anexo 2)

Tabla 17. Por cientos de recuperación obtenido para cada Aflatoxina

Por ciento de Recuperación	Aflatoxina B1	Aflatoxina B2	Aflatoxina G1	Aflatoxina G2
	92.02±8.58	87.56±8.44	92.68±8.11	96.80±8.14

* Ver en detalle la determinación de la incertidumbre de los porcentajes de recuperación en el capítulo 9.9.

Cada uno de los estándares fueron inyectados a muestras en blanco (esto fue determinado en anteriores análisis a muestras que salieron negativas en esta determinación) con concentraciones variantes ya que en la mezcla los estándares poseen diferentes concentraciones, cada uno fue adicionado en concentraciones de la solución madre de 300 y 900 ppb para que a la hora de evaluar la concentración teórica se estimen todas las posibles perdidas que se producen en la trayectoria de las extracciones, así como sus consecutivas diluciones, el fin de la recuperación de las concentraciones de los estándares es evaluar de manera se pueden tener perdidas de de los estándares adicionados a muestras negativas una vez que se estima la concentración que se debe de obtener al final, por lo que la concentración que llamaremos teórica, es aquella que se obtiene estimando mediante calculo todas aquellas perdidas en la dilución y extracción, lo que se comparara con la concentración determinada por el software de Galaxie (software del HPLC) en el que se emite directamente mediante la comparación con la curva de calibración que se encuentra descrita por los estándares que conforman la curva de calibración (concentración experimental).

Después de evaluar las recuperaciones que se obtuvieron en cada uno de las adiciones se obtuvieron recuperaciones aceptables que oscilaron entre del 87.56 al 96.80% por lo que es lo esperado para esta determinación así como para la técnica, debido a la sensibilidad, además que la técnica de extracción es bastante selectiva y las perdidas durante el proceso de extracción son relativamente pequeñas en comparación con otros métodos de ensayo.

9.9. DETERMINACION DE LA INCERTIDUMBRE [14.8.2-14.8.7]

9.9.1. Procedimiento para la estimación de la Incertidumbre según la GUM ISO 1995

9.9.1.2. Incertidumbre para la Concentración en las muestras

9.9.1.2.1. Definición del Mensurando

$$C = f(b_0, b_1, y, r) \pm U_c$$

$b_0 = \text{int ercepto}$

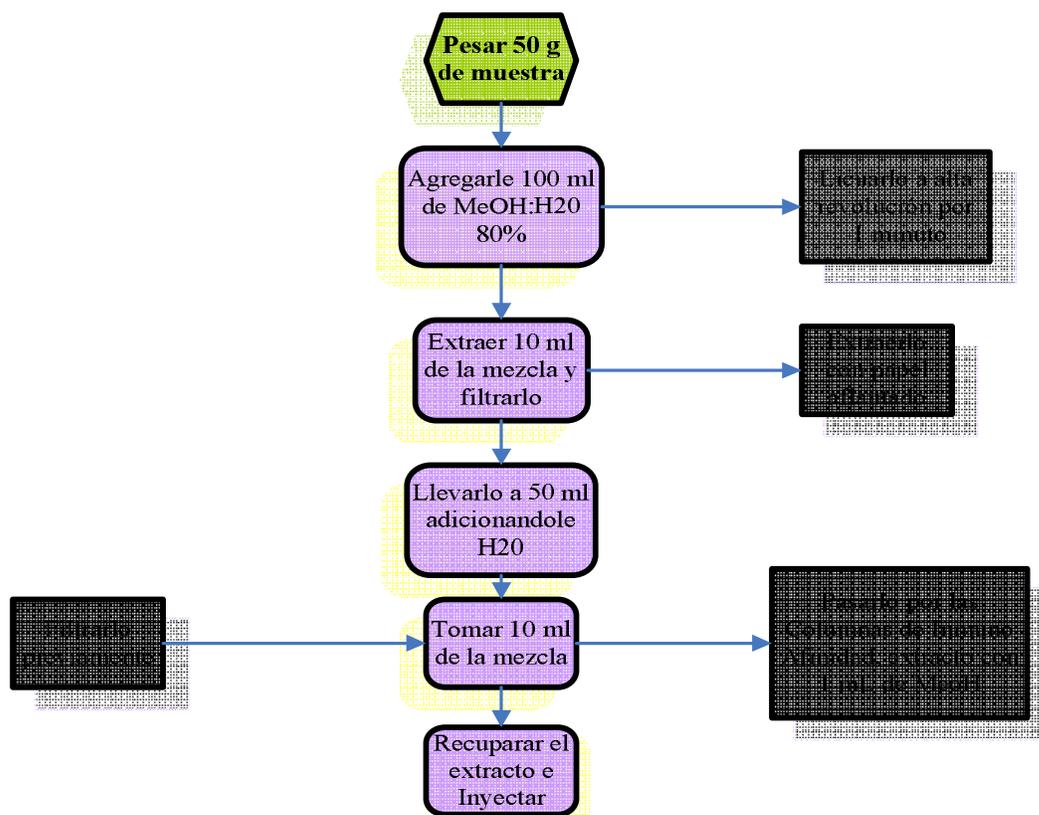
$b_1 = \text{pendiente}$

$y = \text{area del es tan dar}$

$r = \text{coeficiente de correlación}$

Donde $U_c = k u_c$; u_c es la incertidumbre combinada; k es el factor de cobertura, que depende de los grados de libertad y de las diferentes distribuciones de probabilidad de las variables de entrada implicadas en la incertidumbre combinada.

9.9.1.2.2. Diagrama de Procedimiento del método de Aflatoxinas

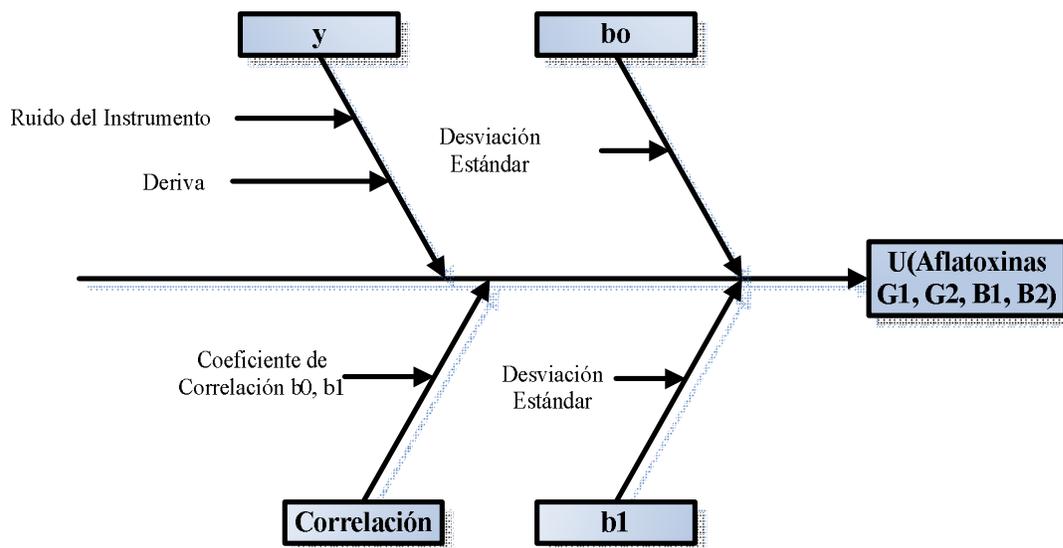


[14.8.2-14.8.7] Ver detalles de la bibliografía en capítulo 14

9.9.1.2.3. Modelo Matemático

$$\text{Concentración}_{\text{Aflatoxina B1, B2, G1, G2}} = \frac{y - b_0}{b_1}$$

9.9.1.2.4. Identificación de los Componentes de la Incertidumbre



9.9.1.2.5. Cuantificación de los componentes de la incertidumbre

9.9.1.2.5.1. Fórmula para determinar la incertidumbre de la muestra se describe a continuación

$$u = \sqrt{(u_{am}^2 \times c_{am}^2) + (u_{bo}^2 \times c_{bo}^2) + (u_{b1}^2 \times c_{b1}^2) + 2(c_{bo} \times c_{b1} \times u_{bo} \times u_{b1} \times r)} \quad (22)$$

9.9.1.2.5.2. Coeficientes de Sensibilidad

$$r = \frac{\sum x_i}{n\sqrt{x_i^2 \times n}} \quad (18)$$

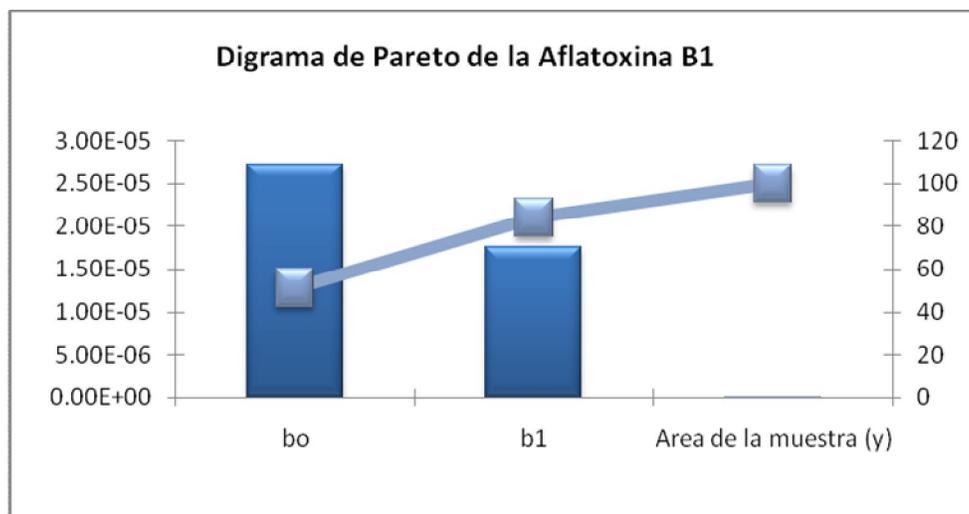
$$c_y = \frac{\partial C}{\partial y} = \frac{1}{b_1} \quad (19)$$

$$c_{b_0} = \frac{\partial x}{\partial b_0} = -\frac{1}{b_1} \quad (20)$$

$$c_{b_1} = \frac{\partial c}{\partial b_1} = -\frac{y - b_0}{b_1^2} \quad (21)$$

Tabla 18. Consolidado de los factores que contribuyen a la Incertidumbre de la Aflatoxina B1

Parámetro xi	Valor de xi	u _{xi}	c _{xi}	$c_{xi}^2 u_{xi}^2$	Ind %
Aflatoxina B1 (concentración)	0.76	0.029	0.1	8.41x10 ⁻⁶	15.80
Intercepto b0	2364.45	229.22	-3.45x10 ⁻⁴	2.72x10 ⁻⁵	51.12
Pendiente b1	2898.36	15.98	-2.63x10 ⁻⁴	1.76x10 ⁻⁵	33.08
Coefficiente de Correlación (R)	-0.101	---	---		
Área de la muestra (y)	4578.5	0.133	3.45x10 ⁻⁴	2.11x10 ⁻⁹	3.96 x10 ⁻³
Repetibilidad	0.008	1.7x10 ⁻³	---	2.89x10 ⁻⁶	
Ruido	8.27	0.133	---	0.017	
Deriva	0.004	2.04x10 ⁻³	---	4.16x10 ⁻⁶	
			Total	5.32x10 ⁻⁵	



Incertidumbre de la muestra

0.76 ppb ± 0.076

Incertidumbre expandida

$u_e = u \times 1.96 \quad (23)$

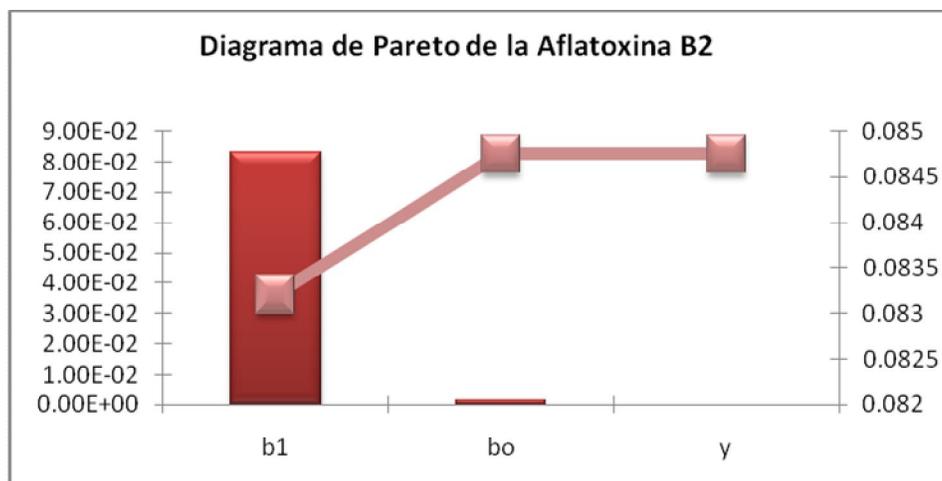
0.76 ppb ± 0.14

Según el diagrama de pareto los puntos críticos para la estimación de la incertidumbre en la determinación de las Aflatoxinas son los determinados en la realización de la curva de calibración, esto se debe de tomar en cuenta en los momentos en que se evalué periódicamente la repetibilidad de las áreas de los estándares en cada sesión de trabajo, pues no puede quedar sin

revisiones ya podría poner en riesgo los datos emitidos para esta determinación. Siendo el intercepto y la pendiente reflejos de las inyecciones de los estándares que sirven para las cuantificaciones es evidente la importancia de su contribución de la incertidumbre pues las cuantificaciones dependen directamente de la curva de calibración realizada en esta validación.

Tabla 19. Consolidado de los factores que contribuyen a la Incertidumbre de la Aflatoxina B2

Parámetro xi	Valor de xi	u_{xi}	c_{xi}	$c_{xi}^2 u_{xi}^2$	Ind %
Aflatoxina B2 (concentración)	0.14	0.004	0.1	1.6×10^{-7}	
Intercepto b0	961.85	323.46	-1.22×10^{-4}	1.55×10^{-3}	1.82
Pendiente b1	8215.92	70.18	1.69×10^{-5}	8.32×10^{-2}	98.17
Coefficiente de Correlación (R)	-0.099	---			
Área de la muestra (y)	2100.5	1.33×10^{-2}	1.22×10^{-4}	2.63×10^{-12}	3.10×10^{-9}
Repetibilidad	8.6×10^{-3}	6.53×10^{-3}		4.26×10^{-7}	
Ruido	8.27	0.133	---	0.017	
Deriva	0.004	2.04×10^{-3}	---	4.16×10^{-6}	
			Total	0.0847	



Incertidumbre de la muestra

$0.14 \text{ ppb} \pm 0.039$

Incertidumbre expandida

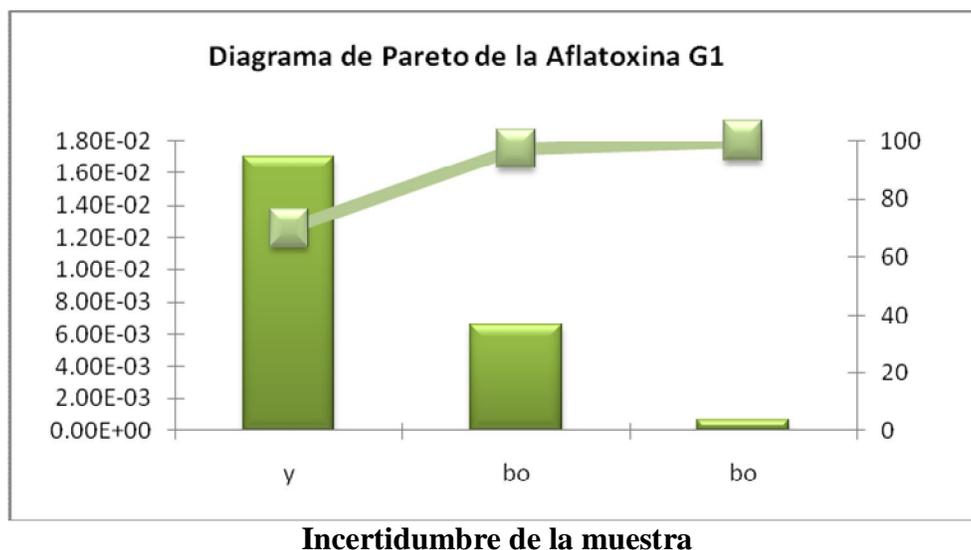
$u_e = u \times 1.96 \quad (23)$

$0.14 \text{ ppb} \pm 0.076$

Según el diagrama de pareto los puntos críticos para la estimación de la incertidumbre en la determinación de las Aflatoxina B2 es la pendiente que contribuye a la cuantificación mediante la curva de calibración, esto se debe de tomar en cuenta en los momentos en que se evalúe periódicamente la repetibilidad de las áreas de los estándares en cada sesión de trabajo. Por lo que por cada evento de trabajo se verificara la tendencia de la pendiente mediante la inyección e un punto de la curva y verificar su comportamiento así como la dispersión que presenta de la curva de calibración.

Tabla 20. Consolidado de los factores que contribuyen a la Incertidumbre de la Aflatoxina G1

Parámetro xi	Valor de xi	u _{xi}	c _{xi}	$c_{xi}^2 u_{xi}^2$	Ind %
Aflatoxina G1 (concentración)	4.72	0.009	0.1	1.01×10^{-2}	
Intercepto b0	702.16	123.21	-6.61×10^{-4}	6.63×10^{-3}	27.23
Pendiente b1	1511.23	8.59	-3.12×10^{-3}	7.15×10^{-4}	2.94
Coefficiente de Correlación (R)	-0.101	---	---		
Área de la muestra (y)	7841.6	0.134	6.61×10^{-4}	1.7×10^{-2}	69.83
Repetibilidad	0.011	2.18×10^{-3}	---		
Ruido	8.27	0.133	---		
Deriva	0.004	2.04×10^{-3}	---		
			Total	2.43×10^{-2}	100



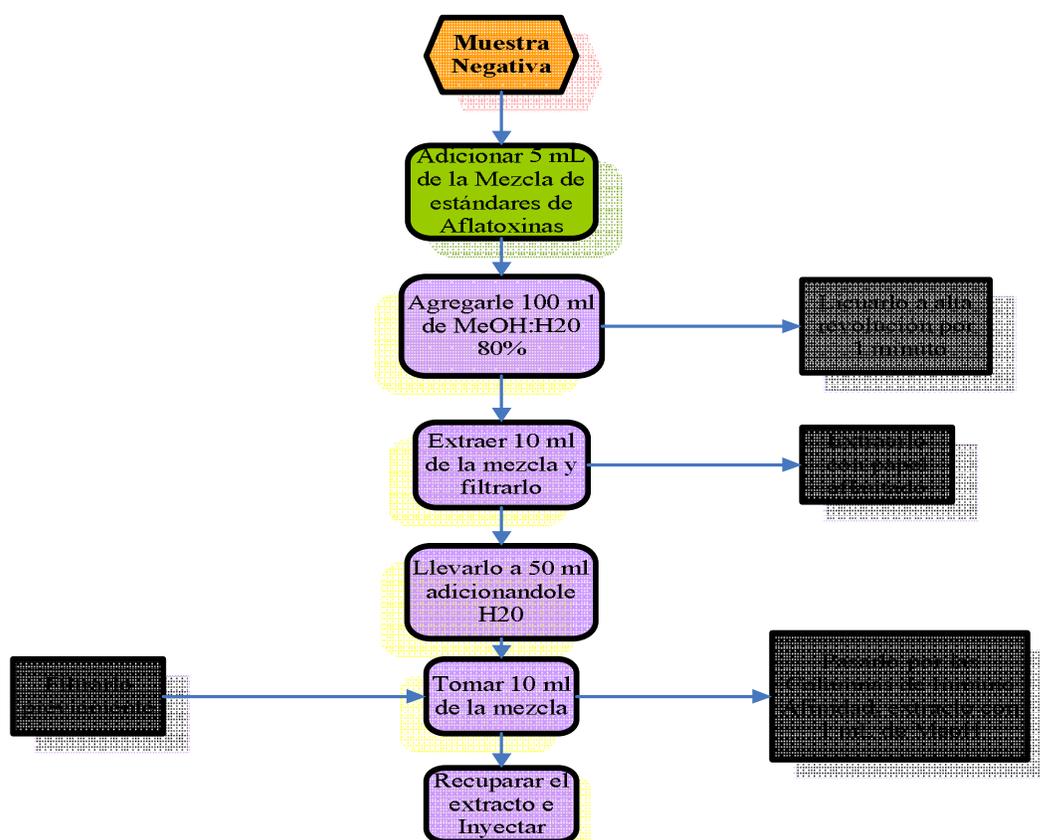
4.72 ppb ± 0.083

**Incertidumbre expandida
4.72 ppb ± 0.163**

Según el diagrama de Pareto los puntos críticos para la estimación de la incertidumbre en la determinación de las Aflatoxina G1 es la pendiente y el intercepto que contribuye a la cuantificación mediante la curva de calibración, esto se debe de tomar en cuenta en los momentos en que se evalué periódicamente la repetibilidad de las áreas de los estándares en cada sesión de trabajo. Por lo que por cada evento de trabajo se verificara la tendencia de la y la estabilidad así como la respuesta del estándar mediante la inyección de un punto de la curva y verificar su comportamiento así como la dispersión que presenta de la curva de calibración.

9.9.1.3. Estimación de la Incertidumbre para el porcentaje de recuperación en las muestras

9.9.1.3.1. Procedimiento de Extracción por la Recuperación



Incertidumbre para el por ciento de recuperación de los estándares de Aflatoxinas

9.9.1.3.2. Definición del Mensurando

$$C = f(b_0, b_1, y, r, v_5, v_{50}, v_{10}, v_{100}, v_{2_{10}}, c_{estandar}) \pm Uc$$

$b_0 = \text{int ercepto}$

$b_1 = \text{pendiente}$

$y = \text{area del es tan dar de cada aflatoxina}$

$v_5 = \text{volumen del es tan dar agregado}$

$v_{50} = \text{volumen de aforo de la primera extracción}$

$v_{10} = \text{primer extracción}$

$v_{100} = \text{dilusion de la muestra}$

$v_{2,10} = \text{segunda extracción}$

$c_{\text{es tan dar}} = \text{concentración del es tan dar adicionado}$

$r = \text{coeficiente de correlación}$

Donde $Uc = k u_c$; u_c es la incertidumbre combinada; k es el factor de cobertura, que depende de los grados de libertad y de las diferentes distribuciones de probabilidad de las variables de entrada implicadas en la incertidumbre combinada.

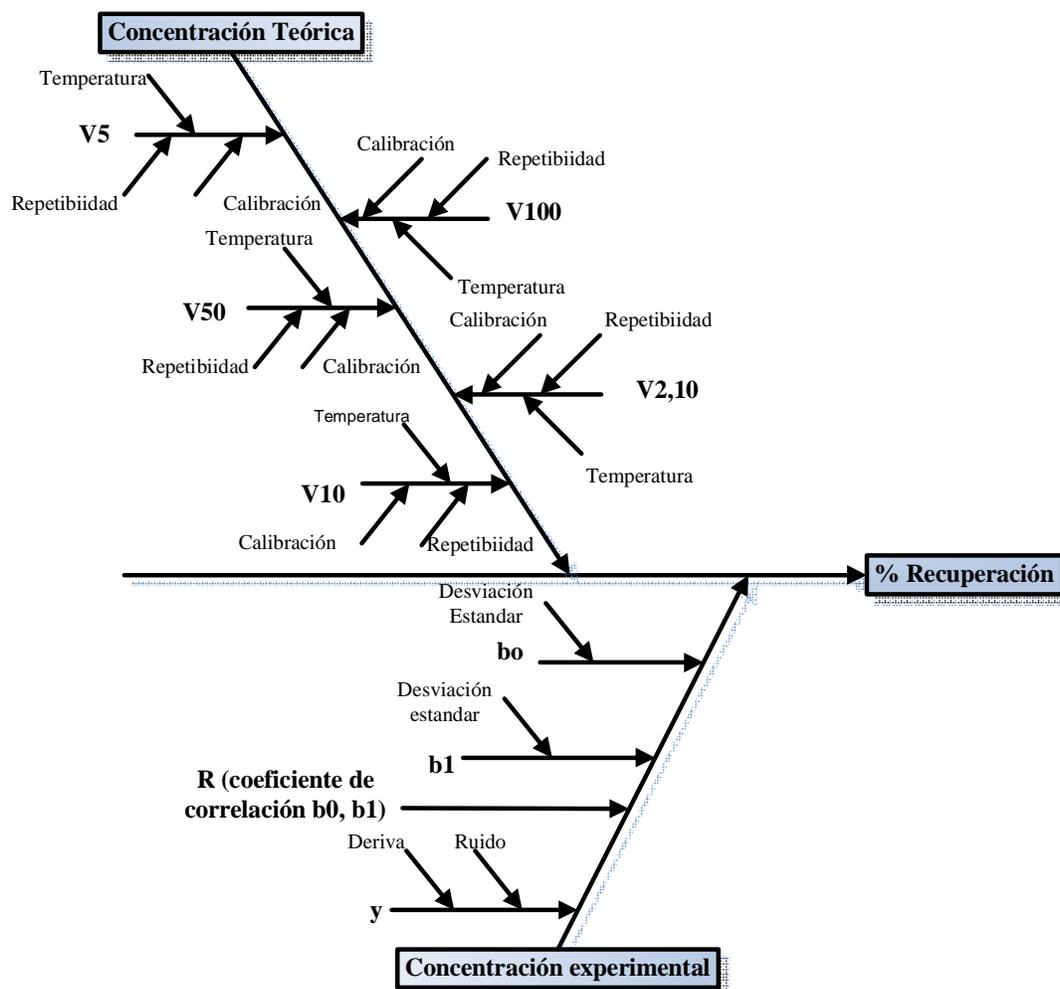
9.9.1.3.3. Modelo Matemático

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración}_{\text{Experimental}}}{\text{Concentración}_{\text{Teórica}}} \times 100 \quad (17)$$

$$\text{Concentraci}on_{\text{Experimental}} = \frac{y - b_0}{b_1} \quad (24)$$

$$\text{Concentración}_{\text{Teórica}} = V_{\text{estandar agregado}} \times \frac{\text{Concentración}_{\text{Estandar}}}{100} \times \frac{10}{50} \times 10 \quad (15)$$

9.9.1.3.4. Identificación de los Componentes de la Incertidumbre



9.9.1.3.5. Cuantificación de los componentes de la incertidumbre

9.9.1.3.5.1. Formula para la determinación de la incertidumbre del porcentaje de Recuperación

$$u = \sqrt{(u_{ce}^2 \times c_{ce}^2) + (u_{ct}^2 \times c_{ct}^2)} \quad (52)$$

9.9.1.3.5.2. Coeficientes de Sensibilidad, para la curva de Calibración

$$c_y = \frac{\partial C}{\partial y} = \frac{1}{b_1} \quad (25)$$

$$c_{b0} = \frac{\partial x}{\partial b0} = -\frac{1}{b1} \quad (26)$$

$$c_{b1} = \frac{\partial c}{\partial b1} = -\frac{y - b0}{b1^2} \quad (27)$$

9.9.1.3.5.3. Incertidumbres Individuales

9.9.1.3.5.3.1. Incertidumbre para las Mediciones Volumétricas

✓ Repetibilidad

$$u(r) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (28)$$

✓ Calibración

$$u(f) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad (29)$$

✓ Temperatura

$$u(t) = \frac{V\alpha}{\sqrt{3}} \left(\frac{\Delta t}{2} \right) \quad (30)$$

9.9.1.3.5.3.2. Componentes de la Incertidumbre de la Curva de Calibración

✓ Deriva

$$u(\text{deriva}) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad (31)$$

9.9.1.3.5.3.3. Incertidumbre para las concentraciones de los estándares de la mezcla

9.9.1.3.5.3.3.1. Modelo es:

$$C_x = \frac{V_c \times C_c}{V_d} \quad (32)$$

9.9.1.3.5.3.3.2. Coeficientes de Sensibilidad:

$$C_{V_c} = \frac{\partial C_x}{\partial V_c} = \frac{C_c}{V_d} \quad (33)$$

$$C_{C_c} = \frac{\partial C_x}{\partial C_c} = \frac{V_c}{V_d} \quad (34)$$

$$C_{V_d} = \frac{\partial C_x}{\partial V_d} = -\frac{V_c \times C_c}{V_d^2} \quad (35)$$

9.9.1.3.5.3.3.2.1. Estimación de la Incertidumbre:

$$u_{cx} = \sqrt{(C_{V_c} u_{V_c})^2 + (C_{C_c} u_{C_c})^2 + (C_{V_d} u_{V_d})^2} \quad (36)$$

9.9.1.3.5.3.3.2.2. Coeficientes de Sensibilidad para los componentes de las Concentración Teórica

$$C_i = V_e \times \frac{C_e}{V_m} \times \frac{V_1}{V_2} \times V \quad (37)$$

$$CVe = \frac{\partial}{\partial Ve} C_t \quad (38) \quad CVe = \frac{Ce \times V1 \times V}{V2 \times Vm} \quad (39)$$

$$CCe = \frac{\partial}{\partial Ce} C_t \quad (40) \quad CCe = \frac{Ve \times V1 \times V}{V2 \times Vm} \quad (41)$$

$$CV1 = \frac{\partial}{\partial V1} C_t \quad (42) \quad CV1 = \frac{Ve \times Ce \times V}{V2 \times Vm} \quad (43)$$

$$CV = \frac{\partial}{\partial V} C_t \quad (44) \quad CV1 = \frac{Ve \times Ce \times V1}{V2 \times Vm} \quad (45)$$

$$CV2 = \frac{\partial}{\partial V2} C_t \quad (46) \quad CV2 = -\frac{Ve \times Ce \times V1 \times V}{V2^2 \times Vm} \quad (47)$$

$$CVm = \frac{\partial}{\partial Vm} C_t \quad (48) \quad CVm = -\frac{Ve \times Ce \times V1 \times V}{V2 \times Vm^2} \quad (49)$$

9.9.1.3.6. Coeficientes de Sensibilidad para determinar el % de Recuperación

$$cC_{\text{exp}} = \frac{\partial}{\partial C_{\text{exp}}} = \frac{100}{C_T} \quad (50)$$

$$cC_T = \frac{\partial}{\partial C_T} = -\frac{100 \times C_{\text{exp}}}{C_T^2} \quad (51)$$

9.9.1.3.6.1. Presupuesto de las Incertidumbres e índice de contribución

* (Ver los datos para los cálculos de cada incertidumbre en el anexo 3)

9.9.1.3.6.2. Presupuesto para la estimación de Aflatoxina B1

Parámetro x_i	Valor de x_i	u_{x_i}	c_{x_i}	$c_{x_i}^2 u_{x_i}^2$	Ind %
Concentración teórica (C_T)	5.005	0.21	-18.403	14.94	79.30
Concentración Experimental (C_e)	4.61	0.099	19.98	3.91	20.70
			Total	18.85	100

Incertidumbre de la muestra

$$92.10 \% \pm 4.38$$

Incertidumbre expandida

$$u_e = u \times 1.96 \quad (23)$$

$$92.10 \% \pm 8.58$$

La Aflatoxina B1 presenta un porcentaje de recuperación aceptable, pues lo esperado para esta Aflatoxina oscila entre 80 y 120 %. El porcentaje de recuperación se estimó de una manera global basándose en la forma en como se determina el valor, la incertidumbre esencialmente se encuentra determinada por las concentración teórica y la experimental, en la que cada una de estas incertidumbres tiene a su vez incertidumbres asociadas que fueron estimados con rigurosidad al momento de realizar la estimación, la evaluación de estos valores se encuentran contemplados en el anexo 3 de esta tesis así como las diversas formulas que se encuentran en detalle en el documento. El porcentaje de recuperación obtenido en esta Aflatoxina B1 es de $\pm 8.58\%$ por lo que es aceptable para esta técnica de análisis HPLC que oscila hasta un 10%, según se describe en la literatura.

9.9.1.3.6.3. Presupuesto para la estimación de Aflatoxina B2

Parámetro x_i	Valor de x_i	u_{x_i}	C_{x_i}	$c_{x_i}^2 u_{x_i}^2$	Ind %
Concentración teórica (C_T)	1.502	0.064	-58.07	13.81	99.64
Concentración Experimental (C_e)	1.31	0.033	66.58	0.048	0.36
			Total	13.86	100

Incertidumbre de la muestra

$$87.20 \% \pm 4.31$$

Incertidumbre expandida

$$u_e = u \times 1.96 \quad (23)$$

$$87.20 \% \pm 8.44$$

La Aflatoxina B2 presenta un porcentaje de recuperación aceptable, pues lo esperado para esta Aflatoxina oscila entre 80 y 120 %. El porcentaje de recuperación se estimo de una manera global basándose en la forma en como se determina el valor, la incertidumbre esencialmente se encuentra determinada por las concentración teórica y la experimental, en la que cada una de estas incertidumbres tiene a su vez incertidumbres asocias que fueron estimados con rigurosidad al momento de realizar la estimación, la evaluación de estos valores se encuentran contemplados en el anexo 3 de esta tesis así como las diversa formulas que se encuentran en detalle en el documento. El porcentaje de recuperación obtenido en esta Aflatoxina B2 es de $\pm 8.44\%$ por lo que es aceptable para esta técnica de análisis HPLC que oscila hasta un 10%, según se describe en la literatura.

9.9.1.3.6.4. Presupuesto para la estimación de Aflatoxina G1

Parámetro x_i	Valor de x_i	u_{x_i}	C_{x_i}	$c_{x_i}^2 u_{x_i}^2$	Ind %
Concentración teórica (C_T)	5.005	0.212	-18.52	15.42	89.86
Concentración Experimental (C_e)	4.64	0.066	19.98	1.74	10.14
			Total	17.16	100

Incertidumbre de la muestra

$$92.71 \% \pm 4.14$$

Incertidumbre expandida

$$u_e = u \times 1.96 \quad (23)$$

$$92.71 \% \pm 8.11$$

La Aflatoxina G1 presenta un porcentaje de recuperación aceptable, pues lo esperado para esta Aflatoxina oscila entre 80 y 120 %. El porcentaje de recuperación se estimó de una manera global basándose en la forma en como se determina el valor, la incertidumbre esencialmente se encuentra determinada por las concentración teórica y la experimental, en la que cada una de estas incertidumbres tiene a su vez incertidumbres asociadas que fueron estimados con rigurosidad al momento de realizar la estimación, la evaluación de estos valores se encuentran contemplados en el anexo 3 de esta tesis así como las diversas formulas que se encuentran en detalle en el documento. El porcentaje de recuperación obtenido en esta Aflatoxina G1 es de $\pm 8.11\%$ por lo que es aceptable para esta técnica de análisis HPLC que oscila hasta un 10%, según se describe en la literatura.

9.9.1.3.6.5. Presupuesto para la estimación de Aflatoxina G2

Parámetro x_i	Valor de x_i	u_{x_i}	c_{x_i}	$c_{x_i}^2 u_{x_i}^2$	Ind %
Concentración teórica (C_T)	1.502	0.064	-64.27	16.92	97.92
Concentración Experimental (C_e)	1.45	0.009	66.58	0.36	2.08
			Total	17.28	100

Incertidumbre de la muestra

$$96.5 \% \pm 4.15$$

Incertidumbre expandida

$$u_e = u \times 1.96 \quad (23)$$

$$96.5 \% \pm 8.14$$

La Aflatoxina G2 presenta un porcentaje de recuperación aceptable, pues lo esperado para esta Aflatoxina oscila entre 80 y 120 %. El porcentaje de recuperación se estimó de una manera global basándose en la forma en como se determina el valor, la incertidumbre esencialmente se encuentra determinada por las concentración teórica y la experimental, en la que cada una de estas incertidumbres tiene a su vez incertidumbres asociadas que fueron estimados con rigurosidad al momento de realizar la estimación, la evaluación de estos valores se encuentran contemplados en el anexo 3 de esta tesis así como las diversas formulas que se encuentran en detalle en el documento. El porcentaje de recuperación obtenido en esta Aflatoxina G2 es de $\pm 8.14\%$ por lo que es aceptable para esta técnica de análisis HPLC que oscila hasta un 10%, según se describe en la literatura.

10. CONCLUSIONES

10.1. En el estudio de Validación de la determinación de Aflatoxinas en muestras de Alimento formulados se evaluaron los siguientes parámetros de validación:

- ✓ Optimización de las condiciones Cromatográficas como son: Flujo de las bombas, porcentajes óptimos de fase móvil, longitud de onda de trabajo y la eficiencia del reconocimiento de las Aflatoxinas con el apoyo del reactor fotoquímico acoplado al detector de fluorescencia.
- ✓ Límites de detección y cuantificación
- ✓ Linealidad de las curvas de calibración de cada una de las Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.
- ✓ Repetibilidad en un tiempo determinado.
- ✓ El porcentaje de recuperación esperado para cada Aflatoxina.

10.2. Cada uno de ellos se evaluó de manera eficiente pudiendo determinar sin equivocaciones las particularidades de cada Aflatoxina, así como su tiempo de retención, las condiciones que la mezcla alcanzaba mejores rendimientos, como tiempo de corrida de 15 minutos, no hay superposición de picos, hay buena simetría en cada uno de la mezcla, las proporciones de fase móvil son: en la bomba A: Acetonitrilo al 25% con una proporción auto ajustada por el software del 60% y e la bomba B: Metanol al 80% con una proporción del 40% a un flujo permanente sin rampa de 1 ml/min. Habiendo realizados estudios en los que se evaluó visualmente los tiempos de retención en los que cada Aflatoxina hacia presencia de manera inequívoca con la mezcla queda demostrado que bajo estas condiciones de trabajo las Aflatoxinas son cuantificables, pues se superaron problemas en las pruebas pilotos como fueron, tiempos de corridas largos, picos muy separados, líneas base con exceso de ruido, tendencias de línea base descendente o ascendente, por lo que el periodo de estabilización al inicio de una corrida es de 30 minutos, al igual que al terminar las jornada de trabajo se deberá realizar un periodo de limpieza de la columna pues si esto no se realiza con regularidad en futuros eventos de trabajo hay mucho ruido y la columna no responde de manera eficiente.

10.3. Dentro de los parámetros de validación que fueron evaluados se omitió, el efecto matriz, esto se debe al sistema de tratamiento que recibe la muestra antes de su inyección, pues el sistema de extracción es selectivo realizándose por medio de columnas de inmuno afinidad que capturan únicamente a la estructura de la Aflatoxina y luego al se retenida se extrae con metanol, y es inyectada, dando al momento de realizar determinaciones en las muestras líneas bases limpias y sin interferencias que pudieran comprometer las cuantificaciones así como las identificaciones de cada pico.

10.4. La linealidad del método presenta una buena tendencia determinado en el ámbito declarado para la determinación, las concentraciones fueron variadas para cada una de las aflatoxinas: para las aflatoxinas B1 y G2 con concentraciones de 1 a 30 ppb y para las concentraciones de B2 y G2 de 0.25 a 10 ppb, las concentraciones presentaban aumentos lineales, sin mostrar puntos de curvaturas. Se tomaron puntos de menor concentraciones para determinar las concentraciones de los LD y LC, en las que se determinaron de 0.08 a 0.25 ppb en las que se determino que tampoco presentaban tendencias no lineales.

10.5 Las concertaciones de los estándares inyectados en diferentes días tenían tendencias simétricas en cuanto a los tiempos de retención y a las áreas de las concentraciones, pues no se mostraron dispersiones significativas que pudiesen arriesgar las cuantificaciones en un periodo de tiempo establecido, pues discrepancias en las áreas de las concentraciones ocasionaría falsas cuantificaciones a la hora de brindar el servicio.

10.6. Los limites de cuantificación y de Detección fueron determinados en un periodo de 5 días con inyecciones de concentraciones descendente diluidas a partir de 100 veces menos la concentración del estándar madre, con el objeto de determinar altura que sobrepasaran 10 y 3 veces el ruido respectivamente obteniendo los siguientes resultaos a demás de comparar estos datos con los obtenidos como resultado de múltiples inyecciones de diferentes niveles de concentraciones que oscilaron de 0.025 y 0.08 ppb hasta concentraciones de 1.5 y 0.5 ppb, por lo que se demostró que concentraciones menores aunque no cumplían exactamente con el criterio de 3 y 10 veces mayores que el ruido determinado con una comparación visual y matemática, concentraciones por debajo de estos niveles demostraron tendencia de distorsión de la simetría de los picos de los 4 estándares, pues comprometía significativamente su identificación.

10.7. Al evaluarse los limites de recuperación de cada una de las Aflatoxinas se adicionaban estándares de la mezcla de las aflatoxinas al inicio de empezar con la determinación con el propósito de evaluar todas las posibles perdidas que se ocasionarían en el trayecto de las extracciones por lo que se obtuvo excelentes índices de recuperación pues los esperados para esta determinación pro esta técnica varían de 80 a un 100% por lo que los pro cientos de recuperación para cada uno de las Aflatoxinas eran los siguientes. Aflatoxinas G1 92.6%, la Aflatoxina G2 96.7%, Aflatoxina B1 92.0% y la Aflatoxina 87.2%.

10.8. A las muestras se evaluaron la incertidumbre según el procedimiento de la GUM, en el que se valoraron todos aquellos puntos que de manera directa están relacionados con el tratamiento de la muestra. La determinación de la incertidumbre las Aflatoxinas fue cuantificada de manera individual aunque tuvieran puntos en común (procedimientos en el proceso de preparación yya que los estándares se encuentran en mezclas), pero existía un limitante con la Aflatoxina G2, pues en el transcurso del historial de las muestras que han ingresado al laboratorio para esta determinación en los alimentos formulados nunca se han encontrados positivos de la Aflatoxina G2 y por este motivo no se determino la incertidumbre para esta toxina. La cuantificaron de las Aflatoxinas se realiza mediante una curva de calibración y de ahí se determino la incertidumbre de cada una de las Aflatoxinas obteniendo los siguientes resultados; para la Aflatoxina B1 (± 0.15), B2 (± 0.08), G1(± 0.17). Así mismo fue determinada la incertidumbre para los porcentajes de recuperación en la cual se establecía la exactitud de la metodología, y las posibles perdidas en el sistema de extracción, los valores fueron aceptables para los cuatro estándares de las Aflatoxinas obteniendo los siguientes valores: Aflatoxina B1 (92.11 ± 8.58), Aflatoxina B2 (87.20 ± 8.44), Aflatoxina G1 (92.71 ± 8.11), Aflatoxina G2 (96.50 ± 8.14).

10.9. La determinación de las Aflatoxinas fueron relajadas en muestras de alimento de diferentes materias primas dentro de las que se analizaron se tuvieron, maíz molido, sorgo molido, y alimentos formulados para la nutrición de pollos, en la mayoría de las ocasiones las muestras resultaron negativas, pero en las ocasiones que salieron positivas las Aflatoxinas que se determinaron fueron

variadas y nunca las y Aflatoxinas encontradas coincidieron por la particularidad de su procedencia y por sus formulaciones.

11. RECOMENDACIONES

11.1. Se deberá de evaluar la incertidumbre de la Aflatoxina G2 cuando en muestras desconocidas se determina la presencia de esta toxina, ya que en las múltiples muestras ingresadas no se ha tenido experiencia con la presencia de esta Aflatoxina.

11.2. Esta determinación de Aflatoxinas se deberá de expandir a otros tipos de matrices que sean de origen de materia prima, granos o aquellos alimentos que no se han evaluado como rutina del laboratorio y que por conocimiento científico se sabe de su presencia y que arriesgue la salud de sus consumidores por su alta toxicidad.

11.3. Se deberá de evaluar la trazabilidad de las mediciones utilizando material de referencia certificado con el fin de disminuir cualquier dispersión desestimada en el proceso de validación así como comprobar la eficiencia de la determinación.

11.4. Realizar pruebas entre laboratorios que ofrezca este mismo servicio para comprar así la veracidad de las cuantificaciones realizadas por el laboratorio además de retroalimentación por parte de todos para verificar si las dispersiones de las cuantificaciones bajo la técnica de HPLC mediante el sistema de extracción de columnas de inmonoafinidad es poco significativo.

11.5. Los porcentajes de recuperación deben de mantenerse dentro de los limites establecidos por lo que por cada sesión de trabajo se deben de evaluar para medir la eficiencia de la extracción en muestras enriquecidas y muestras objeto de análisis.

12. DEFINICIONES

- 12.1. **Error:** Resultado de una medición menos un valor verdadero del mensurado. Como el valor verdadero no puede ser determinado, en la práctica se utiliza un valor convencionalmente verdadero.
- 12.2. **Error Sistemático:** Resultado promedio de un gran numero de mediciones repetidas del mismo mensurado menos un valor verdadero del mensurado.
- 12.3. **Error Aleatorio:** Resultado de una medición menos el resultado promedio de un gran numero de mediciones repetidas de mismo mensurado.
- 12.4. **Exactitud:** Tiene el significado de que Tan lejos o cerca se esta de la verdad.
- 12.5. **Exactitud de medición:** Proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mensurado. Este concepto es cualitativo.
- 12.6. **Magnitud:** Atributo de un fenómeno, cuerpo o sustancias que es susceptible de ser distinguido cualitativamente y determinado cualitativamente. La distinción cualitativa del atributo de un fenómeno, cuerpo o sustancia este definida por la incertidumbre de una medición.
- 12.7. **Mensurado:** Magnitud particular sujeta a medición.
- 12.8. **Nivel de Confianza:** El valor $1 - \alpha$ de la probabilidad asociada con un intervalo de confianza (o intervalo de incertidumbre) o un intervalo de tolerancia estadística (ISO 3534-1)
- 12.8.1. Nota 1: en estadística, el intervalo de incertidumbre es conocido como intervalo de confianza y los limites de incertidumbre son conocidos como limites de confianza.
- 12.8.2. Nota 2: en términos simples, no matemáticos, el intervalo de confianza puede ser definido como el porcentaje de las veces cuando, el promedio, “el valor verdadero” de una propiedad cae dentro de la incertidumbre declarada.
- 12.9. **Patrón:** Media materializada, instrumento de medición, destinado a definir, realizar, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno ovarios valores conocidos de una magnitud para utilizarse como referencia.
- 12.10. **Precisión:** Las concordancia mas estrecha entre los resultados independientes de una prueba obtenidos bajo condiciones prescritas (ISO 5725-1).
- 12.11. **Repetibilidad de Medición:** Proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas, efectuadas con la aplicación de totalidad de las condiciones siguientes:
- Mismo método de medición,
 - Mismo observador,

- Mismo instrumento de medición,
- Mismo lugar
- Misma condición de uso,
- Repetición de periodos cortos de tiempo.

12.12. **Reproducibilidad de la Medición:** Proximidad de la concordancia entre los resultados de concordancia entre los resultados de medición del mismo mensurado realizadas bajo condiciones variables de medición.

12.13. **Trazabilidad:** Propiedad de un resultado de medición consiste en poder relacionarlo con las referencias establecidas, generalmente como patrones internacionales o nacionales por medio de una cadena no interrumpida de comparaciones.

12.14. **Valor Verdadero:** Valor consistente con la definición de un determinada magnitud particular. Este es un valor que se obtendría de una medición perfecta.

ANEXOS

ANEXO 1. DATOS DE LA DERIVA Y EL RUIDO OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE CON LAS NO INYECCIÓN

No Inyección	Tiempo (minutos)	Ruido μV	Deriva promedio $\mu V/min$
No Inyección 512-2-2008 10-45-02	0.5	7.1	0.002
	1	7.6	0.006
	2	8.6	0.002
No inyección 112-2-2008 9-37-09	0.5	8.1	0.006
	1	8.7	0.005
	2	9.4	0.004
No inyección 312-2-200-8 10-10-58	0.5	7.7	0.002
	1	8.4	0.004
	2	8.8	0.004
No Inyección 712-2-2008 11-18-46	0.5	7.5	0.006
	1	8.3	0.007
	2	8.8	0.002
No inyección 412-2-2008 10-26-43	0.5	7.5	0.002
	1	8.1	0.004
	2	8.6	0.005
No Inyección 212-2-2008 9-55-38	0.5	7.8	0.004
	1	8.5	0.004
	2	8.8	0.004
No inyección 312-2-2008 10-10-58	0.5	7.7	0.006
	1	8.4	0.004
	2	8.8	0.004
No inyección 612-2-2008 11-1-15	0.5	7.7	0.002
	10	8.4	0.004
	2	9.3	0.004
	Promedio	8.275	0.004
	Desviación Estándar	0.598003926	0.0014
	Incertidumbres	0.211426316	2.4×10^{-3}

ANEXO 2. Por ciento de Recuperación de cada uno de los estándares de Aflatoxina introducidos en muestras negativas.

Días	[Teórica]				[Experimental]				Promedio de la Concentración				%Recuperación			
	G1	G2	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2	B1	B2
1	5.005	1.502	5.005	1.502	4.64	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.63	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.63	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.63	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.64	1.45	4.61	1.31	4.63	1.45	4.60	1.31	92.6	96.7	92.0	87.2
2	5.005	1.502	5.005	1.502	4.64	1.46	4.60	1.32								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.64	1.46	4.61	1.32								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.64	1.46	4.61	1.32								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.64	1.46	4.61	1.32								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.64	1.46	4.61	1.32	4.64	1.46	4.61	1.32	92.7	97.1	92.1	88.1
3	5.005	1.502	5.005	1.502	4.64	1.46	4.62	1.32								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.65	1.46	4.62	1.33								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.64	1.46	4.62	1.33								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.64	1.46	4.62	1.32								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.65	1.46	4.62	1.32	4.65	1.46	4.62	1.32	92.8	97.0	92.2	88.2
4	5.005	1.502	5.005	1.502	4.62	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.62	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.62	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.62	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.62	1.45	4.59	1.31	4.62	1.45	4.60	1.31	92.4	96.5	91.8	87.0
5	5.005	1.502	5.005	1.502	4.65	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.65	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.65	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.65	1.45	4.60	1.31								
	5.005	1.502	5.005	1.502	4.65	1.45	4.60	1.31	4.65	1.45	4.60	1.31	92.9	96.7	92.0	87.3

Anexo 3. Detalle para la determinación de la Incertidumbre Teóricas y experimentales determinadas para la cuantificación de la incertidumbre del Porcentaje de Recuperación de las Aflatoxina G1, G2, B1, B2.

3.1. Aflatoxina B1- Presupuesto de la incertidumbre de la Concentración Teórica

Parámetro xi	Valor de xi	u _{xi}	c _{xi}	$c_{xi}^2 u_{xi}^2$	Ind %
Aflatoxina B1 (concentración)	1.31	0.21	0.1	4.41x10 ⁻⁴	0.34
V1	10	0.41	0.5	0.042	32.70
V2	10	0.41	-0.1	1.18x10 ⁻³	0.92
Ve	5	0.029	1	0.084	65.40
Vm	100	0.08	-0.05	1.6x10 ⁻⁵	1.24x10 ⁻²
V	50	0.03	0.5	2.22x10 ⁻⁴	0.17
			Total	1.28x10 ⁻¹	100

Estimación de la Incertidumbre mediante la siguiente formula

$$uc_T = \sqrt{(u_{v1} \times c_{v1})^2 + (u_{v2} \times c_{v2})^2 + (u_{ve} \times c_{ve})^2 + (u_{vm} \times c_{vm})^2 + (u_v \times c_v)^2} \quad (53)$$

uc_T = 0.21

3.1.1. Presupuesto de la incertidumbre de la Concentración experimental de la Aflatoxina B1

Parámetro xi	Valor de xi	u _{xi}	c _{xi}	$c_{xi}^2 u_{xi}^2$	Ind %
Intercepto b0	2364.45	229.22	-3.45x10 ⁻⁴	6.25x10 ⁻³	99.70
Pendiente b1	2898.37	15.99	-2.63x10 ⁻⁴	1.77x10 ⁻⁵	0.29
r	0.101	---	---	---	
Área de la muestra	4578.5	0.13	3.45x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁹	3.18x10 ⁻⁵
Repetibilidad	8.69x10 ⁻³	1.7x10 ⁻³	---	2.89x10 ⁻⁶	
Ruido	8.27	0.133	---	0.017	
Deriva	0.004	2.04x10 ⁻³	---	4.16x10 ⁻⁶	
			Total	6.27x10 ⁻³	100

Formula para determinar la incertidumbre de la muestra se describe a continuación

$$u = \sqrt{(u_{am}^2 \times c_{am}^2) + (u_{bo}^2 \times c_{bo}^2) + (u_{b1}^2 \times c_{b1}^2) + 2(c_{bo} \times c_{b1} \times u_{bo} \times u_{b1} \times r)} \quad (22)$$

uc_e = 0.099

3.2. - Presupuesto de la incertidumbre de la Concentración Teórica Aflatoxina B2

Parámetro xi	Valor de xi	u _{xi}	c _{xi}	$c_{xi}^2 u_{xi}^2$	Ind %
Aflatoxina B2 (concentración)	4.6	0.004	0.1	1.6x10 ⁻⁷	4.13x10 ⁻³
V1	10	0.41	0.15	3.78x10 ⁻³	97.67
V2	10	0.41	-0.03	1.51x10 ⁻⁵	0.39
Ve	5	0.029	0.3	7.57x10 ⁻⁵	1.96
Vm	100	0.08	-0.015	1.44x10 ⁻⁶	3.7x10 ⁻²
V	50	0.003	0.15	2x10 ⁻⁹	5.16x10 ⁻⁵
			Total	3.87x10 ⁻³	100

Estimación de la Incertidumbre mediante la siguiente formula

$$uc_T = \sqrt{(u_{v1} \times c_{v1})^2 + (u_{v2} \times c_{v2})^2 + (u_{ve} \times c_{ve})^2 + (u_{vm} \times c_{vm})^2 + (u_v \times c_v)^2} \quad (53)$$

$uc_T = 0.064$

3.2.1. Presupuesto de la incertidumbre de la Concentración experimental de la Aflatoxina B2

Parámetro xi	Valor de xi	u _{xi}	c _{xi}	$c_{xi}^2 u_{xi}^2$	Ind %
Intercepto b0	961.85	323.4631	-1.22x10 ⁻⁴	1.56x10 ⁻³	91.76
Pendiente b1	8215.93	70.18	-1.69x10 ⁻⁵	1.41x10 ⁻⁴	8.29
R		0.064	-0.69		
Área de la muestra	38750.8	0.13	1.22x10 ⁻⁴	2.52x10 ⁻¹⁰	1.48x10 ⁻⁵
Repetibilidad	6.5x10 ⁻³	1.3x10 ⁻³	---		
Ruido	8.27	0.133	---		
			Total	1.70x10 ⁻³	100

Formula para determinar la incertidumbre de la muestra se describe a continuación

$$u = \sqrt{(u_{am}^2 \times c_{am}^2) + (u_{bo}^2 \times c_{bo}^2) + (u_{b1}^2 \times c_{b1}^2) + 2(c_{bo} \times c_{b1} \times u_{bo} \times u_{b1} \times r)} \quad (22)$$

$uc_e = 0.033$

3.3. Presupuesto de la incertidumbre de la Concentración Teórica Aflatoxina G1

Parámetro xi	Valor de xi	u _{xi}	c _{xi}	$c_{xi}^2 u_{xi}^2$	Ind %
Aflatoxina G1 (concentración)	4.6	0.009	0.1	8.1x10 ⁻⁷	1.89x10 ⁻³
V1	10	0.41	0.5	0.04	93.46
V2	10	0.41	-0.1	1.68x10 ⁻³	3.94
Ve	5	0.029	1	8.41x10 ⁻⁴	1.96
Vm	100	0.08	-0.05	1.6x10 ⁻⁵	3.74x10 ⁻²
V	50	0.03	0.5	2.25x10 ⁻⁴	0.54
			Total	4.28x10 ⁻²	100

Estimación de la Incertidumbre mediante la siguiente formula

$$uc_T = \sqrt{(u_{v1} \times c_{v1})^2 + (u_{v2} \times c_{v2})^2 + (u_{ve} \times c_{ve})^2 + (u_{vm} \times c_{vm})^2 + (u_v \times c_v)^2} \quad (53)$$

$uc_T = 0.21$

3.3.1. Presupuesto de la incertidumbre de la Concentración experimental de la Aflatoxina G1

Parámetro xi	Valor de xi	u _{xi}	c _{xi}	$c_{xi}^2 u_{xi}^2$	Ind %
Intercepto b0	702.15	123.21	-6.61X10 ⁻⁴	6.63x10 ⁻³	99.86
Pendiente b1	1511.23	8.59	-3.04X10 ⁻⁴	6.81x10 ⁻⁶	0.11
R		0.2118	-0.71		
Área de la muestra	7841.6	0.13	6.62X10 ⁻⁴	7.41x10 ⁻⁹	1.11x10 ⁻⁴
Repetibilidad	0.011	2.18X10 ⁻³	---	4.75x10 ⁻⁶	
Ruido	8.27	0.13	---	1.96x10 ⁻²	
Deriva	0.004	2.04X10 ⁻³	---	4.16x10 ⁻⁶	
			Total	6.64x10 ⁻³	100

Formula para determinar la incertidumbre de la muestra se describe a continuación

$$u = \sqrt{(u_{am}^2 \times c_{am}^2) + (u_{bo}^2 \times c_{bo}^2) + (u_{b1}^2 \times c_{b1}^2) + 2(c_{bo} \times c_{b1} \times u_{bo} \times u_{b1} \times r)} \quad (22)$$

$uc_e = 0.066$

3.4. Presupuesto de la incertidumbre de la Concentración Teórica Aflatoxina G2

Parámetro xi	Valor de xi	u _{xi}	c _{xi}	$c_{xi}^2 u_{xi}^2$	Ind %
Aflatoxina G2 (concentración)	1.45	0.006	0.1	3.6x10 ⁻⁷	9.11x10 ⁻³
V1	10	0.41	0.15	3.78x10 ⁻³	95.70
V2	10	0.41	-0.03	1.51x10 ⁻⁴	3.82
Ve	5	0.029	0.3	7.57x10 ⁻⁷	1.92x10 ⁻²
Vm	100	0.08	-0.015	1.44x10 ⁻⁶	3.64x10 ⁻²
V	50	0.03	0.15	2.025x10 ⁻⁵	0.51
			Total	3.95x10 ⁻³	100

Estimación de la Incertidumbre mediante la siguiente formula

$$uc_T = \sqrt{(u_{v1} \times c_{v1})^2 + (u_{v2} \times c_{v2})^2 + (u_{ve} \times c_{ve})^2 + (u_{vm} \times c_{vm})^2 + (u_v \times c_v)^2} \quad (53)$$

$uc_T = 0.064$

3.4.1. Presupuesto de la incertidumbre de la Concentración experimental de la Aflatoxina G2

Parámetro xi	Valor de xi	u _{xi}	c _{xi}	$c_{xi}^2 u_{xi}^2$	Ind %
Intercepto b0	1014.14	64.67	-1.81x10 ⁻⁴	1.37x10 ⁻⁴	0.27
Pendiente b1	5524.64	14.03	-2.62x10 ⁻⁴	0.05	99.80
R		0.06	-0.69		
Área de la muestra	9024.87	0.13	1.81x10 ⁻⁴	5.53x10 ⁻¹⁰	1.10x10 ⁻⁶
Repetibilidad	0.005	0.001	---	1x10 ⁻⁶	
Ruido	8.27	0.13	---	1.69x10 ⁻²	
Deriva	0.004	2.04x10 ⁻³	---	4.16x10 ⁻⁶	
			Total	5.01x10 ⁻²	100

Formula para determinar la incertidumbre de la muestra se describe a continuación

$$u = \sqrt{(u_{am}^2 \times c_{am}^2) + (u_{bo}^2 \times c_{bo}^2) + (u_{b1}^2 \times c_{b1}^2) + 2(c_{bo} \times c_{b1} \times u_{bo} \times u_{b1} \times r)} \quad (22)$$

$uc_e = 0.009$

14. BIBLIOGRAFIA

Referencias ISO sobre Muestreo

- 14.1. ISO 2859-0:1995 : Procedimientos de muestreo para inspección por atributos- Parte 0: Introducción al sistema ISO 2859 de muestreo por atributos.
- 14.2. ISO 2859-1: 1999 : Procedimiento de muestreo por atributos – Parte 1: Planes de Muestreo clasificados por nivel de calidad aceptable (NCA) para inspección lote por lote.
- 14.3. ISO 32859-2:1985: Procedimientos de muestreo para inspección por atributos-Parte 2: Plan de muestreo clasificados por nivel de calidad limite (CL) para inspección a lotes aislados.
- 14.4. ISO 7002: 1986 : Productos Agroalimentarios –Configuración de un método normalizado de muestreo de lote.
- 14.5. ISO 8423: 1991: Planes sucesivos de muestreo para inspección por variables para determinar el porcentaje de no conformidades.
- 14.6. ISO 8422: 1991: Planes sucesivos de muestreo para inspección por atributos.
- 14.7. CODEX CAC/GL 50-2004: Directrices Generales sobre Muestreo.
- 14.8. Artículos expuesto para definiciones de palabras utilizados por las ISO y validación de los métodos de ensayo

14.8.1. Guía para muestreo de Alimentos

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
Proyecto TCP/RLA/3013 (A) Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de la calidad para Laboratorios de Análisis de Alimentos en América del Sur.
Proyecto TCP/RLA/3014 (A) Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de la calidad para laboratorios de análisis de alimentos en América central, Cuba, México, Panamá y Republica dominicana.

- 14.8.2. ISO BIMP OIML, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurent (GUM), International (1995).
- 14.8.3. ISO/TS 21748, Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty, International (2004).
- 14.8.4. EUROCHEM/CITAC, Guide-Quantifitying Uncertainty in Analytical Measurent-Second Edition, Europe (2000).
- 14.8.5. ISO BIMO IEC OIML, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) – Supplement 1: Numerical methods for the propagation of distributions International (2004).

- 14.8.6. MIKES, Centre for Metrology and Accreditation, Uncertainty of Quantitative Determinations Derived by Cultivation of Microorganisms, Publication J4/2003, Helsinki (2003)
- 14.8.7. EURACHEM/CITAC, Expression of Uncertainty in Qualitative Testing, Approaches to the Problem, LGL, Europe (2002)
- 14.8.8. Información acerca de las Frases R y S y de medidas de seguridad según las BPL.
- 14.8.9. Artículo expuesto por Internet: GUÍA DE SEGURIDAD Y BUENAS PRÁCTICAS EN EL LABORATORIO CENTRO POLITÉCNICO SUPERIOR Universidad de Zaragoza
- 14.8.10. Fichas Técnicas de Prevención (números 399, 432, 433, 459, 464, 480, 500, 672)
- 14.8.11. Procedimiento de Gestión de Residuos Peligrosos de la Unidad de Protección y Prevención de Riesgos (UPPR)
- 14.8.12. Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco
- 14.8.13. Manuales de Buenas Prácticas Ambientales – Navactiva, El portal para las empresas de Navarra (www.navactiva.com)
- 14.9. Título: Validación de Métodos Analíticos
Colaboración de: Agilent Technologies, MCC Analítica, S.A. Merck Eurolab, Perkin Elmer, S.L, PH-C, SVs,
Autor: José Antonio Prez, Martí Pujol Forn (Barcelona, marzo de 2001)
- 14.10. Artículo. Cromatografía Líquida de Alta eficiencia
Enciclopedia Wikipedia
http://es.wikipedia.org/wiki/cromatografia_liquida_de_alta_eficiencia