DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS TOTALES (G1, B1, G2, B2) SEMILLAS DE OLEAGINOSAS HPLC-FLD

ELABORADO POR:	VERIFICADO POR:	VISTO BUENO DE:
Nombre y Apellido: Lic. Leyla Díaz Lic. Diego Ramirez	**Nombre y Apellido:** Lic. Olga Pavón	**Nombre y Apellido:** Ing. Agr. Carmen Berni
Cargo: Jefa Técnico Departamento de Laboratorio Químicos (DLQ)	**Cargo:** Directora Dirección de Laboratorios (DL)	**Cargo:** Directora General Dirección General Técnica (DGT)
Firma:  **Fecha:** 01/10/26	**Firma:**  **Fecha:** 02/10/26	**Firma:**  **Fecha:** 05/10/26

mecip 2015

1. OBJETIVO

Establecer la metodología analítica para la determinación y cuantificación de aflatoxinas totales B1, B2, G1 y G2 en muestras de semillas oleaginosas mediante cromatografía líquida acoplada a detector de fluorescencia (HPLC-FLR), garantizando resultados confiables y reproducibles.

2. ALCANCE

Este procedimiento aplica al análisis de muestras de semillas oleaginosas procesadas en el laboratorio, abarcando la preparación de la muestra, extracción, purificación, derivatización y determinación instrumental de aflatoxinas totales.

3. DOCUMENTO DE REFERENCIA

3.1 Official analytical test method for total aflatoxins in food as stipulated in Section 2.2 of Notice - Shoku-an-hatsu 0331 No.5 issued on 31 March 2011 and in an appendix of Notice - Shoku-an-hatsu 0816 No.2 issued on 16 August 2011.

4. SIGLAS

4.1. Siglas:

4.1.1 µg/kg: Es el equivalente a ppb

4.1.2 µg/mL, mg/kg y mg/L: Es el equivalente a ppm.

4.1.3 LC: Cromatografía Líquida.

4.1.4 FLR: Fluorescencia

4.1.5 IAC: Columna de Inmunoafinidad

4.1.6 PBS: Buffer fosfato salino

5. RESPONSABLE

El Departamento de Laboratorios Químicos es responsable de asegurar la correcta implementación del procedimiento. Los técnicos del área deben ejecutar cada etapa del método, registrar la información en los formularios correspondientes y garantizar el cumplimiento de los lineamientos técnicos establecidos.

6. ACTIVIDADES

Se describen los equipos y materiales a emplear en el ensayo:

6.1. Equipos:

a) Cromatógrafo Líquido con detector de Fluorescencia

b) Agitador Vortex

c) Agitador Vertical.

d) Sonicador

e) Balanza analítica

f) Balanza granataria

g) Robot Coupe.

h) Bomba de Vacio.

i) Cuba de Filtración

Lic. Diego Ramírez
SENAVE

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Lsc. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma - R.P.N° 8.544

mecip 2015

j) Evaporador de tubos con calefacción.

6.2. Materiales:

a) Espátula de metal
b) Matraz de vidrio con tapa de 10 mL
c) Matraces vidrio con tapa de 50 mL
d) Matraces vidrio con tapa de 100mL
e) Matraces vidrio con tapa de 200mL
f) Balón de destilación de fondo redondo (tipo berenjena) de 500 o 1000mL
g) Probeta de vidrio o plástico de 50 mL
h) Probeta de vidrio o plástico de 500 mL
i) Probeta de vidrio o plástico 1000 mL
j) Pipeta automática o micropipeta 20 a 200µL
k) Micropipeta 100 a 1.000µL
l) Micropipeta 1.000 a 10.000µL
m) Erlenmeyer con tapa de 100mL
n) Erlenmeyer con tapa de 500 ml
o) Embudo de filtracion
p) Viales silanizados con tapa de 2 mL
q) Papel de Fibra de Vidrio
r) Papel de Filtro.

6.3. Reactivos:

a) Material de Referencia Certificado.
b) Acetonitrilo Grado HPLC
c) Metanol Grado HPLC
d) Agua Grado HPLC.
e) Cloruro de Sodio
f) Ácido Trifluoacético
g) Tween 20
h) Columna de Inmunoafinidad.
i) Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7,4.
j) Hipoclorito de Sodio.

6.4. Desarrollo del ensayo:

6.4.1 Preparación de la solución del estándar

a) Solución stock

Solución Estándar Patrón (disponibles en el mercado)

Lic. Diego Ramírez
SENAVE

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Msc. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

Ejemplo: Mix de Aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) 25µg/mL de cada activo.

Solución Estándar (0,125 µg/ml de cada uno)

Ejemplo tomar 1ml de la solución Estándar Patrón (25µg/mL de cada Activo) y diluir en 200ml de acetonitrilo

Mantener refrigerado a -20°C. El vencimiento de la solución stock es de 18 meses.

b) Solución intermedia.

Diluir la solución stock en acetonitrilo para preparar las soluciones de diferentes concentraciones de un rango apropiado incluyendo la del límite de cuantificación (ejemplo: 0.0005 µg/mL, 0.001 µg/mL, 0.002 µg/mL, 0.005 µg/mL). Conservar en un rango de temperatura de (-4 a -10)°C. El vencimiento de las soluciones es de 9 meses.

6.4.2 Preparación de reactivos

a) Solución Buffer fosfato salino pH 7.4:

Solución que contenga 0.138M de NaCl, 0.027M KCl y pH 7.4.

Usar el disponible en el mercado diluir según convenga.

b) Soluciones de Tween20:

Tween 20 al 0.01%: Diluir 0.1g de tween20 en 1litro de PBS

6.4.3 Preparación de Fase Móvil

Acetonitrilo: Agua: Metanol (1:6:3): Mezclar 100mL de Acetonitrilo, 600mL de agua y 300mL de metanol

6.4.4 Preparación de las muestras a ser ensayadas:

Preparación de la muestra

Pesar 50,0 g de muestra previamente triturada y homogenizada, en un balón de destilación de fondo redondo (tipo berenjena) de 500 mL.

6.4.5 Extracción

a) Agregar 200ml de solvente de extracción Acetonitrilo:Agua:Metanol (6:4:1), agitar por 30 min y luego filtrar con papel de filtro cuantitativo.

b) Tomar 5mL del filtrado y diluir con agua destilada a 50ml en un matraz aforado.

c) Homogenizar y filtrar con papel de fibra de vidrio, considerar como la solución de extracción.

6.4.6 Purificación

a) Inyectar 20mL de solución de extracción en la columna de inmuno afinidad (IAC) dejando escurrir a una velocidad de una gota por segundo.

b) Lavar la IAC con 15mL de agua descartando el líquido escurrido.

c) Una vez escurrido toda el agua asegurarse de eliminar todo el líquido remanente de la columna de IAC.

d) Agregar 3mL de acetonitrilo en la columna de IAC recolectando el eluato en un tubo de evaporación.

Lic. Diego Ramírez
SENAVE

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Lsc. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

6.4.7 Derivatización

a) Evaporar el acetonitrilo a 45 °C con corriente de nitrógeno hasta sequedad.

b) Agregar 0,1mL de Ácido Trifluoroacético, cerrar y agitar vigorosamente dejando en reposo al abrigo de la luz por 15 minutos.

c) A continuación agregar 0,9mL de una mezcla de Acetonitrilo/Agua (1:9) y considerarlo como la solución experimental de lectura. Dado que aumenta la intensidad de la fluorescencia de las Aflatoxinas B1 y G1 tomar cada una como hidróxido. (Las Aflatoxinas B2 y G2 no se ven influenciadas por esta operación).

6.4.8 Fortificación

Para la fortificación proceder a agregar un volumen calculado de solución de trabajo para obtener la concentración deseada, se deja reposar por unos minutos y se procede a realizar la extracción descripta anteriormente. Ejemplo: A 50g de muestra agregar 1mL de la solución de 0,125 µg/mL (equivalente a 2.5 µg/mL de cada aflatoxina). Considerar adecuado si la tasa de recuperación se encuentra entre (70 -110) %.

6.4.9 Preparación de la Curva de Calibración

a) Tomar 1 mL de cada punto de la curva por separado (ejemplo: 0.0005 µg/ml, 0.001 µg/ml, 0.002 µg/ml, 0.005 µg/ml) y evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 45°C

b) Agregar 0,1mL de ácido trifuoroacético, agitar vigorosamente y dejar en reposo al abrigo de la luz durante 15 minutos.

c) Transcurrido el tiempo de reposo proceder a agregar 0,9ml de una mezcla de Acetonitrilo/agua (1:9), homogenizar la solución resultante y considerarlo como la solución experimental. Proceder medir la concentración un HPLC-FLD.

6.5 Condiciones cromatográficas:

6.5.1 Condiciones para UPLC-FLR

- **a)** Detector: Detector de Fluorescencia (longitud de onda de excitación, 365nm; longitud de onda de fluorescencia, 450nm)
- **b)** Columna: ODS (diámetro interno: 4,6mm, longitud 150 mm, diámetro de partícula: 3-5µm)
- **c)** Temperatura de columna: 40ºC
- **d)** Velocidad de flujo: 1 mL/minuto
- **e)** Cantidad de inyección: 20 a 100 µL
- **f)** Fase móvil: Mezcla de Acetonitrilo: Agua: Metanol (1:6:3)
- **g)** Tiempo de Análisis: 25 minutos

6.6 Cálculos:

a) Comparar los tiempos de retención de cada Aflatoxinas con los obtenidos en la curva de calibrado.

b) Calcular la concentración de solución experimental mediante la siguiente ecuación.

Concentración de cada Aflatoxina contenida en la muestra (µg/kg)=

Concentración de cada Aflatoxinas en la solución experimental (µg/mL) x 2 x 1000.

Lic. Diego Ramírez
SENAVE

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Msc. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

mecip 2015

Porcentaje de Recuperación

$$\% R = \frac{\text{(Aflatoxinas en muestra)}}{\text{(Aflatoxina agregado)}} \times 100$$

Los resultados se expresan en µg/kg.

7. CONTROL DE CAMBIOS

Item	Página	Cambios
---	---	---

8. DOCUMENTOS

Nombre del Documento	Código	Área de archivo	Responsable	Tiempo de retención por dependencia	Disposición Final
Informe de Resultados de Ensayo LRCV	FOR-DLQ-017	Sala de archivos	Técnicos	5 años	Eliminación
Protocolo de trabajo LRCV	FOR-DLQ-014	Sala de archivos	Técnicos	5 años	Eliminación
Historial de ensayos	FOR-DLQ-021	Silab	Técnicos	5 años	Eliminación

9. APROBACIÓN DEL DOCUMENTO

APROBACIÓN POR LA DGT	
Nombre y Apellido	Carmen Berni Ing. Agr.
Fecha	05/10/26 Reg. COSAVE PY-078
Vigencia	El presente documento será de aplicación a partir del día hábil siguiente a la fecha de su aprobación.

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Msc. Leyla Soria Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

Lic. Diego Ramírez
SENAVE