DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS TOTALES (G1, B1, G2, B2) EN MANI POR HPLC-FLD

ELABORADO POR:	VERIFICADO POR:	VISTO BUENO DE:
Nombre y Apellido: Lic. Leyla Díaz Lic. Fabian Nuñez	**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

1. OBJETIVO

Establecer la metodología analítica para la determinación y cuantificación de aflatoxinas totales B1, B2, G1 y G2 en muestras de maní mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de fluorescencia (HPLC-FLR).

2. ALCANCE

Este procedimiento aplica al análisis de muestras de maní destinadas al control de calidad, abarcando la preparación de la muestra, extracción, purificación, derivatización, determinación instrumental de aflatoxinas totales, hasta la emisión de los resultados.

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:

4.4.1 µg/kg : Es el equivalente a ppb

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

4.4.3 LC: Cromatografía Líquida.

4.4.4 FLR: Fluorescencia

4.4.5 IAC: Columna de Inmunoafinidad

4.4.6 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:

6.1.1 Equipos:

a) Cromatógrafo Líquido acoplado con detector de Fluorescencia

b) Agitador Vortex

c) Agitador Vertical.

d) Sonicador

e) Balanza analítica

f) Balanza granataria

g) Robot Coupe.

h) Bomba de Vacío.

i) Cuba de Filtración

j) Turvo Vap.

Lic. Fabián Núñez
SENAVE

Lic. Olga Pavón
SENAVE

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

6.2. Materiales:

a) Espátula de metal
b) Matraz de vidrio de 10 mL
c) Matraces vidrio de 50 mL
d) Matraces vidrio de 100mL
e) Matraces vidrio de 200mL
f) Balón de destilación de fondo redondo (tipo berenjena) de 300, 500 o 1000 mL
g) Probeta de 50 mL
h) Probeta de 500 mL
i) Probeta de 1000 mL
j) Pipeta automática o micropipeta 20 a 200µL
k) Micropipeta 100 a 1000µL
l) Micropipeta 1000 a 10.000µL
m) Erlenmeyer con tapa de 100mL
n) Erlenmeyer con tapa de 500 ml
o) Embudo de filtracion
p) Viales silanizados de 2 mL
q) Papel de Fibra de Vidrio
r) Papel de Filtro.

6.3. Reactivos:

a) Estándar primario.
b) Hexano p.a
c) Acetonitrilo Grado LC-MS
d) Metanol Grado LC-MS
e) Agua Grado LC-MS.
f) Cloruro de Sodio
g) Ácido Trifluoacético
h) Columna de Inmunoafinidad.
i) 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)

Ejemplo: Mix de Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. 25µg/ml de cada uno

Lic. Olga Pavón
SENAVE

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

Lic. Fabián Núñez
SENAVE

mecip 2015

b) 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 madre es de 18 meses.

c) 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). Mantener refrigerado entre -4 a -10ºC o bien en Freezer. Los vencimientos de las soluciones son 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:

Tween20 al 0.01%: Diluir 0.1g de tween20 en 1litro de PBS. Mezclar bien.

Elaborarlo según convenga para cada matriz.

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:

a) 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 capacidad apropiada según la cantidad de solvente a utilizarse.

b) Extracción

Agregar 200ml de solvente de extracción Acetonitrilo:Agua:Metanol(6:4:1)

(Es necesario elegir el solvente de extracción más adecuado para cada tipo de matriz) agitar por 30 min. Filtrar con papel de filtro cuantitativo. Medir y tomar 5mL de filtrado y completar con precisión hasta 50ml con agua o PBS (añadir Tween20 según sea necesario). Luego mezclar lo suficiente, filtrar con papel de fibra de vidrio, tomar entre 20mL del filtrado y considerar como la solución de extracción.

c) Purificación

Tras inyectar en la IAC (acondicionar la IAC previamente según necesidad), la solución de extracción, escurrir a una gota por segundo y descartar el líquido escurrido. A continuación, agregar 15ml de agua el líquido escurrido. En caso de usar Tween20, agregar 15mL de agua y descartar el líquido escurrido.

Después de quitar con presión el líquido del interior de la columna, agregar 3ml de acetonitrilo y recolectar el eluato.

Lic. Olga Pavón
SENAVE

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

Lic. Fabián Núñez
SENAVE

d) Derivatización

Quitar el solvente, concentrando el eluato con corriente de nitrógeno a 45°C o menos. Agregar 0,1ml de Ácido Trifluoroacético al residuo. Cerrar emeticamente y agitar. Después de dejar 15 min en oscuridad, añadir 0,9ml de una mezcla de Acetonitrilo y agua (1:9) y considerarlo como la solución experimental. 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).

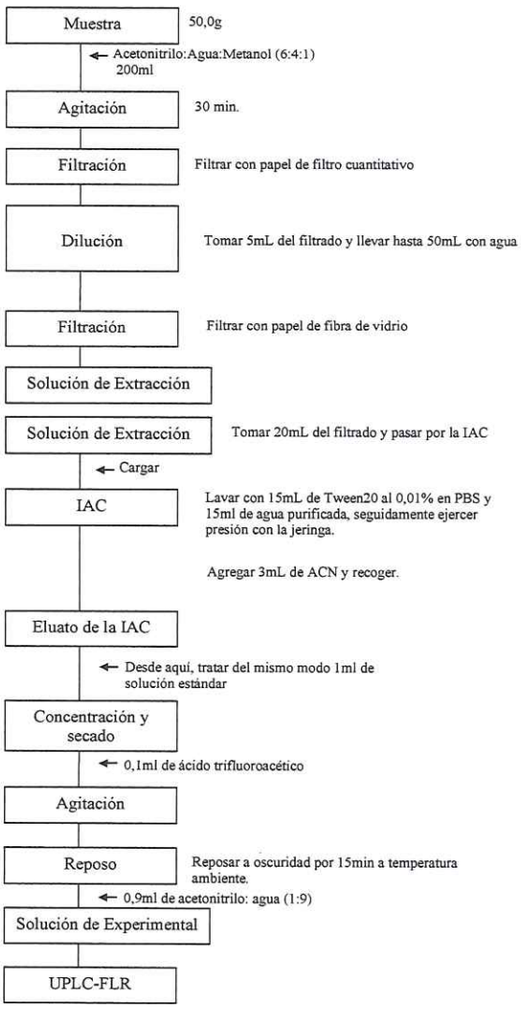
6.4.5 Fortificación

Fortificar las muestras agregando un volumen adecuado de la Solución de trabajo según la concentración deseada. 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 adecuada si la tasa de recuperación se encuentra entre el 70 y 110%

6.4.6 Preparación de la Curva de Calibración

Tomar 1 ml de cada solución estándar para la curva de calibración (ejemplo: 0.0005 µg/ml, 0.001 µg/ml, 0.002 µg/ml, 0.005 µg/ml) y evaporar bajo corriente de nitrógeno a 45°C o menos. Después agregar 0,1ml de ácido trifuoroacético al material residual, cerrar herméticamente, agitar fuertemente y dejar reposar 15 min en oscuridad, seguidamente agregar 0,9ml de una mezcla de Acetonitrilo y agua (1:9) y considerarlo como la solución experimental. Medir la Solución experimental con UPLC-FLR

6.4.7 Esquema de ensayo



mecip 2015

Lic. Fabián Núñez
SENAVE

Lic. Olga Pavón
SENAVE

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

6.5 Condiciones cromatográficas:

6.5.1 Condiciones para HPLC-FLR

Detector: Detector de Fluorescencia (longitud de onda de excitación, 365nm; longitud de onda de fluorescencia, 450nm)

Columna: ODS (diámetro interno: 4,6mm, longitud 150 mm, diámetro de partícula: 3-5µm)

Temperatura de columna: 40ºC

Velocidad de flujo: 1 mL/minuto

Cantidad de inyección: 20 a 100 µL

Fase móvil: Mezcla de Acetonitrilo: Agua: Metanol (1:6:3)

6.6 Cálculos:

Medir la solución experimental con UPLC-FLR y comparar el tiempo de retención de cada Aflatoxinas en el cromatograma obtenido. Calcular la concentración de solución experimental para las coincidencias, a partir de la curva de calibración. Si se supera el límite de la curva de calibración, diluir según convenga hasta que el valor este dentro de la curva. Mediante la siguiente formula, calcular la cantidad de Aflatoxinas presentes en la muestra.

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

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

b) Porcentaje de Recuperación

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

c) Los resultados se expresan en µg/kg.

d) Calcular mediante la curva de calibración el valor de análisis de cada aflatoxina. Considerar como detección cuando se supere los valores cuantitativos mínimo, redondear cada valor al segundo decimal. Sumar el total de valores de cada aflatoxina detectada y redondear dicho valor al primer decimal, considerar como valor cuantitativo de Aflatoxinas totales.

7. CONTROL DE CAMBIOS

Item	Página	Cambios
-----	-----	------

Lic. Fabián Núñez
SENAVE

Lic. Olga Pavón
SENAVE

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

mecip 2015

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. Reg. COSAVE PY 078
Fecha	05/10/26
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 Sofía Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

Lic. Fabián Núñez
SENAVE