

MINISTERIO DE SALUD DE LA REPÚBLICA DE BELARÚS

ENTIDAD ESTATAL
CENTRO REPUBLICANO CIENTÍFICO PRÁCTICO DE HIGIENE

COORDINADO

APROBADO

Vicedirector de Bel GIM

Viceministro
Médico Estatal Principal de la República de
Belarús

(firmado) T.A. Kolomiets

(firmado) V.I. Kachan

“24” 08 2010

“24” 08 2010

Sello:

Comité Estatal de Estandarización, Metrología
y Certificación de la República de Belarús

* GOSSTANDART *

Empresa Unitaria Republicana

INSTITUTO ESTATAL DE METROLOGÍA
DE BELARÚS

Sello:

Ministerio de Salud de la República de Belarús

TÉCNICA
DE DETECCIÓN DE NITROSAMINAS EN LOS ALIMENTOS
Y MATERIA PRIMA ALIMENTICIA
CON EL USO DEL MÉTODO
DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

MVLMN 3543-2010

Timbre:

MVI habilitada por la Empresa Unitaria
Republicana Instituto Estatal de Metrología de
Belarús

Certificado de habilitación

Nº 585/2010

del “24” 08 2010

Director de la Entidad Estatal Centro
Republicano Científico Práctico de Higiene
(firmado) V.P. Filonov
___ 2010

Sello:

República de Belarús, ciudad de Minsk *
Entidad Estatal * Centro Republicano
Científico Práctico de Higiene

Minsk 2010

MINISTERIO DE SALUD DE LA REPÚBLICA DE BELARÚS

ENTIDAD ESTATAL
CENTRO REPUBLICANO CIENTÍFICO PRÁCTICO DE HIGIENE

COORDINADO

APROBADO

Vicedirector de Bel GIM

Viceministro
Médico Estatal Principal de la República de
Belarús

___ T.A. Kolomiets

___ V.I. Kachan

___ de 2010

___ de 2010

**TÉCNICA
DE DETECCIÓN DE NITROSAMINAS EN LOS ALIMENTOS
Y MATERIA PRIMA ALIMENTICIA
CON EL USO DEL MÉTODO
DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

MVL.MN - 2010

Director de la Entidad Estatal Centro
Republicano Científico Práctico de Higiene

___ V.P. Filonov

___ 2010

Minsk 2010

1. Campo de aplicación

El presente documento “Técnica de detección de nitrosaminas en alimentos y materia prima alimenticia con el uso del método de cromatografía líquida de alta eficacia” establece el método para realizar las mediciones de la concentración total (en adelante, concentración) de la suma de las nitrosaminas volátiles (en adelante, NA), la dimetilnitrosamina (en adelante, DMNA) y la dietilnitrosamina (en adelante, DENA) en los alimentos (productos cárnicos y embutidos, pescado y productos de pescado, en los alimentos para niños elaborados a base de productos cárnicos, pescado y harina), así como en la materia prima alimenticia (en los granos, carne cruda, pescado), aplicándose para ello el método de cromatografía líquida con detector de fluorescencia.

El método está destinado para ser aplicado por las entidades e instituciones que estén ejerciendo la fiscalización sanitaria estatal, por las instituciones de investigación científica y demás entidades interesadas.

La dimetilnitrosamina es una sustancia oleosa, con una densidad (en adelante, d^{18}) de 1,01, temperatura de ebullición de 152-153 °C, es soluble en agua, etanol, éter y demás disolventes orgánicos. La fórmula estructural de la misma es $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{N}=\text{O}$, su peso molecular es 74,08 gr/mol.

La dietilnitrosamina es una sustancia oleosa, con d^{20} de 0,95, temperatura de ebullición de 176,9 °C, es soluble en agua, etanol, éter y demás disolventes orgánicos. La fórmula estructural de la misma es $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}-\text{N}=\text{O}$, su peso molecular es 102,13 gr/mol.

Las DMNA y DENA disponen de un amplio espectro de acción tóxica y pueden provocar tumores de diferente localización.

De acuerdo a las Normas, reglas sanitarias y normativas higiénicas “Requerimientos higiénicos de calidad e inocuidad de la materia prima alimenticia y los alimentos”, aprobados por el Decreto del Ministerio de Salud N° 63 del 09 de junio de 2009, la concentración máxima admisible (CMA) de la NA en la carne, productos cárnicos y embutidos es de no más de 0,002 mg/kg, en los productos ahumados de no más de 0,004 mg/kg, en el pescado fresco y cerveza no más de 0,003 mg/kg, en los alimentos para niños no se permite, con una sensibilidad del método de 0,001 mg/kg, y en granos (malta cervecera) no más de 0,015 mg/kg. [1]

La técnica está basada en la detección de la NA por medio de la destilación con vapor de agua y extracción con disolvente orgánico, la desnitrogenación de la NA con Ácido Bromhídrico en ácido acético hasta obtenerse las respectivas aminas, los derivados de aminas de cloruro de dimetilamino-naftaleno-5-sulfonilo” (en adelante, cloruro de dansilo), la separación cromatográfica y detección cuantitativa de los derivados que se hayan formado con el uso de la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia con detector fluorescencia.

El límite de cuantificación de la presente técnica es de 0,0005 mg/kg para la DMNA y de 0,00075 mg/kg para la DENA.

La identificación de los dansil-derivados de la NA se realiza a través de por los tiempos de retención, y la detección cuantitativa del contenido de la DMNA y DENA se llevará a cabo con el uso del método de estándar interno. En calidad de estándar interno se aplicará la dipropilnitrosamina (en adelante, DPNA), la cual se encuentra conforme con los requerimientos que se establecen para seleccionar el estándar interno en el marco de un análisis cuantitativo con el uso de la técnica de cromatografía líquida y es la más aceptable para obtenerse un resultado seguro. [2]

2 Indicadores de precisión de la técnica

Los valores relativos de los indicadores de precisión del método (repetitividad y precisión intermedia) con una probabilidad confiable de P – 95%, están indicados en el cuadro 1.

Cuadro 1 – Límites de las mediciones y valores relativos de los indicadores de precisión del método (probabilidad confiable de $P = 95\%$).

NA	Banda de mediciones, mg/kg	Límite mínimo de las mediciones, X_{LOQ} , mg/kg	Desviación relativa estándar		Límite de repetitividad (para dos resultados de detecciones en paralelo) r , %	Límite de la precisión intermedia (para dos resultados de mediciones) $r_{1(TO)}$, %
			de la repetitividad S_r , %	de la precisión intermedia, $S_{1(TO)}$, %		
DMNA	De 0,0005 a 0,5000 inclusive	0,0005	6,3	6,5	17,6	18,2
DENA	De 0,00075 a 0,75000 inclusive	0,00075	5,9	6,5	16,5	18,2

Usándose el presente método, deberá realizarse una evaluación del indicador de la precisión (detección de la desviación de laboratorio), de acuerdo al STB ISO 5725-4, así como la evaluación de la incertidumbre de las mediciones al ser realizadas en un laboratorio puntual.

3. Medios para realizar las mediciones, dispositivos auxiliares, agentes químicos y material

3.1 Medios para realizar las mediciones

Cromatógrafo líquido de alta eficacia, el cual incluirá: - una bomba con desgasificador de vacío - un termorregulador de columnas - un detector fluorescente - un sistema de mando y procesamiento de datos	Agilent 1100
Pesas de laboratorio electrónicas con una precisión de 0,0001 g, Adventurer AR2140	Marca Ohaus
Microjeringa para el cromatógrafo, "Hamilton" 50mkl, con una división de escala de 1 mkl	Marca Sigma-Aldrich, fabricante de E.E.U.U.
Pipeta de 2da categoría de precisión de 0,1 cm ³ , con una división de escala de 0,002 cm ³	GOST 20292-74
Pipetas 1-1-1-1 1-1-1-2 1-1-1-5 1-1-1-10	GOST 29227-91
Matraz aforado 2-(50,100,200,250,500,1000) - 2	GOST 1770-74
Cilindro aforado 3-(50,1000) - 1	GOST 1770-74
Probeta con sección pulida П-2-(5,10) 14/23 XC	GOST 1770-74

3.2 Dispositivos y equipos auxiliares

Acondicionador de aire H 07 ZP	Marca Samsung
Baño María HB4 digital	Marca IKA
Baño de arena	
Evaporador de vacío giratorio ИП-1М	TU 25-11-917-74
Baño María	TU 64-1-423-72
Tolvas ВД-1-500	GOST 25336-82

3

Tolvas cónicas, de vidrio, con un diámetro de 30-33 mm	GOST 25336-82
Matraz K ₂ -50-14/23 TC	GOST 25336-82
Matraz K-1-250-29/32 TC	GOST 25336-82
Una picadora de carne y trituradora	
Tazas de porcelana para la evaporación (de un diámetro de 55 mm, volumen de 20 cm ³)	
Lámpara UV OKH-11	TU 84-1-1618-77
Refrigerador con una cámara de congelación	
Sistema de filtración y desgasificación del eluyente	

Podrán utilizarse, igualmente, otros medios de medición y dispositivos auxiliares, cuya precisión no sea inferior a la de los aparatos recomendados por la técnica.

3.3 Reactivos químicos y material

Columna metálica para la cromatografía líquida (250x4,6) Eclipse XDB-C18, 5 mkm	Marca Agilent № 990967-902
Dimetilnitrosamina, $\rho=1,01 \text{ g/cm}^3$	Marca Sigma, № de catálogo N 7756
Dietilnitrosamina, $\rho=0,95 \text{ g/cm}^3$	Marca Sigma, № de catálogo N 0756
Dipropilnitrosamina, 100 mg	Marca Supelko, № de catálogo 48554
Metanol para la cromatografía líquida de alta eficacia $\geq 99,9\%$	Marca Fluka
Acetona para la cromatografía líquida de alta eficacia $\geq 99,8\%$	Marca Sigma- Aldrich
Acetonitrilo para la cromatografía líquida de alta eficacia $\geq 99,9\%$	Marca Sigma- Aldrich
Benceno, $\geq 99,5\%$, para la cromatografía líquida de alta eficacia	Marca Fluka
Ácido acético, $\geq 99\%$	Marca Sigma- Aldrich
Hidrógeno bromurado en ácido acético, $\geq 33\%$	Marca Sigma- Aldrich, № de catálogo 18735
Metileno cloroso, para la cromatografía líquida de alta eficacia	Marca Merck
Sulfato de sodio anhidro, $\geq 99,0\%$	Marca Sigma- Aldrich
Ácido sulfúrico, 95-98%	Marca Sigma, № de catálogo D2625-1r
Hidróxido de sodio, $\geq 98\%$	Marca Sigma-

	Aldrich
Bicarbonato de sodio 99,7-100,3%	Marca Sigma-Aldrich
Ácido sulfanílico, $\geq 99,0\%$	Marca Sigma-Aldrich
Cloruro de Sodio $\geq 99,5\%$	Marca Sigma-Aldrich
Agua destilada	GOST 6709-72
Filtros de papel, "banda azul"	TU-6-09-1678-86
Filtros de celulosa regenerada, con un diámetro de 47 mm y tamaño de las células de 0,45 mkm	Marca Agilent № 3150-0576

Podrán ser utilizados agentes químicos y material con características no inferiores a las arriba indicadas.

4. Método de medición

De conformidad con el presente método, las mediciones se llevarán a cabo con el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia, con detección de fluorescencia, realizándose al inicio las siguientes etapas de preparación de los ensayos:

- destilación de las nitrosaminas con vapor de agua;
- extracción líquido-líquido desde el medio acuoso al disolvente orgánico;
- obtención de las aminas – desnitrogenación;
- eliminación del disolvente orgánico y evaporación de la humedad;
- obtención de dansil-derivados de las aminas;
- reextracción de dansil-derivados desde el medio acuoso y de acetona al disolvente orgánico;
- eliminación del disolvente orgánico;
- cromatografía de los dansil-derivados obtenidos.

5. Requerimientos de seguridad

El local donde se lleve a cabo la detección de la NA, deberá estar equipado obligatoriamente de una ventilación por aspiración.

El trabajo con las NA deberá realizarse en un sitio cerrado con aspiración usando medios individuales de protección (lentes, guantes y etc.)

En el laboratorio donde se realice el trabajo con las NA volátiles cancerígenas, siempre deberá estar disponible una solución de ácido bromhídrico en ácido acético para destruir las NA volátiles en caso de que lleguen a parar en los lugares de trabajo y el suelo. Al finalizar el trabajo, con el fin de destruir las NA volátiles en el aire, se hará un tratamiento en el local con rayos UV durante 30 minutos.

El desplazamiento y almacenamiento de las NA se realizará en ampollas de cristal soldadas, envueltas en un tejido de asbesto y embaladas en envases metálicos soldados por parafina.

Las NA se almacenarán en un refrigerador individual, donde no haya muestras analizadas.

6. Requerimientos en relación a la cualificación del operador

A la realización de las mediciones y procesamiento de los resultados del análisis de cromatografía, podrán acceder personas con formación superior especializada, que dispongan de experiencia de trabajo en el campo de la cromatografía líquida, que hayan estudiado los

requerimientos de seguridad y la presente técnica, la guía de uso del cromatógrafo líquido y la instrucción para el uso de los sistemas de procesamiento de los datos cromatográficos.

7. Condiciones de las mediciones

Las mediciones de laboratorio, de acuerdo a la presente técnica, se llevarán a cabo en las siguientes condiciones:

- la temperatura del aire en la preparación de las soluciones, incluyendo las graduadas, será de (20 ± 2) °C;
- la temperatura del aire en las mediciones deberá ser de (20 ± 5) °C;
- la presión atmosférica será de 84,0-106,7 kPa;
- la humedad del aire será de (65 ± 15) % a una temperatura de 25 °C;
- la tensión en la red de alimentación deberá ser de (230 ± 10) V;
- la frecuencia de la corriente alterna será de $(50\pm 0,4)$ Hz.

Las mediciones en el cromatógrafo líquido serán realizadas en las condiciones recomendadas por los documentos técnicos del dispositivo y la presente técnica.

8. Preparativos para realizar las mediciones

Antes de realizarse las mediciones, deberán llevarse a cabo los siguientes trabajos: preparar los aparatos de medición, preparar soluciones, establecer las características de graduación, seleccionar y preparar las muestras para el análisis.

8.1 Preparativos de los aparatos de medición

El cromatógrafo líquido se prepara para el funcionamiento, de acuerdo a la instrucción de uso. Se establecen regímenes de funcionamiento para la columna y el detector. Para la desgasificación el matraz con el eluyente se colocará en baño María a una temperatura de 40-50°C, abriéndose simultáneamente el tapón. Después de enfriarse el matraz hasta la temperatura ambiente la fase móvil estaría lista para su aplicación. El eluyente deberá estar siempre cerrado con un tapón y guardarse en el refrigerador a una temperatura de 2°C a 8°C.

8.2 Preparación de las soluciones

8.2.1 Solución de cloruro de dansilo con una concentración de 0,5 mg/cm³.

La muestra pesada de cloruro de dansilo de un peso de 26,5 mg se colocará en un matraz aforado de una capacidad de 50 cm³, se disolverá en 20 cm³ de acetona y se conducirá hasta la marca con acetona. La solución preparada se guardará en el refrigerador a una temperatura de 2°C a 8°C, previniendo minuciosamente la penetración de humedad en la misma. El plazo de almacenamiento no superará los 3 meses.

8.2.2 La solución 3,3% de ácido bromhídrico en ácido acético (solución denitrozante)

En un matraz cónico de una capacidad de 50 cm³ se vierten 5 cm³ de solución 3,3% de ácido bromhídrico en ácido acético y también se añaden 45 cm³ de ácido acético helado. La mezcla se guardará en un refrigerador a una temperatura de 2°C a 8°C en una vajilla de vidrio oscuro. El plazo de almacenamiento no podrá superar un mes. Un indicio de la ineptitud para usarse la solución es la aparición de una coloración amarilla y marrón.

8.2.3 Solución separadora con un pH de 10,5

En un matraz aforado de 500 cm³ se colocan 3,2 g de NaOH y se vierten 200 cm³ de agua destilada. Se mezcla todo hasta que el álcali se disuelva por completo y se añaden 20,0 g de NaHCO₃. La solución se remueve minuciosamente hasta una disolución completa de la sal, se aumenta el volumen de la solución con el agua destilada hasta alcanzarse la marca. La solución se guardará en vajilla de polietileno. El plazo de almacenamiento será de 3 meses.

8.2.4 Solución 1 n de ácido sulfúrico

En un matraz aforado de 250 cm³ se vierten 200 cm³ de agua destilada. Se añaden 6,7 cm³ de ácido sulfúrico concentrado (de una densidad de 1,98 g/cm³), lo cual se remueve y se deja enfriar hasta la temperatura del ambiente. El volumen se aumenta hasta llegarse a la marca con agua destilada. El plazo de almacenamiento es ilimitado.

8.2.5 Solución de trabajo de la DMNA con una concentración de 10,1 mg/cm³

En un matraz aforado de 100 cm³ se vierten 20 cm³ de alcohol metílico. Se añade 1 cm³ de DMNA (Nº de catálogo 7756) con una pipeta de 1 cm³ y el volumen se ve aumentado

6

con alcohol metílico hasta alcanzarse la marca. La mezcla se remueve y se deja almacenar en una vajilla de vidrio oscuro en el refrigerador a una temperatura de 2°C a 8°C durante no más de 1 año.

8.2.5.1 Solución de trabajo de la DMNA con una concentración de 101 mkg/cm³

En un matraz aforado de 10 cm³ se vierten 20 cm³ de alcohol metílico. Se añade 1 cm³ de DMNA (apartado 8.2.5.) con una pipeta de 1 cm³ y el volumen se ve aumentado con alcohol metílico hasta alcanzarse la marca. La mezcla se remueve y se deja almacenar en una vajilla de vidrio oscuro en el refrigerador a una temperatura de 2°C a 8°C durante no más de 1 año.

8.2.6 Solución de trabajo de la DENA con una concentración de 9,5 mg/cm³

En un matraz aforado de 100 cm³ se vierten 20 cm³ de alcohol metílico. Se añade 1 cm³ de DENA (Nº de catálogo 0756) con una pipeta de 1 cm³ y el volumen se ve aumentado con alcohol metílico hasta alcanzarse la marca. La mezcla se remueve y se deja almacenar en una vajilla de vidrio oscuro en el refrigerador a una temperatura de 2°C a 8°C durante no más de 1 año.

8.2.6.1 Solución de trabajo de la DENA con una concentración de 95 mkg/cm³

En un matraz aforado de 100 cm³ se vierten 20 cm³ de alcohol metílico. Se añade 1 cm³ de DENA (apartado 8.2.6) con una pipeta de 1 cm³ y el volumen se ve aumentado con alcohol metílico hasta alcanzarse la marca. La mezcla se remueve y se deja almacenar en una vajilla de vidrio oscuro en el refrigerador a una temperatura de 2°C a 8°C durante no más de 1 año.

8.2.7 Solución de trabajo de la DPNA con una concentración de 400 mkg/cm³

En un matraz aforado de 250 cm³ se trasladará de forma cuantitativa una muestra de DPNA de un peso de 100 mg (Nº de catálogo de 48554), disolviéndola en alcohol metílico, y se aumentará el volumen del contenido con alcohol metílico hasta alcanzarse la marca. La mezcla

se remueve y se guardará en una vajilla de vidrio oscuro en el refrigerador a una temperatura de 2°C a 8°C durante no más de 1 año.

8.2.7.1 Solución de trabajo de la DPNA con una concentración de 2 mkg/cm³

En un matraz aforado de 200 cm³ se colocará 1 cm³ de solución de trabajo de DPNA con una concentración de 400 mkg/cm³ con ayuda de una pipeta de 1 cm³, luego se añadirán 20 cm³ de alcohol metílico, se revolverá el contenido de forma minuciosa y se aumentará el volumen del contenido con alcohol metílico hasta alcanzarse la marca. La mezcla se remueve y se guardará en una vajilla de vidrio oscuro en el refrigerador a una temperatura de 2°C a 8°C durante no más de 6 meses.

8.2.8 Fase móvil para cromatógrafo líquido – mezcla de acetonitrilo con agua (7:3)

En caso de no haber desgasificador dentro de la estructura del cromatógrafo líquido, la preparación del eluyente se realizará de forma siguiente. Dentro de un matraz cónico de 1000 cm³ se verterán 700 cm³ de acetonitrilo. Se añadirán 300 cm³ de agua destilada, se revolverá lo obtenido de forma minuciosa y se realizará la desgasificación. Para la desgasificación el matraz con eluyente se colocará en baño María a una temperatura de 40-50°C, abriéndose simultáneamente el tapón. Después de enfriarse el matraz con el eluyente hasta la temperatura del ambiente, el eluyente se filtrará a través de un sistema para filtraje y desgasificación, después de lo cual la fase móvil estará lista para su uso. El eluyente se estará guardando en un refrigerador a una temperatura de 2°C a 8°C en vajilla cerrada. El plazo de almacenamiento es ilimitado.

7

8.2.9 Preparación de las soluciones graduadas

8.2.9.1 Preparación de la solución principal de la mezcla de DMNA y DENA con concentraciones de 0,303 mkg/cm³ y 0,456 mkg/cm³, respectivamente

En un matraz aforado de 1000 cm³ con tapón esmerilado se mezclarán 3,0 cm³ de la solución DMNA (de acuerdo al apartado 8.2.5.1), 4,8 cm³ de DENA (de acuerdo al apartado 8.2.6.1), medidos con pipetas de 5 cm³, y el volumen de lo obtenido será aumentado con alcohol metílico hasta alcanzarse la marca. La solución se remueve y se guardará en vajilla de vidrio oscuro en un refrigerador a una temperatura de 2°C a 8°C durante no más de 6 meses.

8.2.9.2 Separación de NA por medio de la extracción por destilación con vapor de agua

Dentro de un matraz para la destilación de 500 cm³, conectado con un generador de vapor y refrigerador recto, de acuerdo al dibujo del Anexo A, se colocarán 250 cm³ de agua destilada, se añadirá la solución principal de la mezcla de DMNA y DENA (apartado 8.2.9.1.), así como será añadida la solución de trabajo de DPNA (apartado 8.2.7.1), en cantidades indicadas en el cuadro 2. A la mezcla se añadirán 10 g de sulfato de sodio, 1 g de ácido sulfamínico, 10 g de cloruro de sodio, 10 cm³ de la solución 1 n de ácido sulfúrico. La mezcla se revuelve, se conectará el matraz con el sistema y las NA se extraerán por destilación con vapor de agua, reuniendo 250 cm³ de destilado en un matraz de 250 cm³.

Dicho procedimiento se llevará a cabo para cada solución graduada, añadiéndose la solución principal de la mezcla de DMNA y DENA (apartado 8.2.9.1.) y la solución de trabajo de DPNA (apartado 8.2.7.1), de conformidad con el cuadro 2.

Cuadro 2 - Preparación de las soluciones graduadas

Nº de la solución graduada	Volumen de la mezcla de DMNA y DENA, cm ³	Volumen de la solución de trabajo de DPNA, cm ³
1	0,17	1
2	0,83	1
3	3,30	1
4	6,60	1
5	10,00	1

8.2.9.3 Extracción de las NA del destilado

Cada 250 cm³ de destilado obtenido, de acuerdo al apartado 8.2.9.2, se colocarán en un embudo separador de 500 cm³. El matraz se enjuaga con 20 cm³ de metileno cloroso, que luego se vierte en el embudo separador con el destilado. La mezcla se agitará de forma intensiva durante 5 minutos y se dejará hasta que las fases se definan claramente. La extracción con el metileno cloroso se repetirá nuevamente dos veces con porciones de 20 cm³. Cada porción de extracto en metileno cloroso se verterá a través del embudo con un filtro de papel, llenado con 5 g de sulfato de sodio anhidro o sulfato de magnesio en un matraz para extracción por destilación con un volumen de 100 cm³. El filtro con sulfato de magnesio se lavará con 10 cm³ de extragente.

8.2.9.4 Obtención de dansil-derivados de las NA

En el extracto seco se añadirán 2 cm³ de solución 3,3% de ácido bromhídrico en ácido acético, preparada, de acuerdo al apartado 8.2.2., luego lo obtenido se revertirá y se dejará para el proceso de

8

desnitrogenación por no menos de 30 minutos a la temperatura del ambiente. El metileno cloroso se evaporará en un evaporador rotatorio a la temperatura del baño María de no más de 30°C hasta alcanzarse aproximadamente 2 cm³. El extracto obtenido se trasladará a una taza de porcelana, el matraz para evaporación se enjuagará con 0,5 cm³ de ácido acético y se conectará con el contenido de la taza de porcelana. El extracto de forma cuidadosa se evaporará en un baño de arena a una temperatura de no más de 120°C hasta secarse perfectamente.

La taza con el residuo seco se dejará enfriar hasta la temperatura del ambiente. Después del enfriamiento a la taza de porcelana con una pipeta de 1 cm³ se añadirán 0,6 cm³ de solución separadora (apartado 8.2.3.) y con movimientos circulares se disolverá el residuo seco. Al extracto obtenido con una pipeta de 1 cm³ se añadirán 0,8 cm³ de cloruro de dansilo, preparado, de acuerdo al apartado 8.2.1, lo obtenido se revertirá y se trasladará de forma inmediata a una probeta con tapón esmerilado de 5 cm³. Después la probeta bien cerrada será colocada en baño María con una temperatura de 55 °C por no menos de 40 minutos, a fin de realizarse el proceso de obtención de los dansil-derivados.

Posteriormente, la probeta será extraída del baño María y se dejará enfriar hasta la temperatura del ambiente. A la solución obtenida se añadirá 1 cm³ de benzol, lo obtenido se agitará intensamente durante 5 minutos y se dejará hasta el momento de la división clara de las fases. De la capa superior transparente de benzol y acetona con una pipeta de 2,0 cm³ se tomará un extracto transparente, el cual será trasladado a una probeta seca de 5 cm³ con tapón esmerilado. Después de ello la extracción con benzol se repetirá una vez más y de nuevo se tomará el extracto transparente de benzol y acetona, uniéndolo con la primera porción. El volumen total de los disolventes del extracto se apartará soplando en el flujo de nitrógeno hasta conseguirse un ambiente perfectamente seco, y exclusivamente dentro de un armario con

extracción. Al residuo seco que se haya obtenido se añadirá 1 cm³ de fase móvil, se cerrará fuertemente y se disolverá el residuo seco agitándose intensamente.

Con ayuda del método arriba mencionado se prepararán cinco series de soluciones, de acuerdo al cuadro N^o 2, en tres frecuencias para cada tipo de concentración.

En el cuadro 3 se indicará la concentración de las NA, presentes en forma de dansil-derivados, en las soluciones obtenidas graduadas.

Las soluciones obtenidas de dansil-derivados de DMNA, DENA y DPNA se guardarán en un refrigerador durante 20 días a una temperatura de 4-5 °C. Al transcurrir 20 días, en caso de que las soluciones registren desviaciones de los indicadores iniciales, de acuerdo al apartado 8.3.2. y 9.1., las mismas no deberán ser utilizadas posteriormente y se prepararán de nuevo.

Cuadro 3 – Concentración de las NA en las soluciones graduadas

N ^o de la solución graduada	Concentración de las NA, mkg/cm ³		
	DMNA	DENA	DPNA
1	0,05	0,08	2,00
2	0,25	0,38	2,00
3	1,00	1,50	2,00
4	2,00	3,01	2,00
5	3,03	4,56	2,00

8.2.9.5 Revisión de la pureza de los agentes químicos utilizados (ensayo en vacío)

Antes de realizar los cálculos, será necesario realizar la revisión de los agentes químicos utilizados en relación a su pureza (se llevará a cabo para una prueba). Para ello en un matraz de destilación de 500 cm³, conectado con la caldera de vapor y el refrigerador recto, de acuerdo al dibujo del Anexo A, se colocarán 250 cm³ de

9

agua destilada y se añadirá una solución de trabajo de DPNA (apartado 8.2.7.1). A la mezcla se añadirán 10 g de sulfato de sodio, 1 g de ácido sulfamínico, 10 g de cloruro de sodio, 10 cm³ de la solución 1 n de ácido sulfúrico. La mezcla se revuelve, se conectará el matraz con el sistema y las NA se extraerán por destilación con vapor de agua, reuniendo 250 cm³ de destilado en un matraz de 250 cm³. Luego se realizarán acciones, de acuerdo a los apartados 8.2.9.3 y apartado 8.2.9.4.

8.3 Establecimiento de la característica de graduación

8.3.1 Condiciones de la cromatografía

La cromatografía de las soluciones de graduación y el ensayo en vacío se realizarán con ayuda de un cromatógrafo líquido con detector fluorescente en las siguientes condiciones:

- columna de acero inoxidable (250x4,6 mm) llenada con sorbente Eclipse XDB-C18, con tamaño de las partículas de 5 mkm;
- temperatura de la columna 30°C;
- fase móvil – mezcla de acetonitrilo y agua en una proporción de 7:3;
- velocidad de elución – 1,2 cm³/min.;
- longitud de la honda de excitación – 350 nm;
- filtro de emisión – 530 nm;
- coeficiente de reforzamiento del Multiplicador Foelectrónico – 10;

- ancho del pico > 0,2 min., repercusión permanente 4 seg.;
- volumen de la muestra inyectada – 20 mkl;
- el tiempo de retención de los dansil-derivados de las NA será establecido, de acuerdo a las soluciones de graduación con las condiciones arriba indicadas de la cromatografía.

8.3.2 Cálculo del coeficiente relativo graduado

Para calcular el coeficiente relativo graduado de cada NA que se determina, se utilizarán soluciones de graduación preparadas, de conformidad con los apartados 8.2.9.2-8.2.9.4, y la muestra testigo. Para ello la parte de alícuota de 0,020 cm³ de cada solución graduada se introduce en un inyector del cromatógrafo líquido. Se registran las superficies de picos de DMNA y DENA y el estándar interno. La cromatografía de cada solución graduada y la muestra testigo se realizará tres veces.

Se calcularán los coeficientes de graduación relativos \overline{K}_{irel} para cada concentración de DMNA y DENA en relación al estándar interno, con una concentración de 2,00 mkg/cm³, de acuerdo a las fórmulas (1) – (6). Los valores medios de los coeficientes \overline{K}_{rel} serán calculados con ayuda de las fórmulas (7), (8) para cada NA que se determine (DMNA y DENA), dentro de la banda total de mediciones.

$$\overline{S}_{DMNAtestigo} = \frac{\sum_{j=1}^3 S_{jDMNAtestigo}}{3}, \quad (1)$$

donde

$\overline{S}_{DMNAtestigo}$ es la superficie promedia del pico de DMNA en la muestra testigo;

$S_{jDMNAtestigo}$ es la superficie del pico de DMNA con la medición j de la muestra testigo.

$$\overline{S}_{DENAtestigo} = \frac{\sum_{j=1}^3 S_{jDENAtestigo}}{3}, \quad (2)$$

$\overline{S}_{DENAtestigo}$ es la superficie promedia del pico de DENA en la muestra testigo;

$S_{jDENAtestigo}$ es la superficie del pico de DENA con la medición j de la muestra testigo.

10

$$K_{ijrelDMNA} = \frac{C_{iDMNA} * S_{jest.int.}}{C_{est.int.} * (S_{ijDMNA} - S_{DMNAtestigo})} \quad (3)$$

donde

$K_{ijrelDMNA}$ es el coeficiente relativo de graduación para la solución i de DMNA, de acuerdo a los resultados de la medición j;

C_{iDMNA} es la concentración de DMNA en solución i graduada (cuadro 3), mkg/cm³;

S_{ijDMNA} es la superficie de pico de DMNA, a raíz de la medición j de la solución i graduada;

$C_{est.int.}$ es la concentración del estándar interno (DPNA) en la solución i graduada, mkg/cm³,

($C_{est.int.} = 2,00$ mkg/cm³);

$S_{ijest.int.}$ es la superficie de pico del estándar interno (DPNA), a raíz de la medición j de la solución i graduada;

$$\bar{K}_{irelDMNA} = \frac{\sum_{j=1}^9 K_{ijrelDMNA}}{9} \quad (4)$$

donde

$\bar{K}_{irelDMNA}$ es el valor relativo promedio del coeficiente graduado para la concentración de DMNA en solución i graduada.

De forma análoga se calculará el coeficiente relativo graduado \bar{K}_{iDENA} , para la concentración de DENA en la solución i graduada.

$$K_{ijrelDENA} = \frac{C_{iDENA} * S_{ijest.int.}}{C_{est.int.} * (S_{ijDENA} - S_{DENAtestigo})} \quad (5)$$

donde

$K_{ijrelDENA}$ es el coeficiente relativo de graduación para la solución i de DENA, de acuerdo a los resultados de la medición j;

C_{iDENA} es la concentración de DENA en la solución i graduada (cuadro 3), mkg/cm³;

S_{ijDENA} es la superficie de pico de DENA, a raíz de la medición j de la solución i graduada;

$C_{est.int.}$ es la concentración del estándar interno (DPNA) en la solución i graduada, mkg/cm³, ($C_{est.int.} = 2,00$ mkg/cm³);

$S_{ijest.int.}$ es la superficie de pico del estándar interno (DPNA), a raíz de la medición j de la solución i graduada;

$$\bar{K}_{irelDENA} = \frac{\sum_{j=1}^9 K_{ijrelDENA}}{9} \quad (6)$$

donde

$\bar{K}_{irelDENA}$ es el valor relativo promedio del coeficiente graduado para la concentración de DENA en solución i graduada.

11

$$\bar{\bar{K}}_{relDMNA} = \frac{\sum_{i=1}^5 \bar{K}_{irelDMNA}}{5} \quad (7)$$

$\bar{\bar{K}}_{relDMNA}$ es el valor medio del coeficiente relativo de graduación para el DMNA, en toda la banda de concentraciones;

$$\bar{\bar{K}}_{relDENA} = \frac{\sum_{i=1}^5 \bar{K}_{irelDENA}}{5} \quad (8)$$

$\overline{K}_{relDENA}$ es el valor promedio del coeficiente relativo de graduación para la DENA, en toda la banda de concentraciones.

8.4 Selección de muestras para el análisis

La selección de muestras se llevará a cabo, de conformidad con el STB 1036. El peso de una muestra promedio del alimento o materia prima alimenticia no deberá ser menos de 1 kg.

Las muestras seleccionadas se guardarán en una cámara de congelación a una temperatura de menos 8 °C a menos 18 °C.

9. Realización del análisis

Antes de realizarse el análisis de la muestra estudiada, deberán cumplirse las siguientes etapas:

- 1) Verificación de la estabilidad del coeficiente de graduación;
- 2) Verificación de la pureza de los agentes químicos (control de la muestra testigo);
- 3) Preparación de la muestra analizada;
- 4) Preparación de la muestra con adición.

9.1 Verificación de la estabilidad del coeficiente de graduación

Para controlar la estabilidad del coeficiente de graduación, antes de realizarse el análisis de las muestras estudiadas, dentro del inyector del cromatógrafo se introducen una sola vez las soluciones de graduación № 2 y 4 (de conformidad con el cuadro 3), preparadas, de acuerdo a los apartados 8.2.9.2-8.2.9.4, y una muestra testigo. Después de ello se calculará el $K_{practDMNA}$ y el $K_{practDENA}$, de acuerdo a las formulas (3) y (5). La desviación de los coeficientes relativos de graduación para la DMNA y la DENA en cada una de las soluciones de los valores obtenidos en el marco del cálculo del coeficiente relativo de graduación, de acuerdo al apartado 8.3.2, no deberá superar un 10% para cada NA determinada.

$$\frac{\overline{K}_{rel} - \overline{K}_{pract}}{\overline{K}_{rel}} \cdot 100 \leq 10\% \quad (9)$$

donde

\overline{K}_{rel} es el valor promedio del coeficiente relativo de graduación de la DMNA o DENA, obtenido en el cálculo, de acuerdo al apartado 8.3.2.

\overline{K}_{pract} es el valor del coeficiente relativo de graduación de la DMNA o DENA, obtenido en la revisión del coeficiente de graduación.

En caso de obtenerse el valor del coeficiente de graduación que se diferencie más de un 10% de cualquier NA que se esté determinando, será necesario adoptar medidas para liquidar las razones del incumplimiento de la condición (9).

9.2 Control de la muestra testigo

La verificación de la pureza de los agentes químicos (control de la muestra testigo) se llevará a cabo al usarse un nuevo lote de agentes químicos, de acuerdo al apartado 8.2.9.5. La solución que se obtenga se someterá dos veces a la cromatografía. Las concentraciones de la

DMNA y la DENA en una muestra testigo, calculadas, de acuerdo a los apartados 10.1.1., 10.1.2, no deberán superar, respectivamente, los 0,0010 mg/kg y 0,00075 mg/kg. En caso de superarse los límites indicados, será necesario adoptar medidas para limpiar los agentes químicos utilizados, o sustituirlos. En caso de que la suma de concentraciones que se estén determinando en la NA dentro de una muestra testigo no supere los 0,0001 mg/kg, al calcularse los resultados de las mediciones se permitirá que no se tome en consideración el contenido de la NA en la muestra testigo.

9.3 Preparación de la muestra analizada

9.3.1 Separación de las NA por medio de la extracción por destilación con vapor de agua

La muestra media de 1 kg se tritura, se revierte minuciosamente y de la muestra obtenida serán extraídas 2 muestras pesadas de 100 g (pesadas con una precisión de 0,1 g). Cada muestra pesada será colocada en un matraz de fondo redondo de 500 cm³. A la muestra pesada se le añaden 150 cm³ de agua destilada y con ayuda de una pipeta de 1 cm³ se añade una solución de DPNA con una concentración de 2 mkg/ cm³ (apartado 8.2.7.1) y en volumen de 1 cm³. A la mezcla obtenida se añaden 10 g de cloruro de sodio, 10 g de sulfato de sodio, 1 g de ácido sulfanílico, 10 cm³ de solución 1 n de ácido sulfúrico. La mezcla se remueve, el matraz se instala en el sistema de extracción por destilación con vapor de agua de las NA, y se recogen 200-250 cm³ de destilado. El esquema del dispositivo para extracción por destilación se indicará en el Anexo A.

9.3.2 Extracción de las NA del destilado

200-250 cm³ de destilado obtenido, de acuerdo al apartado 9.3.1, se colocan en un embudo separador de 500 cm³, el matraz se enjuaga con 20 cm³ de metileno cloroso, el cual se vierte posteriormente en un embudo separador con el destilado, la mezcla se agita de forma intensiva durante 5 minutos y se deja hasta que se realice una clara segregación de las fases. La extracción con metileno cloroso se repite dos veces más con porciones de 20 cm³. Cada porción de extracto en metileno cloroso se vierte a través de un embudo con filtro de papel, llenado con 5 g de sulfato de sodio anhidro o sulfato de magnesio en un matraz de extracción por destilado de 100 cm³. El filtro con sulfato de sodio se lava con 10 cm³ de extragente. Posteriormente, al extracto seco se añaden 2 cm³ de solución 3,3% de ácido bromhídrico en ácido acético, preparada, de acuerdo al apartado 8.2.2, lo obtenido se revuelve y se deja para el proceso de desnitrógenación por no menos de 30 minutos a una temperatura del ambiente. El metileno cloroso se evapora en un evaporador rotativo a la temperatura de baño María de no más de 30 °C. El extracto obtenido se trasladará cuantitativamente a una taza de porcelana, el matraz de evaporación se enjuaga con 0,5 cm³ de ácido acético y se conecta con el contenido de la taza de porcelana. El extracto se evaporará delicadamente en un baño de arena a una temperatura de no más de 120°C hasta que esté perfectamente seco.

La taza con el residuo seco se dejará enfriar hasta la temperatura del ambiente. Después de enfriarse a la taza de porcelana se añadirán 0,6 cm³ de solución separadora y con movimientos circulares se disolverá el sobrante seco. Al extracto obtenido se añadirán 0,8 cm³ de solución de cloruro de dansilo, preparado, de acuerdo al apartado 8.2.1, lo obtenido será revuelto e inmediatamente se trasladará

la mezcla a una probeta de 5 cm³ con tapón esmerilado. La probeta con el tapón apretado se colocará en un baño María con una temperatura de 55°C por no menos de 40 minutos, para ser sometida al proceso de obtención de los dansil-derivados.

Luego la probeta se extrae del baño María y se deja enfriar hasta la temperatura del ambiente. A la solución obtenida se añade 1 cm³ de benzol, lo obtenido se agita durante 5 minutos y se deja hasta que las fases se definan claramente. De la capa superior transparente de benzol y acetona con una pipeta de 2,0 cm³ se tomará el extracto transparente, el cual será trasladado a una probeta seca de 5 cm³ con tapón esmerilado. Después de ello la extracción con benzol se repetirá una vez más y de nuevo se tomará el extracto transparente de benzol y acetona, uniéndolo con la primera porción. El volumen total de los disolventes del extracto se apartará soplando en el flujo de nitrógeno hasta conseguirse un ambiente perfectamente seco, y exclusivamente dentro de un armario con extracción. Al residuo seco que se haya obtenido se añade 1 cm³ de fase móvil, se cerrará fuertemente y se disolverá el residuo seco agitándose intensamente. La solución transparente obtenida se someterá a la cromatografía dos veces en las condiciones de cromatografía indicadas en el apartado 8.3.1.

9.4 Preparación de la muestra con adición

La preparación y el análisis de la muestra con adición se llevarán a cabo 1 vez dentro de una serie de 5 muestras. Para ello de la prueba media de la muestra, preparada, de acuerdo al apartado 9.3.1, se seleccionarán 2 muestras pesadas de 100 g con una precisión de 0,1 g. Cada muestra pesada será colocada en un matraz con un fondo redondo de 500 cm³. A la muestra pesada se añadirán 150 cm³ de agua destilada y con ayuda de una pipeta de 1 cm³ se inyectará la solución de DPNA con una concentración de 2,00 mkg/cm³ (apartado 8.2.7.1) de un volumen de 1 cm³, así como la solución principal de la mezcla de DMNA y DENA (apartado 8.2.9.1) en un volumen de 3,3 cm³, con ayuda de una pipeta de 5 cm³.

El posterior análisis se realizará, de acuerdo a los apartados 9.3.1-9.3.2.

10. Resultados de las mediciones

10.1 Cálculo del contenido de las NA

10.1.1 Cálculo de la concentración de la DMNA en una muestra testigo

La concentración de la DMNA en una muestra testigo será calculada, con fundamento a las mediciones indicadas, de acuerdo al apartado 9.2.

$$C_{DMNA_{testigo1}} = \frac{C_{est.int} * S_{DMNA_{testigo1}} * \overline{\overline{K_{relDMNA}}}}{S_{est.int.testigo1}} \quad (10)$$

donde

$C_{DMNA_{testigo1}}$ es la concentración de la DMNA en la muestra testigo, de acuerdo al cromatograma 1, mkg/cm³;

$S_{DMNA_{testigo1}}$ es la superficie del pico de la DMNA en la muestra testigo, de acuerdo al cromatograma 1;

$\overline{\overline{K_{relDMNA}}}$ es el coeficiente relativo graduado para la DMNA (se calculará, de acuerdo a una fórmula (7));

$C_{est.int}$ es la concentración del estándar interno, mkg/cm³, ($C_{est.int} = 2,00$ mkg/cm³);

$S_{est.int.testigo1}$ es la superficie del pico del estándar interno (DPNA) en la muestra testigo, de acuerdo al cromatograma 1.

De forma análoga se calculará la concentración de la DMNA, de acuerdo al cromatograma 2 $C_{DMNA_{testigo2}}$, usando una fórmula para ello (10).

Luego se calculará la concentración media de la DMNA de la muestra testigo $\bar{C}_{DMNA\text{testigo}}$, usándose para ello la siguiente fórmula:

$$\bar{C}_{DMNA\text{testigo}} = \frac{C_{DMNA\text{testigo}1} + C_{DMNA\text{testigo}2}}{2} \quad (11)$$

donde

$\bar{C}_{DMNA\text{testigo}}$ es el valor promedio de la concentración de la DMNA en una muestra testigo, mkg/cm³.

10.1.2 Cálculo de la concentración de la DENA en una muestra testigo

La concentración de la DENA en una muestra testigo será calculada, con fundamento a las mediciones indicadas, de acuerdo al apartado 9.2.

$$C_{DENA\text{testigo}1} = \frac{C_{est.int} * S_{DENA\text{testigo}1} * \overline{K}_{relDENA}}{S_{est.int.testigo1}} \quad (12)$$

donde

$C_{DENA\text{testigo}1}$ es la concentración de la DENA en la muestra testigo, de acuerdo al cromatograma 1, mkg/cm³;

$S_{DENA\text{testigo}1}$ es la superficie del pico de la DENA en la muestra testigo, de acuerdo al cromatograma 1;

$\overline{K}_{relDENA}$ es el coeficiente relativo graduado para la DENA (se calculará, de acuerdo a una fórmula (8));

$C_{est.int}$ es la concentración del estándar interno (2,00 mkg/cm³), mkg/cm³,

$S_{est.int.testigo1}$ es la superficie del pico del estándar interno (DPNA) en la muestra testigo, de acuerdo al cromatograma 1.

De forma análoga se calculará la concentración de la DENA, de acuerdo al cromatograma 2 $C_{DENA\text{testigo}2}$, usándose una fórmula para ello (12).

Luego se calculará la concentración media de la DENA de la muestra testigo $\bar{C}_{DENA\text{testigo}}$, usándose para ello la siguiente fórmula:

$$\bar{C}_{DENA\text{testigo}} = \frac{C_{DENA\text{testigo}1} + C_{DENA\text{testigo}2}}{2} \quad (13)$$

donde

$\bar{C}_{DENA\text{testigo}}$ es el valor promedio de la concentración de la DENA en una muestra testigo, mkg/cm³.

10.1.3 Cálculo de la concentración de la DMNA en la prueba de la muestra

$$C_{1\ DMNA\ muestra1} = \frac{C_{est.int} * S_{1\ DMNA\ muestra1} * \overline{K_{relDMNA}}}{S_{1\ est.int.muestra1}} \quad (14)$$

donde

$C_{1\ DMNA\ muestra1}$ es la concentración de la DMNA en la muestra analizada de la primera línea paralela, de acuerdo al cromatograma 1, mkg/cm³;

$S_{1\ DMNA\ muestra1}$ es la superficie del pico de la DMNA en la muestra analizada de la primera línea paralela, de acuerdo al cromatograma 1.

15

$\overline{K_{relDMNA}}$ es el coeficiente relativo de graduación para la DMNA (localizado, de acuerdo a la fórmula 7);

$C_{est.int}$ es la concentración del estándar interno (2 mkg/cm³), mkg/cm³;

$S_{1\ est.int.muestra1}$ es la superficie del pico del estándar interno (DPNA) en una muestra testigo de la primera línea paralela, de acuerdo al cromatograma 1.

De forma análoga, con ayuda de una fórmula (14), se calculará la concentración de la DMNA, de acuerdo al cromatograma 2 del primer ensayo en paralelo de la muestra: $C_{1\ DMNA\ muestra2}$

El valor promedio de la concentración de la DMNA en el primer ensayo en paralelo de la muestra será calculado, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\overline{C}_{1\ DMNA\ muestra} = \frac{C_{1\ DMNA\ muestra1} + C_{DMNA\ muestra2}}{2} \quad (15)$$

donde

$\overline{C}_{1\ DMNA\ muestra}$ es el valor promedio de la concentración de la DMNA en el primer ensayo en paralelo de la muestra, mkg/cm³.

El contenido de la DMNA en la primera muestra en paralelo se calculará, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$X_{1\ DMNA\ muestra} = \frac{(\overline{C}_{1\ DMNA\ muestra} - \overline{C}_{1\ DMNA\ testigo}) * V}{P_1} \quad (16)$$

donde:

$X_{1\ DMNA\ muestra}$ es el contenido de la DMNA en la primera muestra en paralelo, mkg/g (mg/kg);

P_1 es la muestra pesada de la muestra de la primera prueba en paralelo, g.

V es el volumen del extracto analizado, cm³.

De forma análoga se calculará el contenido de la DMNA para la segunda muestra en paralelo ($X_{II\ DMNA\ muestra}$)

$$X_{II\ DMNA\ muestra} = \frac{(\overline{C}_{II\ DMNA\ muestra} - \overline{C}_{DMNA\ testigo}) * V}{P_1} \quad (17)$$

donde:

$X_{IIDMNA_{muestra}}$ es el contenido de la DMNA en la segunda muestra en paralelo, mkg/g (mg/kg);

$\overline{C}_{II \text{ DMNA}_{muestra}}$ es el valor promedio de la concentración de la DMNA en la segunda prueba en paralelo de la muestra, mkg/cm³, el cual se calculará de forma similar al caso de la prueba paralela, de acuerdo a las fórmulas (14), (15);

P_{II} es la muestra pesada de la muestra de la segunda prueba en paralelo, g.

El valor promedio del contenido de la DMNA en la muestra se calculará, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\overline{X}_{DMNA} = \frac{X_{1DMNA_{muestra}} + X_{IIDMNA_{muestra}}}{2} \quad (18)$$

donde:

\overline{X}_{DMNA} es el valor promedio del contenido de la DMNA en la muestra analizada, mg/kg.

10.1.4 Cálculo de la concentración de la DENA en la prueba de la muestra

$$C_{1 \text{ DENA}_{muestra1}} = \frac{C_{est.int} * S_{1DENA_{muestra1}} * \overline{\overline{K_{relDENA}}}}{S_{1est.int.muestral}} \quad (19)$$

donde

$C_{1 \text{ DENA}_{muestra1}}$ es la concentración de la DENA en la muestra analizada de la primera línea paralela, de acuerdo al cromatograma 1, mkg/cm³;

$S_{1 \text{ DENA}_{muestra1}}$ es la superficie del pico de la DENA en la muestra analizada de la primera línea paralela, de acuerdo al cromatograma 1.

$\overline{\overline{K_{relDENA}}}$ es el coeficiente relativo de graduación para la DENA (será calculado, de acuerdo a una fórmula (8));

$C_{est.int}$ es la concentración del estándar interno, mkg/cm³;

$S_{1est.int.muestral}$ es la superficie del pico del estándar interno (DPNA) en una muestra testigo de la primera línea paralela, de acuerdo al cromatograma 1.

De forma análoga, con ayuda de una fórmula (19), se calculará la concentración de la DENA, de acuerdo al cromatograma 2 del primer ensayo en paralelo de la muestra: $C_{1DENA_{muestra2}}$

El valor promedio de la concentración de DENA en el primer ensayo en paralelo de la muestra, en caso de cumplirse la condición de repetitividad indicada en el apartado 11.1, será calculado, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\overline{C}_{1DENA_{muestra}} = \frac{C_{1DENA_{muestra1}} + C_{1DENA_{muestra2}}}{2} \quad (20)$$

donde:

$\overline{C}_{1DENA_{muestra}}$ es el valor promedio de la concentración de la DENA en el primer ensayo en paralelo de la muestra, mkg/cm³.

El contenido de la DENA en la primera muestra en paralelo se calculará, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$X_{1DENAmuestra} = \frac{(\bar{C}_{1DENAmuestra} - \bar{C}_{DENAtestigo}) \times V}{P_1} \quad (21)$$

donde:

$X_{1DENAmuestra}$ es el contenido de la DENA en la primera muestra en paralelo, mkg/g (mg/kg);

P_1 es la muestra pesada de la primera prueba en paralelo, g.

De forma similar, de acuerdo a las fórmulas (20)-(21), se calculará la concentración de la DENA para la segunda prueba en paralelo de la muestra ($X_{IIDENAmuestra}$):

$$X_{IIDENAmuestra} = \frac{(\bar{C}_{IIDENAmuestra} - \bar{C}_{DENAtestigo}) \times V}{P_{II}} \quad (22)$$

donde:

$X_{IIDENAmuestra}$ es el contenido de la DENA en la segunda muestra en paralelo, mkg/kg (mg/kg);

P_{II} es la muestra pesada de la muestra de la segunda prueba en paralelo, g.

17

El valor promedio del contenido de DENA en la muestra, en caso de cumplirse la condición de repetitividad indicada en el apartado 11.1, será calculado, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\bar{X}_{DENA} = \frac{X_{1DENAmuestra1} + X_{IIDENAmuestra}}{2} \quad (23)$$

donde:

\bar{X}_{DENA} es el valor promedio del contenido de DENA en la muestra analizada, mg/kg.

Los valores promedios del contenido de DMNA y DENA se redondean hasta la quinta cifra después de la coma.

10.1.5 Cálculo del contenido de la suma de DMNA y DENA en la muestra.

El contenido de la suma de DMNA y DENA ($X_{DMNA+DENA}$), mg/kg, en la muestra analizada será calculado, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$X_{DMNA-DENA} = \bar{X}_{DMNA} + \bar{X}_{DENA} \quad (24)$$

Los valores del contenido de la suma de DMNA y DENA se redondean hasta la cuarta cifra después de la coma.

En caso de que la concentración masiva de DMNA o DENA sea inferior al límite de medición de la técnica $C_{LOQDMNA}$ o $C_{LOQDENA}$, respectivamente, se dará una evaluación unilateral de la concentración masiva de DMNA o DENA en la muestra, en forma de $X_{DMNA} < X_{LOQDMNA}$, o $X_{DENA} < X_{LOQDENA}$ (los valores $X_{LOQDMNA}$, $X_{LOQDENA}$ se indican en el cuadro 1). En caso de que la concentración masiva solamente de una de las NA que se determinan sea inferior al límite de medición de la técnica, el resultado se emitirá para otra NA.

11. Verificación de la aceptabilidad de los resultados de los ensayos

La aceptabilidad de los resultados se verificará, de acuerdo al STB ISO 5725-6-2002. Los resultados de las investigaciones deberán ser obtenidos en condiciones de repetitividad y precisión intermedia.

11.1 Control, de acuerdo al estándar interno

La desviación de la superficie del pico del estándar interno en todas las muestras ensayadas no deberá superar un 10% del valor obtenido al calcularse el coeficiente relativo de graduación. En caso de que la desviación de la superficie del pico del estándar interno supere el valor indicado, será necesario aclarar y eliminar sus razones y repetir el análisis.

11.1 Control de la repetitividad de los resultados de las mediciones

El control se realizará, de acuerdo a dos resultados de las mediciones, obtenidos en condiciones de repetitividad. El valor de la diferencia absoluta entre los dos resultados de las mediciones para cada NA que se defina, deberá compararse con el valor absoluto de los límites de la repetitividad $r_{absDMNA}$ y $r_{absDENA}$, que serán calculados, de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$r_{absDMNA} = r_{nDMNA} \times 0,01 \times \overline{X}_{DMNA} \quad (25)$$

donde:

r_{nDMNA} , es el valor relativo del límite de repetitividad para la DMNA (cuadro 1), %;

18

0,01 es el coeficiente para recalcular los porcentajes;

\overline{X}_{DMNA} es la concentración masiva de la DMNA en dos muestras en paralelo, mg/kg.

$$r_{absDENA} = r_{nDENA} \times 0,01 \times \overline{X}_{DENA} \quad (26)$$

donde:

r_{nDENA} , es el valor relativo del límite de repetitividad para la DENA (cuadro 1), %;

0,01 es el coeficiente para recalcular los porcentajes;

\overline{X}_{DENA} es la concentración masiva de la DENA en dos muestras en paralelo, mg/kg.

En caso de que para el valor de la diferencia absoluta entre los dos resultados de las mediciones en las pruebas en paralelo se cumplan las siguientes condiciones:

$$X_{I\ DMNA\ muestra} - X_{II\ DMNA\ muestra} \leq r_{absDMNA} \quad (27)$$

$$X_{I\ DENA\ muestra} - X_{II\ DENA\ muestra} \leq r_{absDENA} \quad (28)$$

ambos resultados se considerarán aceptables y en calidad de resultado de las mediciones de la concentración masiva de la NA respectiva se indicará el valor promedio de \overline{X}_{DMNA} y de \overline{X}_{DENA} , calculado con ayuda de fórmulas especiales (18), (23).

En caso de que el valor de la diferencia absoluta entre los dos resultados de las mediciones en paralelo de la concentración masiva de la DMNA o DENA supere el valor r_{abs} , se deberán obtener dos resultados más. En caso de que la diferencia entre los cuatro resultados de las investigaciones para la DMNA y DENA sea inferior o igual a la escala crítica (fórmulas (29) – (30)), el valor promedio aritmético de los cuatro resultados (fórmulas (33) – (34)) deberá indicarse como resultado final de las mediciones $\overline{X}_{finDMNA}$ y $\overline{X}_{finDENA}$.

$$|X_{\max.\ DMNA} - X_{\min.\ DMNA}| \leq CR_{0,95DMNA} \quad (29)$$

$$|X_{\max.\ DENA} - X_{\min.\ DENA}| \leq CR_{0,95DENA} \quad (30)$$

$$CR_{0,95DMNA} = 0,01 * \bar{X}_{finDMNA} * 3,6 * \sigma_{rDMNA} \quad (31)$$

$$CR_{0,95DENA} = 0,01 * \bar{X}_{finDENA} * 3,6 * \sigma_{rDENA} \quad (32)$$

donde:

σ_{rDMNA} es el indicador de repetitividad para la DMNA (cuadro 1), %;

σ_{rDENA} es el indicador de repetitividad para la DENA (cuadro 1), %;

3,6 es el coeficiente de la banda crítica para $n = 4$, con $P = 95\%$.

$\bar{X}_{finDMNA}$, $\bar{X}_{finDENA}$ son los valores promedios aritméticos de los cuatros resultados de las mediciones, calculados, de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\bar{X}_{finDMNA} = \frac{\sum_{i=1}^4 X_{iDMNA}}{4} \quad (33)$$

$$\bar{X}_{finDENA} = \frac{\sum_{i=1}^4 X_{iDENA}}{4} \quad (34)$$

Caso al obtenerse los cuatro resultados de las mediciones, las condiciones (29), (30) no se cumplan, se deberá aclarar y eliminar la razón de los resultados insatisfactorios y llevarse a cabo de nuevo las mediciones.

11.2 Control de la aceptabilidad de los resultados de las mediciones, obtenidos en condiciones de precisión intermedia

19

La revisión de la aceptabilidad de los resultados de las mediciones, obtenidos en condiciones de precisión intermedia, se llevará a cabo, de acuerdo al STB ISO 5725-6-2002.

Después de revisarse los resultados obtenidos de las determinaciones en paralelo, de acuerdo al criterio de repetitividad del apartado 11.1, se calcularán el $\bar{\bar{X}}_{DMNA}$ y el $\bar{\bar{X}}_{DENA}$.

$$\bar{\bar{X}}_{DMNA} = \frac{\bar{X}_{I DMNA} + \bar{X}_{II DMNA}}{2} \quad (35)$$

donde:

$\bar{X}_{I DMNA}$ es el valor promedio de la concentración masiva de la DMNA, calculado a base de una fórmula (18), con ayuda de dos mediciones en paralelo, por el primer operador, mg/kg:

$\bar{X}_{II DMNA}$ es el valor promedio de la concentración masiva de la DMNA, calculado a base de una fórmula (18), con ayuda de dos mediciones en paralelo por el segundo operador, mg/kg:

$\bar{\bar{X}}_{DMNA}$ es el valor promedio de la concentración masiva de la DMNA, calculado a base de los resultados de las mediciones de los dos operadores, mg/kg.

$$\bar{\bar{X}}_{DENA} = \frac{\bar{X}_{I DENA} + \bar{X}_{II DENA}}{2} \quad (36)$$

donde:

$\bar{X}_{I\ DENA}$ es el valor promedio de la concentración masiva de la DENA, calculado a base de una fórmula (23), con ayuda de dos mediciones en paralelo por el primer operador, mg/kg:

$\bar{X}_{II\ DENA}$ es el valor promedio de la concentración masiva de la DENA, calculado a base de una fórmula (23), con ayuda de dos mediciones en paralelo por el segundo operador, mg/kg:

$\bar{\bar{X}}_{DENA}$ es el valor promedio de la concentración masiva de la DENA, calculado a base de los resultados de las mediciones de los dos operadores, mg/kg.

Se calcularán las diferencias absolutas de los resultados para $\bar{X}_{I\ DMNA}$, $\bar{X}_{II\ DMNA}$, $\bar{X}_{I\ DENA}$ y $\bar{X}_{II\ DENA}$, los compararán con el valor de la diferencia crítica CR_{abs}

$$CR_{absDMNA} = CR_{0,95DMNA} * 0,01 * \bar{\bar{X}}_{DMNA} \quad (37)$$

$$CR_{absDENA} = CR_{0,95DENA} * 0,01 * \bar{\bar{X}}_{DENA} \quad (38)$$

$$CR_{0,95DMNA} = \sqrt{r_{I(TO)DMNA}^2} - \frac{r_{DMNA}^2}{2} \quad (39)$$

donde:

$r_{I(TO)DMNA}$ es el límite relativo de la precisión intermedia para la DMNA, indicado en el cuadro 1, %;

r_{DMNA} es el límite relativo de la repetitividad para la DMNA, indicado en el cuadro 1, %;

$$CR_{0,95DENA} = \sqrt{r_{I(TO)DENA}^2} - \frac{r_{DENA}^2}{2} \quad (40)$$

donde:

$r_{I(TO)DENA}$ es el límite relativo de la precisión intermedia para la DENA, indicado en el cuadro 1, %;

20

r_{DENA} es el límite relativo de la repetitividad para la DENA, indicado en el cuadro 1, %.

Si para el valor de las diferencias absolutas entre los resultados se cumplen las siguientes condiciones:

$$|X_{I\ DMNA} - X_{II\ DMNA}| \leq CR_{absDMNA} \quad (41)$$

$$|X_{I\ DENA} - X_{II\ DENA}| \leq CR_{absDENA} \quad (42)$$

los resultados finales, obtenido en condiciones de precisión intermedia, se considerarán aceptables y los valores promedios de $\bar{\bar{X}}_{DMNA}$ y $\bar{\bar{X}}_{DENA}$, calculados, de acuerdo con las fórmulas (35), (36), podrán ser usados en calidad de resultado declarado.

En caso de superarse la normativa indicada, deberán aclararse y eliminarse las razones que deriven en los resultados insatisfactorios de control de la precisión intermedia.

11.3 Control del nivel de extracción

Para controlar el nivel de extracción, se utilizarán los resultados del análisis de las muestras con adición, obtenidos, de acuerdo al apartado 9.4, y las mismas muestras sin adición, de acuerdo al apartado 9.3. El cálculo del nivel de extracción (Rec) se llevará a cabo, de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\bar{X}_{obDMNA} = \frac{X_{1obDMNA} + X_{2obDMNA}}{2} \quad (43)$$

donde:

\bar{X}_{obDMNA} es el contenido promedio de la DMNA en una muestra con adición, mg/kg;

$X_{1obDMNA}$ es el contenido de la DMNA en la primera muestra en paralelo con adición, mg/kg;

$X_{IIobDMNA}$ es el contenido de la DMNA en la segunda muestra en paralelo con adición, mg/kg.

$$\bar{X}_{contrDMNA} = \frac{X_{IcontrDMNA} + X_{IIcontrDMNA}}{2} \quad (44)$$

donde:

$\bar{X}_{contrDMNA}$ es el contenido promedio de la DMNA en una muestra sin adición, mg/kg;

$X_{IcontrDMNA}$ es el contenido de la DMNA en la primera muestra en paralelo sin adición, mg/kg;

$X_{IIcontrDMNA}$ es el contenido de la DMNA en la segunda muestra en paralelo sin adición, mg/kg.

$$X_{adic.med.DMNA} = \bar{X}_{obr.DMNA} - \bar{X}_{contrDMNA} \quad (45)$$

donde:

$X_{adic.med.DMNA}$ es el valor de la adición de la DMNA, obtenido de forma experimental, mg/kg.

$$Rec_{DMNA} = \frac{X_{adic.medDMNA}}{X_{adic.teorDMNA}} * 100 \quad (46)$$

donde:

Rec_{DMNA} es el nivel de extracción de la DMNA de la muestra, %.

$X_{adic.teorDMNA}$ es el valor de la adición de la DMNA calculado, de acuerdo al procedimiento de preparación, mg/kg, ($X_{adic.medDMNA} = 0,01000$ mg/kg).

$$\bar{X}_{obDENA} = \frac{X_{1obDENA} + X_{IIobDENA}}{2} \quad (47)$$

donde:

\bar{X}_{obDENA} es el contenido promedio de la DENA en una muestra con adición, mg/kg;

$X_{1obDENA}$ es el contenido de la DENA en la primera muestra en paralelo con adición, mg/kg;

21

$X_{IIobDENA}$ es el contenido de la DENA en la segunda muestra en paralelo con adición, mg/kg.

$$\bar{X}_{contrDENA} = \frac{X_{IcontrDENA} + X_{IIcontrDENA}}{2} \quad (48)$$

donde:

$\bar{X}_{contrDENA}$ es el contenido promedio de la DENA en una muestra sin adición, mg/kg;

$X_{IcontrDENA}$ es el contenido de la DENA en la primera muestra en paralelo sin adición, mg/kg;

$X_{IIcontrDENA}$ es el contenido de la DENA en la segunda muestra en paralelo sin adición, mg/kg.

$$X_{adic.med.DENA} = \bar{X}_{obr.DENA} - \bar{X}_{contrDENA} \quad (49)$$

donde:

$X_{adic.med.DENA}$ es el valor de la adición de la DENA, obtenido de forma experimental.

$$Rec_{DENA} = \frac{X_{adic.medDENA}}{X_{adic.teorDENA}} * 100 \quad (50)$$

donde:

Rec_{DENA} es el nivel de extracción de la DENA de la muestra, %.

$X_{adic.teorDENA}$ es el valor de la adición de la DENA calculado, de acuerdo al procedimiento de preparación, mg/kg, ($X_{adic.medDENA} = 0,01505$ mg/kg).

En caso de que el nivel de extracción de DMNA y DENA se encuentre dentro de una banda de un 90% a un 110%, los resultados de las mediciones se considerarán satisfactorios. Caso contrario, será necesario adoptar medidas para eliminar las razones de dicha disconformidad.

12 Verificación de la estabilidad de los resultados de los ensayos

La verificación de la estabilidad de los resultados de las mediciones se realizará con el uso del mapa de Shewhart (mapa R de las bandas), de acuerdo al STB ISO 5725-6-2002, apartado 6.2.

Se utilizarán los datos obtenidos en el marco del análisis de las pruebas de trabajo. Los mapas de control serán elaborados por separado, para las DMNA y las DENA.

Al elaborarse el mapa de control se calcularán los siguientes parámetros:

- línea central: $d_2 \times \sigma_r$,

donde $d_2 = 1,128$ (coeficiente para el cálculo de la línea central para $n=2$);

- límites de ajuste: $UCL = D_2 \times \sigma_r$,

donde $D_2 = 3,686$ (coeficiente para el cálculo de los límites de ajuste para $n=2$);

- límites preventivos: $UCL = D_2(2) \times \sigma_r$,

donde $D_2(2) = 2,834$ (coeficiente para el cálculo de los límites preventivos para $n=2$);

σ_r es la desviación estándar de la repetitividad (cuadro 1), %.

De acuerdo a los resultados de mediciones obtenidos para DMNA y DENA, en los mapas de control se indicará el valor de la banda relativa, w , %

$$w = 100 * \frac{|x_1 - x_2|}{(x_1 + x_2)/2} \quad (51)$$

donde:

x_1 y x_2 son los resultados de las mediciones en paralelo del contenido de NA, mg/kg, calculados para DMNA y DENA, de acuerdo a las fórmulas (16), (17) y (21), (22), respectivamente; 100 es el coeficiente para recalcular a por cientos.

Los valores obtenidos se indicarán en una hoja de datos del mapa de control, de acuerdo al modelo indicado en el cuadro 4.

Cuadro 4 – Hoja de datos del mapa de control

Data del análisis	Resultados de las mediciones en paralelo, x_1, x_2 , mg/kg		Banda relativa, w , %		Desviación estándar relativa de la repetitividad, s_r , %	
	DMNA	DENA	DMNA	DENA	DMNA	DENA

--	--	--	--	--	--	--	--	--

La evaluación de la desviación estándar relativa de la repetitividad, s_r , calculada, de acuerdo a los datos del mapa de control, se deducirá conforme a la siguiente fórmula:

$$s_r = \sum_{i=1}^L W_i / (L * d_2) = \bar{w} / d_2 \quad (52)$$

donde:

L es el número de las mediciones realizadas.

La evaluación obtenida de la desviación estándar relativa de la repetitividad, s_r , será utilizada en el lugar del indicador establecido de repetitividad en el marco de la elaboración del mapa de control de bandas.

Posteriormente, se aplicarán los pasos, conforme a los requerimientos del STB ISO 5725-6-2002, apartado 6.2.2.

13. Tramitación de los resultados de las mediciones

Los resultados de las mediciones serán tramitados, de acuerdo al modelo que deberá incluir la siguiente información:

- nombre (código) de la muestra;
- fechas de las mediciones;
- resultados de las mediciones;
- apellido del operador.

El resultado garantizado de las mediciones emitido por el laboratorio, podrá reflejarse de forma siguiente:

$$(X_{DMNA-DENA} \pm U(X_{DMNA-DENA})), \text{ mg/kg} \quad (53)$$

donde $X_{DMNA-DENA}$ es el contenido de la suma de NA, obtenido, de conformidad con la presente técnica y calculado, de acuerdo a una fórmula (24), a raíz de los resultados de 2 investigaciones e paralelo de una muestra;

$U(X_{DMNA-DENA})$ es el valor absoluto de la evaluación de la indeterminación ampliada del resultado de las mediciones de la suma de DMNA y DENA, mg/kg.

La evaluación de la indeterminación ampliada del resultado de las mediciones de la suma de DMNA y DENA se llevará a cabo, de acuerdo a las técnicas de evaluación de la indeterminación, aprobadas, de conformidad con el orden establecido.

La técnica ha sido elaborada por el laboratorio de investigaciones cromatográficas de la Sección de Investigaciones Físicas y Químicas de la Entidad Estatal RNPTs de Higiene del Ministerio de Salud de la República de Belarús.

Autores:

Jefe de la Sección de Investigaciones Físicas y Químicas, Candidato a Doctor en Química

N.I. Marusich

Científico Principal

N.P. Levoshuk

Científico Menor

I.N. Masalov

Bibliografía

[1] “Requerimientos higiénicos de la calidad e inocuidad de la materia prima alimenticia y alimentos”, aprobados por el Decreto del Ministerio de Salud № 63 del 09 de junio de 2009.

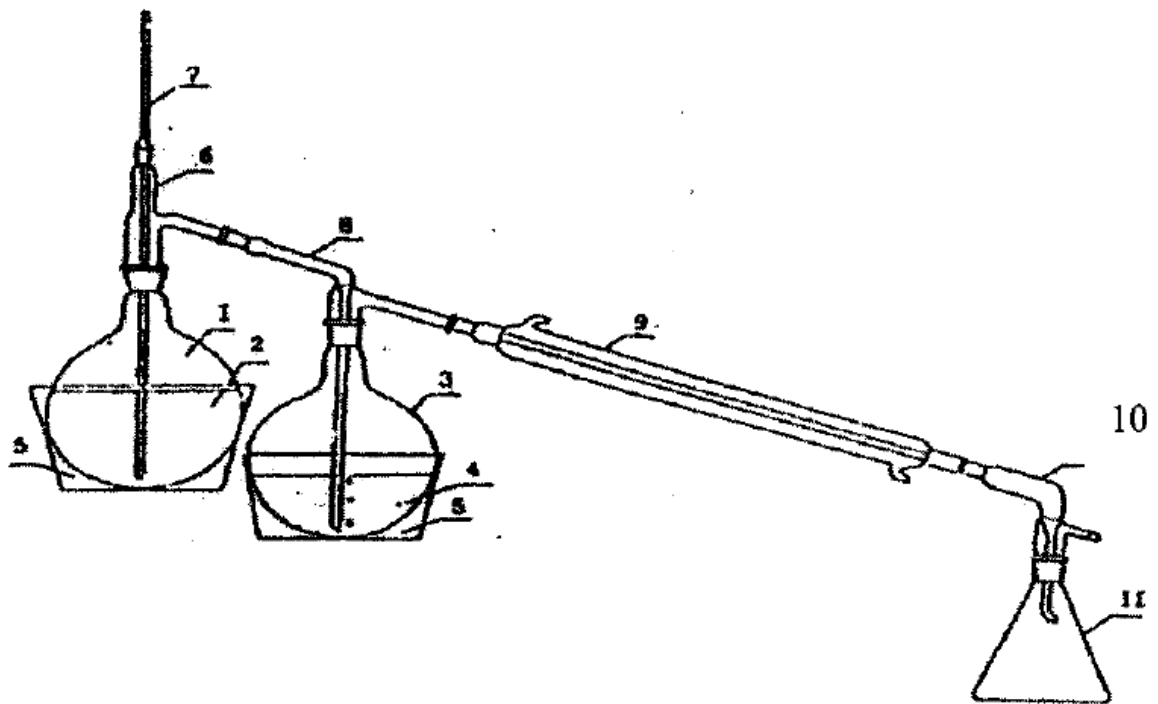
[2] Styskin E.L., Itsikson L.B., Braude E.V., “Cromatografía líquida práctica de alta eficacia”. – Moscú: “Química”, 1986. – página 288.

[3] STB ISO 5725-6-2002 “Exactitud (carácter correcto y precisión) de las técnicas y los resultados de las mediciones”. Parte 6. “Uso de los valores de la exactitud en la práctica”. – Minsk: Gosstandart, 2003 – página 42.

[4] Guiochon G., Guillemin K. “Cromatografía cuantitativa de gas para los análisis de laboratorio y control industrial”. Parte 2. – M.,: Mir, 1994 – página 375.

24

Anexo A
(De carácter obligatorio)



Dibujo A.1. Esquema de la instalación para la destilación con vapor de agua, a fin de separar las NA volátiles de la muestra.

1. Generador de vapor;
2. Agua destilada;
3. Matraz de fondo redondo;
4. Homogenizado del producto analizado;

5. Baño con glicerina;
6. Vocal Viurz;
7. Tubería sobre sección pulida;
8. Vocal barbater;
9. Refrigerador Liebig;
10. Allonge;
11. Receptor.