

ACUERDO GUBERNATIVO NUMERO 226-92

Palacio Nacional: Guatemala, 26 de marzo de 1992,

El Presidente de la República,

CONSIDERANDO:

Que corresponde a la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR) estudiar, elaborar, adoptar y proponer al Organismo Ejecutivo, por conducto del Ministerio de Economía, la aprobación de normas que se consideren de utilidad para el país y contribuyan al desarrollo industrial estableciendo principios de equidad en las relaciones entre productores y consumidores.

CONSIDERANDO:

Que el Consejo Directivo de la Comisión Guatemalteca de Normas convocó en su oportunidad a todos los sectores públicos y privados involucrados en la producción y comercialización de Granos comerciales y otros alimentos, así como a otras entidades relacionadas con el tema, a efecto de que se pronuncien sobre la propuesta de norma que establece el método de ensayo para determinación de aflatoxinas en dichos productos.

CONSIDERANDO:

Que habiéndose recibido diversas opiniones de los diferentes sectores, las cuales fueron conocidas por el Consejo Directivo de la Comisión Guatemalteca de Normas, y habiendo sometido a estudio el referido documento ese Cuerpo Colegiado, en el punto tercero, Acta Número 42-91 de fecha 2 de julio de 1991 se emitió la Resolución Número 19-91 en la que se adopta la Norma COGUANOR NGO 34 052 h2 GRANOS COMERCIALES Y OTROS ALIMENTOS. Determinación de aflatoxinas. Método Romer. Habiendo satisfecho todos los requisitos en la adopción de dicha norma es procedente acordar su aprobación en forma legal.

POR TANTO:

En el ejercicio de las funciones que le confiere el Artículo 183 inciso e) de la Constitución Política de la República de Guatemala y con base en el Artículo 6º., del Decreto 1523 del Congreso de la República, Ley de Creación de la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR).

ACUERDA:

ARTICULO 1.

Aprobar la Norma Guatemalteca Obligatoria de método de ensayo siguiente: COGUANOR NGO 34 052 h2 GRANOS COMERCIALES Y OTROS ALIMENTOS. Determinación de aflatoxinas. Método Romer. Adoptada por la Comisión Guatemalteca de Normas en el punto tercero, Resolución Número 19-91, Acta Número 42-91 de fecha 2 de julio de 1991.

ARTICULO 2.

El Registro Oficial de esta Norma, queda a cargo de la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR).

ARTICULO 3.

El presente Acuerdo y el texto de la Norma (Anexo 1) que se adopta empezará a regir ocho (8) días después de su publicación íntegra en el Diario Oficial.

COMUNIQUESE

JORGE ANTONIO SERRANO ELIAS

El Ministro de Economía

JUAN LUIS MIRON AGUILAR

GRANOS COMERCIALES Y OTROS ALIMENTOS. Determinación de aflatoxinas. Método Romer.	PROYECTO COGUANOR NGO
	34 052 h2:91

1. OBJETO

Esta norma tiene por objeto establecer el método para la determinación de aflatoxinas en granos comerciales y otros alimentos.

2. CAMPO DE APLICACION

El método Romer descrito en la presente norma es aplicable para detectar los siguientes niveles de aflatoxinas:

- a) > 5 ug/kg de aflatoxinas totales, en almendras;
- b) > 2 10 ug/kg de aflatoxinas totales, en maíz blanco y amarillo, harina de maní; harina de algodón, maní, mantequilla de maní y nueces de pistacho; y

c) > 15 ug/kg de aflatoxinas totales en alimentos mezclados;

Nota. La expresión aflatoxinas totales incluye (B1 + B2 + G1 + G2).

3. NORMAS COGUANOR A CONSULTAR

COGUANOR NGO 4 010 Sistema Internacional de Unidades (SI). 2a. Revisión

4. REACTIVOS O MATERIALES

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica reconocida; el agua debe ser deionizada o destilada (véase el numeral 11.1 en el Anexo).

4.1 Cloroformo, grado técnico, almacenado en frascos de vidrio.

4.2 Mezcla de extracción, se prepara mezclando 85 partes de acetona con 15 partes de agua.

4.3 Solvente de elusión, se prepara mezclando cloroformo y acetona en proporción (9 + 1); ambos solventes deben ser de grado cromatográfico.

4.4 Sulfato de calcio anhidro: sin indicadores y que pase un tamiz cuya abertura esté comprendida entre 425 um y 850 um (véase el numeral 7.1.1).

4.5 Florisil (1), que pase un tamiz cuya abertura esté comprendida entre 75 um y 150 um.

4.6 Silica gel 60, para columna cromatográfica, cuyo tamaño de partícula esté comprendido entre 63 y 200 um.

4.7 Alumina neutra, de actividad I y que pase un tamiz cuya abertura esté comprendida entre 75 um y 180 um; para activar la alumina debe colocarse a 110°C durante 2 h.

(1) Se puede emplear el reactivo No. F-101 de Fisher-Scientific Co.

4.8 Solución 0.2 N de NaOH, se prepara disolviendo 8.00 g de NaOH en 1 L de agua.

4.9 Suspensión de cloruro férrico, se prepara mezclando 20 g de FeCl₃ anhidro con 300 mL de agua (1)

4.10 Carbonato cúprico (básico), Cu Co₄

4.11 Tierra de diatomáceas (2).

4.12 Solución al 0.03% de H₂SO₄. se prepara diluyendo 0.3 mL de H₂SO₄ concentrado hasta 1 L con agua.

4.13 Solución lavadora, 0.02 N de KOH y 1% de KCl, se prepara disolviendo 1.12 g de KOH y 10 g de KCl en 1 L de agua.

- 4.14 Sulfato de sodio anhidro.
- 4.15 Aflatoxinas B1. B2. G1 y G2, y soluciones estándares de las mismas; véase el capítulo 6 de la presente norma.
- 4.16 Papel filtro, de filtración rápida (3), de 24 cm de diámetro.
- 4.17 Lana de vidrio.
- 4.18 Corriente de nitrógeno.
- 4.19 Mezcla (98 + 2) de benceno y acetonitrilo.
- 4.20 Silica gel, para cromatografía en capa fina, tamaño de partícula entre 6 y 13 μm ; puede emplearse Adsorbosil 1 ó 5 (4), o bien Silica AR 4G ó 7G (5).
- 4.21 Mezcla (1 + 1) de ácido trifluoroacético (TFC) y benceno: en vez de benceno puede usarse cloroformo. Los reactivos empleados para preparar la mezcla deben ser de calidad cromatográfica. La mezcla debe prepararse el día que se va a usar.
- 4.22 Mezclas solventes para la prueba de confirmación: véase el cuadro 5 y el numeral 7.4.8.1, en la página 14/18.
- 4.23 Solución acuosa al 25% de ácido sulfúrico: también puede emplearse solución al 25% de ácido nítrico o de cualquier otro ácido inorgánico.

5. APARATOS

- 5.1 Balanza analítica de precisión, que aprecie 0.1 mg.
- 5.2 Molino, de martillos o de cuchillas.
- 5.3 Licuadora, con vaso de vidrio de 1 L de capacidad, con tapa perforada con un orificio de 32 mm a aproximadamente 1 cm del centro de la misma, para permitir el escape de vapores o bien, Erlenmeyer de 500 mL con tapa de vidrio esmerilado y agitador mecánico de muñón (Wrist-Action Shaker) (1). (Véase la llamada en página siguiente)

(1) Se puede emplear Fe Cls Fisher Scientific Co. No. I-89 o su equivalente.

(2) Se puede emplear el tipo Hyflo Super - Cel o su equivalente.

(3) El papel Whatman No. 4 es apropiado.

(4) El Adsorbosil es distribuido por la casa Applied Science.

(5) La Silica AR es distribuida por la casa Mallinckrodt.

5.4 Lámpara de luz ultravioleta, de onda larga, con una Intensidad de 430 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ a 15 cm y 365 nm o bien, cámara con fuente de luz ultravioleta (2).

5.5. Minicolumnas, de vidrio al borosilicato, de aproximadamente 6 mm de diámetro interno y 190 mm de longitud, con reducción de su diámetro en uno de sus extremos a aproximadamente 2 mm (ahusada).

También están disponibles en el comercio las minicolumnas ya empacadas, fabricadas por casas especializadas.

5.6 Embudos de vidrio, de 160 mm de diámetro interno.

5.7 Probetas graduadas, de 50, 100, 150 y 250 mL.

5.8 Vasos de precipitados, de 150, 400 y 600 mL.

5.9 Embudos Buchner, de 100 mm de diámetro interno.

5.10 Embudos separadores, de 125 y 500 mL.

5.11 Probetas, de 10 mL, con tapa de vidrio esmerilado.

5.12 Pipetas volumétricas, de 10 mL.

5.13 Jeringas, de 5 mL, provistas de agujas calibre 15 y 125 mm (5 pulgadas) de longitud.

5.14 Rejilla, para mantener las minicolumnas en posición vertical; puede emplearse una rejilla para tubos de ensayo.

5.15 Pera de hule, de aproximadamente 60 mL de capacidad, con un orificio de 7 mm de diámetro en uno de sus extremos.

5.16 Varillas de vidrio, de 5 mm de diámetro.

5.17 Tamices. No. 14 (1.40 mm) y No. 20 (850 un).

5.18 Viales, de 10 mL.

5.19 Baño de agua, regulado a 40°C.

5. 20 Microjeringas, apropiadas para medir 100 y 250 uL.

5.21 Microjeringas graduadas, apropiadas para medir 3.5, 5.0, 6.5, 7.0 y 10.0 uL.

5.22 Densitómetro. (3)

5. 23 Micropipetas capilares desechables, de vidrio, tipo cuentagotas, de 1 uL.

(1) Se puede emplear el agitador Burrel, el cual simula la acción de la muñeca humana, o bien un equipo equivalente.

(2) Se puede emplear la cámara Chromato-Vue equipada con 1 ó 2 lámparas de 15 W y, preferiblemente, con transiluminador C-50 de onda larga o bien su equivalente

(3) Se pueden emplear los siguientes aparatos: TLC densitómetro microprocesador CS-920 con accesorio fluorométrico, marca Shimadzu; fluoroespectrofotómetro MPF-2A o sucesores, con accesorio TLC 018-0057, marca Perkin-Elmer, o un aparato equivalente.

(2) Se puede emplear la cámara Chromato-Vue equipada con 1 ó 2 lámparas de 15 W y, preferiblemente, con transiluminador C-50 de onda larga o bien su equivalente

(3) Se pueden emplear los siguientes aparatos: TLC densitómetro microprocesador CS-920 con accesorio fluorométrico, marca Shimadzu; fluoroespectrofotómetro MPF-2A o sucesores, con accesorio TLC 018-0057, marca Perkin-Elmer, o un aparato equivalente.

5.24 Secador de pelo, con aire caliente o un aparato equivalente.

5.25 Instrumental de laboratorio.

6. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES ESTANDARES DE AFLATOXINAS

6.1 Estándares primarios. Los cristales de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, para preparar las soluciones estándares, deben cumplir con los siguientes criterios de pureza (véase el numeral 11.1 en el Anexo).

6.1.1 Pureza cromatográfica. Cuando se lleva a cabo el método descrito en el numeral 6.2.1, después del desarrollo, los puntos individuales de los estándares de aflatoxina no deberán revelar la presencia de otras aflatoxinas y a lo sumo, solamente puntos fluorescentes tenues cerca del origen.

6.1.2 Absortividad molar. La absortividad molar debe estar comprendida entre los límites de confianza indicados en el cuadro 1 siguiente; véase el numeral 6.2.2.

Cuadro 1. Absortividades molares de aflatoxinas en metanol y límites de confianza esperados al 95% en determinaciones simples de absortividad molar.

Aflatoxina	, nm	Absortividad molar en metanol	Límites de confianza 95% (±)
B1	223	22 100	1 600
	265	12 400	800
	360	21 800	1 100
B2	222	18 600	1 000
	265	12 100	600
	362	24 000	500
G1	216	27 400	2 500
	242	9 600	300
	265	9 600	1200
	362	17 700	700
G2	214	25 300	2 300
	244	10 500	300
	265	9 000	1100
	362	19 300	800

6.1.3 Picos de absorción. Las relaciones de los picos de absorción deben estar comprendidas entre los límites de confianza indicados en el cuadro 2 siguiente (véase el numeral 6.2.2 (c))

Cuadro 2. Relaciones de los picos mayores de los espectros de absorción ultravioleta, de aflatoxinas en metanol y límites de confianza esperados al 95% en espectros simples

Picos mayores comparables nm	Parámetro	Aflatoxinas			
		B1	B2	G1	G2
223/265	Relación límites de confianza al 95%	1.77	1.54		
		± 0.04	± 0.05		
214/265	Relación límites de confianza al 95%			2.86	2.83
				± 0.15	± 0.13
242/265	Relación límites de confianza al 95%			1.00	1.20
				± 0.02	± 0.07
362/265	Relación límites de confianza al 95%	1.76	1.98	1.84	2.09
		± 0.04	± 0.08	± 0.06	± 0.18

6.2 Verificación de la pureza de los estándares primarios.

6.2.1 Determinación de la pureza cromatográfica. 6.2.1.1 Preparación de las placas.

a) En un matraz Erlenmeyer de 300 mL con tapa de vidrio esmerilado, se pesan 30 g de silica gel para ensayo de aflatoxinas en cromatografía en capa fina (véase el numeral 4.20), se adiciona la cantidad de agua recomendada por el fabricante, se agita vigorosamente durante no más de 1 min y se vacía hacia un aplicador; se ajusta la cantidad de agua para obtener una suspensión de consistencia adecuada para ser esparcida.

b) Inmediatamente se cubren 5 placas de vidrio de 20 cm x 20 cm con 0.25 mm de espesor de la suspensión de silica gel y se dejan las placas en completo reposo hasta que gelifiquen (aproximadamente 10 min). Se ajusta el espesor de la capa a 0.5 mm, si es necesario, para proveer una buena resolución de las aflatoxinas y los puntos bien próximos unos de otros. Se secan las placas recubiertas durante 2 ó más horas a 80°C ó a 110°C durante 1 h o más y se almacenan en un desecador con silica gel desecante activada, justo hasta el momento en que van a ser usadas. Para preparar las placas para cromatografía se traza una línea a 16 cm del borde que corresponde al frente del solvente; se deben marcar líneas a aproximadamente 0.5 cm de cada borde o bien se remueven 0.5 cm de gel de cada lado para evitar los efectos de borde.

6.2:1.2 Preparación de las soluciones de trabajo: véase el numeral 11.1 en el Anexo. a) Soluciones estándares A cada uno de los envases que contienen laminillas secas o cristales de las aflatoxinas B1, B2, G1 ó G2, se agrega una mezcla (9 + 1) de benzeno y acetonitrilo (ambos reactivos deben ser de calidad cromatográfica) en cantidad suficiente para dar una concentración calculada comprendida entre 8 y 10 ug/mL; se debe usar la información que contiene la etiqueta en cuanto a la cantidad en masa de la aflatoxina en cada envase, como guía para los cálculos de concentración correspondientes. En un agitador Vortex se agita vigorosamente cada solución durante 1 min y se transfiere a un frasco con tapa de vidrio de tamaño adecuado, sin utilizar enjuagues; estas soluciones son estables durante más de un año si se almacenan en un congelador y apropiadamente protegidas de la luz.

Precaución: Las aflatoxinas secas no deben transferirse para pesarse o para otros propósitos, a menos que se cuente con las facilidades apropiadas para evitar su diseminación en el medio ambiente debido a las cargas electrostáticas sobre las partículas.

b) Si los estándares de aflatoxinas están disponibles en forma de solución, se deben transferir a un frasco de tamaño adecuado y, si es necesario, se diluyen como se indicó anteriormente para ajustar su concentración a 8-10 ug/mL.

c) Para determinar la concentración de las soluciones de aflatoxinas, se registran sus espectros ultravioleta entre 330 y 370 nm, contra el solvente usado para la solución y empleando una celda de referencia; se regresa la solución a su frasco original. Se toma la absorbencia de la solución a la longitud de onda de máxima absorción, cercana a 350 nm y se aplica la siguiente ecuación:

$$C = (A \times MM \times 1000 \times F)/e$$

En la que:

C = Concentración, en microgramos de aflatoxina por mililitro de solución.

A = Absorbencia de la solución. MM = Masa molecular; véase el cuadro 3.

F = Factor de corrección del espectrofotómetro; véase el numeral 11.2 en el anexo, e = Absortividad molar; véase el cuadro 3.

Cuadro 3. Masa molecular y absortividad molar.

Aflatoxina	MM	E
B1	312	19 800
B2	314	20 900
G1	328	17 100
G2	330	18 200
M1	328	18 815

Nota. La exposición normal a la luz ultravioleta durante la determinación de la absorbencia, no produce conversión observable a fotoproductos.

d) Solución estándar de referencia, de resolución, se prepara mezclando, en un matraz aforado de 1 mL con tapa de vidrio esmerilado, las soluciones estándares de 8 a 10 ug/mL, de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, en cantidad apropiada para dar en una única solución las siguientes concentraciones finales cuando se diluyan con una mezcla (98 + 2) de benceno y acetonitrilo: 0.5 ug/mL para las aflatoxinas B1 ó G1, y 0.1 ug/mL para las aflatoxinas B2 ó G2; la solución así preparada se almacena en un tubo microflex de 1 mL dotado con válvula microflex.

6.2.1.3 Procedimiento. Para cada solución estándar se procede en la forma siguiente:

a) Bajo luz incandescente tenue y tan rápido como sea posible se aplican, sobre una línea imaginaria a 4 cm del borde inferior de la placa, sucesivamente y a intervalos de 2 cm: 5 uL de la solución estándar; 5 uL de la solución estándar más 5 uL de la solución estándar de referencia, de resolución; y finalmente 5 uL de la solución estándar de referencia, de resolución.

b) En un tanque desarrollador libre de marcas, se colocan 50 mL de una mezcla (1 + 9) de acetona y cloroformo o bien, una cantidad suficiente de solvente para proveer una profundidad del mismo de aproximadamente 2 cm; la composición de la mezcla solvente puede ser variada de (5 ± 95) a (15 + 85) para compensar las variaciones de la sílica gel y las condiciones de desarrollo. Se debe usar sólo una placa por tanque, colocando la cubeta cerca de uno de los lados para permitir una máxima exposición de la superficie recubierta a el volumen del tanque; inmediatamente se introduce la placa y se sella el tanque.

c) Se deja desarrollar la placa durante 40 min a 23 – 25°C ó hasta que las aflatoxinas alcancen un Rf entre 0.4 y 0.7; se debe ajustar el tiempo de desarrollo si se usa una temperatura diferente durante el mismo o bien se debe ajustar la mezcla solvente si el tiempo de desarrollo es mayor que 90 min.

d) Se remueve la placa del tanque, se deja evaporar el solvente a temperatura ambiente y se examina la placa colocada horizontalmente con el lado recubierto hacia arriba e iluminada por abajo con luz ultravioleta, en una pieza oscura y protegiéndose los ojos con lentes protectores específicos; también puede emplearse la cámara Chromato-Vue para el examen. Se observa el patrón de 4 puntos fluorescentes de la solución estándar de referencia, de resolución. En orden decreciente de Rf, los puntos corresponden a aflatoxina B1, B2, G1 y G2,

respectivamente; se debe notar una pequeña diferencia de color: fluorescencia azulada para las aflatoxinas B y ligeramente verde para las aflatoxinas G.

e) Se verifica que se cumplan los requisitos establecidos en el numeral 6.1.1 de la presente norma.

6.2.2 Determinación de la absorptividad molar en metano.

a) Preparación de la solución. Tomando las precauciones necesarias para evitar la diseminación de partículas de aflatoxinas al medio ambiente, se pesa aproximadamente 1 mg del estándar de aflatoxina al más cercano 0.001 mg y se transfiere cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL; se disuelve y diluye a volumen con metanol. Se calcula la concentración de la solución en microgramos por mililitro.

b) Procedimiento. Se mide la absorbencia de la solución en la máxima absorción ultravioleta (véase el cuadro 1); se calculan las absorptividades molares empleando la siguiente fórmula:

$$e = (A \times MM \times 1000)/C1$$

e = Absorptividad molar en metanol. A = Absorbencia leída.

MM = Masa molecular de la aflatoxina (B1 = 312; B2 = 314; G1 = 328; G2 = 330)

C1 = Concentración de la solución, en microgramos de aflatoxina por mililitro de solución.

c) Se calculan las relaciones de absorbencia para cada aflatoxina a las longitudes de onda indicadas en el cuadro 2.

6.3 Soluciones patrón para usar como estándar interno. Se diluyen las soluciones estándares de concentración 8 a 10 ug/mL correspondientes a las aflatoxinas B1 y G1, con cloroformo para obtener una solución única que contenga una concentración final de 2 ug de cada aflatoxina por mililitro de solución. Esta solución es la que se usa como estándar interno de la muestra; véase el numeral 7.3.2.

6.4 Soluciones patrón de trabajo. Se preparan soluciones patrones de cada aflatoxina, diluyendo por aparte cada una de las soluciones estándares, con una mezcla (9 + 1) de benzeno-acetonitrilo (grado cromatográfico), en cantidad apropiada para obtener las siguientes concentraciones finales: aflatoxinas B1 ó G1 = 0.5 ug/mL y aflatoxinas B2 y G2 = 0.1 ug/mL. Cada solución se prepara en un matraz aforado de 1 mL con tapa de vidrio esmerilado y luego de preparada se almacena en un tubo microflex de 1 mL dotado con válvula microflex.

7. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS

7.1 Preparación de las minicolumnas (1). Con cada minicolumna se procede en la forma siguiente:

7.1.1 En el extremo ahusado de la minicolumna se coloca un pequeño tapón de lana de vidrio; se agregan en el mismo orden y altura indicados, los siguientes reactivos previamente secados: a) 5 a 7 mm de sulfato de calcio anhidro; b) 5 a 7 mm de florisil; c) 18 a 20 mm de sílica gel (véase el numeral 4.6); d) 8 a 10 mm de alumina neutra, activada durante 2 h a 110°C (véase nota); y e) 5 a 7 mm de sulfato de calcio anhidro, apisonando cada capa para asentar el empaque y mantener las interfaces tan niveladas como sea posible.

Nota. Si no se dispone de sulfato de calcio del tamaño establecido, se puede reducir de tamaño una sal de calcio más gruesa, empleando un mortero y la mano del mismo, para llevarla a un tamaño suficientemente fino de manera que se evite la mezcla con el florisil al preparar la minicolumna.

7.1.2 Se coloca un pequeño tapón de lana de vidrio en la parte superior de la columna y se aplica presión sobre él con la varilla de vidrio.

(1) Minicolumnas ya empacadas pueden obtenerse en "Mycolab Co. Box 321, Chesterfield, MO 63017, U.S.A."

7.2 Obtención de las muestras. Si la norma de especificaciones correspondiente no indica el procedimiento para la obtención de las muestras, se deberá proceder en la forma siguiente:

7.2.1 Se forman lotes de inspección de 25 000 kg o menos del producto al que se va a verificar el contenido de aflatoxinas y se subdivide cada lote de inspección, imaginariamente, en 4 partes aproximadamente iguales.

7.2.2 De cada una de las partes se tomará una submuestra de 750 g como mínimo, la cual se formará por la reunión de pequeñas extracciones iguales de cada 250 kg del cuarto de lote.

7.2.3 Se mezclan perfectamente las 4 submuestras para formar una muestra compuesta no menor de 3 kg por lote de inspección.

7.3 Preparación y extracción de la muestra de ensayo.

7.3.1 Si la muestra se presenta en forma de granos enteros o partículas muy gruesas, se muele toda la muestra compuesta por medio de un molino de martillos o de discos, hasta que pase por un tamiz No. 14 (1.40 mm); de la muestra compuesta y molida, se extraen al azar 10 porciones de aproximadamente 100 g cada una, se mezclan y se vuelven a moler, hasta que pasen por un tamiz No. 20 (850 μ m).

7.3.2 La muestra molida como se indicó anteriormente o bien, la muestra compuesta que se recibe ya en forma de partículas finas, se homogeneizan perfectamente y luego se extraen de la misma varias porciones pequeñas suficientes para formar una muestra de ensayo de aproximadamente 110 g, de los cuales se pesan dos porciones de 50 g cada una; a una de tales porciones se le agrega como estándar interno una cantidad conocida de aflatoxinas (arriba del límite de detección) para obtener estándares de comparación (véase el numeral 6.3). A la otra porción de 50 g no se le agrega ningún estándar interno.

7.3.3 Cada una de las porciones de 50 g se transfieren por separado cuantitativamente a sendos vasos mezcladores de licuadora; se agrega a cada uno 250 mL de la mezcla (85 + 15) de acetona y agua, y se mezcla durante 3 min. Si se usan en forma alternativa sendos matraces Erlenmeyer de 500 mL y el agitador mecánico, se debe agitar el conjunto a la velocidad alta durante 45 min.

7.3.4 Se filtra por aparte el contenido de cada vaso a través de papel filtro de filtración rápida, colocado en embudos de 160 mm de diámetro, recibiendo los filtrados en sendas probetas graduadas de 250 mL; se colectan 150 mL de filtrado y se transfieren a sendos vasos de precipitados de 400 mL.

7.4 Purificación Con cada una de las muestras se procede por aparte en la forma siguiente:

7.4.1 A un vaso de precipitados de 600 mL, se transfieren cuantitativamente 170 mL de la solución 0.2N de NaOH y 30 mL de la suspensión de FeCl₃, y se mezcla bien; se agregan aproximadamente 3 g de carbonato básico de cobre al filtrado contenido en el vaso de precipitados de 400 mL, se mezcla bien y se agrega esta mezcla al vaso de precipitados de 600 mL.

7.4.2 Empleando como medidor volumétrico un vaso de precipitados de 150 mL se transfieren a la mezcla 150 mL de tierra de diatomáceas y se mezcla todo perfectamente; se filtra el contenido del vaso de precipitados de 600 mL a través de papel filtro colocado en el embudo de 160 mm o bien, en el embudo Buchner de 10 cm de diámetro interno.

7.4.3 A un embudo separador de 500 mL, se transfieren cuantitativamente 150 mL del filtrado, se adicionan 150 mL de la solución 0.03% de H₂SO₄ y 10 mL de cloroformo, se agita el embudo vigorosamente durante aproximadamente 2 min y se dejan separar las capas; se transfiere la capa inferior de cloroformo (13 a 14 mL) a un embudo separador de 125 mL, se agregan 100 mL de la solución lavadora de KOH y KC₁, se agita

suavemente durante 30 s y se dejan separar las capas; la solución clorofórmica servirá para la determinación cromatográfica tanto cualitativa como cuantitativa.

7.4.4 Si se forma una emulsión, se drena la misma a la probeta graduada de 10 mL, con tapa de vidrio, se agrega aproximadamente 1 g de sulfato de sodio anhidro, se tapa la probeta, se agita durante 30 s y se dejan separar las capas (la fase clorofórmica no requiere estar completamente clara); si no se rompe la emulsión, se la debe transferir a un embudo separador de 125 mL y lavarla con 50 mL de la solución 0.03% de H₂SO₄. Se colectan 3 mL de la capa clorofórmica en una probeta graduada de 10 mL, con tapa de vidrio esmerilado.

7.5 Cromatografía cualitativa. Con cada extracto purificado, se procede por aparte en la forma siguiente:

7.5.1 Empleando la jeringa de 5 mL, se transfieren a la minicolumna 2 mL de la solución de cloroformo y se deja drenar por gravedad (15 a 30 min); para acelerar la elución puede colocarse la pera de hule en el extremo superior de la minicolumna puesta en posición vertical y aplicar una leve presión de aire para forzar el solvente a través de la columna a una velocidad lineal no mayor de 10 cm/min, hasta que el solvente aparezca en el extremo inferior de la minicolumna.

7.5.2 Se deja la minicolumna en reposo para que el solvente drene por gravedad; se remueve la pera de hule, si fue usada, y cuando el solvente alcance el extremo superior del adsorbente se agregan 3 mL de la mezcla solvente de elución (9 + 1) de cloroformo y acetona. Se deja drenar por gravedad hasta que el solvente nuevamente alcance el extremo superior del adsorbente.

Nota. Todo el tiempo las mini columnas deben permanecer totalmente húmedas durante esta operación ya que puede haber pérdida de las aflatoxinas.

7.5.3 Se examinan las columnas en una pieza oscura bajo la lámpara de luz ultravioleta o en la cabina Chromato-vue, empleando los lentes protectores para luz ultravioleta; la presencia de una banda fluorescente azul en el extremo superior de la capa de florisil (aproximadamente a 2.5 cm desde el fondo de la columna) es indicativa de aflatoxinas.

7.5.4 Algunas muestras no contaminadas muestran bandas tenues de fluorescencia blanca, amarilla o parda en el extremo superior de la capa de florisil de la columna con la muestra; si la banda no tiene un tinte azulado definido, la muestra debe considerarse negativa para la presencia de aflatoxinas.

7.5.5 Paralelamente se prepara una columna en blanco, empleando cloroformo puro en lugar del extracto de la muestra y adicionalmente 4 columnas con soluciones estándares de aflatoxina B₁ equivalentes a 5, 10, 15 y 20 ug/kg respectivamente, para usar como patrones de comparación. Las columnas con estándares pueden guardarse secas, protegidas de la luz, en un congelador; en estas condiciones se mantienen estables por 2 meses

7.6 Cromatografía cuantitativa. Si al realizar la cromatografía cualitativa (véase el numeral 7.5) la muestra dio reacción positiva para aflatoxinas, se procede a la determinación cuantitativa de las mismas, en la forma siguiente:

7.6.1 Se transfieren a una probeta de 10 mL, 4 mL de la primera extracción clorofórmica, lavada con la solución de KOH y KCl, contenida en el embudo separador de 125 mL (véase los numerales 7.4.3 y 7.4.4) y se descartan los extractos de cloroformo remanentes contenidos en los embudos separadores; al embudo separador de 500 mL que contiene el extracto de acetona-agua, se le agregan 10 mL de cloroformo y se repiten los pasos de extracción clorofórmica indicados en los numerales 7.4.3 y 7.4.4 según corresponda.

7.6.2 Se combinan 4 mL del segundo extracto clorofórmico lavado con KOH y KCl, con los 4 mL de la primera extracción contenidos en la probeta de 10 mL y se transfieren a un embudo separador de 125 mL; se agregan a la mezcla de extractos 50 mL de la solución 0.03% de H₂SO₄ y se agita suavemente durante aproximadamente 30 s.

7.6.3 Se colectan 6 mL de la capa clorofórmica en el vial de 10 mL y se evapora, justo hasta sequedad, en el baño de agua regulado a 40°C bajo una corriente suave de nitrógeno; se agregan al vial con el residuo, la

cantidad de la mezcla (98 + 2) de benzeno-acetonitrilo indicada en los numerales 7.6.3.1 ó 7.6.3.2, según sea el caso, tomando como referencia para seleccionar tal cantidad, la concentración aproximada de aflatoxinas estimada por medio de la intensidad de la banda observada en la minicolumna al realizar la prueba cualitativa.

7.6.3.1 Si la muestra contiene 50 ó más microgramos de aflatoxinas totales por kilogramo de muestra, se agregan al vial 250 uL de la mezcla (98 + 2) de benzeno-acetonitrilo.

7.6.3.2 Si la muestra contiene menos de 50 ug/kg, se agregan al vial solamente 100 uL de la mezcla solvente.

7.6.4 Se disuelve el residuo en el vial mediante agitación vigorosa del mismo durante 1 min o más y con la solución obtenida se lleva a cabo la cuantificación de las aflatoxinas por cromatografía siguiendo el procedimiento descrito en los numerales 7.6.4.1 a 7.6.4.4 ó alternativamente, el procedimiento descrito en el numeral 7.7; si se requiere más extracto clorofórmico para realizar la determinación cuantitativa, se debe emplear filtración al vacío durante la etapa de purificación (véase el numeral 7.4.2) y se colectan 200 mL de filtrado. Se combina dicho filtrado con 200 mL de la solución 0.03% de H₂SO₄ en un embudo separador de 500 mL y se extrae con dos porciones, de 13 mL cada una, de cloroformo; los otros parámetros del método permanecen inalterables.

7.6.4.1 Preparación de las placas. Las placas cromatográficas se preparan como se indica en el numeral 6.2.1.1 de la presente norma, para formar una capa de 250 um de espesor.

7.6.4.2 Solución estándar de referencia, de resolución y soluciones patrones. Se emplean las soluciones indicadas en los numerales 6.2.1.2 (d), y 6.4 de la presente norma.

7.6.4.3 Procedimiento.

a) Siguiendo un procedimiento similar al descrito en el numeral 6.2.1.3, se aplican a la placa, sucesivamente, 3.5 uL, 5.0 uL y dos porciones de 6.5 uL del extracto de la muestra; todas las aplicaciones deben ser de aproximadamente igual tamaño y no mayores de 0.5 cm de diámetro. Sobre la misma placa, se aplican 3.5; 5.0 y 6.5 ul de las soluciones patrones de trabajo (véase el numeral 6.4) correspondientes a las aflatoxinas observadas en la minicolumna (véase el numeral 7.5.3).

b) Adicionalmente, se aplican sobre uno de los dos puntos de 6.5 ul de la muestra, 5 ul de cada estándar usado o una mezcla de las 4 aflatoxinas; dichos estándares servirán como estándares internos.

c) También se debe aplicar a cada placa, por lo menos un punto de 5 ul de la solución estándar de referencia, de resolución (véase el numeral 6.2.1.2 (d), para determinar si se ha logrado una adecuada resolución.

7.6.4.4 Interpretación del cromatograma. El cromatograma debe evidenciar 4 manchas claramente definidas en el caso de la solución estándar de referencia, de resolución.

a) Se examina la mancha desarrollada para la aplicación que corresponde a la muestra con estándar interno; los valores R_f de las aflatoxinas usadas como estándares internos deben ser iguales o sólo levemente diferentes de las manchas obtenidas con las soluciones patrones de trabajo respectivas.

Nota. Ya que las manchas desarrolladas por la muestra son comparadas directamente con las de los estándares de aflatoxinas sobre una misma placa, la magnitud de los R_f no es importante; éstos pueden variar de placa a placa.

b) Se comparan las manchas de la muestra con la de la muestra que contiene estándar interno; las manchas fluorescentes de la muestra para ser consideradas como aflatoxinas, deben tener valores R_f idénticos a las de los estándares y de un color similar a los mismos, cuando se aplica una muestra no conocida conjuntamente con estándares internos. Las manchas de la muestra combinada con el estándar interno, deberían ser más intensas que las manchas desarrolladas separadamente ya sea por la muestra o por el estándar.

c) Se compara la intensidad de fluorescencia de las manchas correspondientes a la aflatoxina B1 de la muestra con aquellas de las soluciones patrón de trabajo y se determina cuál porción de la muestra tiene una intensidad semejante a la de uno de los estándares. Para facilitar la determinación, se mueve la placa alejándola de la lámpara para atenuar la luz ultravioleta de manera que cualquier par particular de manchas pueda ser comparado en el momento de su extinción.

d) Si la intensidad de la muestra está comprendida entre las de dos estándares, se deben interpolar los valores; si las manchas de la porción más pequeña de muestra (3.5 ul) son demasiado intensas al compararlas con los estándares, se debe diluir la muestra y volver a realizar la cromatografía.

e) Siguiendo el mismo procedimiento indicado anteriormente, se examinan y comparan las manchas desarrolladas por las aflatoxinas B2, G1 y G2, según corresponda. Para la expresión de los resultados, véase el numeral 8.1.1.

7.7 Análisis alternativo empleando densitómetro.

7.7.1 Sobre la placa se aplican las alícuotas de la muestra que se sugieren en el cuadro 4, colocando al lado aplicaciones en duplicado de alícuotas del estándar mezclado de aflatoxinas, de manera que cada punto tenga 5 ng de aflatoxinas B1 y G1, y 1 ng de aflatoxinas B2 y G2; también se preparan por dilución alícuotas separadas de la muestra para dar concentraciones similares a las antes indicadas para las aflatoxinas B2, G1 y G2 y se aplican separadamente.

(Véase el cuadro 4 en página 13/18)

Cuadro 4. Alícuotas para análisis con densitómetro.

Contenido aproximado de aflatoxina B1, en $\mu\text{g}/\text{kg}$	Dilución del extracto, en mililitros	Alícuota sobre la placa, en micro-litros
0 - 10	0.25	10 ? 10
10 - 25	0.25	5 - 5
25 - 50	0.50	6 - 6
50 - 75	1.00	6 - 6
75 - 125	1.00	5 - 5
125 - 150	1.50	5 - 5
150 - 175	2.00	6 - 6
175 - 200	2.50	6 - 6

7.7.2 Se colocan los puntos sobre una línea imaginaria a aproximadamente 4 cm del borde inferior de la placa y se desarrolla como se indica en el numeral 6.2.1.3 (b) de la presente norma. La capa de sílica gel no debe dañarse durante las aplicaciones, ya que si esto ocurre puede introducirse un error significativo; si se inspecciona visualmente la placa antes de emplear el densitómetro, se debe usar una fuente de luz ultravioleta de baja potencia en vatios y reducir al mínimo posible el tiempo de exposición.

7.7.3 Se examina la placa con el densitómetro siguiendo las instrucciones de operación del fabricante del mismo; se irradia con una fuente de 365 nm y se observa la emisión comprendida entre 420 y 460 nm.

7.8 Prueba de confirmación de Przybylski. Si la prueba cualitativa en la minicolumna y la cromatografía cuantitativa, fueron positivas para aflatoxinas, se lleva a cabo la prueba de confirmación para aflatoxinas B1 y G1 que se indica a continuación:

7.8.1 Sobre una placa cromatográfica con sílica gel recién preparada se marca una línea vertical de 1 mm que divida la misma en dos partes iguales, a continuación se aplican en una de las mitades 3 alícuotas de 10 μL cada una, de la solución de la muestra; sobre uno de los puntos con la muestra, se aplica igual cantidad de

cada una de las soluciones patrones de trabajo de aflatoxinas B1 y G1. En otro punto de la placa se aplican 10 uL de cada una de dichas soluciones patrones de trabajo.

7.8.2 Sobre cada punto de la placa y empleando la micropipeta capilar, se aplican 2 uL de la mezcla (1 + 1) de ácido trifluoroacético y benceno o cloroformo (véase nota); se dejan reaccionar durante 5 min. Para comparación, se repite el procedimiento en la otra mitad de la placa (adicionando estándares de aflatoxinas B2 y G2) pero sin agregar sobre los puntos la mezcla de ácido TFA.

Nota. Antes de aplicar la mezcla de ácido TFA sobre la primera mitad de la placa de vidrio, se debe proteger la segunda mitad de la misma con un trozo de cartulina o cartón.

7.8.3 Se seca la placa soplando sobre la misma aire caliente durante aproximadamente 10 min, teniendo la precaución de no permitir que el aire que llega a la placa tenga una temperatura mayor de 40°C; también puede emplearse una corriente de nitrógeno, en cuyo caso el tiempo de secado debe ser de 20 min.

7.8.4 Se desarrolla la placa empleando cualquier método apropiado. Dependiendo del alimento que se está analizando, son satisfactorios 1 ó más de los solventes indicados en el cuadro 5.

Cuadro 5. Solventes para el desarrollo de las placas.

Alimento	Solvente
Maní y sus productos; nueces de Brazil; nueces de pistacho; cebada y maíz.	Mezcla de cloroformo y acetona en proporciones comprendidas entre (90 + 10) y (80 + 20).
Maní tostado y alimentos mezclados para animales.	Mezcla (46 + 35 + 19) de benceno, alcohol etílico y agua.
Maní y sus productos; productos de semilla de algodón; nueces de nogal y cebada.	Mezcla (96 + 3 + 1) de acetato de etilo, alcohol etílico y agua.

7.8.4.1 Solventes opcionales. Los siguientes solventes para el desarrollo de placas, pueden ser usados opcionalmente, después de ser probados por el laboratorio respectivo.

- a) Mezcla (9+1) de benceno y ácido acético.
- b) Mezcla (90+5+5) de benceno, metanol y ácido acético.
- c) Mezcla (96+3+1) de éter, metanol y agua.
- d) Mezcla (88+12+1.5) de cloroformo, acetona y agua.
- e) Mezcla (99+1) de cloroformo e isopropanol.

7.8.5 Se remueve la placa del tanque desarrollador y se seca al aire en un ambiente oscuro; se examina la placa bajo luz ultravioleta de onda larga. El examen debe mostrar manchas fluorescentes azules en el caso del derivado de la aflatoxina B1 a un Rf aproximado de 0.18 a 0.3, y manchas fluorescentes verdes para el derivado de la aflatoxina G1 a un Rf aproximado de 0.15 a 0.25, dependiendo del solvente usado.

Nota. En general, la separación de 2 manchas es de aproximadamente 1 cm.

7.8.6 El ácido TFA reacciona completamente con las aflatoxinas B1 y G1 pero sin afectar a las aflatoxinas B2 y G2; la formación de derivados en la muestra al mismo valor Rf correspondiente al estándar, confirma la presencia de aflatoxinas B1 y G1 en la muestra,

Nota. El cromatograma debe también ser examinado bajo luz ultravioleta de onda corta; esto a menudo permite descubrir manchas falsas en el área de las aflatoxinas G1 - G2, que pueden tener intensidad fluorescente incrementada bajo luz ultravioleta de onda corta.

7.8.7 Se aplica a la placa por aspersion la solución acuosa al 25% de ácido sulfúrico o de otro ácido inorgánico, con lo cual la fluorescencia de las 4 aflatoxinas y la de los derivados de las aflatoxinas B1 y G1, cambian de azul o verde a amarillo; este hecho permite una confirmación adicional de la presencia de aflatoxinas en la muestra.

8. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

8.1 Los resultados se expresan en microgramos de aflatoxinas por kilogramo de muestra y se calculan aplicando una de las siguientes fórmulas, según corresponda.

8.1.1 Cálculo para análisis visual.

a) Se calcula la concentración de cada una de las aflatoxinas (B1, B2, G1 ó G2) según sea el caso aplicando la fórmula siguiente:

$$Af = (V \times C \times V1) / (V2 \times M)$$

En la que:

Af = Contenido de aflatoxina, en microgramos por kilogramo de muestra.

V = Volumen aplicado de la solución patrón de trabajo de aflatoxina, que mostró igual intensidad que la muestra, en microlitros.

C = Concentración de la solución patrón de trabajo de aflatoxina, en ug/mL; es decir, concentración de los V microlitros usados.

V1 = Volumen de la dilución final del extracto de la muestra, en microlitros V2 .

M = Masa de la muestra, correspondiente para la determinación cuantitativa, en gramos (3.9 g si se aplicó el procedimiento descrito sin filtración al vacío y 4.0g si se procedió con filtración al vacío como se indica en el numeral 7.6.4 de la presente norma).

8.1.2 Cálculo para análisis con densitómetro.

a) Se calcula la concentración de cada una de las aflatoxinas (B1, B2, G1 ó G2) según sea el caso aplicando la fórmula siguiente:

$$Af = (a \times C \times V \times V1) / (a1 \times V2 \times M)$$

En la que:

Af = Contenido de aflatoxina, en microgramos por kilogramo de muestra.

a = Área promedio de los picos de aflatoxina en las alícuotas de la muestra, en milímetros cuadrados.

C = Concentración de la solución patrón de trabajo, en microgramos por mililitro.

V = Volumen aplicado de la solución patrón de trabajo, en microlitros.

V1 = Volumen de la dilución final del extracto de la muestra, en microlitros.

a1 = Área promedio de los picos de las alícuotas de la solución patrón de trabajo, en milímetros cuadrados.

V2 = Volumen aplicado del extracto de la muestra, en microlitros.

M = Masa de la muestra, correspondiente para la determinación cuantitativa, en gramos (3.9 g si se aplicó el procedimiento descrito sin filtración al vacío y 4.0g si se procedió con filtración al vacío como se indica en el numeral 7.6.4 de la presente norma).

9. INFORME DEL ENSAYO O ANALISIS

En el informe del análisis debe indicarse como mínimo lo siguiente:

9.1 El método usado y el resultado obtenido en la determinación.

9.2 Cualquier condición no especificada en esta norma o señalada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en los resultados.

9.3 Todos los detalles necesarios que permitan la completa identificación de la muestra.

10. CORRESPONDENCIA

Para la elaboración de la presente norma se han tomado en cuenta los siguientes documentos:

a) Métodos 26.014 a 26.019, descritos en "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC", 14a. Edición, 1984;

b) "Journal of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC"; Vol. 58, No.1, 1975 (páginas 163 y 164) y No. 3, 1975 (páginas 500 a 506);

c) Norma colombiana ICONTEC 1232-75, Granos y Cereales. Determinación de las aflatoxinas;

d) Documento CX/CPL 90/8-Add. 1, mayo 1990, del Codex Alimentarius de la FAO/OMS, Planes de toma de muestras y niveles máximos para aflatoxinas en alimentos; y

e) Literatura técnica.

11. ANEXO

11.1 Precauciones. Siendo las aflatoxinas sustancias altamente tóxicas y carcinógenas a algunas especies animales y debido a que aún no son conocidos sus efectos en seres humanos, deberán tenerse las siguientes precauciones de seguridad durante su manejo:

11.1.1 Los analistas que trabajan con aflatoxinas purificadas deberán hacerlo con sus soluciones preferiblemente ya que las aflatoxinas secas son electrostáticas y pueden asociarse con partículas de polvo en el aire.

11.1.2 Las laminillas secas de aflatoxinas sobre vidrio no son completamente recuperables debido a adsorción; el contacto continuado con solventes puede resultar en una disolución lenta.

11.1.3 Cuando se manejan aflatoxinas secas y productos muy contaminados, deberán usarse máscaras respiratorias y guantes plásticos desechables (el personal que trabaja con masas de grano o producto altamente contaminado con hongos siempre deberá usar máscaras respiratorias, para evitar inhalación masiva de las esporas del hongo).

11.1.4 Las prendas de vestir y delantales así como la cristalería, deberán enjuagarse durante dos horas en solución blanqueadora (véase nota), a continuación se agrega acetona a la solución de hipoclorito en cantidad suficiente para formar una solución al 5% de acetona y se enjuagan perfectamente en tal solución.

Nota. Se debe emplear una solución de hipoclorito con una concentración de la sal comprendida entre 0.8 y 1.3% (0.38 a 0.8% de cloro).

Como las aflatoxinas se destruyen por álcalis, ácidos fuertes y agentes oxidantes, los procedimientos de limpieza, que incluyen el uso de tales reactivos, deberán efectuarse suficientemente para lograr la descontaminación.

11.1.5 Los adsorbentes contenidos en las placas del aparato cromatográfico deberán enjuagarse durante 10 min con la solución blanqueadora y luego rociarse con acetona al 5%, antes de removerse de las placas.

11.1.6 La totalidad de las superficies deberán ser humedecidas y el material adherido completamente disuelto. Si las manos se contaminan deberán lavarse inmediatamente con blanqueador y luego con jabón y agua. Si la piel es demasiado sensible al lavado con la solución de hipoclorito de sodio, se podrá usar borato de sodio con detergente.

11.1.7 Todos los manipuleos con aflatoxinas y/o sus soluciones deberán efectuarse, preferiblemente, en campanas de extracción. Se recomienda el lavado periódico del interior de las campanas con blanqueador; esto se hace al finalizar el trabajo diario y luego se deja durante la noche el equipo de extracción funcionando, con el propósito de evitar hipoclorito residual que pueda deteriorar los posteriores análisis de aflatoxinas.

11.1.8 Para transferir alícuotas con pipetas, deberá utilizarse pera de seguridad.

11.1.9 En el caso de derramarse, esparcirse o rebosarse soluciones, el área afectada deberá ser cubierta completamente con solución blanqueadora y luego con solución al 5% de acetona.. Si la superficie es tal que no puede ser humedecida efectivamente deberá cubrirse con toallas de papel y luego humedecer éstas con la solución blanqueadora y posteriormente con la solución de acetona; el tiempo de contacto deberá ser 30 segundos como mínimo. El área deberá ser verificada con una lámpara de luz ultravioleta (de onda larga) de alta intensidad y si es necesario, tratada nuevamente con blanqueador hasta que no presente fluorescencia.

11.1.10 Cuando se esté empleando luz ultravioleta deberán usarse gafas especiales.

11.1.11 Las áreas de trabajo deberán verificarse frecuentemente con la lámpara de luz ultravioleta para estar seguros de que no existe contaminación que ha pasado inadvertida o ha ocurrido accidentalmente.

11.1.12 Los cultivos de *Aspergillus* vivos deberán destruirse añadiendo una poca cantidad de cloroformo al recipiente, por ejemplo usando un Erlenmeyer Fernbacn, se coloca un tapón de algodón en la boca del frasco

y se calienta en un baño de vapor hasta que los vapores de cloroformo puedan verse condensados en el tapón (aproximadamente 10 a 15 min),

11.2 Factor de corrección del espectrofotómetro. El factor de corrección del espectrofotómetro se determina aplicando el siguiente procedimiento de calibración y cálculo.

11.2.1 Reactivos.

a) Solución aproximadamente 0.018 N de ácido sulfúrico. Se prepara diluyendo 1 mL del ácido sulfúrico concentrado (95 - 98%) en 2 L de agua destilada.

b) Soluciones estándares de dicromato de potasio.

- Solución aproximadamente 0.25 mM; se pesan con exactitud aproximadamente 78 mg de $K_2Cr_2O_7$ (estándar primario) y se disuelven en un litro de la solución 0.018 N de H_2SO_4 . Se calcula la molaridad con 3 cifras decimales, considerando que la masa molecular del dicromato de potasio es 294.2 g.

Solución aproximadamente 0.125 mM; en un matraz aforado de 50 mL se diluyen 25 mL de la solución 0.25 mM de $K_2Cr_2O_7$ 50 mL con la solución 0.018 N de H_2SO_4 .

Solución aproximadamente 0.0625 mM; en un matraz aforado de 50 mL se diluyen 25 mL de la solución 0.125 mM de $K_2Cr_2O_7$ 50 mL con la solución 0.018 N de H_2SO_4 .

11.2.2 Procedimiento.

a) Se determina la absorbencia de cada una de las 3 soluciones de dicromato de potasio (0.25; 0.125 y 0.0625 mM) a la máxima absorción cerca de 350 nm, contra la solución 0.018 N de H_2SO_4 como blanco.

b) Se calcula la absortividad molar (e) para cada concentración empleando la siguiente fórmula:

$e = (A \times 1000)/C$ En la que:

e = Absortividad molar

A = Absorbencia leída

C - Concentración de la solución en milimoles

Nota. Si los 3 valores varían en más de la exactitud garantizada para la escala de absorbencia, debe revisarse bien sea el procedimiento o el instrumento.

c) Se promedian los 3 valores calculados para obtener el valor e y se determina el factor de corrección (F) para cada instrumento y celdas particulares aplicando la siguiente fórmula:

$F = 3160/e$

En la que:

F = Factor de corrección del espectrofotómetro.

3160 - Valor de la e de las soluciones de dicromato estandarizado

- Valor promedio leído para en el espectrofotómetro y celdas que se están calibrando.

Nota 1. Si el factor de corrección es menor que 0.95 ó mayor que 1.05, se deben revisar el procedimiento, el instrumentos y las celdas, para determinar y eliminar la causa.

Nota 2. Se debe usar el mismo juego de celdas para la calibración y la determinación de la pureza.