

NOM-034-ZOO-1996

NORMA OFICIAL MEXICANA, DETERMINACION DE DIETILESTILBESTROL, ZERANOL Y TALERANOL EN HIGADO Y MUSCULO DE BOVINOS, EQUINOS, PORCINOS, OVINOS, AVES, CAPRINOS Y CERVIDOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES - ESPECTROMETRIA DE MASAS.

Al margen un sello con en el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, por conducto de la Dirección General Jurídica, con fundamento en los artículos 1o., 3o., 4o. fracción III, 12, 13, 16, 21, 22, 31 y 32 de la Ley Federal de Sanidad Animal; 38 fracción II, 40, 41, 43 y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 10 fracción V del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, y

CONSIDERANDO

Que la determinación de dietilestilbestrol, zeranol y taleranol, en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, aves, caprinos y cérvidos, se establece con el fin de asegurar que el suministro de alimentos a los consumidores no rebasen los límites máximos permisibles de este tipo de residuos.

Que el consumo de alimentos con residuos de dietilestilbestrol, zeranol y taleranol implica diversos riesgos para la salud.

Que entre los beneficios que reporta el determinar este tipo de residuos, se encuentra el de participar con mayor confianza en el comercio internacional de alimentos, contando de esta forma con las bases suficientes para certificar la inocuidad de los productos alimenticios cárnicos, tanto importados como exportados.

Que para alcanzar los objetivos señalados en los párrafos anteriores, con fecha 13 de septiembre de 1995, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-036-ZOO-1995, Determinación de dietilestilbestrol, zeranol y taleranol en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, aves, caprinos y cérvidos por cromatografía de gases- Espectrometría de masas.

Que en virtud de que dentro del término de 90 días a que se refiere la fracción I del artículo 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, no se presentaron comentarios al proyecto, las disposiciones del mismo han resultado procedentes en sus términos.

Que por todo lo anterior y con el objeto de mantener el orden cronológico a la clave de las normas en esta materia, he tenido a bien expedir la NOM-034-ZOO-1996, DETERMINACION DE DIETILESTILBESTROL, ZERANOL Y TALERANOL EN HIGADO Y MUSCULO DE BOVINOS, EQUINOS, PORCINOS, OVINOS, AVES, CAPRINOS Y CERVIDOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES - ESPECTROMETRIA DE MASAS.

INDICE

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
 2. REFERENCIAS
 3. DEFINICIONES
 4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
 5. FUNDAMENTO
 6. EQUIPO
 7. REACTIVOS, SOLUCIONES Y MATERIALES
 8. ESTANDARES
 9. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION
 10. PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACION
 11. RESULTADOS
 12. SANCIONES
 13. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
 14. BIBLIOGRAFIA
 15. DISPOSICIONES TRANSITORIAS
- APENDICE "A" (NORMATIVO)

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1. Objetivo

Esta Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto establecer el método de prueba para la detección y cuantificación de residuos de dietilestilbestrol, zeranol y taleranol, en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, aves, caprinos y cérvidos.

1.2. Campo de aplicación

Esta Norma se aplica a los laboratorios de análisis de residuos tóxicos en tejidos alimenticios primarios de origen animal, aprobados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

1.3. La vigilancia de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, así como a los gobiernos de los estados, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.

1.4. La aplicación de las disposiciones previstas en esta Norma compete a la Dirección General de Salud Animal, así como a las delegaciones estatales de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales.

2. Referencias

Para la correcta aplicación de esta Norma deben consultarse las siguientes normas oficiales mexicanas:

- NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria, publicada el 28 de abril de 1994.
- NOM-004-ZOO-1994, Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos, publicada el 11 de agosto de 1994.
- NOM-008-SCFI-1993, Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida, publicada el 14 de octubre de 1993.

3. Definiciones

Para efectos de esta Norma se entiende por:

3.1. Coeficiente de correlación: Es la relación nominal, teórica o de una unidad evidente entre una variable y otra que hace mínima a la suma de los cuadrados de las desviaciones de la primera con respecto a su proporcionalidad con la segunda.

Con proporcionalidad exacta, el coeficiente es 1, si no existe ninguna relación es cero. La proporcionalidad inversa completa proporciona un valor de -1.

3.2. Cromatografía de gases: Es una técnica analítica que permite la separación física de dos o más compuestos, basada en la diferente distribución en dos fases, una de las cuales es estacionaria sólida o líquida y la otra móvil en fase gaseosa.

3.3. Espectrometría de masas: Es una técnica analítica que, mediante alto vacío, permite la fragmentación de una muestra en fase vapor, así como la separación y detección de los iones formados de acuerdo con su masa y su carga.

3.4. Estándar interno: Es el compuesto que tiene una estructura química similar a la del compuesto a analizar, que se adiciona al juego de muestras problema y se somete al proceso de extracción normal, para efectos de cuantificación.

3.5. Muestra fortificada: Es un tejido blanco que ha sido adicionado de una concentración conocida del analito.

3.6. Recuperación (R): Es el porcentaje del elemento o compuesto de interés (analito) obtenido en la muestra fortificada, calculado en función de la cantidad real adicionada (CA) y la concentración real determinada (CR).

$$R = \frac{CR \times 100}{CA}$$

3.7. Tejido blanco: Es una muestra de tejido previamente analizada que no contiene al analito.

3.8. Tiempo de retención: Es el tiempo total desde la inyección de la muestra a la columna hasta el punto máximo del pico de interés.

3.9. Tiempo de retención corregido: Es el tiempo de retención absoluto menos el tiempo del pico no retenido.

$$tr = tr - to$$

to = Tiempo del pico no retenido

4. Símbolos y abreviaturas

amu	unidades de masa atómica (por sus siglas en inglés)
CG	cromatografía de gases
DES	dietilestilbestrol
DES MG	dietilestilbestrol monoglucurónido
D8 DES	dietil-1,1,1',1'-d4-estilbestrol-3,3',5,5',-d4
EM	espectrometría de masas
eV	electrón volt
g	gramo
GR	grado reactivo
m	metro
M	molar
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
N	normal
ng	nanogramos
PFTBA	perfluorotributilamina
ppm	partes por millón
ppb	partes por billón
rpm	revoluciones por minuto
TMSI	trimetilsililimidazol
v/v	volumen a volumen
µm	micrómetros
µg	microgramos
µl	microlitros
°C	grados Celsius o centígrados
%	por ciento

5. Fundamento

Este procedimiento emplea una extracción con solventes de tres fases a partir de hígado, usando una solución reguladora acuosa, acetonitrilo, diclorometano y hexano para remover efectivamente la mayoría de los triglicéridos y materiales altamente no polares, previo a la limpieza por columna. Este paso previene la sobresaturación de la columna, lo que reduciría las recuperaciones y simultáneamente fracciona los compuestos en tres clases de polaridad. Para extraer el DES, ZERANOL y TALERANOL, se usa un cartucho de extracción que contiene una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, con grupos amino cuaternarios en la forma de cloruro. El anión fenolato de estos compuestos tiene una gran afinidad por el cloruro de la resina a valores de pH arriba de 12.0. El extracto del tejido contenido en acetonitrilo, se concentra, se alcaliniza y el analito es intercambiado a la resina. Se realizan varios lavados con solvente, para remover las sustancias que interfieren. Un lavado con ácido acético acuoso al 5% permite la elución de una gran cantidad de materiales aniónicos interferentes previamente intercambiados a la resina. Posteriormente la columna se eluye con metanol acuoso al 25% para eliminar el ácido acético residual y el material remanente, antes de la elución final con metanol.

6. Equipo

6.1. Aparatos

- Agitador mecánico horizontal
- Agitador vórtex
- Procesador de muestras automático
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Centrífuga de 5000 rpm con rotor de 12 ángulos
- Evaporador de nitrógeno
- Homogeneizador de tejidos eléctrico con motor 1810, flecha y generador y control de velocidad de alto torque
- Incubadora capaz de regular la temperatura a 37°C
- Block de calentamiento en seco para reacciones térmicas con bloques ordenados

- Picadora de alimentos
- Potenciómetro con precisión de ± 0.1 unidades de pH

6.2. Instrumentos

6.2.1. CG-EM. Cromatógrafo de gases con inyector capilar, acoplado a un detector selectivo de masas con ionización por impacto de electrones.

7. Reactivos, soluciones y materiales

7.1. Reactivos

- Acetato de etilo, grado HPLC o cromatográfico
- Acetonitrilo, grado HPLC o cromatográfico
- Acido acético glacial, ASP
- Agentes derivatizantes:
Bis-trimetilsilil trifluoroacetamida (BSTFA)
Trimetilsililimidazol (TMSI)
- Agua, grado HPLC
- Alcohol isopropílico, grado HPLC
- Beta - Glucuronidasa tipo HP-2S, con actividad aproximada de 100,000 unidades/ml
- Diclorometano, grado HPLC
- Hidróxido de sodio en lentejas, GR
- Hexano, grado HPLC
- Metanol, grado HPLC

7.2. Soluciones

- Acido acético acuoso al 5%. - Diluir 5 ml de ácido acético glacial a 100 ml con agua grado HPLC.
- Hidróxido de sodio 2 N.- Pesar 80 g de hidróxido de sodio, disolver y diluir a 1000 ml con agua destilada desionizada.
- Metanol al 25%. - Mezclar 25 ml de metanol HPLC con 75 ml de agua grado HPLC.
- Solución de isopropanol:metanol 1:1.- Medir por separado 100 ml de cada uno de los solventes, grado HPLC y mezclar.
- Solución reguladora de acetato de sodio 0.04 M.- Pesar 5.44g de acetato de sodio, disolver y diluir a 1000 ml con agua destilada desionizada.

7.3. Materiales

- Cartuchos de intercambio aniónico tipo AS.
- Cronómetro.
- Cuchillo o bisturí.
- Helio grado ultra alta pureza.
- Matraces volumétricos de 1000 ml clase A.
- Matraces volumétricos de bajo actinio de 100 ml tipo A.
- Microjeringas de 5, 100 y 200 μ l.
- Micropipetas de 100 μ l y 200 μ l.
- Nitrógeno grado cromatográfico.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 ml clase A.
- Pipetas Pasteur con punta corta.
- Pipetas volumétricas de 1, 2 y 4 ml.
- Propipetas.
- Repipeteador.
- Tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml con tapón de rosca.
- Tubos de centrifuga de vidrio de 50 ml con tapón esmerilado.
- Viales de centelleo de 20 ml.
- Viales de fondo estrecho de 1 ml para automuestreador.

8. Estándares

Los estándares de referencia usados deben ser certificados:

- DES de 98% de pureza mínima.
- D8 DES. Estándar interno de DES (dietil-1,1,1',1'-d4-estilbestrol-3,3',5,5',-d4).

- Zeranol y Taleranol no son comercialmente disponibles.
- Zearalane no es comercialmente disponible.
- DES-MG. Dietilestilbestrol monoglucurónido. La presentación comercial es de ampollitas conteniendo el equivalente de 1 mg de DES libre por ampollita.

8.1. Soluciones patrón

En matraces volumétricos separados de 100 ml de bajo actinio, pesar 10 mg de DES y D8 DES; disolver y diluir al volumen con metanol. La concentración será de 100 µg/ml.

Disuelva el contenido de la ampollita de DES-MG con volúmenes menores a 1 ml de metanol y vacíe en un matraz volumétrico de 100 ml de bajo actinio, diluir a volumen con metanol. La concentración será equivalente a 10 µg/ml de DES libre.

Solución patrón de zeranol.- Pesar 20 mg de zeranol en un matraz volumétrico de 100 ml. Diluir a volumen con metanol. La concentración es de 200 µg/ml.

Solución patrón de taleranol.- Pesar 20 mg de taleranol en un matraz volumétrico de 100 ml. Diluir a volumen con metanol. La concentración es de 200 µg/ml.

Solución estándar interno de zearalane.- Pesar 20 mg de zearalane en un matraz volumétrico de 100 ml. Diluir a volumen con metanol. La concentración es de 200 µg/ml.

8.2. Soluciones de trabajo

En matraces volumétricos separados de 100 ml de bajo actinio, colocar 100 µl de las soluciones patrón de DES y D8 DES; diluir al volumen con metanol. La concentración es de 0.10 ng/ml.

Colocar 1 ml de solución patrón de DES-MG en un matraz volumétrico de 100 ml de bajo actinio, diluir al volumen con metanol. La concentración es equivalente a 0.10 ng/ml de DES libre.

Solución de trabajo de zeranol.- Colocar 100 µl de la solución patrón de zeranol en un matraz volumétrico de 100 ml y diluir a volumen con metanol. La concentración es de 0.2 ng/µl.

Solución de trabajo de taleranol.- Colocar 200 µl de la solución patrón de taleranol en un matraz volumétrico de 100 ml y diluir a volumen con metanol. La concentración es de 0.4 ng/µl.

Solución de trabajo de zearalane.- Colocar 100 µl de la solución patrón de zearalane en un matraz volumétrico de 100 ml y diluir a volumen con metanol. La concentración es de 0.2 ng/µl.

Dejar equilibrar los estándares a temperatura ambiente antes de usar.

Todos los estándares deben conservarse a 0°C o menos. Las soluciones patrón tienen una vida de anaquel de un año y las soluciones de trabajo de seis meses.

9. Procedimiento de extracción

9.1. Preparación de las muestras

Los tejidos deben conservarse en congelación hasta su ensayo.

9.1.1. Con el cuchillo o el bisturí, quitar la grasa del músculo y el tejido conectivo del hígado. Moler y homogeneizar los tejidos.

9.2. Extracción

9.2.1. Pesar 5.0 ± 0.1 g de tejido de hígado o músculo homogeneizado en un tubo de centrífuga de polipropileno de 50 ml.

9.2.2. Fortificar cada muestra y la muestra control con 50 µl de zearalane a una concentración de 0.2 ng/µl y 50 µl del estándar interno D8 DES a una concentración de 0.1 ng/µl para tener aproximadamente 2.0 ppb de zearalane y 1.0 ppb de D8-DES.

9.2.3. Para el análisis de regresión lineal, fortificar cuatro muestras de tejido blanco con zeranol, taleranol y DES-MG a una concentración de 0.2 ng/µl, 0.4 ng/µl y 0.1 ng/µl, de la siguiente manera:

Concentración			µl de la solución a adicionar	
DES	ZERANOL	TALERANOL		
0.00 ppb	0.00 ppb	0 ppb	0.0	µl
0.50 ppb	1.00 ppb	2 ppb	25.0	µl
1.00 ppb	2.00 ppb	4 ppb	50.0	µl
2.00 ppb	4.00 ppb	8 ppb	100.0	µl

Si se sospecha la presencia de DES a una concentración entre 0.25 y 0.5 ppb, fortificar a un nivel inferior.

9.2.4. Con el repipeteador adicionar 11 ml de solución reguladora de acetato de sodio 0.04 M.

9.2.5. Homogeneizar con el homogeneizador de muestras por 1 min.

9.2.6. Ajustar el pH a 4.25-4.75 con ácido acético glacial, usando una pipeta Pasteur, agitar en vórtex y verificar el pH, generalmente se requieren de 5 a 8 gotas.

9.2.7. Adicionar 100 µl de la beta-glucuronidasa a cada muestra, que equivalen a 10,000 unidades aproximadamente. Tapar el tubo y agitar en vórtex, por 10 s.

9.2.8. Incubar toda la noche (de 16 a 18 horas) a 37°C.

9.2.9. Después de la incubación, agregar 16 ml de acetonitrilo a cada tubo, usando repipeteador y agitar moderadamente por 5 min en el agitador mecánico horizontal o manualmente.

9.2.10. Centrifugar las muestras a una fuerza G mínima de 2450 por 5 min, calculándola de acuerdo a la siguiente fórmula:

Fuerza G = (1.18×10^{-4}) (radio de rotación en cm)(rpm)

Radio de rotación es la distancia del centro de la flecha al extremo interno.

9.2.11. Decantar el sobrenadante en un tubo de centrifuga de vidrio de 50 ml con tapón esmerilado. Si llegase a arrastrar una pequeña cantidad de residuos flotantes durante este paso, éstos no interferirán con la prueba.

9.2.12. Adicionar 2 ml de diclorometano y 8 ml de hexano al sobrenadante.

9.2.13. Agitar moderadamente en forma manual por 1 min.

9.2.14. Centrifugar a una fuerza G mínima de 1060 por 2 min.

9.2.15. Transferir la capa media de acetonitrilo a un vial de centelleo limpio de 20 ml, usando una pipeta graduada de 10 ml, cuidando de no remover ninguna de las otras capas.

9.2.16. Con el repipeteador adicionar 4 ml de acetonitrilo a las dos capas que quedaron en el tubo de centrifuga de 50 ml.

9.2.17. Agitar moderadamente en forma manual por 1 min.

9.2.18. Centrifugar a una fuerza G mínima de 1060 por 2 min.

9.2.19. Repetir el paso 9.2.15. Transferir el acetonitrilo al mismo vial de centelleo de 20 ml.

El análisis puede detenerse en este punto durante una hora a temperatura ambiente.

9.2.20. Evaporar el acetonitrilo a sequedad, utilizando una corriente de nitrógeno y el módulo de calentamiento en seco a una temperatura de 60°C.

Todo el acetonitrilo debe ser evaporado. Esto toma de 45 a 60 min.

9.2.21. Adicionar 2 ml de una solución de isopropanol:metanol, 1:1 y disolver el residuo. Dejar reposar 5 min y agitar en vórtex hasta disolución.

9.2.22. Adicionar 1.5 ml de solución de hidróxido de sodio 2 N y agitar en vórtex de 5 a 10 s.

Nota: A partir de este punto inicia la limpieza por columna en el procesador de muestras automático, de la manera siguiente:

9.3. Extracción en procesador de muestras automático.

9.3.1. Construir el programa en la computadora del procesador automático, como se indica en el Apéndice "A" (Normativo).

9.3.2. Separar los cartuchos tipo AS de las copas de desecho y la tapa, decantar el líquido que está sobre la cama de la resina de intercambio aniónico. Colocar los cartuchos de extracción en el anillo interno del rotor, colocar las copas de desecho y las de recuperación de las muestras en el anillo exterior del rotor.

9.3.3. Colocar los siguientes solventes de lavado en los diferentes reservorios, respectivamente.

Reservorio No. 1. Colocar 18 ml de agua destilada grado HPLC. Esto equivale a 1.4 ml por cartucho.

Reservorio No. 2. Colocar 33 ml de ácido acético acuoso al 5%. Esto equivale a 2.75 ml por cartucho.

Reservorio No. 3. Colocar 22 ml de metanol acuoso al 25%. Esto equivale a 1.75 ml por cartucho.

Reservorio No. 4. Colocar 36 ml de metanol al 100%. Esto equivale a 3 ml por cartucho.

9.3.4. Adicionar la solución de la muestra sobre la cama del cartucho. Enjuagar los viales con 1 ml de metanol:isopropanol y adicionar al cartucho.

9.3.5. Cerrar la tapa del procesador, iniciar el programa. Después de centrifugar los primeros 4 min espere a que pare el rotor y vacíe las copas de desecho.

9.3.6. Adicionar 4 ml de metanol a cada cartucho, con la ayuda de un repipeteador, cerrar la tapa del procesador y continuar con el programa. Después de centrifugar dos minutos, esperar a que el rotor se detenga.

9.3.7. Vaciar las copas de desecho, cerrar la tapa del procesador y continuar con el programa.

9.3.8. Después de terminar el programa, retirar las copas de recuperación y transferir el eluato de metanol (0.1-0.5 ml) con micropipeta o pipeta Pasteur a un vial cónico de 1 ml. Si el volumen de alguna de las muestras de 0.5 ml evaporar parcialmente en seco a 60°C, haciendo pasar una corriente suave de nitrógeno hasta alcanzar el volumen mencionado.

9.3.9. Enjuague la copa de recuperación con 0.2 ml de metanol y transfiera el enjuague al mismo vial de la muestra.

9.3.10. Evaporar las muestras justo a sequedad, pasando una corriente suave de nitrógeno en el módulo de calentamiento en seco a una temperatura de 60°C.

9.3.11. La muestra está lista para analizarse por CG/EM.

Los extractos pueden analizarse dentro de los 2 días siguientes, siempre y cuando se conserven en congelación a 0°C o menos.

9.4. Resumen del método

El método anteriormente descrito se resume de la siguiente manera:

Pesar 5.0 ± 0.1 g de muestra en un tubo de centrífuga de polipropileno.

Fortificar esta muestra y la de control, con 50 μ l del estándar interno.

Para la curva de calibración, fortificar 4 muestras de tejido blanco con 0.0, 25.0, 50.0 y 100 μ l de la solución de trabajo de DES-MG.

Agregar 11 ml de la solución reguladora de acetato de sodio y agitar en vórtex por 1 min.

Ajustar el pH de 4.25 a 4.75 con ácido acético glacial y agitar en vórtex.

Agregar 100 μ l de la beta-glucoronidasa a cada muestra, mezclar en vórtex e incubar toda la noche a 37°C.

Adicionar 16 ml de acetonitrilo y agitar mecánicamente por 5 min.

Centrifugar a una fuerza G mínima de 2450 por 5 min.

Decantar el sobrenadante en un tubo de centrífuga de vidrio de 50 ml, con tapón esmerilado.

Agregar 2 ml de diclorometano y 8 ml de hexano al sobrenadante; agitar manualmente por 1 min.

Centrifugar a una fuerza G mínima de 1060 por 2 min.

Transferir la capa de acetonitrilo a un vial de centelleo de 20 ml.

Adicionar otros 4 ml de acetonitrilo a las dos capas que quedaron en el tubo de centrifuga; agitar manualmente por 1 min.

Centrifugar a una fuerza G mínima de 1060 por 2 min.

Transferir la capa de acetonitrilo al mismo vial de centelleo de 20 ml.

En este punto puede detenerse el análisis durante una hora, conservando las muestras a temperatura ambiente.

Evaporar el acetonitrilo a sequedad a 60°C, lo cual toma de 45 a 60 min.

Adicionar 2 ml de isopropanol:metanol 1:1 y disolver el residuo; reposar 5 min.

Adicionar 1.5 ml de hidróxido de sodio 2 N y agitar en vórtex de 5 a 10 s.

Preparar los cartuchos, eliminando el líquido por decantación.

Cargar las muestras en la cama del cartucho; enjuagar los viales con 1 ml de isopropanol:metanol 1:1 y agregarlo a los cartuchos.

Use el programa del procesador automático de muestras.

Agregar 4 ml de metanol a cada cartucho y repetir el paso anterior.

Continuar con el programa del procesador automático de muestras.

Al terminar el programa retire las copas de recuperación del procesador automático de muestras, transferir el eluato de metanol a un vial de automuestreador de 1 ml; enjuagar las copas de recuperación con 0.2 ml de metanol y adicionarlo al vial.

Evaporar las muestras justo a sequedad, con una corriente suave de nitrógeno, con calor seco a 60°C.

Los extractos pueden conservarse en el congelador a 0°C y analizarse dentro de los dos días siguientes.

Analizar por CG/EM.

10. Procedimiento de cuantificación

Las siguientes condiciones se dan como un ejemplo solamente; el analista debe optimizar los parámetros para el instrumento que esté utilizando.

10.1. Para cromatógrafo de gases:

10.1.1. Columna:

Capilar de 15 m de longitud,
0.25 mm de diámetro interno,
100% metil silicona, con un
espesor de película de 0.25 µm.

- 10.1.2. Gas acarreador: Helio ultra alta pureza.
- 10.1.3. Velocidad lineal del gas acarreador: 30 cm/s.
- 10.1.4. Temperatura del inyector: 260°C mínimo.
- 10.1.5. Modo de operación del inyector: Sin división de flujo.
- 10.1.6. Temperatura de la línea de transferencia: 260°C.
- 10.1.7. Programación de temperatura: Iniciar en 130°C durante un minuto, incrementar a una velocidad de 20°C/min hasta 230°C y cambiar la velocidad a 5°C/min hasta 295°C por 5 min.

10.2. Para espectrómetro de masas:

- 10.2.1. Modo de ionización: Por impacto de electrones.
- 10.2.2. Rango de masa: De 350 a 550.
- 10.2.3. Amplitud de barrido: 0.2 s/barrido.
- 10.2.4. Tiempo de adquisición: 15 min.
- 10.2.5. Tiempo de retardo: 5 min.
- 10.2.6. Estándar de calibración: PFTBA.
- 10.2.7. Voltaje del 11: 70 eV.
- 10.2.8. Calibración: Automática.

10.3. Determinación.

- Reconstituir el residuo seco con 10 µl de acetato de etilo y derivatizar las muestras con BSTFA más 2% del catalizador TMSI, usando una técnica de derivación sobre columna.
- Tomar de 1 a 2 µl de muestra con la jeringa, seguidos de 1 µl de aire y 2 a 3 µl de agente derivatizante.
- Inyectar el contenido completo, de 3 a 5 µl en total.
- Inyectar las muestras de la curva de calibración y las muestras problema.

10.4. Tiempos de retención

Los tiempos de retención aproximados, con las condiciones arriba citadas, son:

cis DES.....	7.3 min
trans DES.....	8.0 min
Zearalane	10.3 min
Zeranol	12.6 min
Taleranol	12.8 min

10.5. Iones monitoreados

Iones (Dwells = 100 milisegundos)

D8 DES.....	420
DES.....	412, 397, 383
Zeranol	538, 523, 433, 379
Zearalane	435
Taleranol	538, 523, 433, 379

11. Resultados

11.1. Cálculos

- Leer la cuenta de área tangencial o la altura del pico, para los iones seleccionados del reporte de integración y tabular.

- Obtener los valores para la curva de calibración, relacionando el área del ion del analito con el estándar interno apropiado, de la siguiente manera:

$$DES = \frac{\text{Cuentas de área o altura ion 412 cis + trans.}}{\text{Cuentas de área o altura del ion 420 cis + trans.}}$$

$$ZERANOL = \frac{\text{Cuentas de área o altura de iones 538 + 523 + 433}}{\text{Cuentas de área o altura de ion 435}}$$

$$TALERANOL = \frac{\text{Cuentas de área o altura de iones 538 + 523 + 433}}{\text{Cuentas de área o altura de ion 435}}$$

- Con las relaciones de los iones y sus correspondientes concentraciones en ppb, calcular la regresión lineal de la curva de calibración, por la siguiente fórmula:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = relación de los iones analito/estándar interno

x = concentración en ppb

m = pendiente

b = intercepto

El coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.995.

- Con la relación del ion usando la pendiente de regresión y el intercepto, calcular la concentración para cada muestra.

11.2. Criterio para confirmación

- Las muestras que se sospechen positivas deben reanalizarse por duplicado, la serie incluirá un tejido blanco y tres fortificaciones que comprendan el nivel estimado de la muestra sospechosa.

- Todos los iones monitoreados deben estar presentes para todos los isómeros.

- El tejido blanco no mostrará interferencias.

- Las relaciones del ion deben estar dentro del 30% del estándar fortificado.

DES (cis + trans) 383/412

397/412

ZERANOL, TALERANOL 523/538

433/538

379/538

11.3. Informe de resultados

Estos se reportarán en ppb.

12. Sanciones

El incumplimiento a las disposiciones contenidas en la presente Norma será sancionado conforme a lo establecido en la Ley Federal de Sanidad Animal y la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

13. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente con ninguna norma internacional.

14. Bibliografía

Determination and Confirmation of Diethylstilbestrol/Zeranol/Taleranol in Bovine and Ovine Tissues. Chemistry Laboratory Guidebook. July 1991 Revision. Food Safety and Inspection Service, Science USDA.

Determination of Diethylstilbestrol and Zeranol in Bovine Liver Extraction Screening, Quantitation, and Confirmation.

Prepared by Covey, Stilbestre, and Henion, Cornell University, Ithaca, NY for USDA, October 15, 1985.

Method Extension Study on Ovine Tissue for Taleranol, DES, and Zeranol. September, 1988.

Quantitation of Zeranol and Diethylstilbestrol in Beef Liver, Kidney, and Muscle by GC-MS. Agriculture Canada, Animal Pathology Laboratory, Saskatoon, Saskatchewan, HOR-DP01.TXT - September, 1986.

15. Disposiciones transitorias

Esta Norma entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

APENDICE "A" (NORMATIVO)

Programa creado para la extracción por columna de intercambio aniónico

STEP	TIME	SPEED	DIRECTION	SOLVENT	AIR	HEAT
1	10	900	0	0	0	0
2	10	1350	0	0	0	0
3	240	1800	0	0	0	0
4	-1	0	0	0	0	0
5	10	900	0	0	0	0
6	10	1350	0	0	0	0
7	120	1800	0	0	0	0
8	-1	0	0	0	0	0
9	10	900	0	0	0	0
10	30	900	0	1	0	0
11	10	1350	0	0	0	0
12	90	1800	0	0	0	0
13	10	900	0	0	0	0
14	30	900	0	2	0	0
15	10	1350	0	0	0	0
16	180	1800	0	0	0	0
17	10	900	0	0	0	0
18	30	900	0	3	0	0
19	10	1350	0	0	0	0
20	120	1800	0	0	0	0
21	5	50	1	0	0	55
22	10	900	1	0	0	55
23	30	900	1	4	0	55
24	10	1350	1	0	0	55
25	240	1800	1	0	0	55
26	300	0	0	0	1	55
27	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 31 de enero de 1996.- El Director General Jurídico, Roberto Zavala Echavarría.- Rúbrica.