

PUBLICADA EN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN EL 23 DE MAYO DE 1995

NORMA Oficial Mexicana NOM-021-ZOO-1995, Análisis de residuos de plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados en grasa de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves por cromatografía de gases.

Al margen un sello con 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, 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 el análisis de residuos de plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados en grasa de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves por cromatografía de gases, se establece con el fin de asegurar a los consumidores el suministro de alimentos que no rebasen los límites máximos permisibles de este tipo de productos.

Que el consumo de alimentos contaminados de origen animal implica diversos riesgos para la salud, que dependen de la presencia de los residuos nocivos.

Que entre los beneficios que reporta el hecho de aplicar las pruebas que permiten la detección de 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 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, los interesados no presentaron comentarios al proyecto, las disposiciones del mismo han resultado procedentes en sus términos.

Que para conseguir los propósitos enunciados, he tenido a bien expedir la NOM-021-ZOO-1995, ANALISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS Y BIFENILOS POLICLORADOS EN GRASA DE BOVINOS, EQUINOS, PORCINOS, OVINOS Y AVES POR CROMATOGRFIA DE GASES.

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. INFORME DE RESULTADOS
12. SANCIONES
13. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
14. BIBLIOGRAFIA
15. DISPOSICIONES TRANSITORIAS

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 plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados en grasa animal de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves.

1.2. Campo de aplicación

Esta Norma se aplica a los laboratorios de análisis de residuos tóxicos en tejidos alimenticios primarios de origen animal, que hayan sido 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 Zoosanitaria, 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. Muestra fortificada: Es un tejido blanco que ha sido adicionado de una concentración conocida del analito.

3.4. Recuperación (R): Es el porcentaje del elemento o compuesto de interés (analito) obtenido en la muestra fortificada (MF), calculado en función de la cantidad real adicionada (C.A.)

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

CA

3.5. Tejido blanco: Es una muestra de tejido previamente analizada, que no contiene al analito o puede contenerlo en cantidades menores al límite máximo de residuos.

4. Símbolos y abreviaturas

cm centímetro

g gramo

G.R. grado reactivo

h hora

l litro

m metro

mg miligramo

min minuto

ml mililitro

mm milimetro

ppm partes por millón

ppb partes por billón

s segundo

sol. solución

µg microgramos

µl microlitros

% porciento

5. Fundamento

La técnica se basa en la obtención de los lípidos por calentamiento a partir del tejido graso; los hidrocarburos clorados son extraídos y purificados por cromatografía en columna, usando como fase estacionaria alúmina parcialmente desactivada y como fase móvil un solvente no polar adecuado.

El eluato obtenido se concentra y una alícuota se inyecta al cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones, para realizar la identificación y cuantificación de los plaguicidas organoclorados y de los bifenilos policlorados.

6. Equipo

6.1. Aparatos

- Balanza analítica.
- Balanza granataria.
- Baño de vapor.
- Evaporador de nitrógeno.
- Homogeneizador.
- Horno.
- Mufla.
- Rotavapor.

6.2. Instrumentos

- Cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones.

7. Reactivos y materiales

7.1. Reactivos

- Acetona, grado cromatográfico.
- Acido nítrico G.R.
- Agua destilada.

- Alúmina neutra, grado de actividad 1, mallas 80/200 o equivalente.
- Bencina de petróleo, grado cromatográfico o pesticida.
- Hexano, grado cromatográfico o pesticida.
- Parametoxiazobenceno G.R.

7.1.1. Preparación de reactivos

- Acido nítrico al 50%. - Diluir 50 ml de ácido nítrico G.R. a 100 ml con agua destilada.
- Alúmina neutra tratada.- Colocar la alúmina en un recipiente abierto, en una mufla a 800°C durante un tiempo mínimo de 4 h; conservar en un horno a 130°C en el recipiente abierto. Desactivar, enfriando a temperatura ambiente en un contenedor cerrado, destapar y agregar un porcentaje en peso de agua, el cual ha sido previamente determinado para dar de 80 a 110% de recuperación (del 5 al 7% aproximadamente) usando la columna de interés; tapar, agitar vigorosamente y dejar equilibrar toda la noche en un desecador o por lo menos 4 h antes de usar. Desactivar solo la cantidad que va a usarse cada día. Determinar el volumen de elución con parametoxiazobenceno, para cada lote de alúmina.
- Parametoxiazobenceno al 0.3%. - Disolver 0.3 g de colorante en 100 ml de hexano, grado cromatográfico o pesticida.

7.2. Materiales

- Columna de vidrio para cromatografía de gases, de 2.00 m en espiral, 2 mm de diámetro interno, empacada con 5% DC 200 en Chrom WHP, mallas 80/100 o equivalente; o bien, columna capilar para cromatografía de gases, de 30 m de longitud, 0.53 mm de diámetro interno, DB-608 Megaboro o equivalente.
- Columnas de vidrio para cromatografía de 12 x 300 mm con llaves de teflón.
- Columnas Snyder de 3 balines con junta esmerilada 24/40.
- Crisoles de porcelana de 40 ml.
- Cuchillo.
- Desecador.
- Embudos de acero inoxidable de 15 cm de diámetro.
- Embudos de vidrio de 5 cm de diámetro.
- Fibra de vidrio.
- Frascos de vidrio de 30 ml con tapa.
- Matraces Erlenmeyer de 250 y 125 ml con tapón de baquelita.
- Matraces redondos de fondo plano de 300 ml con junta esmerilada 24/40.
- Matraces volumétricos de 100, 50, 25 y 10 ml.
- Nitrógeno alta pureza.

- Pipetas volumétricas de 5, 4, 2 y 1 ml.
- Probetas de 100 y 50 ml.
- Tubos de centrífuga graduados de 15 ml.
- Vasos de precipitado de 150, 30 y 10 ml.

El material de vidrio que se utilice, deberá someterse a lavado de acuerdo a las siguientes instrucciones:

- Lavar perfectamente con agua y jabón, el cual deberá ser de preferencia neutro.
- Enjuagar primeramente con agua corriente, después con ácido nítrico al 50 % y posteriormente con agua destilada hasta tener agua neutra.
- Dejar escurrir y secar en la estufa.
- Enfriar y enjuagar con bencina de petróleo, grado cromatográfico o pesticida.

8. Estándares

Los estándares de referencia usados, deben tener una pureza mínima certificada del 98% y son:

- Plaguicidas organoclorados

Alfa BHC

Lindano

Beta BHC

Heptacloro

Heptacloro epóxido

4'4' DDE

Dieldrin

Endrin

4'4' DDT

Endosulfan

Mirex

Metoxicloro

- Bifenilos Policlorados

Aroclor 1016

Aroclor 1221

Aroclor 1232

Aroclor 1242

Aroclor 1248

Aroclor 1254

Aroclor 1260

8.1. Plaguicidas organoclorados.

Todas las diluciones de los estándares que se indican a continuación, se harán con hexano, grado cromatográfico o pesticida.

8.1.1. Soluciones patrón de estándares individuales 0.5 mg/ml.

Tomando en cuenta la pureza, pesar la cantidad equivalente a 25 mg de cada estándar y llevar a 50 ml con hexano.

8.1.2. Soluciones intermedias de estándares individuales.

Con el fin de observar la respuesta en el cromatógrafo y conocer los tiempos de retención, realizar diluciones sucesivas para encontrar las concentraciones que den una respuesta entre el 50 y 80% de la carta.

Se recomiendan las siguientes:

Alfa y beta BHC y Lindano 0.025 µg/ml

Heptacloro, Heptacloro epóxido,

Aldrin y 4'4' DDE 0.050 µg/ml

Dieldrin y Endrin 0.060 µg/ml

Endosulfan, 4'4' DDT y Mirex 0.100 µg/ml

Metoxicloro 0.400 µg/ml

Injectar 1 µl al cromatógrafo y conservar las gráficas para identificar los compuestos en las mezclas, así como para valorar nuevos estándares.

8.1.3. Solución del estándar interno de 0.01 µg/ml.

Poner 5 ml de la solución intermedia de aldrin, en un matraz volumétrico de 25 ml y llevar a volumen con hexano.

8.1.4. Mezclas de estándares:

A partir de las soluciones intermedias preparar 3 mezclas de estándares con concentraciones diferentes para cada compuesto, en µg/ml.

Compuesto	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Alfa BHC	0.0025	0.005	0.010

Lindano	0.0025	0.005	0.010
Beta BHC	0.0050	0.010	0.020
Heptacloro	0.0025	0.005	0.010
Aldrin	0.0100	0.010	0.010
Heptacloro			
epóxido	0.0025	0.005	0.010
4'4' DDE	0.0030	0.006	0.012
Dieldrin	0.0050	0.010	0.020
Endrin	0.0050	0.010	0.020
4'4' DDT	0.0100	0.020	0.040
Endosulfan	0.0050	0.010	0.020
Mirex	0.0125	0.025	0.050
Metoxicloro	0.0125	0.025	0.050

Los estándares patrón, los intermedios y las mezclas de estándares deberán guardarse en refrigeración. La vida de anaquel es de 6, 2 y 1 mes, respectivamente.

8.2. Bifenilos policlorados.

8.2.1. Soluciones patrón 1 µg/ml.

Hacer las diluciones apropiadas de cada uno de los estándares, para alcanzar la concentración indicada.

Injectar 1 µl al cromatógrafo y conservar las gráficas.

8.2.2. Soluciones estándares de trabajo de 0.0125, 0.025 y 0.050 µg/ml.

A partir de las soluciones patrón, preparar las diluciones de cada estándar, para tener las concentraciones señaladas.

9. Procedimiento de extracción

9.1. Preparación de las muestras

9.1.1. Muestras con alto contenido de grasa

- Picar la muestra y poner aproximadamente 50 g en un embudo de acero inoxidable, al que se le ha colocado una capa de fibra de vidrio; poner el embudo en un matraz Erlenmeyer y derretir la grasa en un horno a 110 °C, hasta que cese de gotear la grasa.
- Transferir a frascos de 30 ml y conservar en refrigeración hasta que se procese la muestra.

9.1.2. Muestras con bajo contenido de grasa.

Picar la muestra y pesar 25 g en un matraz Erlenmeyer con tapón de baquelita de 250 ml; agregar 100 ml de una solución 1:1 de acetona-bencina de petróleo; agitar en un homogeneizador durante una hora; filtrar a través de fibra de vidrio y recibir la solución en un vaso de precipitado de 150 ml; dejar que las capas se separen y decantar el éter de petróleo que contiene la grasa en un vaso de precipitado de 100 ml; evaporar el solvente en un baño de vapor hasta la obtención de la grasa.

9.2. Preparación de las columnas.

- Enjuagar dos veces las columnas cromatográficas de 12 x 300 mm sucesivamente con acetona grado cromatográfico y bencina de petróleo grado cromatográfico o pesticida; poner un tapón de lana de vidrio en el fondo de la columna y llenarla a 3/4 de su capacidad con bencina de petróleo.

- Colocar un embudo de vidrio sobre la columna y adicionar 10 g de alúmina neutra tratada y dejar sedimentar; compactar perfectamente la alúmina, eluir la bencina de petróleo hasta el nivel de la alúmina en la columna. No permitir que se seque, si esto sucediera, deséchela.

9.3. Extracción.

9.3.1. Determinar el volumen de elución del solvente requerido, para extraer los hidrocarburos clorados de los lípidos en la muestra, de la siguiente manera:

9.3.1.1. Disolver 1 ml de la solución de parametoxiazobenceno al 0.3 %, en 0.18 a 0.22 g de tejido graso blanco.

9.3.1.2. Transferir la muestra a una columna preparada, con pequeñas porciones de éter de petróleo, usando en total 5 ml.

9.3.1.3. Dejar que penetre en la columna, con un flujo de una gota por s, colectando el eluato en un matraz.

9.3.1.4. Llenar la columna con más éter de petróleo y ajustar el flujo a una gota por s.

9.3.1.5. El colorante se separará de la grasa como una banda naranja brillante, la cual puede dispersarse al final de la columna. Cuando la banda ha eluido, mida el volumen que se requirió. Esta es la cantidad usualmente suficiente para eluir los hidrocarburos clorados, separados de la grasa, aproximadamente 55 ml.

Los pasos del 9.3.1.1 al 9.3.1.5 pueden eliminarse, pero se corre el riesgo de arruinar la columna en el cromatógrafo de gases, debido a que las grasas pueden pasar en una cantidad excesiva. Se recomienda realizar estos pasos con cada serie de muestras.

9.3.2. Pesar de 0.18 a 0.22 g de grasa fundida en un vaso de precipitado de 10 ml, evitando que se solidifique; agregar 4 ml de estándar interno. A las muestras para la determinación de bifenilos policlorados, no se les adiciona el estándar interno.

9.3.3. Para el análisis de plaguicidas organoclorados pesar de igual forma dos muestras de tejido graso blanco, a una de ellas adicionar el estándar interno y a la otra 4 ml de la mezcla de estándares número 2, la primera es el blanco y la segunda la muestra de recuperación.

Para el reanálisis de las muestras que resulten positivas, preparar por cada serie de muestras, un tejido blanco y tres muestras de recuperación, adicionando al blanco el estándar interno y fortificando las muestras de recuperación con las mezclas de estándares número 1, 2 y 3. Los datos serán usados para elaborar las curvas estándares.

Para las muestras de bifenilos policlorados, pesar dos muestras de tejido graso blanco, una de ellas será el tejido blanco y la otra la recuperación; a esta última, adicionar 4 ml de la solución estándar de trabajo que elija, a una concentración de 0.025 µg/ml.

Para el reanálisis de las muestras positivas, preparar un tejido blanco y tres muestras de recuperación, las cuales se fortificarán con 4 ml de cada una de las soluciones de trabajo del compuesto identificado.

9.3.4. Correr simultáneamente un blanco de reactivos, que lleva únicamente 4 ml de estándar interno, en el caso de plaguicidas organoclorados y 4 ml de hexano grado cromatográfico o pesticida para los bifenilos policlorados.

9.3.5. Transferir las muestras a las columnas, con la bencina de petróleo necesaria, permitiendo que penetren los primeros 5 ml hasta la superficie de la alúmina, cuidando que no seque la columna.

9.3.6. Eluir las muestras con el volumen de elución ya conocido, colectando el eluato en matraces redondos de 300 ml con junta esmerilada 24/40, previamente enjuagados con acetona grado cromatográfico y bencina de petróleo, grado cromatográfico o pesticida.

9.3.7. Colocar los matraces en baño de vapor, conectando en la boca del matraz una columna Snyder de 3 balines; o usar un rotavapor a 50 °C, concentrar a aproximadamente 3 - 5 ml.

9.3.8. Transferir a tubos de centrifuga graduados de 15 ml, enjuagando el matraz con 3 a 5 ml de éter de petróleo.

9.3.9. Evaporar con nitrógeno hasta un volumen de 4 ml.

9.3.10. Inyectar 1 o 2 µl en el cromatógrafo de gases, en el orden siguiente: blanco de reactivos, tejido blanco, mezcla de estándares, recuperación y muestras.

9.4. Resumen del método.

El método anteriormente descrito se resume de la siguiente manera:

Preparar las columnas

Pesar 0.2 g 10 % de muestra fundida. Pesar tejido blanco y muestra de recuperación

Para las muestras de organoclorados, agregarles a ellas y al blanco el estándar interno y a la recuperación la mezcla de estándares

Para las muestras de bifenilos, adicionar a la recuperación la solución estándar de trabajo de 0.025 µg/ml

Correr blanco de reactivos

Transferir las muestras a las columnas, con el volumen necesario de bencina de petróleo. Dejar que penetren los primeros 5 ml

Eluir las muestras con el volumen conocido de solvente, recibiendo el eluato en un matraz de bola

Conectar al matraz una columna Snyder o rotavapor a 50°C y concentrar a 3-5 ml

Transferir a tubos de centrifuga graduados de 15 ml y lavar el matraz con bencina de petróleo.

Evaporar con nitrógeno hasta un volumen de 4 ml

Injectar 1 o 2 µl al cromatógrafo

10. Procedimiento de cuantificación

Las siguientes condiciones son para un cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones y se dan como un ejemplo solamente. El analista deberá optimizar estos parámetros para el instrumento que est usando.

10.1. Con columna empacada.

10.1.1. Gas acarreador: Nitrógeno con un flujo de 65 ml/min

10.1.2. Temperatura de la columna: 205 °C

10.1.3. Temperatura del inyector: 230 °C

10.1.4. Temperatura del detector: 300 °C

10.1.5. Sensibilidad: 4

10.1.6. Atenuación: 32

10.1.7. Velocidad de la carta: 0.5 cm/min

10.1.8. Tiempo de corrida: 36 min

Injectar 2 µl del blanco de reactivos, el tejido blanco, la(s) mezcla(s) de estándares, la(s) recuperación(es) y las muestras.

10.2. Con columna capilar.

10.2.1. Gas acarreador: Nitrógeno con un flujo de 17 ml/min.

10.2.2. Temperatura inicial

de la columna: 185 °C por 1 min.

10.2.3. Programación de

temperatura: 4 °C/min.

10.2.4. Temperatura final de

la columna: 225 °C durante 9 min.

10.2.5. Temperatura del inyector: 260 °C.

10.2.6. Temperatura del detector: 300 °C.

10.2.7. Sensibilidad: 10

10.2.8. Atenuación: 32

10.2.9. Velocidad de la carta: 1.0 cm/min.

10.2.10. Tiempo de corrida: 26 min.

Injectar 1 µl del blanco de reactivos, el tejido blanco, la(s) mezcla(s) de estándares, la(s) recuperación(es) y las muestras.

10.3. Cálculos

10.3.1. Sistema manual:

- Medir la altura del pico, para cada compuesto en la(s) mezcla(s) de estándares, en la(s) recuperación(es) y en las muestras.
- Calcular el porcentaje de recuperación. El rango es de 80 a 110 % para los plaguicidas organoclorados y de 75 a 100 % para los bifenilos policlorados.
- Calcular la relación de altura del pico, para cada compuesto en los tres niveles de las recuperaciones y en las muestras.

Relación = altura del pico del compuesto encontrado

altura del pico del estándar interno

- Con las relaciones de altura y sus correspondientes concentraciones en ppm, calcular la regresión lineal de la curva de calibración, por el método de mínimos cuadrados.

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Relación de altura del pico.

x = Concentración del analito en ppm.

m = Pendiente.

b = Intercepto.

El coeficiente de correlación deberá ser mayor o igual a 0.990

- Usando la pendiente de regresión y el intercepto, calcular la concentración del analito (x) para cada muestra, con la relación de altura del pico obtenida.
- Corregir de acuerdo al % de recuperación del compuesto.

10.3.2. Sistema de cómputo.

- Si el cromatógrafo cuenta con un sistema de manejo de datos, referirse al manual de operación, para establecer los procedimientos de cálculo de concentración por estándar interno, utilizando los datos de los 3 niveles de concentración de cada estándar.

11. Informe de resultados

Estos se reportarán en ppm del compuesto encontrado

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

Clacys, Robert R., and Inman, Roderick D., JAOAC, 57. 1974.

Micro Alumina Column Screening for Chlorinated Hydrocarbons and PCB Residues in Fatty Foods. Chemistry Laboratory Guidebook. July 1991 Revision. Food Safety and Inspection Service, Science USDA.

Método de análisis de residuos de plaguicidas organoclorados en grasa animal. Manual de Procedimientos del Laboratorio de Residuos Tóxicos y Contaminantes. Revisión 1992. Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. SARH.

15. Disposiciones transitorias

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

Atentamente

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 3 de mayo de 1995.- El Director General Jurídico, Roberto Zavala Echavarría.- Rúbrica.