

ANÁLISIS DE AFLATOXINAS B1, B2, G1, G2 Y TOTALES EN MANÍ, MAÍZ Y ALIMENTOS BALANCEADOS CON COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD; DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN CON HPLC Y DERIVATIZACIÓN POSTCOLUMNA. PROCESO DE VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA

ANALYSIS OF AFLATOXINS B1, B2, G1, G2 AND TOTAL AFLATOXINS IN PEANUT, CORN AND BALANCED FEED WITH IMMUNOAFFINITY CLEAN-UP; DETECTION AND QUANTIFICATION BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND POST-COLUMN DERIVATIZATION. VERIFICATION PROCESS

María Sara Valdez, Carola Lavezzo, Marcela Nelly Flores Quinteros (Senasa)

Resumen

Este trabajo detalla el proceso para la verificación de un método normalizado, publicado por la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC, por sus siglas en inglés) en sus métodos oficiales de análisis (Official Methods of Analysis), para la determinación de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y totales por cromatografía líquida de alta performance, previa limpieza de las muestras con columnas de inmunoespecificidad, y derivatización postcolumna de los extractos por bromación electroquímica.

Los parámetros de verificación seleccionados son los necesarios a criterio del laboratorio para demostrar la competencia técnica y adecuación a las necesidades.

Palabras clave: aflatoxinas, derivatización postcolumna, columna de inmunoespecificidad.

Abstract

This work shows the verification process of a normalized AOAC method for determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 and total aflatoxins, by High Performance Liquid Chromatography, with previous immunoaffinity clean-up and post-column derivatization involving electrochemically generated bromine.

The verification parameters have been selected in order to support fitness for use.

Keywords: aflatoxins, post-column derivatization, immunoaffinity column.

Introducción

Las micotoxinas son metabolitos secundarios formados por ciertas cepas de hongos que conforman un grupo de fundamental importancia como contaminantes biológicos.

Las aflatoxinas, son metabolitos tóxicos, producidos generalmente por un hongo del género *Aspergillus* y de la especie *flavus*. Son compuestos difuranocumarinas (estables al calor y con fluorescencia propia a la luz ultravioleta) con anillo ciclopentano en las B (aflatoxina B1 y B2; la denominación B responde a la fluorescencia azul al ultravioleta, del inglés blue) y lactona en las G (aflatoxina G1 y G2; cuya denominación responde a la fluorescencia verde al ultravioleta, del inglés green).

Son sustancias extremadamente carcinogénicas para

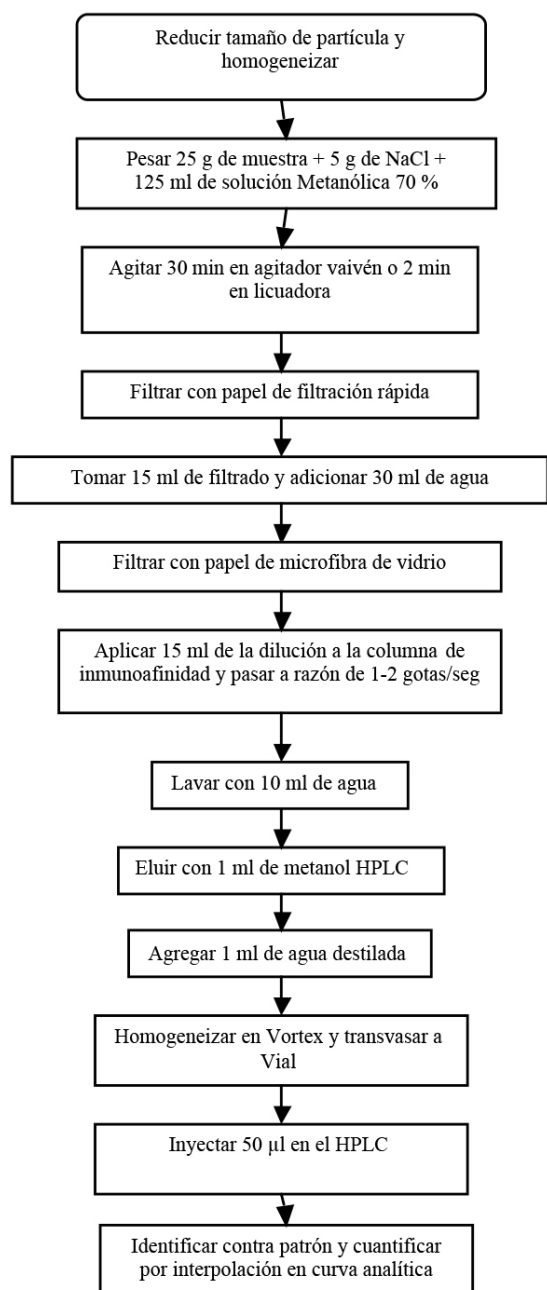
muchos animales. Los efectos y las rutas de acceso al cuerpo humano no están totalmente estudiados.

Los valores máximos aceptables para estas toxinas difieren según los países, y la tendencia indica una tolerancia cada vez menor de las concentraciones admitidas.

Desarrollo de la verificación Metodología empleada

El método utilizado es el AOAC 999.07 (capítulo 49 rev. 2010).

El tamaño de partícula de la muestra de análisis debe ser uniforme y, para que el resultado obtenido sea representativo, la muestra debe estar correctamente homogeneizada [AOAC Official Method 977.16].



- Tipo de inyección: automática
Volumen de inyección: 50 µl
- Bomba: capaz de operar en forma isocrática con un flujo de 1,2 ml/min
- Tiempo de corrida: 9 min

Fase móvil: Pesar 580,0 g de agua destilada, 205,4 g de metanol HPLC y 124,3 g de acetonitrilo HPLC. Agregar 60 mg de bromuro de potasio, y desgasificar la solución filtrando con membrana de nylon de 0,45 µm. Agregar 100 µl de ácido nítrico 65 %

- Calcular la concentración en µg/kg de cada toxina a partir de las soluciones medidas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C_m (\mu\text{g/kg}) = a \times \text{señal}_m (\text{unidades}) + b$$

$$\text{Aflatoxinas } (\mu\text{g/kg}) = C_m \times \text{ml solvente} \times \text{elución} / W \times \text{alícuota}$$

Donde:

C_m = concentración individual de cada aflatoxina calculada por regresión lineal

Señal_m (unidades) = área del pico de cada toxina obtenida en la medición

ml Solvente = ml de solución utilizados en la extracción

Elución = volumen final (en ml) obtenido luego de la elución de la columna monoclonal

Alícuota = ml de la alícuota aplicada a la columna de inmunoafinidad

W = porción de ensayo en g.

Los resultados se expresan en µg de toxina por kg de muestra y se corrigen por recuperación.

Parámetros de verificación

Cuando un laboratorio está utilizando un método que, como en este caso, ya ha sido validado, no es necesario volver a validarlo en su totalidad aunque deba verificarse el cumplimiento de algunos parámetros. Normalmente, la verificación supone determinar el cumplimiento de menos parámetros y hacer menos mediciones de cada parámetro que si se tratara de una validación. Los resultados de la verificación pueden diferir levemente de los obtenidos en la validación, pero debe determinarse si son aceptables teniendo en cuenta el objetivo que se persigue al utilizar el método.

Linealidad del método: intervalo de trabajo para el cual la concentración de las toxinas es proporcional a la señal producida.

Parámetros de uso del cromatógrafo líquido

- Detector: de fluorescencia, con un sistema con fuente de tungsteno (preferentemente)
 - λ de excitación: 360 nm
 - λ de emisión: 440 nm
 - Atenuación: 8
- Columna: Tipo Agilent Zorbax SB-C18 o equivalente
- Características de la columna: Largo de columna: 25 cm (o equivalente)
 - Temperatura de columna: 40 °C
 - Diámetro interno: 4,6 mm
 - Tamaño de poro: 5 µm
- Celda electroquímica de derivatización post-columna tipo Coring Cell

Tradicionalmente, se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida cuando se aplica el método y la concentración del analito en la matriz dentro del rango de concentraciones del analito buscado (rango de trabajo). El rango de trabajo viene definido por la finalidad del método y puede representar solo una parte de la totalidad de la línea recta. Habitualmente, los criterios de aceptación implican una prueba de la “bondad de ajuste”.

A partir del *mix* de aflatoxinas # L11461A se preparan las soluciones de trabajo para elaborar la curva analítica. Cada punto se prepara en forma independiente por triplicado [Aflatest Manual de Instrucciones Effective].

| Concentración B1-G1 (µg/kg) | Concentración B2-G2 (µg/kg) |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 0,40 | 0,10 |
| 1,00 | 0,25 |
| 2,00 | 0,50 |
| 4,00 | 1,00 |
| 8,00 | 2,00 |
| 10,00 | 2,50 |
| 20,00 | 5,00 |
| 40,00 | 10,00 |

Tabla N.º 1: Puntos de la curva analítica

Sobre las áreas promedio obtenidas a partir de ensayar cada concentración por triplicado, se realiza el análisis de regresión y se analizan los siguientes parámetros:

- R^2 para cada una de las toxinas (porcentaje de valores estimados explicados por la función)
- Hipótesis nula para la pendiente $H_0=0$, es decir que no hay correlación entre la variable dependiente y la independiente con un $\alpha=0,05$.
- Análisis de residuales estandarizados, considerando aceptables los residuos normalizados comprendidos entre ± 2 (nivel de confianza 95 %)

| Nivel | Concentración (µg/kg) | Área1 | Área2 | Área3 | Área Promedio |
|-------|-----------------------|------------|------------|------------|---------------|
| 1 | 0,40 | 24226,00 | 19498,00 | 22352,00 | 22025,33 |
| 2 | 1,00 | 67612,00 | 49493,00 | 64861,00 | 60655,33 |
| 3 | 2,00 | 128444,00 | 100541,00 | 123590,00 | 117525,00 |
| 4 | 4,00 | 259198,00 | 199480,00 | 195157,00 | 217945,00 |
| 5 | 8,00 | 520009,00 | 373115,00 | 482470,00 | 458531,33 |
| 6 | 10,00 | 707912,00 | 544721,00 | 609805,00 | 620812,67 |
| 7 | 20,00 | 1426566,00 | 1079041,00 | 1174102,00 | 1226569,67 |
| 8 | 40,00 | 2685068,00 | 2710816,00 | 2618095,00 | 2671326,33 |

Tabla N.º 2: Valores de área obtenidos para AFB1

| Estadísticas de la regresión | |
|--------------------------------------|--------|
| Coefficiente de correlación múltiple | 0,9990 |
| Coefficiente de determinación R2 | 0,9981 |
| R2 ajustado | 0,9978 |
| Error típico | 0,6333 |
| Observaciones | 8 |

Tabla N.º 3: Análisis estadístico de la curva analítica para AFB1

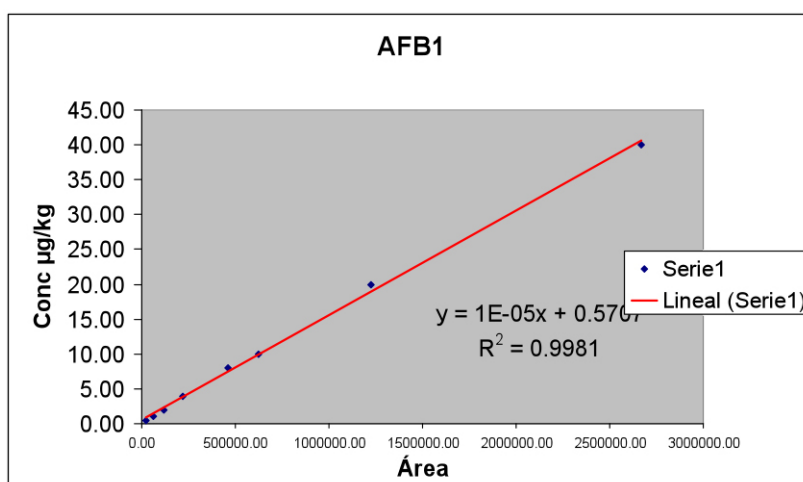


Gráfico N.º 1: Curva analítica de AFB1

| Nivel | Concentración (µg/kg) | Área1 | Área2 | Área3 | Área Promedio |
|-------|-----------------------|------------|------------|------------|---------------|
| 1 | 0,10 | 11402,00 | 8672,00 | 10728,00 | 10267,33 |
| 2 | 0,25 | 32537,00 | 22017,00 | 30920,00 | 28491,33 |
| 3 | 0,50 | 60906,00 | 44629,00 | 58598,00 | 54711,00 |
| 4 | 1,00 | 122520,00 | 89630,00 | 92524,00 | 101558,00 |
| 5 | 2,00 | 250252,00 | 172912,00 | 231068,00 | 218077,33 |
| 6 | 2,50 | 340007,00 | 259014,00 | 313542,00 | 304187,67 |
| 7 | 5,00 | 684303,00 | 518152,00 | 599495,00 | 600650,00 |
| 8 | 10,00 | 1285072,00 | 1301180,00 | 1322962,00 | 1303071,33 |

Tabla N.º 4: Valores de área obtenidos para AFB2

| Estadísticas de la regresión | |
|--------------------------------------|--------|
| Coefficiente de correlación múltiple | 0,9990 |
| Coefficiente de determinación R2 | 0,9981 |
| R2 ajustado | 0,9978 |
| Error típico | 0,1590 |
| Observaciones | 8 |

Tabla N.º 5: Análisis estadístico de curva analítica para AFB2

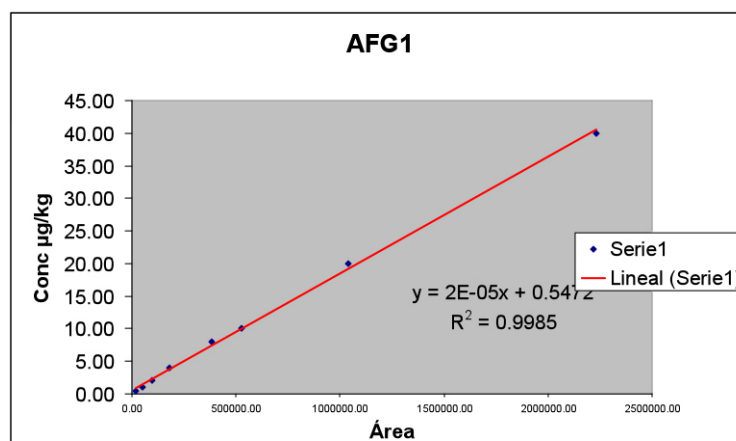


Gráfico N.º 2: Curva analítica de AFB2

| Nivel | Concentración (µg/kg) | Área1 | Área2 | Área3 | Área Promedio |
|-------|-----------------------|------------|------------|------------|---------------|
| 1 | 0,40 | 20371,00 | 14812,00 | 19231,00 | 18138,00 |
| 2 | 1,00 | 57688,00 | 36865,00 | 55426,00 | 49993,00 |
| 3 | 2,00 | 108976,00 | 76156,00 | 105991,00 | 97041,00 |
| 4 | 4,00 | 219398,00 | 152260,00 | 167543,00 | 179733,67 |
| 5 | 8,00 | 442062,00 | 297801,00 | 412476,00 | 384113,00 |
| 6 | 10,00 | 603170,00 | 468220,00 | 503718,00 | 525036,00 |
| 7 | 20,00 | 1220242,00 | 927151,00 | 967220,00 | 1038204,33 |
| 8 | 40,00 | 2297649,00 | 2294465,00 | 2096895,00 | 2229669,67 |

Tabla N.º 6: Valores de área obtenidos para AFG1

| Estadísticas de la regresión | |
|--------------------------------------|--------|
| Coefficiente de correlación múltiple | 0,9993 |
| Coefficiente de determinación R2 | 0,9985 |
| R2 ajustado | 0,9983 |
| Error típico | 0,5558 |
| Observaciones | 8 |

Tabla N.º 7: Análisis estadístico de curva analítica para AFG1

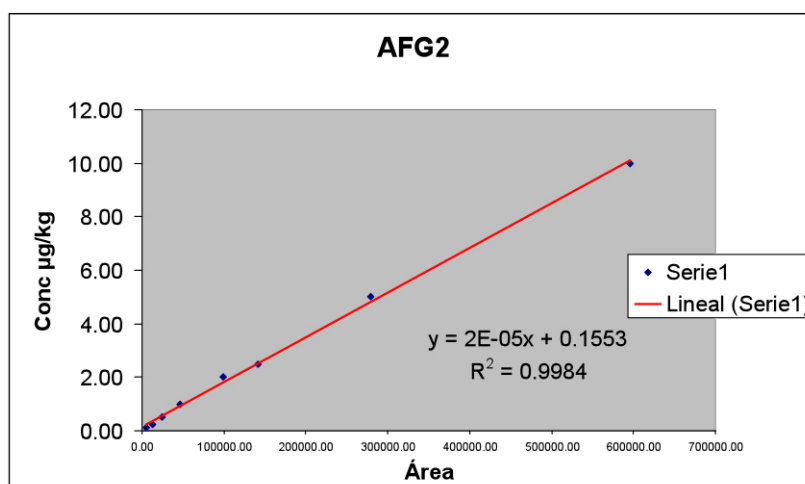


Gráfico N.º 3: Curva analítica para AFG1

| Nivel | Concentración (µg/kg) | Área1 | Área2 | Área3 | Área Promedio |
|-------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| 1 | 0,10 | 5125,00 | 3691,00 | 5100,00 | 4638,67 |
| 2 | 0,25 | 15127,00 | 9127,00 | 14413,00 | 12889,00 |
| 3 | 0,50 | 28081,00 | 19253,00 | 27292,00 | 24875,33 |
| 4 | 1,00 | 56429,00 | 38604,00 | 43251,00 | 46094,67 |
| 5 | 2,00 | 114535,00 | 75188,00 | 105669,00 | 98464,00 |
| 6 | 2,50 | 156346,00 | 121517,00 | 146776,00 | 141546,33 |
| 7 | 5,00 | 316058,00 | 238687,00 | 282709,00 | 279151,33 |
| 8 | 10,00 | 594302,00 | 593812,00 | 600203,00 | 596105,67 |

Tabla N.º 8: Valores de área obtenidos para AFG2

| Estadísticas de la regresión | |
|--------------------------------------|--------|
| Coefficiente de correlación múltiple | 0,9992 |
| Coefficiente de determinación R2 | 0,9984 |
| R2 ajustado | 0,9981 |
| Error típico | 0,1466 |
| Observaciones | 8 |

Tabla N.º 9: Análisis estadístico de curva analítica para AFG2

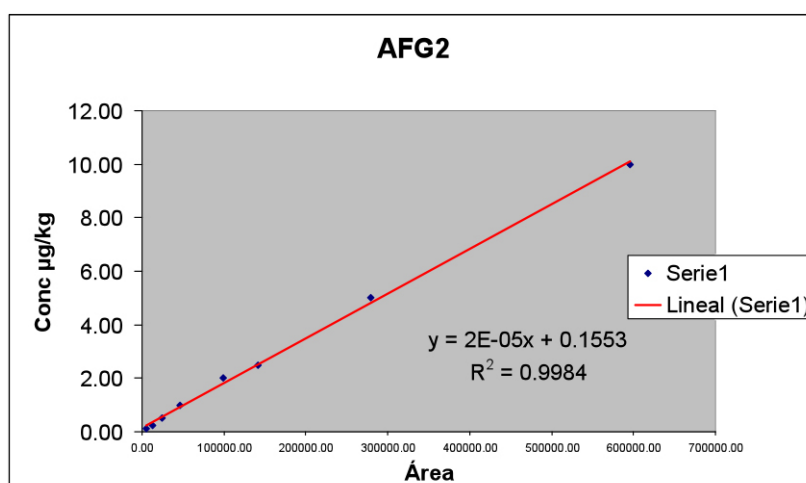


Gráfico N.º 4: Curva analítica para AFG2

Recuperación

Por recuperación de analitos en un ensayo se entiende la respuesta del detector ante una adición o extracción de analito de la matriz, en comparación con su respuesta ante la concentración real del estándar de referencia verdadero. También puede entenderse como la proporción de metabolito presente inicialmente que llega hasta el final del procedimiento.

Los experimentos de recuperación deben hacerse comparando los resultados analíticos de las muestras extraídas con tres concentraciones (uno bajo, medio y alto) que se analizan por quintuplicado. No es necesario que la recuperación del analito sea del 100 %, pero el grado de recuperación debe ser estable, preciso y reproducible.

Para verificar este parámetro se enriquecieron porciones de maní previamente analizadas y con resultado negativo para cada una de las toxinas. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla N.º 10.

| Toxina | Nivel 1 (en µg/kg) | % de recuperación | Nivel 2 (en µg/kg) | % de recuperación | Nivel 3 (en µg/kg) | % de recuperación |
|--------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| B1 | 2,0 | 93,2 | 10,0 | 98,4 | 20 | 90,6 |
| B2 | 0,5 | 95,9 | 2,5 | 101,1 | 5 | 93,9 |
| G1 | 2,0 | 95,6 | 10,0 | 108,7 | 20 | 101,9 |
| G2 | 0,5 | 70,6 | 2,5 | 73,4 | 5 | 66,6 |

Tabla N.º 10: Valores de recuperación obtenidos

Obtención de los límites de detección y de cuantificación

Límite de detección: se trata de la concentración mínima de analito que puede ser detectada e identificada con un determinado grado de certidumbre. El límite de detección se define también como la concentración mínima que puede distinguirse del ruido de fondo con un determinado grado de confianza. Para estimar el límite de detección pueden utilizarse varios métodos, todos los cuales dependen del análisis de muestras blanco y del examen de la relación entre la señal y el ruido. Por lo general se acepta un requisito mínimo de relación señal/ruido de 3/1.

El límite de detección no es un parámetro robusto y puede resultar afectado por cambios menores del sistema analítico (por ejemplo, temperatura, pureza de los reactivos, efectos de matriz, condiciones instrumentales). Por tanto, es importante que este parámetro sea siempre verificado por laboratorios que hayan adoptado métodos previamente validados.

El laboratorio debe garantizar la detección y cuantificación de muestras con 2 µg/kg de toxina B₁ y 4 µg/kg de aflatoxinas totales, teniendo en cuenta los valores de recuperación e incertidumbre de las mediciones, obtenidos internamente para este procedimiento.

De esta forma, se propone demostrar la posibilidad de establecer como límite de detección (LOD) 0,25 ng de toxinas B₁-G₁ (0,2 µg/kg resultante del redondeo de 0,25 ng de toxina) y 0,125 ng para B₂-G₂ (0,1 µg/kg resultante del redondeo de 0,125 ng de toxina). Se propone tomar como límite de cuantificación (LOC) tres veces el límite establecido para detección (teniendo en cuenta los valores reales en ng y aplicando luego el redondeo debido a forma de expresión de resultados), es decir, 0,8 µg/kg para B₁-G₁ (resultante del redondeo de 0,75 ng de toxina) y 0,4 µg/kg para B₂-G₂ (correspondiente a 0,38 ng de toxina). Los valores propuestos se presentan en la Tabla N.º 11.

| Toxina | Nivel 1 (en µg/kg) | Nivel 1 (en µg/kg) |
|--------|--------------------------|-----------------------------|
| B1 | (0.25ng de toxina) 0.2 | (0.25 ng x 3=0.75 ng) 0.8. |
| B2 | (0.125 ng de toxina) 0.1 | (0.125 ng x 3=0.375 ng) 0.4 |
| G1 | (0.25ng de toxina) 0.2 | (0.25 ng x 3=0.75 ng) 0.8. |
| G2 | (0.125 ng de toxina) 0.1 | (0.125 ng x 3=0.375 ng) 0.4 |

Tabla N.º 11: Valores propuestos de LOD y LOC

Las muestras se inyectan en el cromatógrafo y se obtiene un informe de performance de cada una de las aflatoxinas.

Parámetros considerados:

- Número de platos teóricos
- Resolución
- Asimetría de los picos
- Relación señal: ruido

Los resultados obtenidos acusan valores satisfactorios para las cuatro toxinas. La concentración ensayada es sustancialmente inferior a la propuesta como límite de detección, por lo cual se aceptan los límites propuestos,

La *precisión* mide el grado de acuerdo entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método.

Las condiciones en que se mide la precisión se dividen, según opinión general, en condiciones repetibles y condiciones reproducibles.

La repetibilidad de las condiciones existe cuando el mismo analista analiza muestras el mismo día y con el mismo instrumento, los mismos materiales y en el mismo laboratorio. Cualquier cambio de estas condiciones (por ejemplo, diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos, diferentes laboratorios) implica que las condiciones solo serán reproducibles.

La precisión normalmente se mide en términos de coeficiente de variación o desviación típica relativa de los resultados analíticos obtenidos con patrones de control preparados independientemente.

Las condiciones de repetibilidad comprenden:

- El mismo procedimiento de medida
- El mismo observador
- El mismo instrumento de medida utilizado en las mismas condiciones
- El mismo lugar
- Repetición durante un corto periodo de tiempo

- Para realizar el ensayo de repetibilidad y reproducibilidad intermedia se utilizó un maní previamente analizado y se le asignó un valor de consenso. Para verificar este parámetro, participaron todos los analistas que rutinariamente realizan el ensayo.

Reproducibilidad intermedia o intralaboratorio:

Grado de concordancia entre los resultados de las mediciones del mismo mensurando, variando los operadores. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla N.º 12.

| Identificación | AFB1 µg/kg | AFB1+recu 94,1% µg/ kg | AFB2 µg/kg | AFB2 µg/ kg+recu 97% | AFG1 µg/kg | AFG1 µg/ kg+recu 102,1% | AFG2 µg/kg | AFG2 µg/ kg+recu 70,2% | AFT µg/kg |
|----------------|------------|------------------------------|------------|----------------------------|------------|-------------------------------|------------|------------------------------|-----------|
| mr15-8 | 6,41 | 6,81 | 0,88 | 0,91 | 0,55 | 0,54 | 0,11 | 0,16 | 7,96 |
| mr15-8c1 | 7,91 | 8,41 | 1,10 | 1,13 | 0,71 | 0,70 | 0,14 | 0,20 | 9,86 |
| mr15-8c2 | 6,9 | 7,33 | 0,95 | 0,98 | 0,58 | 0,57 | 0,12 | 0,17 | 8,56 |
| mr15-8c3 | 6,85 | 7,28 | 0,94 | 0,97 | 0,64 | 0,63 | 0,13 | 0,19 | 8,56 |
| mr16-8c4 | 6,75 | 7,17 | 0,92 | 0,95 | 0,63 | 0,62 | 0,12 | 0,17 | 8,41 |
| mr16-8c5 | 6,71 | 7,13 | 0,93 | 0,96 | 0,66 | 0,65 | 0,13 | 0,19 | 8,44 |
| mr17-8c6 | 6,98 | 7,42 | 0,95 | 0,98 | 0,66 | 0,65 | 0,12 | 0,17 | 8,72 |
| mr17-8-11c7 | 6,71 | 7,13 | 0,92 | 0,95 | 0,64 | 0,63 | 0,13 | 0,19 | 8,41 |
| mr19-8c8 | 7,18 | 7,63 | 0,97 | 1,00 | 0,67 | 0,66 | 0,13 | 0,19 | 8,95 |
| mr19-8c9 | 7,05 | 7,49 | 0,96 | 0,99 | 0,67 | 0,66 | 0,13 | 0,19 | 8,82 |
| mr15-8a | 7,72 | 8,20 | 1,08 | 1,11 | 0,69 | 0,68 | 0,12 | 0,17 | 9,62 |
| mr15-8b | 7,17 | 7,62 | 0,99 | 1,02 | 0,63 | 0,62 | 0,12 | 0,17 | 8,91 |
| mr16-8c | 6,94 | 7,38 | 0,94 | 0,97 | 0,65 | 0,64 | 0,11 | 0,16 | 8,63 |
| mr16-8d | 6,74 | 7,16 | 0,93 | 0,96 | 0,66 | 0,65 | 0,11 | 0,16 | 8,44 |
| mr17-8-11e | 6,88 | 7,31 | 0,95 | 0,80 | 0,67 | 0,66 | 0,11 | 0,60 | 8,60 |
| mr17-8-11f | 6,89 | 7,32 | 0,94 | 0,97 | 0,65 | 0,64 | 0,10 | 0,14 | 8,59 |
| mr18-8-11g | 7,24 | 7,69 | 1,00 | 1,03 | 0,72 | 0,71 | 0,11 | 0,16 | 9,07 |
| mr18-8-11h | 6,94 | 7,38 | 0,98 | 1,01 | 0,66 | 0,65 | 0,11 | 0,16 | 8,70 |
| mr16-8r1 | 6,68 | 7,10 | 0,92 | 0,95 | 0,64 | 0,63 | 0,11 | 0,16 | 8,35 |
| mr16-8r2 | 6,19 | 6,58 | 0,85 | 0,88 | 0,57 | 0,56 | 0,09 | 0,13 | 7,70 |
| mr17-8r3 | 6,71 | 7,13 | 0,89 | 0,92 | 0,60 | 0,59 | 0,10 | 0,14 | 8,30 |
| mr17-8r4 | 6,43 | 6,83 | 0,86 | 0,89 | 0,57 | 0,60 | 0,09 | 0,13 | 7,96 |
| mr17-8r5 | 6,86 | 7,29 | 0,89 | 0,92 | 0,60 | 0,59 | 0,10 | 0,14 | 8,45 |
| mr18-8-11r6 | 7,14 | 7,59 | 1,01 | 1,04 | 0,69 | 0,68 | 0,11 | 0,16 | 8,94 |
| mr18-8-11r7 | 7,52 | 7,99 | 1,05 | 1,08 | 0,72 | 0,71 | 0,11 | 0,16 | 9,40 |
| mr19-8-11r8 | 7,24 | 7,69 | 0,98 | 1,01 | 0,70 | 0,69 | 0,13 | 0,19 | 9,05 |
| mr19-8-11r9 | 7,41 | 7,87 | 1,01 | 1,04 | 0,71 | 0,70 | 0,13 | 0,19 | 9,26 |
| mrmi1 | 6,12 | 6,50 | 0,79 | 0,81 | 0,51 | 0,50 | 0,08 | 0,11 | 7,50 |
| mrmi2 | 5,11 | 5,43 | 0,65 | 0,67 | 0,41 | 0,40 | 0,08 | 0,11 | 6,26 |
| mrmi3 | 5,35 | 5,69 | 0,70 | 0,72 | 0,45 | 0,44 | 0,07 | 0,10 | 6,58 |
| mrmi4 | 7,06 | 7,50 | 1,00 | 1,03 | 0,68 | 0,70 | 0,11 | 0,16 | 8,86 |
| mrmi5 | 7,42 | 7,89 | 1,04 | 1,07 | 0,71 | 0,70 | 0,11 | 0,16 | 9,28 |
| mrmi6 | 7,38 | 7,84 | 1,05 | 1,08 | 0,72 | 0,71 | 0,11 | 0,16 | 9,27 |
| mrmi7 | 6,66 | 7,08 | 0,95 | 0,98 | 0,64 | 0,63 | 0,11 | 0,16 | 8,35 |
| mrmi8 | 7,16 | 7,61 | 0,98 | 1,01 | 0,68 | 0,67 | 0,12 | 0,17 | 8,95 |
| mrmi9 | 7,39 | 7,85 | 1,01 | 1,04 | 0,71 | 0,70 | 0,13 | 0,19 | 9,24 |
| mrmi10 | 5,58 | 5,93 | 0,76 | 0,78 | 0,50 | 0,49 | 0,10 | 0,14 | 6,94 |
| mrmi11 | 5,09 | 5,41 | 0,71 | 0,73 | 0,46 | 0,45 | 0,90 | 0,13 | 6,33 |
| Promedio | 6,80 | 7,23 | 0,93 | 0,96 | 0,63 | 0,62 | 0,11 | 0,16 | 8,48 |

| Identificación | AFB1 µg/kg | AFB1+recu 94,1% µg/ kg | AFB2 µg/kg | AFB2 µg/ kg+recu 97% | AFG1 µg/kg | AFG1 µg/ kg+recu 102,1% | AFG2 µg/kg | AFG2 µg/ kg+recu 70,2% | AFT µg/kg |
|----------------|------------|------------------------------|------------|----------------------------|------------|-------------------------------|------------|------------------------------|-----------|
| Desvest | 0,652 | 0,693 | 0,101 | 0,104 | 0,079 | 0,078 | 0,016 | 0,022 | 0,840 |
| Desvest% | 9,59 | 9,59 | 10,90 | 10,90 | 12,62 | 12,62 | 14,50 | 14,50 | 9,92 |

Tabla N.º 12: Valores obtenidos de reproducibilidad intermedia sobre material de referencia maní

Estimación del valor de incertidumbre de las mediciones (Nordtest)

Los laboratorios de análisis deben establecer y aplicar procedimientos de estimación de la incertidumbre de las mediciones. Tener en cuenta la incertidumbre aumenta la garantía de que los resultados y conclusiones obtenidos con los métodos y programas analíticos utilizados permitan cumplir los objetivos fijados.

El Vocabulario Internacional de Metrología (VIM) define la incertidumbre de medida como un parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente podrían ser atribuidos al mensurando.

En términos más prácticos, la incertidumbre se puede definir como la probabilidad o el nivel de confianza. Cualquier medición que hagamos entrañará un cierto grado de incertidumbre, por lo que el intervalo de incertidumbre que se fije será el rango dentro del cual se situará el valor real con un determinado grado de confianza. Normalmente se utiliza un grado de confianza del 95 %

Se ensaya el material de referencia de maní generado internamente por el laboratorio en condiciones de reproducibilidad intermedia. Los valores obtenidos se corrigen por recuperación.

Se ensaya a su vez un material de referencia proveniente de un interlaboratorio Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) para estimar el sesgo del laboratorio y su aporte a la incertidumbre combinada. Los resultados se presentan en la Tabla N.º 13.

El sesgo (en inglés, *bias*) es la medición de la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, debido a un error sistemático del método y del laboratorio. Normalmente se expresa en porcentaje. La exactitud (sesgo) y la precisión determinan el error total del análisis.

$$ubias = \sqrt{(bias)^2 + \left(\frac{S_{bias}}{\sqrt{n}}\right)^2 + u(Cref)^2}$$

Tabla N.º 13: Valores asignados a material de referencia FAPAS

Donde:

ubias: es la incertidumbre aportada por el sesgo del laboratorio

bias: es el sesgo, la diferencia entre el valor obtenido por el laboratorio y el de referencia aceptado

S_{bias}: es el desvío estándar de las *n* determinaciones realizadas para el material de referencia

n: es el número de determinaciones realizadas del material de referencia utilizado

u(Cref): es la incertidumbre declarada del material de referencia analizado

Las toxinas monitoreadas son AFB1, AFG2 y AFT por considerarse AFB1 la más crítica y también la de mayor incidencia; la AFG2, la más difícil de recuperar y con mayor grado de variabilidad, y las AFT, por ser la sumatoria de las cuatro. Las Tablas N.º 14, 15 y 16, presentadas a continuación, muestran las estimaciones de incertidumbre expandida obtenidas para AFB1, AFG2 y AFT.

| | Valor 1 (µg/kg) | Valor 2 (µg/kg) | Valor promedio (µg/kg) | Valor FAPAS (µg/kg) | Sesgo (µg/kg) | Sesgo relativo % | Desvest | Desvest relativo % |
|------|-----------------|-----------------|------------------------|---------------------|---------------|------------------|---------|--------------------|
| AFB1 | 15,48 | 12,46 | 13,97 | 12,5 | 1,47 | 10,52 | 2,13546 | 15,28 |

| | |
|------------------|------------|
| ubias relativo % | 11,2540894 |
| Ucomb relativo % | 14,7858929 |
| Uexp relativo % | 29,6 |

Tabla N.º 14: Estimación de incertidumbre expandida para AFB1 según Nordtest

Donde

Desvest: corresponde al desvío estándar de las mediciones

ubias: es el aporte a la incertidumbre dado por el sesgo de las mediciones respecto del valor asignado.

ucomb: es el valor de incertidumbre combinada, correspondiente a la raíz de la suma cuadrática de los distintos componentes

Uexp: es la incertidumbre combinada expandida, que surge de aplicar un factor de cobertura $k=2$. Este factor se aplica para poder decir con un 95 % de confianza, que el valor verdadero está comprendido dentro del rango informado.

| Material de referencia FAPAS Maní | | | |
|-----------------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------|
| Toxina | Valor asignado (µg/kg) | Incertidumbre (µg/kg) | Incertidumbre (%) |
| AFB1 | 12,500 | 0,346 | 2,768 |
| AFT | 25,900 | 0,780 | 3,011 |
| AFG2 | 3,920 | 0,171 | 0,862 |

| | Valor 1 (µg/kg) | Valor 2 (µg/kg) | Valor promedio (µg/kg) | Valor FAPAS (µg/kg) | Sesgo (µg/kg) | Sesgo relativo % | Desvest | Desvest relativo % |
|------|-----------------|-----------------|------------------------|---------------------|---------------|------------------|---------|--------------------|
| AFG2 | 3,29 | 3,04 | 3,165 | 3,92 | -0,76 | -23,85 | 0,1768 | 5,58 |

| | |
|------------------|------------|
| ubias relativo % | 4,11232309 |
| Ucomb relativo % | 15,068092 |
| Uexp relativo % | 30,7 |

Tabla N.º 15: Estimación de incertidumbre expandida para AFG2 según Nordtest

| | Valor 1 (µg/kg) | Valor 2 (µg/kg) | Valor promedio (µg/kg) | Valor FAPAS (µg/kg) | Sesgo (µg/kg) | Sesgo relativo % | Desvest | Desvest relativo % |
|-----|-----------------|-----------------|------------------------|---------------------|---------------|------------------|-----------|--------------------|
| AFT | 29,78 | 24,77 | 27,275 | 25,9 | 1,38 | 5,04 | 3,5426049 | 12,99 |

| | |
|------------------|------------|
| ubias relativo % | 9,76270574 |
| Ucomb relativo % | 13,915815 |
| Uexp relativo % | 27,8 |

Tabla N.º 16: Estimación de incertidumbre expandida para AFT según Nordtest

Los valores de incertidumbre obtenidos (Tablas N.º 14, 15 y 16) cumplen con los requisitos de la Dirección General de Salud y Consumidores de la Comisión Europea (European Commission Directorate General Health and Consumers - DG SANCO).

SANCO/0064/2003 – rev. 3 Punto 4.6 Incertidumbre expandida (U_{exp}) para componentes en concentración <120µg/kg hasta 44 % (resultante de emplear la fórmula de Horwitz y aplicar un factor de cobertura k=2 para expandirla).

$$Horwitz = \frac{0.2c}{m}$$

Donde:

c: es la concentración obtenida expresada en forma de relación adimensional de masas (ej 1µg/kg ≡ 10⁻⁹)

m: relación adimensional de masas (ej 1µg/kg ≡ 10⁻⁹)

Bibliografía

Aflatest Manual de Instrucciones Effective date December 12,2000 VICAM.

AOAC Official Method 990.33 “Aflatoxinas en maíz y manteca de maní” (año 2010).

AOAC Official Method 972.26 “Aflatoxinas en maíz” (año 2010).

AOAC Official Method 968.22 “Aflatoxinas en maní y manteca de maní” (año 2010).

AOAC Official Method 994.08 “Aflatoxinas en maíz, almendras, nueces, maní y pistachos” (año 2010)

AOAC Official Method 999.07 “Aflatoxina B₁ y aflatoxinas totales en manteca de maní, pasta de pistachos y paprika en polvo” (año 2010).

AOAC Official Method 977.16 “Preparación de muestras” (año 2010).

Guía SANCO/0064/2003 – rev. 3.

NORDTEST TR537 Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories- Nordtest Tekniikantie 12 FIN-02150 Espoo Finland.