

05-22-95 NORMA Oficial Mexicana NOM-020-ZOO-1995, Determinación de ivermectinas en hígado de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves por cromatografía de líquidos alta resolución.

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.

CONSIDERANDO

Que la determinación de ivermectinas en hígado de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves por cromatografía de líquidos alta resolución, 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-020-ZOO-1995, DETERMINACION DE IVERMECTINAS EN HIGADO DE BOVINOS
EQUINOS,
PORCINOS, OVINOS Y AVES POR CROMATOGRFIA DE LIQUIDOS ALTA
RESOLUCION.

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

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 ivermectinas en hígado de bovinos, equinos, porcinos y 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, 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-003-1994 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. Blanco de cristalería: Es el extracto que resulta de enjuagar con isoootano y realizar la derivación de una población representativa del material de vidrio utilizado en el análisis, que no produce interferencia con la respuesta del estándar.

3.2. Blanco de reactivos: Es la solución resultante de realizar el análisis completo, omitiendo la muestra, que no produce interferencia con la respuesta del estándar.

3.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución: 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) y la otra móvil (líquida).

Cuando la mezcla de compuestos es arrastrada a través de la cama por un líquido, el proceso se llama "Cromatografía de líquidos". Cuando partículas muy pequeñas están contenidas en un tubo (columna) y el líquido es forzado a través de la columna por una bomba, los componentes son detectados al salir de la cama por un detector sensitivo, entonces al proceso se le conoce como "Cromatografía de líquidos alta resolución".

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

3.5. 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 (CA).

$$R = MF \times 100$$

CA

3.6. 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

HPLC cromatografía de líquidos alta resolución

(por sus siglas en inglés)

G.R. grado reactivo

min minuto

ml mililitro

mm milímetro

ng nanogramos

nm nanómetros

ppm partes por millón

ppb partes por billón

rpm revoluciones por minuto

s segundo

µg microgramos

µl microlitros

v/v volumen a volumen

°C grados Celsius o centígrados

% por ciento

5. Fundamento

En este procedimiento, el analito se extrae del tejido hepático con isooctano y se limpia precipitando con baja temperatura los residuos extraños de la matriz. Con el reactivo derivatizante, se forma un derivado fluorescente, que se analiza por cromatografía de líquidos. El método también se aplica a músculo, riñón, grasa y plasma.

6. Equipo

6.1. Aparatos.

- Agitador mecánico.
- Balanza analítica.
- Baño de aceite.
- Baño de ultrasonido.
- Centrífuga de 5000 rpm.
- Evaporador de nitrógeno.
- Licuadora.
- Mezclador vórtex.

6.2. Instrumentos.

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia.

7. Reactivos, soluciones y materiales

7.1. Reactivos.

- Acetona, grado HPLC.
- Acetonitrilo, grado HPLC.
- Agua, grado HPLC.
- Anhídrido acético, G.R.
- Cloroformo, grado HPLC.
- N,N - Dimetil formamida, G.R.
- Isooctano, grado HPLC.
- Metanol, grado HPLC.
- 1- metilimidazol, 99 % de pureza.
- Trimetil-clorosilano.

7.2. Soluciones.

- Solución de acetona:agua 1:1 v/v.
- Fase móvil: 96 % de metanol, 4% de agua grado HPLC.
- Reactivo derivatizante: En un tubo de centrifuga de vidrio de 15 ml, mezclar 2 partes de 1-metilimidazol con 3 partes de anhídrido acético y 9 partes de N,N dimetil formamida, agitar en un mezclador vórtex. Preparar antes de usar y descartar el sobrante.

El reactivo derivatizante es sensible a residuos ácidos y alcalinos, por lo tanto, debe seguirse un régimen de limpieza riguroso para los tubos de vidrio que se usen en su preparación, se recomienda:

Remover todos los residuos de muestra manualmente, no lavar en máquina.

Lavar con agua y jabón, enjuagar con agua corriente y secar.

Sumergir en cloruro de metileno por 2 horas.

Remojar en solución detergente otras dos horas.

Enjuagar con agua caliente, agua destilada, acetona y metanol antes de secarlos.

7.3. Materiales.

- Cartucho de extracción en fase sólida de sílica gel de 500 mg.
- Columna de 150 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno Zorbax ODS.
- Cuchillo o escalpelo con bisturí.
- Jeringas de 50 µl, 250 µl y 5 ml.
- Nitrógeno, alta pureza.
- Pipetas graduadas de 1 y 2 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 ml.
- Tubos de centrifuga de 15 y 50 ml con tapón esmerilado.
- Tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml.

Las condiciones de los tubos de 15 ml afectan la resolución analítica; para evitarlo deben silanizarse. Esto hace que sea más fácil limpiarlos y cubrir los sitios reactivos que puedan adsorber la ivermectina.

8. Estándares

El estándar de referencia usado es ivermectina, que es una mezcla de dos homólogos: 22, 23 dihidroavermectina BIa o H2BIa en una proporción de 80% mínimo y la 22, 23 dihidroavermectina BIb o H2BIb en no más del 20 %

La concentración comercial disponible, es aproximadamente de 1.38% para H2BIa y 0.21 % para H2BIb.

8.1. Solución Patrón de 125 µg/ml.

Siguiendo las instrucciones que acompañan al estándar, preparar una solución que contenga aproximadamente 125 µg/ml de ivermectina en metanol grado HPLC.

8.2. Solución de trabajo 0.5 µg/ml.

A partir de la solución patrón, preparar dos diluciones intermedias para obtener una concentración aproximada de 0.5 µg/ml en metanol grado HPLC.

Las soluciones patrón y de trabajo, deberán conservarse en tubos de polipropileno a - 20°C. La solución patrón tiene una vida de anaquel de 1 año y la de trabajo de 90 días.

9. Procedimiento de extracción

9.1. Extracción.

9.1.1. Con el cuchillo o el bisturí quitar el tejido conectivo del hígado y licuar.

9.1.2. En un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml, pesar 2.5 ± 0.1 g de tejido hepático homogeneizado.

9.1.3. Por cada serie de muestras, preparar un blanco de cristalería, un blanco de reactivos, un tejido blanco y una muestra de recuperación, la cual se fortifica con 100 µl de la solución estándar de trabajo de 0.5 µg/ml para tener aproximadamente 20 ppb.

9.1.4. Adicionar 15 ml de la solución de acetona:agua 1:1.

9.1.5. Agregar 15 ml de isooctano grado HPLC , tapar los tubos y agitar en vórtex por 20 s para dispersar el tejido.

9.1.6. Agitar mecánicamente durante 10 min.

9.1.7. Centrifugar a 2000 rpm, durante 10 min.

9.1.8. Transferir el isooctano, capa superior, a un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml.

9.1.9. Evaporar el isooctano a aproximadamente 0.5 ml, en un baño de vapor a 55 - 60 °C y una corriente suave de nitrógeno. Quedará un líquido viscoso.

9.1.10. Realizar dos extracciones más, repitiendo los pasos del 9.1.5. al 9.1.9.

Es muy importante transferir sólo la capa de isooctano, durante la extracción del tejido. Para evitar tomar de la capa inferior, de cada una de las tres porciones de 15 ml de isooctano, transfiera sólo de 13 a 14 ml.

9.1.11. Adicionar 4 ml de acetonitrilo, previamente calentado a 55 - 60°C, al tubo de polipropileno que contiene el residuo viscoso.

9.1.12. Tapar el tubo y mezclar en vórtex.

9.1.13. Regresar el tubo al baño de vapor a 55 - 60°C por 5 min.

9.1.14. Agitar el tubo en vórtex por 2 min.

9.1.15. Poner el tubo en un baño de ultrasonido por 2 min.

9.1.16. Poner el tubo en un congelador a 0°C durante una hora y media.

9.1.17. Centrifugar el tubo frío a 1500 rpm por 5 min.

9.1.18. Decantar el acetonitrilo, en un tubo de centrifuga de vidrio de 15 ml previamente silanizado.

9.1.19. Evaporar el acetonitrilo, en un baño de vapor a 55 - 60°C, con una corriente suave de nitrógeno. Deberá quedar un líquido viscoso, similar al del paso 9.1.9.

9.1.20. Preparar el estándar externo, colocando 100 µl de la solución del estándar de trabajo de 0.5 µl/ml, en un tubo de centrifuga de vidrio de 15 ml y evaporando el solvente, en un baño de vapor a 55 - 60°C, con una corriente suave de nitrógeno.

9.1.21. Agregar 150 µl del reactivo derivatizante a cada tubo. Tapar y agitar en vórtex por 20 s.

9.1.22. Colocar el tubo en el baño de ultrasonido, por 5 min.

9.1.23. Centrifugar a 1500 rpm durante 1 min.

9.1.24. Poner los tubos en el baño de aceite a $96 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante una hora y media.

9.1.25. Humedecer los cartuchos de extracción de sílica gel con 5 ml de cloroformo. Desechar el solvente.

9.1.26. Remover los tubos del baño, quitarles el exceso de aceite y dejarlos enfriar.

9.1.27. Adicionar 1 ml de cloroformo a cada tubo.

9.1.28. Decantar el contenido de los tubos en los cartuchos de extracción de sílica gel. Lavar con 3 ml de cloroformo y agregar el lavado al cartucho de extracción.

9.1.29. Después que ha pasado el cloroformo, lavar el reservorio y el cartucho de extracción de sílica gel con 8 ml de cloroformo, adicionándolos en porciones sucesivas de 2 ml.

9.1.30. Conservar todos los eluatos clorofórmicos, en un tubo de centrífuga de vidrio de 15 ml.

9.1.31. Evaporar el cloroformo a sequedad, en un baño de vapor a 55 - 60°C, con una corriente suave de nitrógeno.

9.1.32. Llevar a un volumen final de 1 ml con metanol.

9.1.33. Tapar los tubos, agitar en vórtex y después en el baño de ultrasonido .

9.1.34. Poner los tubos en congelación, durante 30 min.

9.1.35. Centrifugar los tubos fríos a 1500 rpm por 5 min.

9.1.36. Transferir una alícuota a un vial de volumen reducido e inyectar al cromatógrafo de líquidos.

9.2. Resumen del método.

El método anteriormente descrito se resume de la siguiente manera:

Pesar 2.5 ± 0.1 g de muestra, tejido blanco

y recuperación.

Fortificar la muestra de recuperación para

tener aproximadamente 20 ppb.

Adicionar a todos los tubos 15 ml de la

solución de acetona:agua 1:1.

Agregar 15 ml de isooctano y agitar

manualmente. Agitar en vórtex por 20 s.

Agitar mecánicamente durante 10 min.

Centrifugar a 2000 rpm por 10 min.

Transferir el isooctano a un tubo de
centrífuga y evaporar a 0.5 ml en un baño
de vapor con flujo de nitrógeno

Repetir la extracción con isooctano dos
veces más y evaporar a sequedad.

Adicionar 4 ml de acetonitrilo caliente a 55 -
60°C al residuo viscoso, mezclar en vórtex.

Poner en baño de vapor a 55 - 60 °C por 5
min; agitar en vórtex 2 min; colocar en el
baño de ultrasonido 2 min

Congelar los tubos a 0 °C por 1.5 horas

Centrifugar a 1500 rpm por 5 min.

Decantar el acetonitrilo en un tubo de
centrífuga de vidrio de 15 ml silanizado

Evaporar el acetonitrilo en el baño de vapor
con corriente de nitrógeno.

Preparar el estándar externo evaporando
100 µl de la solución estándar de trabajo.

Agregar 150 µl del reactivo derivatizante.

Agitar en vórtex 20 s; colocar en el baño de
ultrasonido 5 min.

Centrifugar a 1500 rpm, 1 min.

Colocar en el baño de aceite a 96°C

durante 1.5 horas.

Quitar los tubos del baño y agregar 1 ml de cloroformo.

Decantar el contenido de los tubos en los cartuchos de extracción previamente humedecidos con cloroformo.

Lavar con 3 ml de cloroformo y agregar al cartucho de extracción.

Lavar el reservorio y el cartucho de extracción con 8 ml de cloroformo.

Combinar los extractos clorofórmicos.

Evaporar el cloroformo a sequedad en un baño de vapor a 55 - 60 °C con flujo suave de nitrógeno.

Llevar a un volumen final de 1 ml con metanol.

Agitar en vórtex y en el baño de ultrasonido.

Congelar los tubos 30 min. Centrifugar a 1500 rpm por 5 min.

Injectar en el cromatógrafo de líquidos.

10. Procedimiento de cuantificación

Las condiciones que enseguida se presentan, se sugieren como guía, para lo cual el analista deberá optimizar estos parámetros para el instrumento que esté usando.

10.1. Fase móvil: 4 % de agua en metanol

10.2. Velocidad de flujo: 1.8 ml/min.

10.3. Volumen de inyección : 50 µl.

10.4. Temperatura de la columna: 30°C.

10.5. Longitud de onda de excitación: 360 nm.

10.6. Longitud de onda de emisión: 425 nm.

10.7. Atenuación del detector: 10.

10.8. Velocidad de la carta: 5 mm/min.

10.9. Rango del registrador: 1 mv.

Injectar el blanco de cristalería, el blanco de reactivos, el estándar externo, el tejido blanco, la recuperación y las muestras. El porcentaje de recuperación aceptable es de 60 a 110%.

Los blancos no deberán presentar picos que interfieran con el tiempo de retención del estándar; en caso contrario, eliminar el problema y repetir el análisis.

11. Resultados

Cálculos

- Medir la altura del pico con el tiempo de retención del estándar con una tolerancia de $\pm 5\%$ en los cromatogramas del estándar, la recuperación y las muestras.

- Calcular el % de recuperación, el cual deberá estar entre el 60 y 110%.

- Calcular la concentración de ivermectina de acuerdo a:

$$C = A \times D - E$$

B

Donde :

C = Concentración de ivermectina en la muestra, en ng/g.

A = Concentración del estándar, en ng/g.

B = Altura del pico del estándar en mm.

D = Altura del pico de la muestra en mm.

E = Promedio de 10 recuperaciones/100.

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

Johnson, E. L. and Stevenson, R. Basic Liquid Chromatography. Varian Associates, Inc. 1978.

Determination and Confirmation of Ivermectin Residue in Animal Tissue. Chemistry Laboratory Guidebook. July 1991 Revision. Food Safety and Inspection Service, Science USDA.

Method validation NADA 131-392; NADA 135-008. Ivermectin application: Merck & Co., Inc., Rahway, NJ 07065.

Técnica de Extracción para la Determinación de Ivermectinas. Manual de Procedimientos del Laboratorio de Residuos Tóxicos y Contaminantes. Revision 1992. Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. SARH.

Tway, P. C. , Wood, J. S.,and Downing, G. V., J. Agric. Food Chem., 29, 1059-1063. 1981.

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.