


<b>aoxlab</b>	Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-220</b>
		Revisión: <b>1</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-04-03</b>

# Procedimiento de ensayo de Determinación de Dioxinas y Furanos




**AOXLAB S.A.S.**

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

## DOCUMENTO CONTROLADO


### PROC-TC-220 Procedimiento de ensayo de determinación de Dioxinas y Furanos

Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
<b>Elaboró:</b>	Santiago Valencia Álvarez	Analista de Laboratorio		2024-03-22
<b>Revisó:</b>	Laura Stefanía Guerra Foronda	Director Técnico		2024-04-03
<b>Aprobó:</b>	Laura Stefanía Guerra Foronda	Director Técnico		2024-04-03
<b>Localización del documento:</b>		<a href="http://107.190.135.130/~aoxlabsgc/sig/">http://107.190.135.130/~aoxlabsgc/sig/</a>		


### Control de Cambios

Estado	Fecha de inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Vigente	2024-04-03	1	Ninguno (versión original)	SVA	LSGF	LSGF


	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

## ÍNDICE

<b>1. OBJETIVO Y ALCANCE.....</b>	<b>5</b>
1.1 <b>Objetivo.....</b>	<b>5</b>
1.2 <b>Alcance.....</b>	<b>5</b>
<b>2    DEFINICIONES Y NOTACIONES.....</b>	<b>6</b>
2.1 <b>Definiciones.....</b>	<b>6</b>
2.2 <b>Notaciones.....</b>	<b>8</b>
<b>3    REFERENCIAS.....</b>	<b>9</b>
<b>4    DESARROLLO.....</b>	<b>10</b>
<b>4.1    CONDICIONES GENERALES.....</b>	<b>10</b>
4.1.1 <b>Revisión general.....</b>	<b>10</b>
4.1.2 <b>Estabilización.....</b>	<b>10</b>
4.1.3 <b>Verificación de equipos.....</b>	<b>11</b>
4.1.4 <b>Manejo de la muestra.....</b>	<b>11</b>
4.1.5 <b>Medidas de seguridad.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2    INSTRUCCIONES DE ENSAYO.....</b>	<b>12</b>
4.2.1 <b>Patrones y equipos de medición.....</b>	<b>12</b>
4.2.1.1 <b>Equipos de medición.....</b>	<b>12</b>
4.2.1.2 <b>Materiales y consumibles.....</b>	<b>12</b>
4.2.1.3 <b>Reactivos y soluciones.....</b>	<b>13</b>
4.2.2 <b>Preparación de soluciones.....</b>	<b>13</b>
4.2.2.1 <b>Cloruro de sodio al 5%.....</b>	<b>13</b>
4.2.3 <b>Preparación de la muestra.....</b>	<b>13</b>
4.2.3.1 <b>Muestras de carne y pescado.....</b>	<b>13</b>
4.2.3.2 <b>Muestras de leche.....</b>	<b>14</b>
4.2.3.3 <b>Muestras de queso:.....</b>	<b>14</b>
4.2.3.4 <b>Muestras de leche deshidratada y productos derivados:.....</b>	<b>15</b>
4.2.3.5 <b>Muestras de huevos líquidos:.....</b>	<b>15</b>
4.2.3.6 <b>Muestras de huevos deshidratados:.....</b>	<b>15</b>
4.2.4 <b>Extracción de grasa.....</b>	<b>16</b>
4.2.4.1 <b>Clean Up.....</b>	<b>16</b>
4.2.5 <b>Condiciones cromatográficas.....</b>	<b>17</b>
4.2.6 <b>Curva de calibración.....</b>	<b>18</b>

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

4.3	INFORME .....	19
4.4	CONTROL DE LA CALIDAD .....	21
5	RESPONSABILIDADES .....	21
6	FORMATOS RELACIONADOS.....	22
7	ANEXOS .....	22

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo.

Describir los pasos para realizar la determinación de Dioxinas y Furanos en grasas de acuerdo a los parámetros de la norma EPA 8290A "Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDS) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFS) by high-resolution gas chromatography/highresolution mass spectrometry (HRGC/HRMS)" [2], así como con los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [1].


### 1.2 Alcance.

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Determinación de Dioxinas y furanos (Modificado)	EPA 8290 A [2]	Cromatografía de Gases acoplada a masas-masas (Triple cuadrupolo)

Este método es aplicable a las siguientes matrices:

- Leche y productos lácteos
- Carnes y productos cárnicos
- Productos frescos y frutas
- Frutas secas, nueces, semillas
- Pescado y productos derivados
- Cacao y derivados
- Cereales
- Confitería
- Aves de corral y productos de aves de corral crudos, listos para cocinar
- Alimentos fortificados
- Café y productos derivados
- Huevo
- Salsas y aderezos
- Grasas y aceites

**Nota:** Para las matrices no grasas, se debe de realizar la extracción de la grasa.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

## 2 DEFINICIONES Y NOTACIONES.

### 2.1 Definiciones.

#### Documento [3].

Información y su medio de soporte.

#### Ensayo/prueba [3].

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

#### Procedimiento [3].

Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso.

#### Dioxinas [6].


Las dioxinas se refieren a un grupo de compuestos químicos tóxicos que comparten ciertas estructuras químicas y características biológicas. Existen varios cientos de estos productos químicos y son miembros de tres familias estrechamente relacionadas:

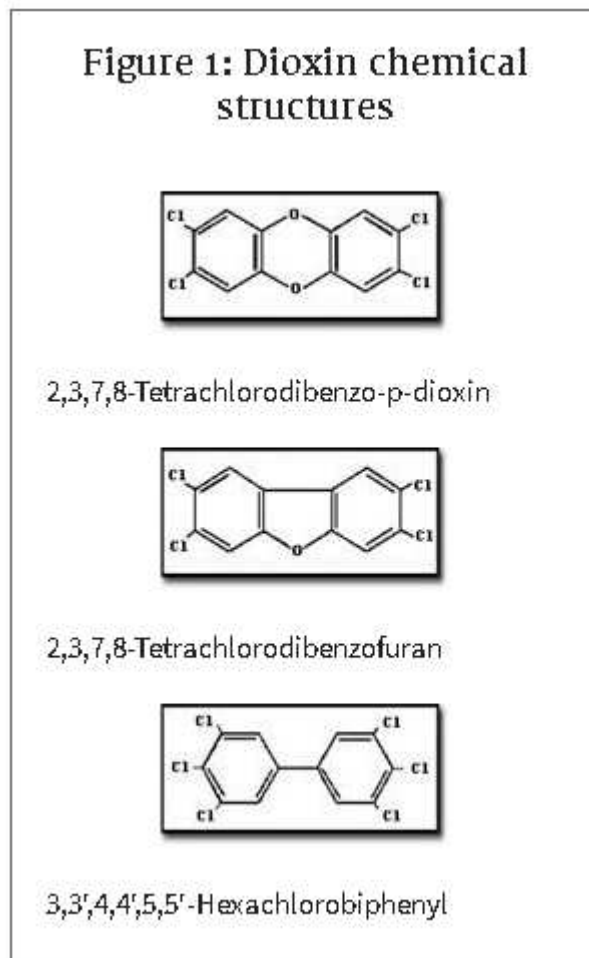
Dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD)

Dibenzofuranos policlorados (PCDF)

Bifenilos policlorados (PCB)

Aunque existen cientos de PCDD, PCDF y PCB, solo algunos son tóxicos, esto se debe a la posición de los átomos de cloro alrededor de la molécula, aquellos con átomos de cloro en las posiciones 2, 3, 7 y 8 son tóxicos (ver figura 1). Los PCB similares a las dioxinas tienen ambos anillos de bifenilo en el mismo plano (apariencia planar), lo que les permite actuar como dioxinas en el cuerpo.

	Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-220</b>
		Revisión: <b>1</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-04-03</b>




**Figura 1. [6]. Estructura química de las dioxinas**

Los PCDD y PCDF no se crean intencionalmente, sino que se producen como resultado de actividades humanas como la quema de basura en el patio trasero. Los procesos naturales como los incendios forestales también producen PCDD y PCDF.

Después de la emisión a la atmósfera, las dioxinas se depositan en tierra o agua, cerca o lejos de las fuentes de emisión, dependiendo del tamaño de las partículas con las que se asocian.

Las dioxinas en el agua se unen fuertemente a partículas pequeñas, materia orgánica o plancton. Las dioxinas depositadas en la tierra se adhieren fuertemente al suelo y, por lo tanto, la mayoría de las veces no contaminan las aguas subterráneas.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

La mayoría de las dioxinas que se encuentran en las plantas provienen del aire y el polvo o de pesticidas o herbicidas que contienen dioxinas. Las plantas y los animales son devorados por animales más grandes, que acumulan dioxinas en su cuerpo y leche (bioacumulación). Debido a que las dioxinas se unen a las grasas y son muy estables, sus concentraciones aumentan con cada paso de la cadena alimentaria (biomagnificación) [7].

Las dioxinas, furanos, PCB's y PAH's afectan principalmente al sistema nervioso y el grupo más vulnerable a sus efectos tóxicos son los neonatos.


## 2.2 Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

**“Laboratorio”**: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.


**“Servicios”**: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

**“Ítem”**: se refiere a los objetos o materiales bajo ensayo.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

### 3 REFERENCIAS.

- [1] International Organization for Standardization. (2023). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (ISO Standard No. 17025:2017).
- [2] EPA 8290A Environmental Protection Agency "POLYCHLORINATED DIBENZO-p-DIOXINS (PCDDs) AND POLYCHLORINATED DIBENZOFURANS (PCDFs) BY HIGH-RESOLUTION GAS CHROMATOGRAPHY/HIGHRESOLUTION MASS SPECTROMETRY (HRGC/HRMS)".
- [3] International Organization for Standardization. (2023). Quality management systems - Fundamentals and vocabulary (ISO Standard No. 9000:2015).
- [4] Centro Español de Metrología Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. 3ª edición en español (2012).
- [5] International Organization for Standardization. (2023). Conformity assessment — Vocabulary and general principles (ISO Standard No. 17000:2020).
- [6] US EPA. 2021. Learn about Dioxin | US EPA. [online] Available at: <<https://www.epa.gov/dioxin/learn-about-dioxin>> [Accessed 11 July 2023].
- [7] Greenfacts.org. 2021. Dioxins: 1. What are dioxins? [online] Available at: <<https://www.greenfacts.org/es/dioxinas/l-2/dioxins-1.htm#3>> [Accessed 25 June 2021].

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

## 4 DESARROLLO

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos clave:

Equipos y materiales
Cromatógrafo de Gases con acoplado a masas-masas
Balanza analítica con resolución de 0.1 mg
Automuestreador AOC-6000
Columna capilar Zebron ZB-5MS Capillary GC Column 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm.
Baño María
Cabina extractora
Desecador
Estufa
Centrifuga
Vortex Mixer

### 4.1 CONDICIONES GENERALES

#### 4.1.1 Revisión general.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, ésta es inspeccionada con el fin de verificar que las condiciones de cantidad, empaque y preservación se mantienen, conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".


Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que se cuenta con mínimo 10 gramos de muestra para realizar este análisis.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

#### 4.1.2 Estabilización.

Los ítems de ensayo, patrones y controles de calidad deben atemperarse con suficiente antelación de tal manera que se encuentren en equilibrio térmico con el ambiente en el cual se ejecutarán los ensayos.

La balanza analítica y otros equipos electrónicos que realicen mediciones de alguna magnitud correspondiente a condiciones de influencia en la ejecución del ensayo deben encenderse por lo menos media hora antes de su uso. Así mismo, el cromatógrafo líquido de alta resolución debe encenderse, adecuarse y ajustarse a los parámetros de medida, acondicionando el sistema al menos 30 minutos antes de iniciar la corrida cromatográfica. a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

#### 4.1.3 Verificación de equipos.

Antes de iniciar el ensayo, debe verificarse que el estado de funcionamiento de los equipos sea adecuado. Esto puede llevarse a cabo revisando que cuenten con la etiqueta de mantenimiento vigente y que estos no tengan alguna etiqueta que lo identifique como "Fuera de servicio". Además, en el caso en el cual se lleve el control de uso, deben registrarse los últimos registros consignados en el formato FOR-TC-017, con el propósito de verificar que no se han registrado fallas en el funcionamiento. Si algún equipo es utilizado para la medición de alguna magnitud de influencia en el ensayo, este debe estar calibrado. Por tanto, se debe verificar la etiqueta de calibración adherida a este, y comprobar que se encuentre vigente.

Así mismo, debe verificarse que se haya realizado y registrado la verificación diaria de la balanza analítica en el formato FOR-TC-005.


El cromatógrafo de gases acoplado a masas-masas, en caso de encontrarse apagado, se debe estabilizar el vacío que se genera en el espectrómetro de masas aproximadamente 12 horas para su correcto funcionamiento, esto se hace a través del Software GCMS Real Time Analysis. Asegurarse que no se tenga fugas en el sistema, verificar que el liner sea el adecuado para el análisis, en este caso el inserto splitless, el liner no puede estar despicado, parcialmente quebrado y mucho menos sucio, de ser así se debe de cambiar inmediatamente. Verificar el estado del septum, este no puede presentar deterioros aparentes, debe cambiarse igual que el liner (aproximadamente cada 200 inyecciones) esto con el fin de prevenir fugas o contaminaciones.

Se debe realizar una verificación a la columna revisando que no se encuentre partida o quemada; se deben revisar las conexiones de la columna y de igual manera, verificar que los extremos de la columna no se encuentren quemados o mal cortados.

Además de lo anterior, debe verificarse la fecha de expiración de los patrones, materiales de referencia y controles de calidad empleados en el ensayo con el fin de evitar el uso de materiales vencidos. Verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio". En caso de que se encuentre alguna anomalía al respecto, avisar a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.

#### 4.1.4 Manejo de la muestra.

Durante el almacenamiento y ensayo de la muestra, esta debe permanecer herméticamente cerrada, con el fin de no alterar la humedad original que contiene la muestra durante estas actividades. La identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, deben realizarse de acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

Sí la muestra es líquida, mezclar hasta homogeneidad aparente mediante agitación magnética, y con la ayuda de un gotero o una pipeta tomar la cantidad necesaria de muestra, mientras se continúa con la agitación.

Sí la muestra es sólida, moler o triturar en su totalidad hasta homogeneidad aparente, y realizar un cuarteo atendiendo los siguientes pasos:

- Colocar la muestra previamente homogeneizada sobre una superficie lisa, limpia y seca, donde no existan corrientes de aire fuertes.
- Limpiar los instrumentos a utilizar (espátula o cuchara).
- Mezclar la muestra echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.
- Juntar todo el material dándole forma circular con espesor uniforme.
- Dividir el material en cuatro sectores iguales.
- Eliminar los sectores opuestos quedando la masa del material reducida a la mitad.
- Mezclar los dos sectores restantes echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.

#### 4.1.5 Medidas de seguridad.

Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar u omitir ningún paso.

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC-015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XIII.

## 4.2 INSTRUCCIONES DE ENSAYO.


### 4.2.1 Patrones y equipos de medición

#### 4.2.1.1 Equipos de medición

- Nitrógeno gaseoso grado analítico
- Cromatógrafo de Gases con acoplado al espectrómetro de masas-masas
- Columna capilar Zebron ZB-5MS Capillary GC Column 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm.
- Balanza analítica con resolución de 0.1 mg
- Transferpipetas de 1000 µL, 200 µL y 10 mL
- Baño María
- Plancha de calentamiento

#### 4.2.1.2 Materiales y consumibles

- Micro espátula metálica
- Tubos Falcon de 50 mL con tapa rosca

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

- Beaker de 250 mL
- Embudos de separación de 250mL
- Copas extracción Soxhlet
- Viales ámbar de 2 mL con tapa

#### 4.2.1.3 Reactivos y soluciones

- Estándares DIOXIN & FURAN FOOD/QQQ CALIBRATION SERIES (E-144)
- Dietil éter (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O)
- Sulfato de Sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Hexano grado GC (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>)
- Hidróxido de Amonio 58% w/w (NH<sub>4</sub>OH), equivalente a amoniaco en solución 28-30%.
- Bencina de petróleo
- Etanol 95% v/v (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)
- Ácido clorhídrico 37% (HCl)
- Oxido de aluminio neutro
- Silica gel
- Carbón grafitizado
- Cloruro de sodio
- Ácido sulfúrico concentrado
- Diclorometano

#### 4.2.2 Preparación de soluciones


##### 4.2.2.1 Cloruro de sodio al 5%

Pesar 5 gramos de cloruro de sodio, adicionar 50 mL de agua tipo I y disolver, adicionar la solución a un balón volumétrico de 100 mL, completar volumen con agua tipo I.

#### 4.2.3 Preparación de la muestra

##### 4.2.3.1 Muestras de carne y pescado

- Pesar 20 g de muestra de pescado o carne previamente homogeneizada, adicionarle 60 g de sulfato de sodio anhidro y mezclar bien con la ayuda de una espátula.
- Adicionar la muestra a un dedal de celulosa.
- El balón de extracción previamente desengrasado con 1 mL de acetona se pesa y se registra el peso.
- Se realiza el montaje de extracción Soxhlet y se adiciona el dedal en el soxhlet.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>


- Adicionar 150 mL de diclorometano en el balón de extracción, iniciar el calentamiento, realizar la extracción por 16 horas, verificar que no se presenten fugas de solvente en el sistema.
- Evaporar el solvente en un baño de agua a 40°C, utilizando una corriente de nitrógeno para ayudar en la evaporación. El residuo remanente en el beaker es la grasa extraída. Pesar el balón de extracción y registrar en el formato de datos primarios y determinar la cantidad de grasa obtenida.

#### 4.2.3.2 Muestras de leche

- Acondicionar la muestra aproximadamente a 20°C con agitación magnética hasta que esté homogénea. Si hay presencia de grumos y estos no se disipan, calentar la leche en un baño de agua a una temperatura no mayor de 38°C y continuar mezclando hasta que esté homogénea.
- Dejar enfriar hasta aproximadamente 20°C.
- Pesar un beaker de 250 mL.
- Pesar 100 g de muestra y registrar el peso en el formato FOR-TC-180.
- Adicionar 11.5 mL de NH<sub>4</sub>OH al recipiente que contiene la muestra preparada y mezclar vigorosamente durante 1 minuto.
- Adicionar 3 gotas de indicador fenolftaleína para ayudar a diferenciar con mayor facilidad la fase acuosa de la fase etérea (Opcional).
- Adicionar 10 mL de alcohol etílico y agitar durante 15 segundos.
- Continuar con el proceso de extracción.

#### 4.2.3.3 Muestras de queso:

- Cortar la muestra en tirillas y pasar 3 veces a través de un procesador de alimentos, en caso de no contar con un procesador de alimentos, cortar o triturar finamente y mezclar vigorosamente.
- Pesar 10 g de muestra preparada dentro de un beaker de 250 mL y registrar el peso en el formato FOR-TC-180.
- Adicionar 50 mL de agua tipo I y 6 mL de NH<sub>4</sub>OH.
- Mezclar hasta obtener un fluido, calentar suavemente hasta que la caseína se haya suavizado completamente.
- Neutralizar el NH<sub>4</sub>OH con HCl concentrado utilizando papel indicador.
- Adicionar 20 mL de HCl fumante al 37% y algunas perlas de ebullición. Cubrir el beaker con un vidrio reloj y ebullición suavemente durante 5 minutos o calentar en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos.
- Enfriar la solución y transferir al recipiente embudo de separación.
- Lavar el beaker sucesivamente con 10 mL de alcohol etílico y continuar con el proceso de extracción.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión:</b> 1
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

#### 4.2.3.4 Muestras de leche deshidratada y productos derivados:

- Agitar vigorosamente de forma manual en el recipiente que contiene la muestra.
- Pesar aproximadamente 10 g de muestra bien mezclada en un tubo falcón de 50 mL y registrar el peso en el formato FOR-TC-180.
- Adicionar 30 mL de agua tipo I (25.5 mL para productos derivados) y agitar hasta homogeneidad con la ayuda del vortex. Calentar si es necesario.
- Adicionar con micropipeta entre 3 – 3.75 mL de NH<sub>4</sub>OH (4,5 mL para productos derivados) y calentar en baño de agua entre 60 – 70°C durante 15 minutos, agitando de forma manual ocasionalmente.
- Transferir la mezcla en un embudo de separación.
- Adicionar con probeta 10 mL de alcohol etílico y mezclar.
- Continuar con el proceso de extracción.

#### 4.2.3.5 Muestras de huevos líquidos:

- Pesar la cantidad de muestra homogénea correspondiente según la Tabla 1 en un tubo falcón de 50 mL y registrar el peso en el formato FOR-TC-180.
- Lentamente adicione con micropipeta 30 mL de HCl fumante al 37%. Agite vigorosamente con el vortex.
- Caliente en un baño de agua a 70°C y lleve hasta ebullición. Continúe la ebullición durante 30 minutos agitando cada 5 minutos de forma manual.
- Retire el recipiente del calor y transfiera la muestra a un embudo de separación.
- Enfríe a temperatura ambiente.
- Continuar con el proceso de extracción.


La siguiente tabla detalla el tamaño de muestra requerido según la porción de huevo que se desea analizar:

Tamaño de la muestra	10 g	15 g	20 g
Tipo de huevo	Yema de huevo	Huevo crudo	Claras de huevo

**Tabla 1.** Peso para las muestras de huevo.

#### 4.2.3.6 Muestras de huevos deshidratados:

- Pesar 10 g de muestra homogenizada en un tubo falcon de 50 mL y registrar el peso en el formato FOR-TC-180.
- Lentamente adicionar con micropipeta 30 mL de HCl concentrado, procurando arrastrar cualquier partícula de huevo que haya quedado adherida a las paredes.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

- Caliente en un baño de agua a 70°C y lleve hasta ebullición. Continúe la ebullición durante 30 minutos agitando cada 5 minutos.
- Retire el recipiente del calor.
- Transferir la muestra a un embudo de separación.
- Continuar con el proceso de extracción.

#### 4.2.4 Extracción de grasa


##### Primera extracción

- Adicionar 25 mL de éter etílico, sellar el recipiente y agitar vigorosamente durante 1 minuto, siendo cuidadoso de liberar periódicamente la presión generada.
- Adicionar 25 mL de éter de petróleo, sellar el recipiente y agitar vigorosamente durante 1 minuto, siendo cuidadoso de liberar periódicamente la presión generada.
- Decantar la solución etérea en un beaker de capacidad mínima de 100 mL, previamente desengrasado y seco, evitando el derrame de cualquier sólido o fase acuosa dentro del recipiente.
- El beaker debe estar desengrasado con acetona y se debe secar en la estufa a 103°C por 1 hora. El peso del beaker vacío y seco se registra en el formato FOR-TC-180.

##### Segunda extracción

- Adicionar 5 mL de alcohol etílico, sellar el recipiente con el tapón humedecido con agua y agitar durante 15 segundos.
- Adicionar 15 mL de éter etílico, sellar el recipiente y agitar vigorosamente durante 1 minuto, siendo cuidadoso de liberar periódicamente la presión generada.
- Adicionar 15 mL de éter de petróleo, sellar el recipiente y agitar vigorosamente durante 1 minuto, siendo cuidadoso de liberar periódicamente la presión generada.
- Decantar la solución etérea en el mismo beaker que se decantó la primera extracción, evitando el derrame de cualquier sólido o fase acuosa dentro del beaker.
- Evaporar el solvente en un baño de agua a 40°C, utilizando una corriente de nitrógeno para ayudar en la evaporación. El residuo remanente en el beaker es la grasa extraída. Pesar el beaker y registrar en el formato de datos primarios FOR-TC-180.

##### 4.2.4.1 Clean Up

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

### Lavado ácido-base

- Adicionar 10 mL de n-hexano a la copa de extracción o al vaso de precipitados y transferir a un embudo de separación de 250 mL, realizar tres lavados consecutivos con 5 mL n-hexano cada uno y transferir al embudo de separación.
- Adicionar al embudo de separación 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitar por 2 minutos; realizar liberación de gases para disminuir la presión del embudo y así evitar accidentes. Separar fases, descartar el ácido, repetir este proceso hasta que no se aprecie color en la fase ácida, no realizar más de 4 limpiezas.
- Adicionar 40 mL de una solución al 5% de cloruro de sodio, agitar por 2 minutos, remover y descartar la fase acuosa.
- Recoger la fase de n-hexano en un tubo de centrifuga de 50 mL que contiene 0.5 g de sulfato de sodio anhidro.

### Lavado Silica/Alumina


- Al extracto obtenido en el paso anterior adicionar 500 mg de silica gel y 500 mg de alúmina neutra, tapar el tubo de ensayo, agitar por un minuto y centrifugar (7500 rpm, 3 min). Transferir el contenido del tubo a otro tubo de ensayo limpio.

### Lavado carbón grafitizado

- Al extracto obtenido en el paso anterior adicionar 500 mg de carbón grafitizado, tapar el tubo de ensayo, agitar por un minuto y centrifugar (7500 rpm, 3 min). Transferir el contenido del tubo a otro tubo de ensayo limpio. Concentrar el extracto hasta sequedad.
- Reconstituir el extracto con 1 mL de diclorometano y filtrar por poro de 0.22 µm. La muestra queda lista para su análisis cromatográfico.

### 4.2.5 Condiciones cromatográficas

<b>GC Column:</b>	5ms (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm df)	<b>Flow Mode:</b>	Constant linear velocity (36.7 cm/s)
<b>Inj. Mode:</b>	Splitless	<b>Interface Temp:</b>	300 °C


	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

**GC Oven Temp:** 200 °C for 2 minutes, 5 °C / min to 220 °C hold for 16 min, 5 °C / min to 235 °C hold for 7 min, 5 °C / min to 330 °C hold for 5 min  
**Ion Source Temp:** 230 °C  
**Sample:** 1 µL

Las dioxinas, furanos, PCB's y PAH's son determinados en el modo MRM.

#### 4.2.6 Curva de calibración


Ítem	Compuesto	Concentración pg/µL						
		Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7
1	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxin	0.1	0.5	2	5	25	50	200
2	2,3,7,8-Tetraclorodibenzofuran	0.1	0.5	2	5	25	50	200
3	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo-p-dioxin	0.1	0.5	2	5	25	50	200
4	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofuran	0.1	0.5	2	5	25	50	200
5	2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran	0.1	0.5	2	5	25	50	200
6	1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxin	0.2	1	4	10	50	100	400
7	1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxin	0.2	1	4	10	50	100	400
8	1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzo-p-dioxin	0.2	1	4	10	50	100	400
9	1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzofuran	0.2	1	4	10	50	100	400
10	1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzofuran	0.2	1	4	10	50	100	400
11	1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzofuran	0.2	1	4	10	50	100	400
12	2,3,4,6,7,8-Hexaclorodibenzofuran	0.2	1	4	10	50	100	400
13	1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo-p-dioxin	0.2	1	4	10	50	100	400
14	1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzofuran	0.2	1	4	10	50	100	400
15	1,2,3,4,7,8,9-Heptaclorodibenzofuran	0.2	1	4	10	50	100	400
16	Octaclorodibenzo-p-dioxin	0.5	2.5	10	25	125	250	1000
17	Octaclorodibenzofuran	0.5	2.5	10	25	125	250	1000
18	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxin (13C12)	10	10	10	10	10	10	10
19	2,3,7,8-Tetraclorodibenzofuran (13C12)	10	10	10	10	10	10	10
20	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo-p-dioxin (13C12)	10	10	10	10	10	10	10
21	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofuran (13C12)	10	10	10	10	10	10	10


	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

22	2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofuran (13C12)	10	10	10	10	10	10	10
23	1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxin (13C12)	20	20	20	20	20	20	20
24	1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxin (13C12)	20	20	20	20	20	20	20
25	1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzo-p-dioxin (13C12)	20	20	20	20	20	20	20
26	1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzofuran (13C12)	20	20	20	20	20	20	20
27	1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzofuran (13C12)	20	20	20	20	20	20	20
28	1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzofuran (13C12)	20	20	20	20	20	20	20
29	2,3,4,6,7,8-Hexaclorodibenzofuran (13C12)	20	20	20	20	20	20	20
30	1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo-p-dioxin (13C12)	20	20	20	20	20	20	20
31	1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzofuran (13C12)	20	20	20	20	20	20	20
32	1,2,3,4,7,8,9-Heptaclorodibenzofuran (13C12)	20	20	20	20	20	20	20
33	Octaclorodibenzo-p-dioxin (13C12)	50	50	50	50	50	50	50
34	Octaclorodibenzofuran (13C12)	50	50	50	50	50	50	50
35	1,2,3,4-Tetraclorodibenzo-p-dioxin (13C6)	10	10	10	10	10	10	10
36	1,2,3,4-Tetraclorodibenzo-p-dioxin (13C12)	10	10	10	10	10	10	10
37	1,2,3,4,6,9-Hexaclorodibenzofuran (13C12)	20	20	20	20	20	20	20
38	1,2,3,4,6,8,9-Heptaclorodibenzofuran (13C12)	20	20	20	20	20	20	20

### 4.3 INFORME

Los datos serán registrados en el formato FOR-TC- 180 "Formato para el registro de datos primarios de Dioxinas, Furanos, PAHs y PCBs"

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

	Formato para el registro de datos primarios de Dioxinas, Furanos, PAH's y PCB's en alimentos	<b>Identificación:</b>	<b>FOR-TC-180</b>
		<b>Revisión:</b>	<b>1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b>	<b>2021-09-24</b>
<sup>(1)</sup> Realizó	<sup>(2)</sup> Metodología:	<sup>(7)</sup> EQUIPOS USADOS EN EL ANÁLISIS	
<sup>(3)</sup> Fecha inicio:	<sup>(5)</sup> Fecha final:	Equipo/N° Inventario	Balanza analítica (006 - 235)
<sup>(4)</sup> Hora inicio:	<sup>(6)</sup> Hora final:	Equipo/N° Inventario	Estufa de secado (002)
<sup>(10)</sup> Reactivos		Equipo/N° Inventario	Balanza analítica (006 - 235)
Éter de petróleo	Éter etílico	Equipo/N° Inventario	Equipo Soxhlet (083)
Amoniaco	Dedales de celulosa		Cromatógrafo de gases-masas (0425)
Ácido Sulfúrico	n-Hexano		Automuestreador AOC-6000 (0427)
	Solución NaCl		
<sup>(12)</sup> Id Muestra	<sup>(13)</sup> Masa de muestra (g)	<sup>(14)</sup> Tipo de muestra	<sup>(15)</sup> Peso beaker vacío (m <sub>0</sub> )
			<sup>(16)</sup> Peso beaker mas grasa (m <sub>1</sub> )
			<sup>(17)</sup> Peso beaker mas grasa (m <sub>2</sub> )
		<sup>(18)</sup> Matriz	<sup>(19)</sup> Reporte
			<sup>(20)</sup> Observaciones

- Calcule el porcentaje de grasa:

$$\%grasa = \frac{m2 - m0}{W}$$

Donde:

*m2*: Peso del beaker más grasa

*m0*: Peso del beaker vacío.

*W*: Peso de la muestra

La concentración de las dioxinas y furanos en las muestras es calculada automáticamente por el software, cargando el método con su respectiva curva de calibración.

Los resultados son calculados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Cp = \frac{A + I}{m}$$

*Cp*: Concentración de la dioxina y furano en pg/μL

*A*: Área del pico

*I*: Intercepto de la curva


*m*: Pendiente de la curva

*FD*: Factor de dilución

$$C = \frac{Cp}{w}$$

*C*: Concentración plaguicida en pg/g

*w*: Peso de la muestra en g

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

#### 4.4 CONTROL DE LA CALIDAD

El tipo, periodicidad y criterios de aceptación para los resultados obtenidos de los ensayos para el control de calidad se resumen en la tabla siguiente:

CONTROL	PERIODICIDAD	CRITERIO
Verificación de la contaminación de los reactivos (Blanco de reactivos)	En cada lote de ensayo	Se debe de hacer corrección en los resultados de las muestras de los picos obtenidos.
Duplicado por matriz	Cada que se realiza el ensayo	El coeficiente de variación obtenido debe ser menor o igual al 10%.

#### 5 RESPONSABILIDADES.

##### Director técnico.


- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

##### Director de Calidad.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.
- Revisar los resultados obtenidos del aseguramiento de calidad del método.
- Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

##### Líder de Laboratorio.

- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de Dioxinas y Furanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-220</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-04-03</b>

salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.

- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.
- Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.
- Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

#### **Analista.**

- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio
- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.
- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.
- Realizar el análisis de los resultados de control de calidad de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-077
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.
- Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.
- Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

#### **6 FORMATOS RELACIONADOS.**

FOR-TC- 180 "Formato para el registro de datos primarios de Dioxinas, Furanos, PAHs y PCBs".

#### **7 ANEXOS**

No Aplica