



Acta Universitaria

ISSN: 0188-6266

actauniversitaria@ugto.mx

Universidad de Guanajuato

México

Velázquez Chong, Laura Renné; Rodríguez Valdés, Osvaldo Nicolás; Soto Alvarado, Sonia del Carmen; Rodríguez Ventura, Guillermo; Escoboza García, Isabel; Sánchez López, Eduardo
Desarrollo de un método analítico para compuestos anabólicos utilizando GC / PTV /EI / MS

Acta Universitaria, vol. 19, núm. 3, septiembre-diciembre, 2009, pp. 33-39

Universidad de Guanajuato

Guanajuato, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41613097005>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Desarrollo de un método analítico para compuestos anabólicos utilizando GC / PTV / EI / MS*

Laura Renné Velázquez Chong*, Osvaldo Nicolás Rodríguez Valdés*, Sonia del Carmen Soto Alvarado*, Guillermo Rodríguez Ventura**, Isabel Escoboza García*** y Eduardo Sánchez López*.

RESUMEN

El empleo de un inyector de temperatura programable (PTV), a diferencia de los clásicos inyectores isotérmicos en los sistemas acoplados de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS), ha abierto nuevas vías analíticas en la determinación de diferentes familias de compuestos utilizados como promotores de crecimiento con actividad anabólica en el ganado de engorda. Con la combinación analítica GC/PTV/EI/MS se ha creado un método confiable de medición que permite la detección e identificación estructural de diferentes familias de compuestos anabólicos naturales y sintéticos en tejido animal, a niveles de ultratrazas con límites de cuantificación de hasta 0,25 µg/kg. Este desarrollo representa una alternativa en el análisis de los compuestos anabólicos Dietilestilbestrol, Zeranol y Taleranol, monitoreados por la Norma Oficial Mexicana NOM-034-ZOO-1996. El método desarrollado elimina pasos en el tratamiento de la muestra y en el inyector PTV se hace una limpieza adicional de la matriz y las reacciones de derivatización de estos compuestos se realizan con presiones y temperaturas controladas, donde la recuperación en músculo de bovino está entre 70% y 120%.

ABSTRACT

The use of a programmable temperature vaporizing injector (PTV), unlike the classic isothermal injectors in coupled gas chromatography/mass spectrometry systems (GC/MS), has opened new analytical pathways in the determination of different families of anabolically active compounds used as growth promoters in cattle fattening. With the analytical combination of GC/PTV/EI/MS a reliable method of measurement has been created that allows the detection and structural identification of different families of natural and synthetic anabolic compounds in animal tissues, at ultratrace levels with quantification limits up to 0,25 µg/kg. This new method represents a valuable alternative in the analysis of the anabolic compounds Dietilestilbestrol, Zeranol and Taleranol, monitored by the Official Mexican Norm NOM-034-ZOO-1996, because it reduces the steps required in the treatment of the sample, and in the PTV injector an additional cleaning of the reaction matrix is done, and the derivatization reactions of these compounds are done under controlled pressure and temperature with a recovery in the bovine muscle of between 70 and 120%.

Recibido: 12 de Enero de 2009
Aceptado: 15 de Mayo de 2009

INTRODUCCIÓN

El control de residuos de compuestos anabólicos en la producción pecuaria ha sido sugerido por las organizaciones internacionales de la FAO y OMS desde 1973 (OEI, 1983; Hanrahan, 1996). Las limitaciones de las técnicas analíticas hasta la última década del siglo pasado, han restringido de manera considerable los estudios profundos sobre los efectos en la salud humana de los residuos de compuestos con actividad anabólica empleados para lograr una mayor eficiencia en la producción pecuaria, por medio de implantes y aditivos en las dietas animales.

Los datos analíticos y la evidencia científica han sido insuficientes para poder determinar el nivel en el cual la presencia residual en tejido, orina

Palabras clave:
Anabólicos; GC / PTV / EI /MS; Método analítico.

Keywords:
Anabolic; GC / PTV / EI /MS; Analytical method.

* Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Laboratorio de Toxicología Analítica, Km. 3.5 Carretera Mexicali-San Felipe, Fracc. Campestre S/N C.P. 21386, Mexicali, Baja California, México. Correo electrónico: osvr_jim@hotmail.com.

** Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Calzada Tecnológico S/N. Delegación Mesa de Otay, Tijuana, Baja California, México.

*** Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ciencias Agrícolas, Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California.

* Proyecto financiado por la Fundación PRODUCE para la Investigación Agropecuaria y Forestal del Estado de Baja California, A. C.

y suero, pueden tener una repercusión dañina en la salud humana, por lo que a nivel mundial aún no se ha definido un valor por debajo del cual sea seguro su uso (FSIS-USDA, 1991).

Ante esto, los organismos mundiales han recomendado que en los países donde se realizan estas prácticas, su uso sea monitoreado de forma obligatoria, principalmente para constatar que se han cumplido los tiempos para el retiro de los implantes, y así asegurar que los niveles residuales han disminuido y que son de alguna forma inocuos para el consumo humano.

Tratando de tener un mayor control de los niveles residuales de los compuestos anabólicos se han ensayado muchas combinaciones analíticas (Cunniff *et al.*, 1996; Brittain *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 2002), como el sistema Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas/Espectrometría de Masas (GC/MS/MS) para la familia de Estilbenos (Wilson *et al.*, 1997); el sistema Cromatografía líquida/Espectroscopía Ultravioleta Visible/Detector de Arreglo de Diodos (LC/UV/DAD) para el presuntivo de trembolona; para los β -agonistas el sistema Cromatografía de Líquidos/Espectrometría de Masas/Espectrometría de masas (LC/MS/MS), en las hormonas 17β , 17α y 19-nortestosterona LC/MS/MS y el Cloranfenicol Cromatografía de gases/Ionización Negativa-ionización Química (GC/NICI).

Dentro de los sistemas de inyección en los sistemas GC/MS, el inyector de temperatura programable es, sin duda una de las innovaciones tecnológicas con muchas ventajas analíticas (Wylie, 1997) para el análisis de sub-ultratrazas (10^{-12} a 10^{-15})g, donde es posible inyectar grandes volúmenes de muestra, además de una concentración adicional de la muestra analizada, todo esto sin degradar térmicamente el analito de interés. En estos sistemas de inyección indirecta, se retiene el analito inyectado un lapso de tiempo antes de pasar al sistema cromatográfico, permitiendo inyecciones múltiples.

La técnica de silanización (Supelco, 1997; Agilent, 1999; Knapp, 1979) ha sido aplicada ampliamente con los inyectores tradicionales en caliente en los sistemas de cromatografía gaseosa con un procedimiento de inyección directa, la cual provoca problemas de descomposición térmica, radicando los mayores en la repetibilidad y reproducibilidad analítica, pues se hace manualmente. En esta reacción el átomo de hidrógeno del analito se reemplaza por un átomo de silicio al que se le encuentra unido a grupos adecuados dando como origen a los derivados trimetilsilil (TMS), siendo el producto resultante más volátil y de baja polaridad,

ideales para el análisis en los sistemas GC/MS (Rosso *et al.*, 2003). El objetivo de este trabajo fue realizar un método alternativo a la norma Oficial Mexicana NOM-034-ZOO-1996 para el análisis de residuos de compuestos anabólicos con una configuración instrumental sencilla de GC/MS que pueda ser aplicable en los laboratorios de constatación en salud animal, autorizados y aprobados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación del Servicio Nacional, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, así como disminuir los pasos de tratamiento de la muestra, evitar la degradación que se produce en los inyectores *split-splitless* y llevar a cabo la silanización de estos compuestos con presión, temperatura y humedad controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipamiento

Para la preparación de las soluciones madre y de trabajo, se utilizó una balanza analítica OHAUS AP210S, micropipetas VWR de (10-100) μ L y (20-200) μ L. Los instrumentos empleados en la preparación de la muestra, la extracción líquido-líquido y la silanización, fueron los siguientes: balanza analítica OHAUS Explorer, número de Informe LMC-CCE1798/07, fecha de calibración de 30 de marzo 2007; potenciómetro Benchtop VWR Scientific 8000, verificada con soluciones tampón trazables al SI de unidades, respectivamente; incubadora Fisher Isotemp ajustada a (37 \pm 0,5) $^{\circ}$ C; agitador mecánico horizontal Eberbach 6010; centrífuga Varifuge modelo 4656 con capacidad de hasta 6000 rpm; agitador vórtex Genie2; evaporador de Nitrógeno Nvap 116 de 36 posiciones.

Instrumentación analítica

Se utilizó un espectrómetro de masas con fuente de ionización de impacto electrónico GC/MS 6890/5973 Agilent Technologies, con un inyector de temperatura programable (PTV), y un sistema automatizado de inyección de muestras, Agilent Technologies 7683.

Reactivos y preparación de las muestras

Preparación de las soluciones madre

Todas las soluciones madre fueron diluidas con metanol Unisolv, Spectrum Lote LJ0229. Las soluciones una vez preparadas se almacenaron a temperaturas de congelación (-4 $^{\circ}$ C), en viales ámbar con tapón de rosca y septa de PTFE/silicona.

Se pesó 10 mg de Dietilestilbestrol, (DES), Sigma Aldrich, 99,00% pureza, lote 096K1041 y se diluyó en un matraz volumétrico clase A de 100 mL. El Zeranol, (ZER), Sigma Aldrich, 99,85% de pureza, lote 045K4064 y el Taleranol, (TAL) Sigma Aldrich, 99,5% de pureza lote 124K4032, se diluyeron por separado tomando la masa total del contenido del frasco cuyo peso proporcionado por el fabricante es de 1 mg, como el peso de referencia y se diluyeron en matraces ámbar tipo A de 10 mL.

En todos los casos se obtuvieron concentraciones para las soluciones madre de 100 mg/L.

Preparación de la solución de trabajo empleada en la construcción de la curva de calibración y en la fortificación de muestras

De las soluciones madre preparadas, se tomaron 5 μ L de DES y 10 μ L de ZER y TAL los cuales se diluyeron a la marca con Metanol Unisolv, Spectrum, Lote LJ0229 en un matraz volumétrico clase A de 10 mL, para a partir de esta mezcla construir una curva de calibración con las siguientes concentraciones, para DES (0,25 , 0,5 , 1,0 , 2,0, 4,0) μ g/kg, y para ZER y TAL (0,5 , 1,0 , 2,0, 4,0 , 8,0) μ g/kg.

Preparación de la solución de trabajo de 1 000 μ g/mL

Esta solución se empleó para el ajuste del sistema de espectrometría de masas GC/PTV/EI/MS, de los *tiempos de ventana* en el modo SCAN y previo a la medición en SIM.

De las soluciones madre preparadas separadamente, se tomó 100 μ L de cada uno de los anabólicos y se aforó con Metanol Unisolv, Spectrum, Lote LJ0229 en un matraz volumétrico clase A de 10 mL.

Pesada de la muestra

Se pesó 5,0 g (0,005 kg) de muestra en una balanza analítica OHAUS EXPLORER con fecha de calibración de 30 de marzo 2007, número de Informe LMC-CCE1798/07.

Preparación de la recuperación 1 y 2

Se pesó por separado 0,005 kg de muestra, en tubos de polipropileno de 50 mL con tapón de rosca, a cada uno se les adicionó 100 μ L de la solución de trabajo 100 μ g/L para tener como valores de recuperación para DES de 1,0 μ g/kg, y para ZER y TAL 2,0 μ g/kg.

Ajuste de pH de la muestra

Posterior a la preparación de recuperación se realizó el ajuste del pH de la muestra en una solución amor-

tiguadora de acetato de sodio trihidratado G. R. 0,04M para obtener un pH final de 4,50 con ácido acético al 5% v/v, utilizando una pipeta mohr de 10 mL, se adicionó posteriormente 100 μ L (aproximadamente 10 000 unidades/mL) de β -glucuronidasa tipo HP2S, Sigma, Aldrich, con una micropipeta VWR 20-200 μ L. Se dejó en incubación por 18 horas a (37 \pm 0.5)°C.

Extracción líquido-líquido

Se adicionó 16 mL de acetonitrilo HPLC y se agitó mecánicamente por 5 minutos en un agitador horizontal Eberbach 6010 y se centrifugó a 3 500 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante a otro tubo de polipropileno de 50 mL, para posteriormente agregarle 2 mL de diclorometano HPLC, Fermont, número de lote 846133 y 8mL n-hexano 95%, HPLC, Fermont, número de lote 809133, agitándose por dos minutos y se centrifugó a 2 500 rpm por 5 minutos.

Una vez separadas las 3 fases, se extrajo la fase intermedia a los tubos de centrifuga de vidrio y se repitió la secuencia adicionándole 4 mL de acetonitrilo, se agitó mecánicamente por dos minutos y se centrifugó a 2 500 rpm por cinco minutos, se transfirió el volumen de acetonitrilo en su totalidad a un tubo de centrifuga de 15 mL y se llevó a sequedad por corriente suave de Nitrógeno a 60 °C. Este extracto puede ser viable hasta por una semana si se almacena en congelación, si se elimina completamente el disolvente de extracción.

Obtención del extracto (muestra problema, recuperación, blanco muestra)

El extracto final ya evaporado en su totalidad se reconstituyó en 400 μ L de Metanol, y de éste se tomo una aliquota de 200 μ L que fue depositado en un inserto de vidrio desactivado (silanizado) de 250 μ L, soportado en viales de 2 mL ámbar y evaporado a la sequedad en seco a temperatura ambiente. Finalmente se reconstituyó en 80 μ L de acetato de etilo anhidro y 70 μ L (bis-trimetilsililtrifluoroacetamida/trimetilsililmidazol) BSTFA/TMSI 2 % v/v.

Procedimiento analítico

Programa de Operación (OP)

Injector

Tipo de inyector:	PTV. Modo de inyección venteo de solventes
Volumen de inyección:	3 inyecciones de 5 μ L, con demora entre inyección de 3 segundos
Tipo de inyección:	Automática
Presión:	12,00 psi
Tiempo de venteo:	4 min
Flujo de venteo:	400,0 mL/min

Presión de venteo:	0,0 psi
Flujo de purga:	50,0 mL/min
Tiempo de purga:	6,00 min
Flujo:	54,4 mL/min
Ahorro de gas:	Activado
Flujo de ahorro de gas:	35,0 mL/min
Tiempo de inicio del ahorro:	4,00 min
Gas acarreador:	Helio cromatográfico (99,998% pureza, Infra)
Programa de temperatura del inyector:	60 °C (4 min), incrementar 200 °C/min hasta 300 °C (2 min), disminuir 100 °C/min hasta 100 °C (3 min), disminuir 50 °C/min hasta 55 °C (21 min)
Disolventes de limpieza:	A: Metanol B: Acetato de etilo
Programa de enjuague de la jeringa:	Sample Washes: 2 Sample Pumps: 3 Post Inj solv A washes: 3 Post Inj Solv B washes: 3
Horno	
Columna:	J&W Scientific DB-5MS (5% de metilsilicona), 25 m, DI 0,25 mm, grosor película de 0,25 μ m
Modo:	Presión constante
Presión:	≈ 12,00 psi
Flujo nominal inicial:	≈ 1,6 mL/min
Velocidad promedio:	≈ 51 cm/seg Helio
T°C máxima de columna:	325 °C
Programa de temperatura del horno:	60 °C (7,20 min), incrementar 30 °C/min hasta 130 °C (1 min), incrementar 30 °C/min hasta 230 °C (1 min), incrementar 5 °C/min hasta 295 °C (1 min)
T°C de interfase:	250 °C

Medición en el sistema GC/EI/PTV/MS.

1. Inyectar 15 μ L de la solución de referencia de hormonas 10 ng/mL en modo SCAN para ajuste de los *tiempos de ventana (dwell)* para medición de SIM.
2. Inyectar 15 μ L de la curva de calibración, para ver las interferencias del blanco, el cálculo de las recuperaciones para las muestras de tejido fortificadas y las muestras problema mediante el procedimiento de la técnica de Monitoreo de Iones selectivos (SIM).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la utilización del inyector de vaporización de temperatura programable PTV, es posible realizar inyecciones múltiples con volúmenes de hasta un mL, que estará en dependencia de la complejidad de la matriz. En el caso del método desarrollado para el análisis de residuos de compuestos anabólicos en tejido de ganado bovino, se realizan 3 inyecciones de 5 μ L en intervalos de 3 segundos entre inyección e inyección en donde el extracto de tejido se mezcla con los agentes

derivatizantes BSTFA/TMSI con un programa de inyección automática. Las muestras en el interior del inyector se concentran, con un programa de temperatura que durante 4 min se corta el flujo hacia la columna para permitir la formación de los derivados de los compuestos anabólicos analizados y eliminar la interferencia del exceso de estos reactivos a través del flujo de *Split* de 400 mL/min y con un programa de calentamiento rápido, en 2 minutos a (60-300) °C, se lleva a cabo la reacción de derivatización en el puerto de inyección. La cantidad de la muestra inyectada se concentra en el *liner* del inyector. Los anabólicos se adhieren a las paredes del *liner* y mediante el programa de temperatura, el disolvente es eliminado por la válvula de escape, la cual es programada de acuerdo a la metodología desarrollada en el laboratorio (Velázquez *et al.*, 2007, Rodríguez *et al.*, 2007).

La temperatura de evaporación de los anabólicos tienen en todos los casos una diferencia mayor al punto de vaporización de solvente, que debe ser de 10 °C por arriba del punto de vaporización de los compuestos analizados al menos, de lo contrario, sería una fuente de incertidumbre considerable. El programa de temperatura del inyector fue optimizado para la reacción de derivatización de los anabólicos. En la norma oficial mexicana este proceso se lleva a cabo sin control de temperatura, presión y humedad del ambiente, en nuestro método, el inyector tiene una gran ventaja porque evita la degradación térmica propia de los analitos en los inyectores *split/splitless*. Otra ventaja del método desarrollado es que permite la limpieza adicional de la muestra en el inyector, eliminando el uso de las columnas de limpieza y del preparador de muestra empleado en la norma (NOM-034-ZOO-1994). El proceso de preparación y medición de la muestra se realiza en menos etapas.

La repetibilidad del método se calculó realizando 10 inyecciones, en concentración de 10 μ g/kg, se obtuvieron coeficientes de variación por debajo del 30 %, esto es representado en la Figura 1. El método permite realizar mediciones de la familia de compuestos estilbenos como el hexestrol, dienestrol y dietilestilbestrol, de hormonas naturales como la testosterona, 17- α -estradiol, 17- β -estradiol, estrona y progesterona y de xenobióticos no estilbenos como zearanol, taleranol, acetato de trembolona y zearalanona, de igual forma es posible determinar los metabolitos relacionados con los anabólicos estudiados y además de sus productos de isomerización, un resumen se presenta en la Tabla 1.

La linealidad de método para el Dietilestilbestrol, Zeranol y Taleranol, se representan en las Tablas 2, 3 y 4 respectivamente, en las tablas podemos observar datos estadísticos importantes como la sensibilidad

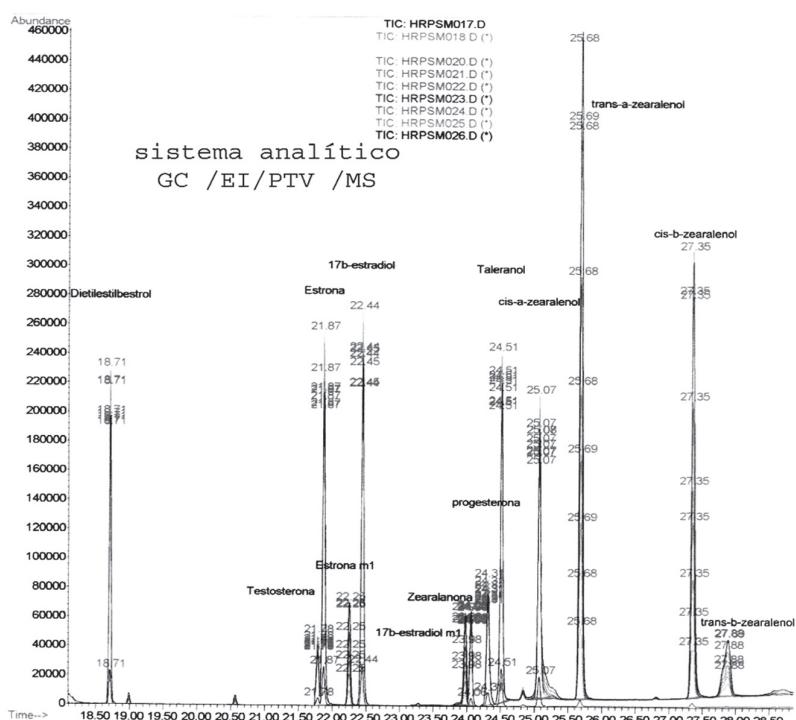


Figura 1. Repetibilidad de los compuestos anabólicos estudiados en el método desarrollado, 5 μ g/kg, modo SIM.

Tabla 1. Datos para la cuantificación optimizada de compuestos anabólicos por GC/PTV/EI/MS

Familia de anabólicos	Ion molecular	Pico Base	Pérdidas significativas	Monitoreo de ion (dwell)	Límites de detección µg/kg
Estilbenos					
Hexestrol	414	207	399, 385	108	0,10
Dienestrol	410	410	395, 381	110	0,25
Dietilestilbestrol	412	412	397, 383	114	0,25
Hormonas naturales					
Testosterona	360	129	345, 270, 129	103	0,25
17-β-Estradiol	416	416	401, 285, 129	134	0,50
17-α-Estradiol	416	416	401, 285, 129	125	0,50
Estrona	342	342	327, 314, 257	87	0,25
Progesterona	314	124	299, 124	141	0,25
Xenobióticos no Estilbénicos					
Zeranol (α-Zearalanol)	538	433	523, 433	166	0,25
Taleranol (β-Zearalanol)	538	433	523, 433	134	0,25
Acetato de Trembolona	312	252	270, 252, 43	147	1,00
Zearalanona	449	464	449, 307	208	0,25

de calibración, el estimador de interferencia, la desviación estándar de la pendiente, del intercepto y la linealidad del método con coeficientes de correlación superiores a 0,997, que cumplen con los requisitos de la NOM-034-ZOO-1996 que son parámetros muy importantes para monitorear la calidad analítica del método.

Los parámetros instrumentales más importantes del inyector de temperatura programable relacionados con la apertura y cierre de la válvula para la eliminación del exceso de disolventes, derivatizantes y coextractos de la matriz de tejido, fueron descritos en el programa de operación del procedimiento analítico, donde se observan los parámetros detallados del método como el flujo de *Split*, el flujo de purga que son tiempos óptimos que se deben de mejorar para evitar la pérdida de los residuos de anabólicos, de lo contrario los anabólicos derivatizados se pudieran perder a través de la válvula del *Split* en donde el tiempo optimizado es de 4 minutos y esto fue logrado haciendo experimentos de programación de la válvula de *Split*, desde (1-6) min.

Dado que el objetivo de este trabajo es principalmente técnico, la forma de estimación de la existencia de una ventaja económica del método aquí planteado aunque no es exhaustiva permite complementar la definición de la factibilidad de la propuesta, por lo que considera una evaluación parcial del costo por análisis con base en tres rubros de costos: equipo, remuneraciones del personal y materiales utilizados. Con respecto a los costos asociados al equipo considerando un precio de \$1 019 506 pesos mexicanos, tomando como base una vida útil del equipo de cinco años (periodo de amortización) y una capacidad diaria de trabajo de \$19,20 pesos mexicanos, se determinó que por

Tabla 2.
Resumen de los parámetros estadísticos del método desarrollado para DES.

Parámetro	
Número de datos, n	15
Sensibilidad de calibración (pendiente), b	22 197,6064
Estimador de interferencia (intercepto), a	239,9762
Ecuación de la recta, $y=bx+a$	22 197,6064 x +239,9762
Coeficiente de correlación, r	0,9971
Coeficiente de determinación, r^2	0,9942
Estimadores de incertidumbre	
Incertidumbre de la calibración (error aleatorio), $100 \cdot r^2$	0,5756%
Test de correlación, (t_r)	47,3851
Varianza de la regresión, S^2_{xy}	396 978,3515
Desviación estándar de la pendiente, S_b	468,4510
Desviación estándar del intercepto, S_a	241,1499
$t_{95\% \text{ confianza}}, n-2 \text{ grados de libertad}, t_{95\% \text{ confianza}}, n-2 \text{ g.l.}$	2,16
Intervalo de confianza de la pendiente, $b=b \pm S_b$	22 197,6064 \pm 1011,8541
Intervalo de confianza del intercepto, $a=a \pm S_a$	239,9762 \pm 520,8838

Tabla 3.
Resumen de los parámetros estadísticos del método desarrollado para ZER.

Parámetro	
Número de datos, n	15
Sensibilidad de calibración (pendiente), b	26 225,4222
Estimador de interferencia (intercepto), a	-3881,0889
Ecuación de la recta, $y=bx+a$	26 225,4222 x -3881,0889
Coeficiente de correlación, r	0,9972
Coeficiente de determinación, r^2	0,9945
Estimadores de incertidumbre	
Incertidumbre de la calibración (error aleatorio), $100 \cdot r^2$	0,5524%
Test de correlación, (t_r)	48,3790
Varianza de la regresión, S^2_{xy}	1322 3416,1983
Desviación estándar de la pendiente, S_b	542,0827
Desviación estándar del intercepto, S_a	1334,7239
$t_{95\% \text{ confianza}}, n-2 \text{ grados de libertad}, t_{95\% \text{ confianza}}, n-2 \text{ g.l.}$	2,16
Intervalo de confianza de la pendiente, $b=b \pm S_b$	26 255,4222 \pm 1170,8987
Intervalo de confianza del intercepto, $a=a \pm S_a$	-3881,0889 \pm 2883,0037

Tabla 4.
Resumen de los parámetros estadísticos del método desarrollado para TAL.

Parámetro	
Número de datos, n	15
Sensibilidad de calibración (pendiente), b	28 073,8278
Estimador de interferencia (intercepto), a	-2459,7986
Ecuación de la recta, $y=bx+a$	28073,8278 x - 2459,7986
Coeficiente de correlación, r	0,9976
Coeficiente de determinación, r^2	0,9952
Estimadores de incertidumbre	
Incertidumbre de la calibración (error aleatorio), $100 \cdot r^2$	0,4795%
Test de correlación, (t_r)	51,9411
Varianza de la regresión, S^2_{xy}	1314 5981,6358
Desviación estándar de la pendiente, S_b	540,4932
Desviación estándar del intercepto, S_a	1330,8102
$t_{95\% \text{ confianza}}, n-2 \text{ grados de libertad}, t_{95\% \text{ confianza}}, n-2 \text{ g.l.}$	2,16
Intervalo de confianza de la pendiente, $b=b \pm S_b$	28 073,8278 \pm 1167,4654
Intervalo de confianza del intercepto, $a=a \pm S_a$	-2459,7986 \pm 2874,5501

este concepto el costo por análisis es de \$40,84 pesos mexicanos, en el caso del rubro de remuneraciones tomando un gasto diario de \$750,00 pesos mexicanos el costo unitario asciende a \$39,06 pesos, finalmente en el caso de materiales se determinó que los consumibles asociados a la realización de un análisis suman un valor de \$26,20 pesos mexicanos, este costo sumado a los dos anteriores da un total de \$106,64 pesos mexicanos, valor que se ve como bajo tomando en cuenta el precio comercial que tiene este servicio, que es de \$900,00.

CONCLUSIONES

El método desarrollado puede ser una alternativa para los laboratorios de recursos promedio, para la determinación de los compuestos anabólicos de la Norma Oficial Mexicana, NOM-034-ZOO-1996, ya que resulta más económico debido a que el tratamiento de la muestra es más sencillo, y entre otras ventajas, se evita una degradación importante de los compuestos anabólicos en el puerto de inyección, lográndose límites de cuantificación de 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y recuperaciones aceptables, este valor es inferior a los límites de funcionamiento exigidos para los laboratorios de la Unión Europea, que para todos estos compuestos es superior a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. También es factible analizar otras familias de compuestos anabólicos, por lo que es posible realizar un análisis multiresiduos más exhaustivo.

REFERENCIAS

- Agilent Technologies. (1999) *Steroid-TMS Derivatives with the Ultra-Low-Bleed HP-5MS* Available from URL:<http://www.chem.agilent.com/cag/peak3-9/article13.html>
- Brittain, R. D., Goodridge, R., Ehorn, C. (1992). *Determination of Estradiol in Blood by GC/MSMS*. Varian, Inc. GC/MS Application Note Number 46. Available from URL:<http://www.varianinc.com/csb/gcmsnote/gcms.html>
- Cunniff, J., Tiller, P., Land, A., Wakefield, M. (1996). *Quantitative Analysis of Steroids in Complex Matrices by LC/MS/MS*. Finnigan. Application Report # 250. Publication number CS #96-0217-96.
- Fang, X., Chen, J., Guo, D., Wang, G. (2002). Detection and Identification of Zeranol in Chicken or Rabbit Liver by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*. 85(4) 841-848.
- Food Safety and Inspection Service, Science FSIS-USDA. (1991). *Determination and confirmation of Diethylstilbestrol/zeranol/Taleranol in Bovine and Ovine Tissues*. Chemistry Laboratory Guidebook.
- FSIS-USDA (1991). *Analytical Chemistry Laboratory Guidebook Residue Chemistry*. United States Department of Agriculture. United States.
- Hanrahan, C. E. (1996). *Carne tratada con hormonas. Prueba de las normas mundiales de seguridad alimentaria*. Junio. Publicación electrónica de USIS. I:6.
- Knapp, D. R. (1979). *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. John Wiley and Sons. New York. p.p. 8-10.
- NOM-034-ZOO-1996. (1996). *Determinación de Diethylstilbestrol, Zeranol y Taleranol en Hígado de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, aves, caprinos cérvidos por Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas*.
- OEI, Anabólicos en Producción Pecuaria (1983). *Aspectos de salud pública: métodos de análisis y reglamentaciones*. Simposio celebrado en la OEI. París, 15-17 de Febrero.
- Rosso, A.; Álvarez, P. (2003). *Criterios de Validación en Métodos Analíticos Instrumentales para Industria Farmacéutica*. CEQUIPE. Available from URL: <http://www.calidadsigloxxi.com.mx/html/soft-vdma.html>.
- Supelco (1997). *Guide to Derivatization Reagents for GC*. Bulletin 909A. Sigma-Aldrich Co. Publication number T196909A.
- Velázquez, L.; Rodríguez, O.; Soto, S. (2007). Desarrollo de un método analítico para el compuesto de análisis anabólicos en matrices biológicas con un sistema GC/PTV/EI/MSMS. *Memorias in extenso XXI Congreso Nacional de Química Analítica*. Editadas por la Asociación Mexicana de Química Analítica, A.C. México.
- Wilson, B., Wylie, P. L., Klee, M. S. (1997). *Large Volume Injection for Gas Chromatography using a PTV Inlet*. Agilent Technologies, Inc. Gas Chromatography Application Note.
- Wylie, P. L. (1997). *Trace Level Pesticide Analysis by GC/MS Using Large-Volume Injection*. Agilent Technologies, Inc. Gas Chromatography Application Note.