



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Tema:

Implementación del Método Kjeldahl para la determinación de proteína para diferentes matrices en el laboratorio ECUACHEMLAB CÍA. LTDA.

Trabajo de Titulación, modalidad Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autora: Andrea Margarita Salazar Moya

Tutor: PhD. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador

Agosto-2016

APROBACIÓN POR EL TUTOR

PhD. Orestes López

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 23 de mayo del 2016



.....
PhD. Orestes Darío López Hernández

175478486-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Andrea Margarita Salazar Moya, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Intervención, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke, positioned above a dotted line.

Andrea Margarita Salazar Moya

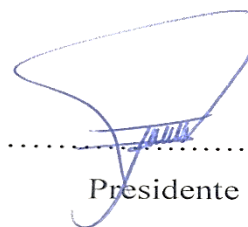
C.I: 180460820-4

AUTORA

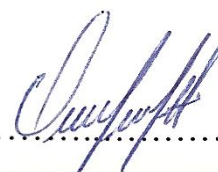
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



.....
Presidente del tribunal



.....
Mg. Pablo Israel Amancha Proaño
C.I. 180334186-4



.....
Mg. Cecilia Mercedes Carpio
C.I. 170462765-0

Ambato, 29 de Julio del 2016

DERECHOS DEL AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica del Ambato, para que haga de este Proyecto de Intervención o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke, positioned above a dotted line.

Andrea Margarita Salazar Moya

C.I 180460820-4

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios, por la vida y las bendiciones.

A mis padres, mi ejemplo y apoyo.
A mis hermanos y familia por confiar en mí, por sus consejos y cariño.
A Gonzalo, por acompañarme en todo momento y ser mi confidente.

Los Amo, son mi motivación y alegría.

AGRADECIMIENTOS

Infinitas gracias a mis padres quienes han sido mi apoyo constante, mi ejemplo, mi motor impulsor en los momentos más difíciles, a ustedes quienes me han regalado la oportunidad de realizarme como profesional, por la sabiduría para encaminar mi formación personal y por el amor incondicional.

A Ecuchemlab, por la apertura brindada para la realización y consecución de este trabajo. Gracias especialmente al Doctor Bladimir Acosta y a la Doctora Sandra Morales por el apoyo constante en este proceso.

Al PhD. Orestes López, por su colaboración para la presentación de este trabajo y a las personas que de una u otra forma me apoyaron para cumplir con esta meta.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO	I
APROBACIÓN POR EL TUTOR.....	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	III
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	IV
DERECHOS DEL AUTOR	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
EL PROBLEMA	3
1.1 Tema	3
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO II	5
MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Antecedentes Investigativos	5
2.1.1 Método Kjeldahl	5
2.1.2 Validación de métodos analíticos	7
2.2 Hipótesis	10
2.2.1 Hipótesis nula	10
2.2.2 Hipótesis alternativa	10
2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis.....	10
2.3.1 Variables independientes	10
2.3.2 Variables dependientes	10
CAPÍTULO III.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Equipos, materiales y reactivos	11
3.1.1 Equipos	11
3.1.2 Materiales.....	11
3.1.3 Reactivos.....	11
3.2 Método	12
3.2.1 Selección de matrices y rango para la validación	12
3.2.2 Preparación de reactivos:	13
3.2.3 Preparación de la muestra:	13
3.2.4 Digestión.....	14
3.2.5 Destilación y Valoración	14
3.3 Recolección y Análisis de Datos	15
CAPÍTULO IV	17

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1 Análisis y discusión de los resultados.....	17
4.1.1 Cuantificación de proteína en las matrices propuestas y determinación del intervalo de trabajo	17
4.1.2 Determinación de la precisión del método	19
4.1.2.1 Análisis de Repetibilidad	19
4.1.2.2 Determinación de los límites de repetibilidad	22
4.1.2.3 Análisis de reproducibilidad	22
4.1.2.4 Determinación de los límites de reproducibilidad	24
4.1.2.5 Prueba t de student.....	25
4.1.3 Determinación de la exactitud del método	26
4.1.4 Determinación de la incertidumbre del método.....	29
4.2 Verificación de la hipótesis.....	31
CAPÍTULO V	32
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	32
5.1 Conclusiones.....	32
5.2 Recomendaciones	33
1 REFERENCIAS BibliogrÁFICaS	34
2 ANEXOS	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Puntos de medición	12
Tabla 2. Criterios para la aceptación de la validación	16
Tabla 3. Cuantificación de proteína	18
Tabla 4. Medidas de dispersión para el análisis de repetibilidad.....	19
Tabla 5. Repetibilidad: Análisis de varianza para el analista 1 matriz cárnicos y derivados	20
Tabla 6. Repetibilidad: Análisis de varianza para el analista 2 matriz cárnicos y derivados	20
Tabla 7. Repetibilidad: Análisis de varianza para el analista 1 matriz cereales y derivados	21
Tabla 8. Repetibilidad: Análisis de varianza para el analista 2 matriz cereales y derivados	21
Tabla 9. Repetibilidad: Análisis de varianza para el analista 1 matriz lácteos y derivados	21
Tabla 10. Repetibilidad: Análisis de varianza para el analista 2 matriz lácteos y derivados	21
Tabla 11. Límites de repetibilidad (Lr).....	22
Tabla 12. Medidas de dispersión para el análisis de reproducibilidad.....	23
Tabla 13. Reproducibilidad: Análisis de varianza para cárnicos y derivados.....	23
Tabla 14. Reproducibilidad: Análisis de varianza para cereales y derivados	24

Tabla 15. Reproducibilidad: Análisis de varianza para lácteos y derivados.....	24
Tabla 16. Límites de reproducibilidad (LR)	24
Tabla 17. Prueba de t, cárnicos y derivados punto 2.....	25
Tabla 18. Prueba t, cereales y derivados punto 3	25
Tabla 19. Prueba t, matriz lácteos y derivados punto 3	26
Tabla 20. Determinación de exactitud por Z score para cárnicos y derivados	27
Tabla 21. Determinación de exactitud por Z score para cereales y derivados	27
Tabla 22. Determinación de exactitud por recuperabilidad para lácteos y derivados, material de referencia Infant/Adult Nutritional Formula (1849a).....	28
Tabla 23. Determinación de exactitud por recuperabilidad para el patrón (Sulfato de amonio) utilizado	29
Tabla 24. Contribuciones tipo B	30
Tabla 25. Factor de incertidumbre	31

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A Instructivo de validación de métodos.....	37
ANEXO B. Método oficial de la AOAC 2001.11 para determinación de proteína.....	43
ANEXO C. Certificado provisto por el NIST para el material de referencia de cárnicos utilizado en la validación	46
ANEXO D. Certificado provisto por el NIST del material de referencia de cereal utilizado en la validación	50
ANEXO E. Certificado provisto por el NIST del material de referencia para lácteos utilizado en la validación	54
ANEXO F. Resultado de la intercomparación de cárnicos solicitada a LGC.....	58
ANEXO G. Resultados de la intercomparación de cereal solicitada a LGC	61
ANEXO H. Certificado de análisis del sulfato de amonio estándar primario	64
ANEXO I. Procedimiento interno para la estimación de la incertidumbre	65
ANEXO J. Certificado de calibración de la balanza analítica Mettler Toledo AX205 ...	68
ANEXO K. Declaración de la validación del método	69
ANEXO L. Procedimiento interno de análisis de proteína implementado en Ecuachemlab	70

RESUMEN

La validación de métodos analíticos, es una tarea muy importante para los laboratorios de análisis. Se realizan con la finalidad de generar resultados confiables, basados en pruebas documentadas que sustenten su veracidad. Particularmente, para la determinación de nitrógeno y proteína en alimentos se establece el método Kjeldahl, utilizado actualmente como método oficial por varios organismos nacionales e internacionales.

En el desarrollo del trabajo se empleó el método oficial de la AOAC 2001.11, que describe el procedimiento por destilación Kjeldahl para medición de proteína cruda. Con la recolección y el procesamiento de los datos se establecieron rangos de trabajo que comprenden del 9 al 23%, 7 al 34% y 0,3 al 24% para las matrices de cárnicos, cereales, lácteos y sus derivados respectivamente. Se evaluó la precisión del método a través del valor del coeficiente de variación (CVr) menor a 5%, criterio cumplido en todos los puntos de cada matriz.

Adicionalmente se calcularon los límites de repetibilidad y reproducibilidad, que permiten evaluar la diferencia absoluta entre duplicados en análisis posteriores, los valores adecuados en condiciones repetibles deben ser menores o iguales a 0,39 (cárnicos), 0,28 (cereales) y 0,24 (lácteos) y de 0,43 (cárnicos), 0,32 (cereales) y 0,22 (lácteos) en condiciones reproducibles. Por otra parte, la exactitud se comprobó por medio del estadístico Z score para las matrices de cárnicos y cereales, analizando materiales de referencia certificados (NIST) e intercomparaciones solicitadas a LGC. Para la matriz de lácteos se comprobó recuperabilidad del material de referencia certificado así como la de sulfato de amonio, estándar primario. Finalmente se establecieron factores de incertidumbre de 0,030 para cárnicos, 0,021 para cereales y 0,014 para lácteos.

Palabras clave: validación, Método Kjeldhal, Ecuachemlab Cía. Ltda.

ABSTRACT

The validation of analytical methods is a very important task for the laboratories of analysis. Are performed with the aim of generating reliable results, based on documented evidence to support their veracity. Particularly, for the determination of nitrogen and protein in food, the Kjeldahl method is set, which one is currently used as official method by several national and international agencies.

In the development of this work, the AOAC Official Method 2001.11 was used, which describes the procedure by Kjeldahl distillation for the measurement of crude protein. With the collection and processing of the data, working ranges were established which varied from 9 to 23%, 7 to 34% and 0.3 to 24% for matrices of meat, cereals, milk and its derivatives, respectively. The accuracy of the method was assessed by the value of the coefficient of variation (CVr) lower than 5%, which criterion was fulfilled at all points of each matrix.

Additionally, the limits of repeatability and reproducibility were calculated, allowing to evaluate the absolute difference between duplicates in subsequent analysis, the appropriate values in repeatable conditions must be lower than or equal to 0.39 for Meat, 0.28 for cereals, and 0.24 for dairy products, 0.43 for meat, 0.32 for cereals and 0.22 for dairy products in reproducible conditions. On the other hand, the accuracy was verified by the statistic Z score for matrices of meat and cereals, analyzing certified reference materials (NIST) and intercomparisons requested to LGC. For the matrix of dairy products, it was **found** the recoverability of certified reference materials as well as that of the primary standard ammonium sulphate. Finally, the factors of uncertainty for meat, cereals and dairy products were established as 0.030, 0.021 and 0.014, respectively.

Key words: validation, Kjeldahl method, Ecuachemlab Cía. Ltda.

INTRODUCCIÓN

El análisis de las propiedades fisicoquímicas de los alimentos es uno de los aspectos principales en el aseguramiento de la calidad, cumpliendo un papel muy importante en la determinación del valor nutricional de los alimentos, en el control del cumplimiento de los parámetros exigidos por los organismos de salud y para el estudio de las posibles irregularidades como adulteraciones, falsificaciones, etc. tanto en alimentos terminados como en sus materias primas **(ICTA, 2016)**. Con el fin de tener una idea general sobre la calidad de un alimento y su composición se realizan análisis de contenido inmediato o proximal, que comprende una evaluación de: grasa, proteínas, carbohidratos, humedad, y ceniza **(Castañeda, 2011)**. En el presente trabajo se abordará puntualmente el análisis de proteínas y la importancia de tener un método validado que permita obtener resultados fiables.

Las proteínas son estructuras químicas complejas que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, este último constituye aproximadamente el 16% de la mayoría de las proteínas de la dieta **(Williams, 2002)** y se encuentra en forma de grupo amino (NH_2) **(López, 2003)**. Este tipo de biomoléculas son parte estructural de las células, de las moléculas que se transportan en la sangre, hormonas, enzimas y por consiguiente su presencia en la dieta es esencial **(ICTA, 2016)**, por lo que la calidad y cantidad de proteínas de la alimentación, sus fuentes y su metabolismo, son de gran importancia **(Vázquez, De Cos, & López, 2005)**. El contenido proteínico de los alimentos puede ser determinado por varios métodos, cada uno basado en diferentes propiedades de las proteínas para interactuar con diversos compuestos. En este caso se empleará el método Kjeldahl, el cual se basa en la determinación del nitrógeno de la muestra, considerando que la proporción de nitrógeno no proteínico en un producto alimenticio es demasiado pequeña para ser significativa y que una determinación del contenido de nitrógeno total refleja con suficiente precisión el contenido de proteína del alimento **(Verdini, 2015)**. El método ha sido descrito como oficial en múltiples normativas: AOAC, ISO, Farmacopeas y distintas Directivas Comunitarias.

El trabajo tiene como fin validar el método Kjeldahl para determinación de proteína cruda, es decir someter el método a evaluación y pruebas para asegurar resultados válidos. La validación de métodos analíticos y la calibración del equipo son elementos importantes que garantizan la calidad de los análisis en los laboratorios. (UNODC, 2010). La validación tiene por objeto obtener evidencia objetiva y documentada de que el método es confiable para producir un resultado esperado (CENMA, 2006). La norma ISO 17025 define a la validación como, la confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto (ENAC, 2014). Las características típicas que se deberían considerar en la validación son: la Exactitud, Precisión, Incertidumbre, Especificidad, Límite de detección, Límite de cuantificación, Linealidad, Rango, Robustez (Salazar, 2004), sin embargo, de estas es posible seleccionar las que sean necesarias y aplicables para corroborar la validez del método, en base a la experiencia y criterio de la(s) persona(s) que efectuarán la validación.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema

“IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO KJELDAHL PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA PARA DIFERENTES MATRICES EN EL LABORATORIO ECUACHEMLAB CÍA. LTDA.

1.2 Justificación

Los métodos analíticos que son empleados en la determinación de la composición química de alimentos y en general de cualquier producto, deben ser apropiados y utilizar técnicas analíticas exactas, pues de esto dependerá conocer lo más cercanamente posible el valor nutricional del alimento. Por tanto, el método de análisis seleccionado debe asegurar el manejo adecuado de las muestras hasta la determinación final del nutriente.

Entre los muchos nutrientes que contiene un alimento, se encuentra como uno de los más importantes las proteínas, debido a que todos los procesos biológicos requieren de la presencia o dependen de la actividad de este tipo de moléculas. Las proteínas ingeridas en la alimentación, son degradadas a aminoácidos, entre estos 9 esenciales para la biosíntesis de nuevas moléculas.

La cuantificación de proteínas en alimentos es de gran importancia, pues brinda información nutricional adecuada del tipo de alimento que se consume, y es considerado por los organismos reguladores de este tipo de productos en cada país, como un parámetro obligatorio que debe reportar un producto alimenticio. Esto genera el interés en las Industrias alimenticias de buscar un laboratorio que le proporcione resultados veraces a través de análisis de calidad. Por tanto, se hace evidente la necesidad de implementar un método de análisis adecuado y confiable en el laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda., que le permita garantizar su trabajo por medio de la validación del método Kjeldahl para

medición de proteína en alimentos y la posterior acreditación del laboratorio con este método; una vez que haya finalizado la serie de pruebas necesarias para la validación se obtendrán datos reales acerca de la precisión, exactitud, incertidumbre y rango.

En el desarrollo de la validación de un método analítico es conveniente contar con una guía adecuada que respalde el procedimiento realizado y la documentación que deberá ser presentada, por ello se utilizará la normativa ISO/IEC 17025, que cuenta con los criterios con los cuales un laboratorio de ensayo y calibración debe cumplir, para que una vez validado el método este pueda ser auditado en cualquier momento.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Implementar el método Kjeldahl para la determinación de proteína para diferentes matrices en el Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Elaborar un procedimiento interno de análisis para la determinación de proteína por el método Kjeldahl, AOAC 2001.11.
- Verificar la validez del método a través del análisis de precisión, exactitud e incertidumbre, a un rango determinado.
- Obtener la declaración del método como validado, una vez se hayan procesado los datos y obtenido los parámetros que sean necesarios para la validación de acuerdo a la norma ISO/IEC 17025.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos

2.1.1 Método Kjeldahl

Aunque con el tiempo ha estado sujeto a modificaciones el método Kjeldahl, desarrollado en 1883 por Johann Kjeldahl, sigue siendo la técnica más confiable para la determinación de nitrógeno orgánico y proteína. En consecuencia, es usado para calibrar métodos físicos y automáticos, se incluye en métodos oficiales de análisis (**Kirk, Sawyer, & Egan, 2002**) como los descritos por la AOAC, USEPA, ISO, en Farmacopeas y distintas Directivas Comunitarias (**García & Fernández, 2008**). En Ecuador la Norma INEN también lo establece para la medición de nitrógeno y proteína en Alimentos (**INEN I. E., 2015**), Además de ello en la normativa INEN 1334-2:2011 se establece a la proteína como uno de los nutrientes de declaración obligatoria (**INEN I. E., 2011**) exigiendo a las industrias alimentarias satisfacer la necesidad de analizar este y otros parámetros adicionales, con la búsqueda de laboratorios que generen resultados fiables.

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, para formar sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, que se destila recibiendo en: a) Ácido sulfúrico donde se forma sulfato de amonio, el exceso de ácido es valorado con hidróxido de sodio en presencia de rojo de metilo, o b) Ácido bórico formándose borato de amonio el que se valora con ácido clorhídrico (**Instituto de Salud Pública de Chile, s.f**), López (**2003**) reporta que 1 mL de HCl o H₂SO₄ 0,1 M es equivalente a 1,401 mg de nitrógeno y que el límite de detección del método es de 0,0005 mg/mL = 0,5 mg /L = 0,00005 % de N.

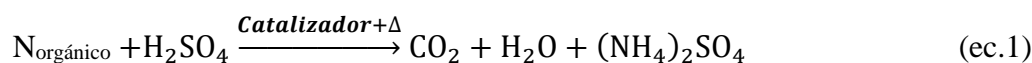
El método Kjeldahl ha sido utilizado para la determinación del nitrógeno en una amplia gama de muestras de alimentos, forrajes, fertilizantes y aguas residuales, en el caso de los alimentos la determinación de nitrógeno orgánico, hace posible la conversión y aproximación adecuada al contenido de proteína de la muestra, presumiendo una

proporción entre la proteína y el nitrógeno (**García & Fernández, 2008**), a este valor se lo denomina “proteína cruda o total”, ya que se considera que el contenido de nitrógeno no proteico, proveniente de ácidos nucleicos, sales de amonio, compuestos aromáticos nitrogenados (pirazina, ciclopentapirazina, pirrol y oxazol) y de vitaminas (B₁, B₂, nicotinamida), es insignificante y que la cuantificación de nitrógeno total refleja con suficiente precisión el total de proteína (**Cruz, 2007**). El método no incluye el nitrógeno nítrico, el cianhídrico, el de la hidracina, ni el del grupo azo, por lo cual el método es relativamente específico para la determinación de proteína (**CIM, 2016**).

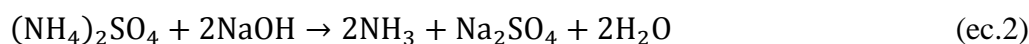
La proporción que representa el nitrógeno en la mayor parte de las proteínas, es del 16% en peso, de modo que suele utilizarse 6,25 como factor para convertir el contenido de nitrógeno en porcentaje proteína, en la mayoría de productos alimenticios, excepto los productos lácteos, para los cuales se usa el factor 6,38 (**Simone, Simone, Eitenmiller, Mills, & Cressman, 1997**). Para resultados más precisos se utilizan factores específicos, que reflejan mejor esta relación, para el trigo se puede utilizar un factor de 5,7 dado que en este caso el nitrógeno representa el 18% de la proteína, en la avena el factor es 5,83; para el huevo de 6,68; para almendras 6,18 (**Vázquez, De Cos, & López, 2005**).

Las modificaciones del método que han resultado más útiles emplean óxido de mercurio (Wilfoth) y sulfato de cobre (Arnold) como catalizadores de oxidación y sulfato de potasio para aumentar el punto de ebullición del ácido sulfúrico (Gunning), en el método original la digestión se efectuaba con una mezcla de ácido sulfúrico y anhídrido fosfórico y la oxidación se completaba mediante la adición de permanganato de potasio. Otra modificación ampliamente aceptada, es la propuesta por Winkler en la etapa de destilación: originalmente se utilizaba ácido sulfúrico valorado para captar el amoniaco, titulando posteriormente su exceso con hidróxido de sodio valorado, la modificación consiste en recibir el NH₃ sobre una solución de ácido bórico y titularlo directamente con solución valorada de H₂SO₄ o HCl (**Verdini, 2015**). En general el método consta de tres etapas: digestión de la muestra, destilación con arrastre de vapor del amoniaco producido y valoración ácido-base (**Bernal de Ramírez, 1993**).

En la digestión de la muestra el hidrógeno y el oxígeno proteico, son oxidados a dióxido de carbono y agua, el nitrógeno es convertido en sulfato de amonio (**Bernal de Ramírez, 1993**), en medio ácido caliente (agente oxidante) en presencia de un catalizador (generalmente formado de cobre, mercurio o selenio) y sulfato de sodio o potasio para elevar la temperatura de ebullición (**López, 2003**) (ecuación 1).



En la etapa siguiente, mediante la acción de una base fuerte, generalmente hidróxido de sodio, se libera el amoniaco de la sal de amonio (ecuación 2) y se recoge sobre ácido bórico formando borato de amonio, el cual se titula directamente (ecuación 3) (**Bernal de Ramírez, 1993**). Es destilado únicamente el nitrógeno en forma de NH_3 (**López, 2003**).



En la etapa final, la cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza por volumetría ácido-base del ión borato formado, empleando ácido clorhídrico o sulfúrico y como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y verde de bromocresol (ecuación 4). Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoníaco destilados (**García & Fernández, 2008**).



Los catalizadores permiten acortar el tiempo de digestión y actúan como transportadores de oxígeno. Cuando se usa mercurio como catalizador, éste debe ser precipitado mediante el agregado de tiosulfato de sodio para liberar el NH_3 (**Verdini, 2015**).

2.1.2 Validación de métodos analíticos

Internacionalmente la comunidad analítica ha establecido las principales especificaciones y requisitos operativos de un laboratorio por medio de la norma internacional ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y

calibración”, indicando claramente la necesidad de la validación de los métodos analíticos como requisito indispensable antes de realizar una medición **(INECC-CCA, 2010)**.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, de que el método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para generar un resultado esperado dentro de intervalos definidos, además permite conocer las características de funcionamiento del método **(AEFI, 2001)**.

En la validación de un método analítico se establece un procedimiento que conlleva estudios de laboratorio para obtener una base de datos que demuestren estadísticamente que un método tiene las características de desempeño (exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, robustez e incertidumbre) adecuadas para cumplir con los requerimientos de las aplicaciones analíticas proyectadas **(USP, 2007)**. En la validación es importante identificar los requisitos del método, que dependerán de si este es, cualitativo o cuantitativo y las técnicas a utilizarse para su desempeño **(UNODC, 2010)**.

Exactitud: La “exactitud” expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero. La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados, evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre estos. La evaluación práctica se fundamenta en la comparación de la media de resultados de un método con relación a valores conocidos **(EURACHEM, 2005)**.

Precisión: es una medida de que tan cercanos están los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante medidas como la desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados **(EURACHEM, 2005)**. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. En general, la precisión puede ser medida en condiciones repetibles y en condiciones reproducibles.

UNODC (2010) menciona que la repetibilidad de las condiciones existe cuando un mismo técnico analiza muestras el mismo día, con el mismo instrumento y/o los mismos materiales en el mismo laboratorio y que cualquier cambio de estas condiciones (diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos, diferentes laboratorios) implica que las condiciones sólo serán reproducibles.

Especificidad: Calpena (1991) la define como la capacidad de un método analítico para identificar/cuantificar el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra. Sin embargo, en algunas ocasiones se aceptan métodos con baja especificidad cuando el propósito del análisis es captar compuestos similares dentro de un grupo (grasa total, cenizas, etc.) (Vinagre, 2007)

Límite de detección: Diversos criterios coinciden en que, el límite de detección se define a partir de la cantidad más pequeña detectable por encima del ruido de un procedimiento y dentro de un límite declarado de aceptación (Coy, 2006).

Límite de cuantificación: La menor concentración de un analito que puede determinarse con precisión (repetibilidad) y exactitud aceptable, bajo las condiciones establecidas de la prueba (EURACHEM, 2005).

Linealidad: Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito (EURACHEM, 2005)

Rango o Intervalo de trabajo: Intervalo de concentración donde actúa el método en cuestión, sin ninguna dilución (Coy, 2006). Para cualquier método cuantitativo se determina el intervalo de concentraciones del analito, sobre los cuales el método puede aplicarse. En el extremo inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación. En el extremo superior del intervalo de concentración, las limitaciones serán impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento (EURACHEM, 2005).

Robustez: resistencia al cambio en los resultados obtenidos por un método analítico cuando se obtienen desviaciones menores a partir de las condiciones experimentales descritas en el proceso (**Castelluci, 2005**).

Incertidumbre: En metrología, la incertidumbre se define como un parámetro asociado con el resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que puede atribuirse razonablemente al mensurando (**UNODC, 2010**). La incertidumbre de medición es un parámetro único (usualmente una desviación estándar o un intervalo de confianza) que expresa el intervalo de posibles valores sobre la base de los resultados de medición. Una estimación de la incertidumbre de medición considera todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado; las incertidumbres asociadas a cada efecto son combinadas de acuerdo a procedimientos bien establecidos (**EURACHEM, 2005**).

2.2 Hipótesis

2.2.1 Hipótesis nula

El método de análisis Kjeldahl para la determinación de proteína en diferentes matrices cumple con los criterios de calidad seleccionados.

2.2.2 Hipótesis alternativa

El método de análisis Kjeldahl para la determinación de proteína en diferentes matrices no cumple con los criterios de calidad seleccionados.

2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1 Variables independientes

Método de análisis Kjeldahl para la determinación de proteína.

2.3.2 Variables dependientes

Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad), exactitud e incertidumbre del método.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

La validación se llevó a cabo en base al instructivo interno de Ecuachemlab para la validación de métodos (ANEXO A), el mismo que ha sido realizado de acuerdo a los lineamientos planteados por la norma NTE INEN-ISO/IEC 17025:2005

3.1 Equipos, materiales y reactivos

3.1.1 Equipos

Balanza analítica (Mettler Toledo AX205 Delta Range), digestor de proteína (Foss Tecator Kjelttec Digestor), destilador de proteína (Foss Tecator Kjelttec Auto 1030 Analyzer), desmineralizador de agua (Osmolife AD-2415), sorbona (Labconco Basic 47).

3.1.2 Materiales

Tubos de Kjeldahl Labconco, materiales de referencia certificados (NIST, USA): Infant/Adult Nutritional Formula (1849a), Meat Homogenate (1546a), Fortified Breakfast Cereal (3233). Intercomparaciones LGC Standards: Wheat based digestive biscuits (770) y Pork & duck liver pate (731).

3.1.3 Reactivos

Tabletas para Kjeldahl y ácido clorhídrico (Merck, Alemania), sulfato de amonio estándar primario, ácido bórico, rojo de metilo, papel para pesar libre de nitrógeno y carbonato de sodio (Fisher Scientific, USA), hidróxido de sodio y ácido sulfúrico grado técnico, verde de bromocresol (Lobachemie, India), agua desmineralizada.

3.2 Método

La metodología empleada para la realización y consecución del tema de trabajo propuesto se basó en el Método Oficial de la AOAC 2001.11 (ANEXO B), el cual describe el procedimiento por destilación Kjeldahl para medición de proteína cruda.

3.2.1 Selección de matrices y rango para la validación

Debido a que Ecuachemlab está orientado principalmente al análisis de alimentos y tomando en cuenta que estos pueden ser de diferente tipo y de diversas características se realizó una revisión bibliográfica, de acuerdo a la experiencia y criterio del grupo de validación de Ecuachemlab, en Food Composition and Nutrition Tables (**Souci, Fachmann, & Kraut, 2000**) para establecer los puntos de medición, de tal forma que se pueda trabajar con un rango adecuado, estableciéndose el uso de las muestras listadas en la **Tabla 1**, como materiales de referencia.

Tabla 1. Puntos de medición

Matriz	Puntos	% Proteína teórico	Muestras/MR utilizadas
Cárnicos y derivados	Salchicha	9,50	Salchicha Vienesas Don Diego
	Mortadela	12,4	Mortadela la Italiana
	Pollo	25,1	Pollo con piel
	Atún en agua	23,8	Lomitos Van Capms en agua
Lácteos y derivados	Mantequilla	3,50	Mantequilla Pasteurizada Miraflores
	Manjar de leche	6,36	Manjar Arequipe
	Leche en polvo	19,3	Leche en polvo La Vaquita
	Queso maduro	22,8	Queso Maduro Cheddar Javeriano
Cereales y derivados	Maíz	8,96	Maíz Mediano Supermaxi
	Quinoa	14,8	Quinoa Especial Supermaxi
	Lenteja	23,4	Lenteja especial Aki
	Soya	37,6	Soya Cereales la Pradera

Elaborado por: Salazar A., 2015.

3.2.2 Preparación de reactivos:

3.2.2.1 Ácido Bórico al 4%:

El ácido bórico fue disuelto en agua desmineralizada caliente, se dejó enfriar la solución y luego se trasvasó a un balón de aforo de un litro, donde se añadió verde de bromocresol y rojo de metilo 0,1% en relación 1:100 y 0,7:100 respectivamente, y se completó el volumen.

3.2.2.2 Preparación del Hidróxido de Sodio 40% p/p:

El hidróxido fue pesado y diluido en recipientes plásticos, la dilución se la realizó mientras se mantenía el recipiente en baño de agua fría.

3.2.2.3 Preparación del Ácido Clorhídrico 0,1 N

La solución se preparó a partir de ácido clorhídrico concentrado y fue valorada utilizando estándar primario de carbonato de sodio siguiendo el procedimiento que indica **Skoog *et al.* (2000)**.

Las soluciones preparadas fueron colocadas en los recipientes que se encuentran conectados al destilador de proteína.

3.2.3 Preparación de la muestra:

Los materiales de referencia a ser utilizados durante la validación fueron homogenizados adecuadamente mediante trituración y/o agitación. En el caso de cárnicos y lácteos refrigerados se esperó a que estos llegaran a temperatura ambiente para comenzar con las determinaciones efectuadas.

3.2.4 Digestión

Se pesó entre 0,5 y 1,0 gramo de muestra en moldes de papel libre de nitrógeno, seguidamente se colocó el molde dentro de un tubo Kjeldahl, se adicionó una tableta de Kjeldahl y 12 ml de ácido sulfúrico concentrado. Los tubos con muestra se colocaron dentro de las celdas del digestor cubriéndolos con una flauta de recolección de vapores. La digestión se llevó a cabo a $420^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, dentro de una sorbona, para evitar la contaminación con los vapores generados. Se apagó el equipo y se dejó enfriar, cuando ya no se observó vapor dentro de los tubos, al igual que el sistema de recolección de vapores, se retiró la flauta y los tubos del digestor, cuando estos se encontraban a una temperatura tolerable al contacto, se adicionó 50 ml de agua desmineralizada.

3.2.5 Destilación y Valoración

Los tubos fueron introducidos en un destilador de proteína previamente sometido a dos ciclos de lavado de tal forma que cuando se realizó la lectura del blanco el valor fue cero (0). El equipo destila y titula automáticamente desplegando el valor del volumen de HCl 0,1 N utilizado para titular la muestra. Al final de las mediciones se realizó una verificación, midiendo una muestra de sulfato de amonio estándar primario.

Se trabajó con los factores de 6,25 para cárnicos y cereales, y 6,38 para lácteos. El porcentaje de proteína fue calculado mediante la expresión (**Horwitz & Latimer, 2005**)

$$\%P = \frac{V_{HCl} * N_{HCl} * 0,014 * F}{M_{muestra}} * 100 \quad (\text{ec.5})$$

Donde:

V_{HCl} , volumen de HCl consumido en la titulación.

N_{HCl} , normalidad del HCl utilizado en la titulación.

F, factor utilizado para la conversión de %nitrógeno a % de proteína.

$M_{muestra}$, gramos de muestra utilizada.

3.3 Recolección y Análisis de Datos

La validación del método Kjeldahl para la determinación de proteína se basó en el cálculo de exactitud, precisión e incertidumbre, parámetros considerados necesarios y adecuados por Ecuachemlab Cía. Ltda.

- Precisión (repetibilidad y reproducibilidad). Se emplearon 3 matrices: lácteos y derivados, cárnicos y derivados, cereales y derivados; con cuatro puntos de medición cada una. En la toma de datos intervinieron dos analistas cada uno encargado de realizar 10 mediciones de cada punto. Se calcularon los límites de repetibilidad (Lr) y reproducibilidad (LR) en base a los datos obtenidos, con el fin de asegurar que en análisis posteriores se cumplan las condiciones de precisión. Los límites fueron calculados con las expresiones: **(Canela & Griful, 2004)**

$$Lr = 2,8 * Sr \quad (ec.5)$$

$$LR = 2,8 * SR \quad (ec.6)$$

Los datos obtenidos, fueron tabulados, ordenados y analizados a través del coeficiente de variación, análisis de varianza (ANOVA) y prueba t de Student con $p \leq 0,05$.

- Exactitud: Se realizaron 3 mediciones para cada material de referencia adquirido del Instituto Nacional de Estandarización y Tecnología (NIST). Adicionalmente se tomaron en cuenta datos adquiridos de intercomparaciones solicitadas a LGC Standards para las matrices de Cereales y Cárnicos. Se realizaron 10 mediciones de contenido de nitrógeno en sulfato de amonio.

En este parámetro se calculó Zscore y recuperabilidad, según corresponda, mediante las ecuaciones 7 y 8 **(Samaniego, 2015)** respectivamente:

$$Zscore = \frac{x-\mu}{\sigma} \quad (ec.7)$$

Donde:

x, valor obtenido.

μ , valor asignado.

σ , desviación estándar.

$$R = \frac{C_o}{C_v} \quad (\text{ec.8})$$

Donde:

C_o , concentración obtenida

C_v , concentración certificada.

- La incertidumbre del método, fue calculada en base a todas las contribuciones identificadas que afectan el resultado y puedan provocar que este se aleje del valor real.

La incertidumbre combinada se calculó considerando todas las aportaciones de incertidumbre de las magnitudes de entrada, en términos de desviaciones estándar, planteando un modelo matemático propio y adecuado para el método validado, con ello se calculó la incertidumbre expandida mediante la ecuación 9 (Samaniego, 2015).

$$U = k * u(y) \quad (\text{ec.9})$$

Donde:

k , factor de cobertura.

$u(y)$, incertidumbre combinada.

Para la evaluación del cumplimiento del método con las características de desempeño se definieron los criterios de validación descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Criterios para la aceptación de la validación

	CRITERIO	VALOR
Serie de repeticiones	%CVr	≤ 5
Repetibilidad	Valor F	$\leq 2,25$
T-Student	Valor T	$\leq 2,12$
Reproducibilidad	Valor F	$\leq 2,25$
Exactitud	Z-Score	$-2 \leq Z \leq 2$
Recuperabilidad	% Recuperabilidad	95% - 105%
Incertidumbre	μ	$\leq 30\%$ Rango bajo

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de los resultados

4.1.1 Cuantificación de proteína en las matrices propuestas y determinación del intervalo de trabajo

Como se muestra en el apartado 3.3 en la recolección de datos intervinieron dos analistas para las mediciones del contenido de proteína de la muestra en cada punto, detallado en la Tabla 1. Con el fin de evaluar de mejor manera las condiciones de reproducibilidad los analistas trabajaron en días distintos, obteniendo los datos presentados en la Tabla 3, siendo estos satisfactorios de acuerdo a la revisión bibliográfica en Food Composition and Nutrition Tables al ser cercanos a los teóricos reportados en esta fuente.

De acuerdo a los resultados obtenidos se consiguió definir el intervalo o rango de trabajo para la cuantificación de proteínas en las diferentes matrices empleadas en Ecuachemlab. Para cárnicos y derivados la validación comprende del 9 al 23%, para cereales y derivados de 7 a 34% y para lácteos y derivados de 0,3 a 24% de proteína cruda. Los rangos son bastante amplios, lo que favorece la capacidad y confiabilidad del análisis, considerando que estos logran incluir la mayor parte de productos que se puedan encontrar para las matrices. Además de ello se obtuvieron los valores intermedios para poder cubrir lo más uniformemente posible el rango.

Tabla 3. Cuantificación de proteína

% Proteína: Matriz Cárnicos y derivados								
Medición N°	Analista 1				Analista 2			
	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4
1	9,06	13,57	21,62	22,42	9,13	13,76	21,57	22,51
2	9,14	13,57	21,58	22,30	9,13	13,53	21,59	22,43
3	9,13	13,54	21,65	22,41	9,09	13,65	21,77	22,35
4	9,15	13,64	21,72	22,29	9,01	13,70	21,64	22,45
5	9,11	13,50	21,74	22,36	9,13	13,54	21,69	22,35
6	9,12	13,64	21,69	22,55	9,15	13,59	21,53	22,28
7	9,08	13,59	21,78	22,54	9,08	13,30	21,66	22,34
8	9,10	13,65	21,49	22,32	9,13	13,74	21,48	22,30
9	9,04	13,59	21,68	22,29	9,14	13,58	21,42	22,32
10	9,17	13,34	21,57	22,24	9,11	13,63	21,61	22,21
% Proteína: Matriz Cereales y derivados								
1	7,19	15,46	24,34	34,04	7,44	15,29	24,42	34,01
2	7,28	15,22	24,64	34,53	7,39	15,53	24,06	34,14
3	7,45	15,16	24,19	34,41	7,22	15,71	24,27	34,03
4	7,44	15,55	24,31	34,41	7,08	15,57	24,37	34,12
5	7,36	15,51	24,08	34,31	7,38	15,49	24,32	34,14
6	7,23	15,12	24,33	34,12	7,45	15,56	24,16	34,43
7	7,15	15,58	24,36	34,03	7,37	15,87	24,23	34,07
8	7,04	15,61	24,29	34,14	7,32	15,41	24,03	34,10
9	7,15	15,27	24,56	34,23	7,59	15,48	24,26	34,41
10	7,40	15,54	24,15	34,30	7,49	15,68	24,00	34,08
% Proteína: Matriz Lácteos y derivados								
1	0,33	7,06	17,87	23,25	0,30	7,28	17,73	23,30
2	0,31	7,20	17,94	23,23	0,30	7,22	17,82	23,07
3	0,30	7,08	17,60	23,34	0,30	7,23	17,89	23,36
4	0,32	7,26	17,84	23,29	0,30	7,13	17,79	23,26
5	0,30	7,10	17,90	23,32	0,30	7,06	17,91	23,34
6	0,32	7,09	17,74	23,43	0,29	7,03	17,82	23,28
7	0,30	7,30	17,89	23,42	0,30	7,18	17,94	23,22
8	0,30	7,28	17,67	23,29	0,30	7,10	17,80	23,30
9	0,29	7,12	17,82	23,26	0,29	7,08	17,70	23,22
10	0,29	7,28	17,85	23,32	0,31	7,32	17,84	23,39

4.1.2 Determinación de la precisión del método

Se analizaron la repetibilidad, el límite de repetibilidad, la reproducibilidad y el límite de reproducibilidad del método. El análisis de repetibilidad permite determinar la precisión más pequeña esperada y la reproducibilidad es la medida de precisión más grande normalmente encontrada (EURACHEM, 2005).

4.1.2.1 Análisis de Repetibilidad

Para el análisis de repetibilidad, se evaluó la serie de datos a través del cálculo de la desviación estandar (s), que permite determinar la dispersión entre los datos y, del coeficiente de variación (%CVr) que indica el grado de dispersión con relación a la media, como se indica en la Tabla 2, el %CVr no debe ser mayor al 5%. Estos valores estadísticos son aplicables a toda clase de mediciones repetidas, por ejemplo, entre lotes, dentro de un mismo lote, en la repetibilidad y en la reproducibilidad (UNODC, 2010). Los valores fueron calculados para cada punto de medición y analista involucrado en las diferentes matrices (Tabla 4).

Tabla 4. Medidas de dispersión para el análisis de repetibilidad

% Proteína: Matriz Cárnicos y derivados								
	Analista 1				Analista 2			
	punto 1	punto 2	punto 3	punto 4	punto 1	punto 2	punto 3	punto 4
x	9,11	13,56	21,65	22,37	9,11	13,60	21,60	22,35
s	0,04	0,09	0,09	0,11	0,04	0,13	0,10	0,09
%CVr	0,45	0,68	0,41	0,48	0,46	0,97	0,47	0,39
% Proteína: Matriz Cereales y derivados								
x	7,27	15,40	24,33	34,25	7,37	15,56	24,21	34,16
s	0,14	0,19	0,17	0,17	0,14	0,16	0,15	0,15
%CVr	1,92	1,22	0,70	0,50	1,92	1,04	0,60	0,43
% Proteína: Matriz Lácteos y derivados								
x	0,31	7,18	17,81	23,32	0,30	7,16	17,82	23,27
s	0,01	0,10	0,11	0,07	0,01	0,10	0,08	0,09
%CVr	3,99	1,33	0,62	0,28	1,69	1,35	0,43	0,39

Los valores calculados para las desviaciones estándar de los grupos de datos, demuestran que, la dispersión de estos en la distribución es pequeña y que existe uniformidad en la serie. Los valores del coeficiente de variación, demuestran que el método es preciso en terminos de repetibilidad, para cada punto analizado al no exceder el 5% establecido como objetivo de validación.

Mediante el análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo (ANOVA) se evaluó la repetibilidad del método para cada matriz, el análisis se realizó para cada analista (Tablas 5-10), con el fin de evaluar que, tanto los datos del primer analista como los del segundo cumplen con este parámetro.

Tabla 5. Repetibilidad: Análisis de varianza, analista 1 matriz cárnicos y derivados

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,0948	9	0,01054174	1,67	0,1442	2,25
Columnas	1241,4062	3	413,802079	65755,5	2,94275E-52	2,96
Error	0,1699	27	0,00629303			
Total	1241,6710	39				

Tabla 6. Repetibilidad: Análisis de varianza, analista 2 matriz cárnicos y derivados

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,0717	9	0,0079	0,81	0,6057	2,25
Columnas	1231,6477	3	410,5492	42033,9	1,2353E-49	2,96
Error	0,2637	27	0,0097			
Total	1231,9832	39				

Tabla 7. Repetibilidad: Análisis de varianza, analista 1 matriz cereales y derivados

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,1770	9	0,0196	0,63	0,7584	2,25
Columnas	4047,2531	3	1349,0843	43451,6	7,8947E-50	2,96
Error	0,8382	27	0,0310			
Total	4048,2684	39				

Tabla 8. Repetibilidad: Análisis de varianza para el analista 2 matriz cereales y derivados

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,1536	9	0,0170	0,71	0,6889	2,25
Columnas	3968,8395	3	1322,9465	55562,25	2,85864E-51	2,96
Error	0,6428	27	0,0238			
Total	3969,6361	39				

Tabla 9. Repetibilidad: Análisis de varianza para el analista 1 matriz lácteos y derivados

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,0577	9	0,0064	1,00	0,4622	2,25
Columnas	3217,4327	3	1072,4775	167464,73	9,736E-58	2,96
Error	0,1729	27	0,0064			
Total	3217,663438	39				

Tabla 10. Repetibilidad: Análisis de varianza para el analista 2 matriz lácteos y derivados

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,0666	9	0,0074	1,39	0,2395	2,25
Columnas	3212,9433	3	1070,9811	201628,13	7,9425E-59	2,96
Error	0,1434	27	0,0053			
Total	3213,1533	39				

A través del estadístico F que se presenta en las tablas de ANOVA y su comparación con el valor crítico de F, se afirma que el método es preciso en condiciones de repetibilidad al 95% de confianza para cada matriz y para los dos analistas. Esta afirmación es posible debido a que los valores calculados de F en cada tabla de ANOVA es menor que el valor crítico correspondiente a 2,25.

4.1.2.2 Determinación de los límites de repetibilidad

Los límites de repetibilidad se calcularon en base a la desviación típica de repetibilidad (S_r), que muestra la dispersión de los resultados de ensayo en condiciones de repetibilidad, en este caso la dispersión es pequeña y por tanto adecuada, estos valores se presentan en la Tabla 11 junto con los límites calculados para los dos analistas.

Tabla 11. Límites de repetibilidad (Lr)

Matriz	S_r		Lr	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Cárnicos y derivados	0,103	0,080	0,28	0,25
Cereales y derivados	0,140	0,131	0,39	0,36
Lácteos y derivados	0,080	0,086	0,22	0,24

De los límites obtenidos se seleccionó el más representativo de cada matriz entre los dos analistas (valores señalados en verde), así se estableció con una probabilidad del 95 % que el valor absoluto de la diferencia entre dos resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad, deberá ser menor o igual a 0,28 para cárnicos y derivados, 0,39 para cereales y derivados, y 0,24 para lácteos y derivados.

4.1.2.3 Análisis de reproducibilidad

Para el análisis de reproducibilidad se tomaron 5 datos al azar de cada analista, para cada punto de las matrices. A partir de estos datos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación (Tabla 12).

Tabla 12. Medidas de dispersión para el análisis de reproducibilidad

	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4
% Proteína: Matriz Cárnicos y derivados				
x	9,11	13,57	21,59	22,34
S	0,04	0,14	0,11	0,12
%CV _r	0,43	1,02	0,52	0,52
% Proteína: Matriz Cereales y derivados				
x	7,39	15,49	24,22	34,28
S	0,11	0,20	0,18	0,19
%CV _r	1,53	1,31	0,76	0,54
% Proteína: Matriz Lácteos y derivados				
x	0,30	7,18	17,81	23,32
S	0,01	0,10	0,11	0,07
%CV _r	3,99	1,33	0,61	0,28

Se observa que las medias obtenidas con la combinación de datos de los dos analistas, son similares a las medias obtenidas en la Tabla 4, de igual manera los valores de desviación estándar muestran baja dispersión entre los datos. Al relacionar la media y desviación estándar, se evidencia que el coeficiente de variación es aceptable conforme se estableció en el criterio de validación y se afirma que el método es preciso en términos de reproducibilidad.

La reproducibilidad del método para cada matriz se evaluó a través de ANOVA (Tablas 13-15).

Tabla 13. Reproducibilidad: Análisis de varianza para cárnicos y derivados

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,1175	9	0,0130	1,16	0,3527	2,25
Columnas	1231,5392	3	410,5130	36742,37	7,593E-49	2,96
Error	0,3016	27	0,011171			
Total	1231,9584	39				

Tabla 14. Reproducibilidad: Análisis de varianza para cereales y derivados

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,2130	9	0,0236	0,71	0,68753711	2,25
Columnas	4006,2468	3	1335,4156	40540,09	2,0132E-49	2,96
Error	0,8893	27	0,0329			
Total	4007,3492	39				

Tabla 15. Reproducibilidad: Análisis de varianza para lácteos y derivados

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,0666	9	0,0074035	1,39	0,2395	2,25
Columnas	3212,9433	3	1070,9811	201628,13	7,943E-59	2,96
Error	0,1434	27	0,0053			
Total	3213,1534	39				

Los valores obtenidos para el estadístico F son inferiores en los tres casos al valor crítico, por tanto a un 95% de confianza el método es reproducible para las matrices de cárnicos y derivados, cereales y derivados, lácteos y derivados.

4.1.2.4 Determinación de los límites de reproducibilidad

Los límites de reproducibilidad fueron determinados a partir de la desviación típica de reproducibilidad (SR), que muestra la dispersión entre los datos cuando estos han sido tomados en condiciones diferentes.

Tabla 16. Límites de reproducibilidad (LR)

Matriz	SR	LR
Cárnicos y derivados	0,114	0,32
Cereales y derivados	0,154	0,43
Lácteos y derivados	0,089	0,25

El límite de reproducibilidad establecido permite tener un posterior criterio de aceptación para duplicados obtenidos en condiciones diferentes, estableciendo que, el valor absoluto de la diferencia entre los resultados obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad deberá ser 0,32 para cárnicos y derivados, 0,43 para cereales y derivados y 0,25 para lácteos y derivados.

4.1.2.5 Prueba t de student

La prueba estadística t de student permite evaluar si existe diferencia significativa entre las medias de dos poblaciones con distribución normal. Esta prueba fue utilizada para demostrar si existe diferencia entre las medias de los dos analistas. La prueba se muestra para uno de los cuatro puntos de cada matriz (Tablas 17-19).

Tabla 17. Prueba de t, cárnicos y derivados punto 2

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	13,56305437	13,60170911
Varianza	0,00853656	0,017428936
Observaciones	10	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-0,758585479	
P(T<=t) una cola	0,229565065	
Valor crítico de t (una cola)	1,745883676	
P(T<=t) dos colas	0,459130131	
Valor crítico de t (dos colas)	2,119905299	

Tabla 18. Prueba t, cereales y derivados punto 3

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	24,32480731	24,21162046
Varianza	0,029056147	0,020996313
Observaciones	10	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	1,599864639	
P(T<=t) una cola	0,063516652	
Valor crítico de t (una cola)	1,734063607	
P(T<=t) dos colas	0,127033304	
Valor crítico de t (dos colas)	2,10092204	

Tabla 19. Prueba t, matriz lácteos y derivados punto 3

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	7,177419838	7,161867436
Varianza	0,00911972	0,009395864
Observaciones	10	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	0,361433808	
P(T<=t) una cola	0,360991435	
Valor crítico de t (una cola)	1,734063607	
P(T<=t) dos colas	0,721982871	
Valor crítico de t (dos colas)	2,10092204	

La diferencia hipotética entre las medias a un 95% de confianza es cero, permitiendo asegurar que no existe diferencia significativa entre los analistas, como se observa en las tablas 17-19, el estadístico t calculado es inferior al valor crítico corroborando lo mencionado; en el presente trabajo únicamente se muestran las tablas para un punto de cada matriz, sin embargo, el análisis fue realizado para cada punto teniendo los mismos resultados, concluyendo que el método es reproducible.

4.1.3 Determinación de la exactitud del método

Este parámetro fue evaluado a través del cálculo del estadístico Z score, bajo la interpretación de que los resultados analíticos que se ajustan a una distribución Normal se encuentran dentro de dos desviaciones estándar con una probabilidad del 95%. La norma ISO 13528 establece que la evaluación de los valores de z se realiza atendiendo a:

- $|z\text{-score}| \leq 2,0$ se considera como satisfactorio;
- $2,0 < |z\text{-score}| < 3,0$ se considera como cuestionable (“señal de aviso”);
- $|z\text{-score}| \geq 3,0$ se considera como insatisfactorio (“señal de acción”) (**Eurachem, 2014**).

El estadístico Z score fue utilizado para la evaluación de los resultados obtenidos en los materiales de referencia e intercomparaciones de las matrices de cárnicos y derivados, cereales y derivados (Tablas 20 y 21).

Tabla 20. Determinación de exactitud por Z score para cárnicos y derivados

	%Proteína	Promedio (x)		Desviación estándar (s)		Z score
		calculado	declarado	Calculado	Estudio	
Meat Homogenate (1546a)	15,49 15,50 15,52	15,50	15,68	0,01	0,18	-1,00
Pork & duck liver Pate	13,08 12,88 12,74	12,90	12,66	0,17	0,253	0,95

Tabla 21. Determinación de exactitud por Z score para cereales y derivados

	%Proteína	Promedio (x)		Desviación estándar (s)		Z score
		Calculado	declarado	Calculado	Estudio	
Fortified Breakfast Cereal (3233)	7,76 7,77 7,76	7,08	7,250	0,01	0,180	-0,94
Wheat based digestive biscuits (770)	6,80 6,77 6,83	6,80	6,800	0,03	0,300	0,00

Dado que se obtuvieron valores de z score menores a 2 y -2, se establece a un 95% de confianza que el método para medición de proteína cruda en matrices de cárnicos y cereales es exacto, siendo las mediciones de materiales de referencia certificados adecuadas para su uso, frente a la comparación con el valor verdadero reportado en los certificados de análisis provistos por el NIST (ANEXO C y D), de igual forma, las intercomparaciones, que establecen un parámetro de evaluación del rendimiento o aptitud de Ecuachemlab, permiten afirmar la exactitud del método y el buen desempeño del laboratorio en el análisis, especialmente en la intercomparación de cereales y derivados, en la cual, se puede decir que el resultado está en total concordancia con el valor asignado como verdadero (ANEXO F y G).

La exactitud para la matriz de lácteos y derivados fue medida como recuperabilidad (Tabla 22), con un criterio de aceptación establecido de 95 a 105%. En este caso el análisis por z score no se realizó debido a que los valores contrastados (valor medido y valor certificado)

son notablemente distintos, con una diferencia de 0,35 entre los valores, y una incertidumbre del valor certificado de tan solo 0,056.

Con esta consideración se calculó el porcentaje de recuperabilidad, para determinar la cantidad de analito que está siendo medida de la cantidad total inicial supuesta como el valor certificado por el NIST (ANEXO E).

Tabla 22. Determinación de exactitud por recuperabilidad para lácteos y derivados, material de referencia Infant/Adult Nutritional Formula (1849a)

	% Proteína medido	Valor promedio medido	Desv.est. (S)	Valor real	Recuperabilidad
1	12,86				
2	12,89	12,88	0,02	13,225±0,056	97,37
3	12,88				

El 97,37% de proteína está siendo recuperada, valor que cae entre los límites establecidos como aceptables, sin embargo, de la cantidad inicial un 2,63% de analito no está siendo cuantificado, lo que evidencia una anomalía con el material de referencia, pudiendo considerar que hubo alguna alteración en las propiedades físicas de la muestra. Debido a lo mencionado no es posible afirmar que la medición de proteína cruda en lácteos y derivados sea exacta, como en las matrices anteriores, no obstante por medio de la prueba de recuperabilidad es posible presumir que este parámetro está siendo cumplido. No fue posible inscribir a Ecuachemlab en una intercomparación para lácteos hasta la finalización de este trabajo.

Adicionalmente a la determinación de exactitud para cada una de las matrices, se realizó un análisis de recuperabilidad para el patrón utilizado (sulfato de amonio), las mediciones se presentan en porcentaje de nitrógeno (Tabla 23). Lo ideal sería determinar exactitud por z score, pero no se dispone de un dato de desviación en el certificado.

Tabla 23. Determinación de exactitud por recuperabilidad para el patrón (Sulfato de amonio) utilizado

Medición N°	% N
1	21,00
2	21,06
3	21,03
4	21,07
5	21,01
6	21,13
7	21,12
8	21,14
9	20,98
10	21,01
Promedio de medición	21,06
Desvest (S)	0,06
Valor verdadero	21,04
Recuperabilidad	100,08

Se obtuvo una recuperabilidad del 100,08% con respecto a la media, lo cual indica que se está midiendo todo el nitrógeno contenido en el sulfato de amonio, valor tomado del certificado de análisis (ANEXO H), por tanto, el reactivo y método son adecuados para el análisis.

4.1.4 Determinación de la incertidumbre del método

La determinación de incertidumbre es sin duda la base de una validación y se encuentra establecido como requisito indispensable por la ISO/IEC 17025 para presentar un resultado analítico cuantitativo. Se utilizó como guía el procedimiento interno de Ecuachemlab para la estimación de la incertidumbre de medición (ANEXO I), el cual está plantado conforme a los lineamientos establecidos en la norma NTE INEN-ISO/IEC 17025:2005.

Este parámetro está asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando. La incertidumbre

de medida asociada a las estimaciones de entrada se evaluó utilizando las contribuciones de "Tipo A" y "Tipo B".

Contribución Tipo A: corresponden al análisis estadístico de una serie de observaciones, en este caso, son la incertidumbre asociada a la repetibilidad, reproducibilidad, masa, volumen, recuperabilidad y exactitud. Más puntualmente estas son las medidas de desviación estándar encontradas para estos parámetros.

Contribución Tipo B: Corresponde al Certificado de calibración y Resolución de los equipos utilizados. Para el método en cuestión se identificó como contribuciones a la incertidumbre aquella generada por la balanza, valor tomado del certificado de calibración (ANEXO J) y por la bureta del destilador (Tabla 24).

El análisis de las contribuciones permite determinar el modelo matemático para el cálculo de incertidumbre, y establecer las contribuciones finales que pueden afectar a que un resultado se aleje del valor real.

Tabla 24. Contribuciones tipo B

Equipo	Fuente tipo B	Incertidumbre
Balanza	Calibración	0,000250
	Resolución	0,000029
Destilador	Resolución	0,000289

Debido a que mediciones presentan una distribución normal se utilizó un factor de cobertura (k) igual a 2, para obtener así la incertidumbre expandida con una probabilidad de cobertura aproximadamente del 95%. Considerando que, aunque normalmente se tiene un valor de incertidumbre establecido, este no es igualmente significativo en cada punto del rango, como lo sería un factor que sea razonable de acuerdo a los datos posteriores que se puedan obtener en los análisis.

Tabla 25. Factor de incertidumbre

Factor	Lácteos y derivados	Cárnicos y derivados	Cereales y derivados
Incertidumbre combinada	0,007	0,010	0,010
Incertidumbre expandida	0,014	0,030	0,021

Finalmente se estableció la incertidumbre del método, para cada una de las matrices empleadas, en forma de factor de modo que este pueda ser multiplicado por el resultado que se obtenga en un ensayo y así se defina la incertidumbre del valor obtenido. Para lácteos y derivados el factor a utilizarse es de 0,014; para cereales y derivados de 0,021; para cárnicos y derivados de 0,03. Todos los factores cumplen con el criterio de aceptación mencionado en la Tabla 2, siendo menores al 30% del límite inferior de cada matriz, esto se confirma al multiplicar el factor por el límite inferior y evaluar que porcentaje del valor representa. Para cárnicos y derivados constituye un 3,0%, para cereales y derivados un 2,1% y para lácteos y derivados un 1,4%.

Finalmente, a través del desarrollo del trabajo y la determinación y comprobación de los parámetros propuestos, se realizó la declaración de la validación del método (ANEXO K) y se implantó de forma documentada el procedimiento interno de análisis para determinación de proteína cruda (ANEXO L).

4.2 Verificación de la hipótesis

A través de las pruebas realizadas a lo largo de este trabajo, se confirma que el método Kjeldahl para determinación de proteína en diferentes matrices cumple con los criterios de calidad, como lo fueron el análisis de precisión exactitud y el cálculo final de incertidumbre. Las pruebas incluyen análisis de varianza (ANOVA) y t de student que permiten afirmar a un 95% de confianza que se cumplió con los parámetros establecidos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se elaboró un procedimiento interno de análisis para la determinación de proteína cruda por Kjeldahl, a partir del método oficial AOAC 2001.11, estableciendo un documento escrito con las directrices necesarias para realizar la determinación de proteína cruda en productos alimenticios que se encuentren dentro de las matrices de cárnicos, cereales, lácteos y sus derivados, además de una guía adecuada para quien aplique el método en análisis posteriores, teniendo en cuenta los Lr y LR para cada matriz los rangos de trabajo y la incertidumbre del método reportada como un factor que deberá ser multiplicado por el porcentaje de proteína obtenido en el análisis.

- Se verificó la validez del método a través del cumplimiento de precisión, exactitud e incertidumbre, en los rangos de 9-23% para cárnicos y derivados; 7-34% para cereales y derivados; y 0,3-23% para lácteos y derivados, la precisión y exactitud se afirman a un 95 % de confianza, a excepción de la matriz de lácteos y derivados, en la que solo se presume que el método es exacto. En base a las contribuciones encontradas se calculó los siguientes factores de incertidumbre: para cárnicos y derivados 0,021; para cereales y derivados 0,014; y para lácteos y derivados 0,030.

- Se obtuvo la declaración de validación del método habiendo cumplido los parámetros establecidos por la norma ISO/IEC 17025 para cada matriz involucrada, una vez que se comprobó la precisión y exactitud del método y se obtuvieron datos derivados de estos dos parámetros, además de realizarse el cálculo de incertidumbre, valor con que Ecuachemlab trabajara al emitir resultados posteriores a este trabajo.

5.2 Recomendaciones

- Buscar rondas de intercomparación disponibles e inscribir a Ecuachemlab para corroborar la exactitud del método en la matriz de lácteos y derivados.
- Ampliar la cobertura del método a otro tipo de matrices, como puede ser frutas y vegetales.
- Incluir otros factores más específicos para la conversión de resultado de porcentaje de nitrógeno a proteína.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEFI, A. E. (2001). Validación de Métodos Análíticos. *Monografía. Comisión de Normas de buena fabricación y control de calidad.*
- Bernal de Ramírez, I. (1993). Análisis de Alimentos. *Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales colección Julio Carrinzosa No2.*
- Calpena A, E. E. (1991). Validación de los métodos analíticos. *Farm Clin: European Journal of Clinical Pharmacy - Current issue.*
- Canela, M. Á., & Griful, E. (2004). Gestión de la Calidad: Control Metrológico . Barcelona: Ediciones de la Universidad Politécnica de Catalunya.
- Castañeda, A. (Agosto de 2011). *Importancia del Análisis de los Alimentos.* Recuperado el 16 de Diciembre de 2015, de [uaeh.edu.mx: http://www.uaeh.edu.mx/docencia/P_Presentaciones/icbi/asignatura/AnalisisAlimentos.pdf](http://www.uaeh.edu.mx/docencia/P_Presentaciones/icbi/asignatura/AnalisisAlimentos.pdf)
- Castelluci, F. (2005). *Recomendaciones armonizadas para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio. Organización internacional de la vina y el vino.* París.
- CENMA, F. C. (2006). En *Materiales de Referencia Y Comparaciones Interlaboratorios: Herramientas para el Control de la Calidad en Laboratorios de Ensayo* (pág. 40). Santiago de Chile: Aquaprint.
- CIM, F. U. (25 de 02 de 2016). aulavirtual.uco.es. Recuperado el 20 de 04 de 2016, de <https://www.google.com.ec/search?q=Aula+Virtual+Grupo+UCO-6&oq=Aula+Virtual+Grupo+UCO-6&aqs=chrome..69i57.259j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
- Coy, G. (21 de 04 de 2006). *Instituto de Hidrología Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia.* Recuperado el 16 de 03 de 2016, de http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38152/Estandarizacion_metodos_analaticos.pdf/934bd941-dd47-4501-8507-d2721ef4f316
- Cruz, L. A. (2007). repository.uaeh.edu.mx. Recuperado el 16 de 03 de 2016, de <http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10914/Correlacion%20del%20metodo%20KJELDAHL.pdf?sequence=1>
- ENAC. (2014). *Entidad Nacional de Acreditación* . Recuperado el 15 de Diciembre de 2015, de <https://www.enac.es/documents/7020/b7e24234-daba-4a62-9652-76eb7e96db30>

- EURACHEM. (2005). Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. *Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito*. México: CENAM: Publicación Técnica CNM-MRD-PT-030.
- Eurachem. (2014). *www.eurachem.org*. Guía para la Validación. Recuperado el 04 de Mayo de 2016, de https://www.eurachem.org/images/stories/leaflets/pt/labhelp/how_can_PT_help_my_lab_2013_ES.pdf
- García, M. E., & Fernández, S. I. (2008). *riunet.upv.es*. Recuperado el 04 de Abril de 2016, de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16338/Determinaci%C3%B3n%20de%20proteinas.pdf?sequence=1>
- Horwitz, W., & Latimer, G. (2005). Official Methods of Analysis (AOAC). USA: AOAC International .
- ICTA, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. (2016). *Química Avanzada Nuffield: Ciencia de la Alimentación*. Recuperado el 28 de marzo de 2016, de <http://www.icta.unal.edu.co>: <http://www.icta.unal.edu.co/index.php/ct-menu-item-12/analisis-icta/ct-menu-item-13>
- INECC-CCA. (2010). *Guía para la implantación, validación y verificación del desempeño*. Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/>: http://www2.inecc.gob.mx/dgcenica/proname/informes/guia_implantacion_validacion_y_verificacion_de_metodos_analiticos_inecc_2013.pdf
- INEN, I. E. (2011). *controlsanitario.gob.ec/*. Obtenido de <http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/09/1334-2-1.pdf>
- INEN, I. E. (2015). *normalizacion.gob.ec/*. Obtenido de <http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/02/n-te-inen-16-2.pdf>
- Instituto de Salud Pública de Chile, Sub Departamento de Laboratorios del Ambiente. (s.f). *ispch.c*. Recuperado el 16 de Diciembre de 2015, de http://www.ispch.cl/lab_amb/met_analitico/doc/ambiente%20pdf/Proteina.pdf
- Kirk, R., Sawyer, R., & Egan, H. (2002). Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. México: Compañía Editorial Continental.
- López, O. (Abril de 2003). Determinación Cuantitativa de Nitrógeno. Cuba.

- Salazar, L. (2004). *med.ufro.cl*. Recuperado el 15 de Diciembre de 2015, de http://www.med.ufro.cl/Recursos/Bioquímica-offline/Apuntes/clinica1/validacion_metodologica_imp.pdf
- Samaniego, C. (2015). *Cuso taller de incertidumbre de la medición en laboratorios de ensayo*. Equalitas , Quito.
- Simone, A. H., Simone, E. H., Eitenmiller, R. R., Mills, H. A., & Cressman, C. P. (1997). Could the Dumas Method Replace the Kjeldahl Digestion for Nitrogen and Crude Protein Determinations in Foods. *Journal Science Food and Agriculture*, 39-45.
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (2000). *Food Composition and Nutrition Tables*. Stuttgart: Medpharma Scientific Publishers.
- UNODC, O. D. (2010). *Directrices Para la Validación de Métodos Analíticos y la Calibración del Equipo Utilizado Para el Análisis de Drogas Ilícitas en Materiales Incautados y Especímenes Biológicos*. Obtenido de https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf
- USP, U. S. (2007). *Validación de procedimientos farmacopeicos*. Rockville, USA: Mack Printing.
- Vázquez, C., De Cos, A., & López, C. (2005). *Alimentación y Nutrición: Manual Teórico Práctico*. España: Ediciones Díaz de Santos.
- Verdini, R. (2015). *Ánalysis del Contenido de Proteínas en los Alimentos*. Recuperado el 16 de Diciembre de 2015, de http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/124179/mod_resource/content/1/QA-2015-PROTEINAS-METODOS.pdf
- Vinagre, J. (2007). *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. Recuperado el 20 de 04 de 2016, de Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición: Calidad de Métodos Analíticos: <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/AH833S15.htm>
- Williams, M. (2002). *Nutrición para la Salud, la Condición Física y el Deporte*. Barcelona: Editorial Paidotribo.

ANEXOS

ANEXO A Instructivo de validación de métodos

ECUACHEMLAB Cía. Ltda. Laboratorio Químico y Microbiológico del Ecuador		
INSTRUCTIVO DE AREA	Edición:	01
	Documento:	IF-01-5.4
	Página:	1 de 7
INSTRUCTIVO DE VALIDACION DE METODOS		

1. OBJETIVO

Establecer un instructivo para realizar la validación de los métodos de análisis, utilizados en Ecuachemlab Cía. Ltda.

2. ALCANCE

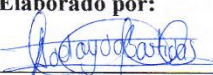
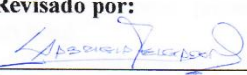
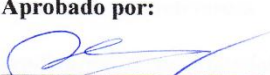
El presente instructivo aplica desde el inicio del proceso de validación hasta la Declaración de la Incertidumbre del Método en el Área Físico Químico.

3. ACTIVIDADES:

La **Gerencia General** debe proveer los recursos necesarios para la adquisición de las matrices y los suministros necesarios para realizar la validación de métodos.

La **Gerencia de Calidad** junto con el **Jefe de Área**

- Deben determinar el método de análisis a validar
- Seguidamente se debe realizar el diseño experimental, para llevar a cabo la validación del método
- Se seleccionan las posibles matrices que utilizará en el análisis, guiándose en datos de bibliografía que indiquen los valores teóricos del analito.
- En base a esto elaboran una lista de los productos que se encuentran disponibles en el mercado, y eligen los que le permitan lograr el rango de trabajo más amplio, registrándolos en el **Registro de Resultados de Validación de los Métodos R-04-5.4**
- Se determinan los parámetros de validación que pueden ser pero no estar limitados a:
 - Selectividad / Especificidad
 - Linealidad (en aquellos métodos instrumentales en donde se trabaje con curvas de calibración).
 - Límite de detección (métodos instrumentales en donde se trabaje con curvas de calibración y en los métodos microbiológicos cuantitativos).
 - Límite de cuantificación (métodos instrumentales en donde se trabaje con curvas de calibración, y en los métodos microbiológicos cuantitativos).

Elaborado por:  Quím. Al. Tania Bastidas Jefe Área Físico Químico	Revisado por:  Quím. Al. Gabriela Delgado Gerencia de Calidad	Aprobado por:  Dr. Bladimir Acosta Gerencia General
FECHA: 08-10-15	FECHA: 13-10-15	FECHA: 15-10-15

INSTRUCTIVO DE AREA	Edición:	01
	Documento:	IF-01-5.4
	Página:	2 de 7
INSTRUCTIVO DE VALIDACION DE METODOS		

- Precisión:
 - Repetibilidad
 - Límite de repetibilidad
 - Reproducibilidad
 - Límite de reproducibilidad

- Exactitud:
 - Recuperabilidad (Cuando se desea determinar exactitud de un método pero por falta de materiales de referencia se adiciona valor conocido de analito a la muestra).
 - Intercomparación
 - Materiales de Referencia

- Rango de trabajo

4. VALIDACION DE METODOS

4.1 VALIDACION METODOS FISICOQUIMICOS

Repetibilidad

- Tomar mínimo 4 muestras de diferente concentración de analito
- Identificar las muestras, codificarlas o conservar su propia identificación registrando en la **Lista de Material de Referencia L-01-5.9**.
- Realizar el ensayo 10 veces en cada muestra, en condiciones de repetibilidad, por el mismo técnico, identificado como técnico 1.
- Anotar los resultados en el **Registro de Resultados de Validación de Métodos R-04-5.4**

Reproducibilidad

- Realizar el análisis con las mismas muestras codificadas que para las condiciones de repetibilidad, por un técnico diferente, identificado como técnico 2.
- Realizar el ensayo 5 veces en cada muestra, en condiciones de reproducibilidad
- Anotar los resultados en el **Registro de Resultados de Validación de Métodos R-04-5.4**

Exactitud

- Realizar la exactitud puede ser de patrones primarios, materiales de referencia, PT, Intercomparaciones o recuperabilidad.
- Identificar la muestra, codificarla o conservar su código como Material de Referencia
- Realizar el análisis 3 veces en cada muestra, en condiciones de repetibilidad.
- Registrar los resultados obtenidos en el **Registro de Resultados de Validación de Métodos R-04-5.4**
- La exactitud se puede también evaluar por la participación en un PT, Intercomparación o demostrando Recuperabilidad, anotando en el **Registro de Resultados de Intercomparaciones R-05-5.9**

INSTRUCTIVO DE AREA

Edición:	01
Documento:	IF-01-5.4
Página:	3 de 7

INSTRUCTIVO DE VALIDACION DE METODOS

4.2 VALIDACION METODOS INSTRUMENTALES

Límite de Detección

- Tomar 1 muestra de las que se haya utilizado para determinar recuperabilidad, de ella realizar las diluciones necesarias, inyectar cada dilución, la más baja cuya señal sea 3 veces mayor que el ruido inyectar 10 veces.
- Registrar los resultados en el **Registro de Resultados de Validación de Métodos R-04-5.4**

Límite de Cuantificación

- Tomar 1 muestra de las que se haya utilizado para determinar recuperabilidad, de ella realizar las diluciones necesarias, inyectar cada dilución, la más baja cuya señal sea 10 veces mayor que el ruido inyectar 10 veces.

Linealidad

- Preparar 5 puntos de estándar en concentraciones diferentes de analito.
- Las diferentes concentraciones de soluciones de estándar identificarlas.
- Elaborar en las condiciones indicadas en el método, en el rango normal de trabajo, cinco curvas de calibración, en condiciones de reproducibilidad.
- Registrar los resultados obtenidos de pendiente, intersección al eje, y coeficiente de correlación de cada curva en **Registro de Resultados de Validación de Métodos R-04-5.4** de acuerdo a lo indicado en él, identificando los datos obtenidos.

Repetibilidad

- Tomar mínimo 4 muestras de diferente concentración de analito
- Identificar la muestra, codificarla o conservar su propia identificación
- Realizar el ensayo 6 veces en cada muestra, en condiciones de repetibilidad
- Registrar los resultados obtenidos en **Registro de Resultados de Validación de Métodos R-04-5.4**

Reproducibilidad

- Tomar mínimo 4 muestras de diferente concentración de analito
- Identificar la muestra, codificarla o conservar su propia identificación
- Realizar el ensayo 6 veces en cada muestra, en condiciones de reproducibilidad
- Anotar los resultados obtenidos en el **Registro de Resultados de Validación de Métodos R-04-5.4**

Exactitud

- Realizar la exactitud puede ser de patrones primarios, materiales de referencia, PT, Intercomparaciones ó recuperabilidad).
- Identificar la muestra, codificarla o conservar su código como Material de Referencia

INSTRUCTIVO DE AREA

Edición:	01
Documento:	IF-01-5.4
Página:	4 de 7

INSTRUCTIVO DE VALIDACION DE METODOS

- Realizar el análisis 3 veces en cada muestra, en condiciones de repetibilidad.
- Registrar los resultados obtenidos en el **Registro de Resultados de Validación de Métodos R-04-5.4**

Recuperabilidad

- Realizar el ensayo 6 veces con la adición del analito a una muestra, determinar primero la cantidad de analito presente en la muestra antes de proceder a la adición de una cantidad de concentración conocida, en condiciones de repetibilidad.
- Registrar los resultados obtenidos en el **Registro de Resultados de Validación de Métodos R-04-5.4**

4.3 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

- Realizar un análisis de espina de pescado, o causa efecto, para determinar cuáles son las contribuciones a la incertidumbre registrándola en el **Registro de Análisis para No Conformidades R-01-4.11**.
- Realizar la fórmula Matemática del Método, para las contribuciones de incertidumbre
- Una vez determinadas todas las contribuciones, igualar los valores a una misma unidad para que sean comparables.
- Estimar la incertidumbre del método

4.4 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN O RECHAZO

Los criterios de aceptación pueden ser pero no estan limitados a:


- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Coeficiente de Variación (%SDR)
 $CV < 5 \%$
- Criterio F
 $F_{calculada} < F_{tabulado}$
- T de Student
 $T_{calculada} < T_{tabulado}$
- Z score
 $Z_{score} < |2|$
- Porcentaje de Recuperabilidad
95 - 105%

4.4.1 Límite de detección y cuantificación

Se aceptará el valor de los límites si se cumple con las necesidades del análisis.

Análisis de HPLC, se aceptará el límite de detección si la señal es tres veces más que el ruido, y el límite de cuantificación si la señal es diez veces más que el ruido.

Se calcula los límites según las siguientes fórmulas:

	
INSTRUCTIVO DE AREA	Edición: 01
	Documento: IF-01-5.4
	Página: 5 de 7
INSTRUCTIVO DE VALIDACION DE METODOS	

Límite de detección $LD = 3\sigma$

Límite de cuantificación $LC = 10\sigma$

4.4.2 Repetibilidad y reproducibilidad:

- Se determina el % SDR como método para evaluar la dispersión de la serie de datos de una muestra.

$$\%SDR = \frac{\sigma}{x} * 100$$

Se aceptará si % SDR menor al:

- 5% para análisis físico químico
 - 2% para análisis instrumentales en condiciones de repetibilidad y
 - 5% en condiciones de reproducibilidad
 - 30% para análisis microbiológicos
- Se realiza una prueba de ADEVA en donde se analiza el criterio F, lo que permite evaluar si existe o no diferencia significativa entre los datos obtenidos.
 - F calculada < F tabulada

Si el valor de F que se obtiene es menor al F tabulado, indica que no existe diferencia significativa entre los datos y hay un solo rango de trabajo.

Si el valor de F es mayor al tabulado, indica que existe diferencia significativa entre los datos.

- T Student

Para evaluar la dispersión entre 2 series de datos comparándolas medias, se analiza t student lo que permite evaluar si existe o no diferencia significativa entre las series de datos.

Una vez realizado el estudio estadístico usando la desviación estándar se calcula los límites de repetibilidad y reproducibilidad utilizando las fórmulas:

Límite de repetibilidad $Lr = \sqrt{2}xt\sigma$

Límite de reproducibilidad $LR = \sqrt{2}xt\sigma$


Donde: t=1.96

- Exactitud:
 - Se realiza una prueba de Z-score, según la fórmula:

$$z = \frac{x_{obtenida} - x_{estudio}}{\sigma_{estudio}}$$

Dónde:

x : media, promedio

		
INSTRUCTIVO DE AREA	Edición:	01
	Documento:	IF-01-5.4
	Página:	6 de 7
INSTRUCTIVO DE VALIDACION DE METODOS		

σ : Desviación estándar

Si el resultado no es satisfactorio se debe realizar una acción correctiva para determinar las causas del desvío.

4.4.3 Recuperabilidad

Se evalúa los datos según la fórmula:

$$\% \text{ RECUPERABILIDAD} = \frac{\text{Valor obtenido} \times 100}{\text{Valor teórico}}$$

Para análisis fisicoquímicos: Se acepta el resultado si su valor se encuentra entre en 95 y 105%

Para análisis instrumentales: Se acepta el resultado si su valor se encuentra entre en 98 y 102%

Para análisis microbiológicos: Se acepta el resultado si su valor se encuentra entre en 70 y 130%

4.4.4 Para la Linealidad:

Se realiza una prueba de mínimos cuadrados, aceptando el rango con 0.999 de coeficiente de correlación

Se determina el %SDR como método para evaluar la dispersión de la serie de datos de una muestra, se aceptará si el valor es menor al 5%.

4.4.5 Para la Incertidumbre Expandida:

Se acepta el resultado si, el valor obtenido es menor al 30% del valor más bajo del rango de trabajo evaluado.

4.5 CÁLCULOS:

Para la realización de los cálculos se utilizará una hoja electrónica desarrollada en Excell.

4.6 DECLARACIÓN DE LA VALIDACIÓN:

De acuerdo a cada método se declara como validado si se ha cumplido con los criterios de aceptación de la validación. La Declaración de la validación se realizará mediante las firmas de Jefe de Área, Técnico, la Gerencia de Calidad, y Gerencia General.

5 REFERENCIAS

- Registro de Resultados de Validación de Métodos R-04-5.4
- Procedimiento de Validación De Métodos Microbiológicos PA-MB-05
- Instructivo de Manejo de Cepas De Referencia IG-01-5.9,
- Lista de Material de Referencia L-01-5.9
- Registro de Resultados de Intercomparaciones R-05-5.9

ANEXO B. Método oficial de la AOAC 2001.11 para determinación de proteína

ANIMAL FEED
Chapter 4, p. 34

AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2009)

References: *JAOAC* 71, 1162(1988).
USDA Handbook (1989) 643, 45.

4.2.11

AOAC Official Method 2001.11 Protein (Crude) in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain, and Oilseeds Block Digestion Method Using Copper Catalyst and Steam Distillation into Boric Acid First Action 2001 Final Action 2005

[Applicable to the determination of 0.5–50% Kjeldahl N (3–300% equivalent crude protein) in forage, animal feed and pet food, grain, and oilseeds, and applicable to the same matrices as 976.05 (see 4.2.05), 976.06 (see 4.2.06), 984.13 (see 4.2.09), 988.05 (see 4.2.03), and 990.02 (see 4.2.07); the method does not measure oxidized forms of N or heterocyclic N compounds.]

See Tables 2001.11A and B for the results of the interlaboratory study, expressed on a protein basis ($N \times 6.25$), supporting acceptance of the method.

A. Principle

The material is digested in H_2SO_4 to convert the protein N to $(NH_4)_2SO_4$ at a boiling point elevated by the addition of K_2SO_4 with a Cu catalyst to enhance the reaction rate. Ammonia is liberated by alkaline steam distillation and quantified titrimetrically with standardized acid. Aluminum block heaters increase the efficiency of the digestion.

The digest must contain residual H_2SO_4 to retain the NH_3 . Water is added manually or automatically to the digest to avoid mixing concentrated alkali with concentrated acid and to prevent the digest from solidifying. Concentrated NaOH is added to neutralize the acid and make the digest basic, and the liberated NH_3 is distilled into a boric acid solution and titrated with a stronger standardized acid, HCl, to a colorimetric endpoint. The same endpoint detection

system (e.g., indicator, wavelength) must be used for the standardization of the HCl and for the analyte.

The analyte is referred to as “crude” protein because the method determines N, a component of all proteins. In addition, N from sources other than true protein is also determined. (Additional digestion procedures must be used in order to include N from nitrate.) The amount of protein in most materials is calculated by multiplying % N by 6.25, because most proteins contain 16% N.

The H_2SO_4 and NaOH used are in concentrated form and are highly corrosive. Wear gloves and eye protection while handling the chemicals. Do not mix concentrated acid and NaOH directly. If chemicals are splashed on the skin or in the eyes, flush with copious amounts of water. Seek medical attention. Do not breathe the sulfur oxide fumes produced during digestion.

B. Apparatus

(a) *Digestion block*.—Aluminum alloy block with adjustable temperature device for measuring and controlling block temperature (Tecator Digestion System 20, 1015 Digester, Foss North America, 7682 Executive Dr, Eden Prairie, MN 55344, USA; Tel: +1-952-974-9892, Fax: +1-952-974-9823, info@fossnorthamerica.com; or equivalent).

(b) *Digestion tubes*.—250 mL.

(c) *Distillation units*.—(1) *For steam distillation*.—Foss Tecator 2200, or equivalent, to accept 250 mL digestion tubes and 500 mL titration flasks. (2) *For steam distillation and autotitration*.—Foss Tecator 2300, or equivalent.

(d) *Titration flask*.—500 mL graduated Erlenmeyer flask (for collection and titration of distillate).

(e) *Fume exhaust manifold*.—With Teflon ring seals, connected to a water aspirator in a hooded sink.

(f) *Weighing paper*.—Low N, Alfie Packers No. 201 (Alfie Packers, Inc., 8901 J St, Ste 10, Omaha, NE 68127, USA), or Fisher 09-898-12A, 3 × 3 in. (76 × 76 mm), or equivalent.

Table 2001.11A. Interlaboratory study results for the determination of crude protein by block digestion with a copper catalyst and distillation into 4% boric acid

ID	No. of labs ^a	Mean, %	RSD _n , %	RSD _R , %	HorRat
Protein block	10(1)	40.19	0.45	0.76	0.333
Swine pellets	10(1)	37.04	0.47	0.60	0.256
Corn silage	11	7.10	1.64	2.16	0.726
Grass hay	11	7.11	1.94	1.94	0.650
Fish meal	11	64.67	0.73	0.98	0.460
Dog food	11	24.50	0.87	0.91	0.369
Chinchilla food	11	18.01	0.89	0.99	0.383
Albumin	10(1)	79.14	0.40	0.44	0.212
Birdseed	11	13.48	0.88	1.29	0.475
Meat and bone meal	11	50.06	1.90	1.90	0.857
Milk replacer	11	20.78	1.39	1.39	0.550
Soybeans	9(2)	38.76	0.49	0.54	0.236
Sunflower seeds	11	17.43	2.38	2.38	0.916
Legume hay	11	18.81	1.45	1.45	0.565

^a Each value is the number of laboratories retained after elimination of outliers; each value in parentheses is the number of laboratories removed as outliers.

Table 2001.11B. Interlaboratory study results for the recovery of nitrogen from standard compounds by block digestion with a copper catalyst and distillation into boric acid

Compound	No. of labs ^a	Theoretical yield, % N	Avg. found, % N	Avg. rec., %	RSD _R , %	HorRat
Acetanilid	10(0)	10.36	10.37	100.1	1.50	0.53
Lysine-HCl	10(0)	15.34	13.32	86.8	4.16	1.53
Tryptophan	10(0)	13.72	13.55	98.8	1.04	0.39

^a Each value is the number of laboratories retained after elimination of outliers; each value in parentheses is the number of laboratories removed as outliers.

(g) *Pipetting dispenser*.—25 mL, adjustable volume, attached to a 5 pint (2.4 L) acid bottle.

C. Reagents

(a) *Sulfuric acid*.—Concentrated, 95–98% H₂SO₄, reagent grade.

(b) *Catalyst*.—7.0 g K₂SO₄ + 0.8 g CuSO₄. (Commercially available in tablet form as 3.5 g K₂SO₄ and 0.4 g CuSO₄ per tablet.)

(c) *Sodium hydroxide solution*.—40% (w/w) NaOH, low N (≤5 µg N/g).

(d) *Methyl red indicator solution*.—Dissolve 100 mg methyl red in 100 mL methanol.

(e) *Bromocresol green indicator solution*.—Dissolve 100 mg bromocresol green in 100 mL methanol.

(f) *Boric acid solution*.—4% (w/v). Dissolve 400 g H₃BO₃ in 5–6 L hot deionized water. Mix and add more hot deionized water to a volume of about 9 L. Cool to room temperature, add 100 mL bromocresol green solution and 70 mL methyl red solution, and dilute to a final volume of 10 L. Adjust to obtain a positive blank of 0.05–0.15 mL with 30 mL H₃BO₃ solution, using 0.1M NaOH (to increase blank) or 0.1M HCl (to decrease blank). Commercially available.

(g) *Boric acid solution*.—1% (w/v). (Optional trapping solution for titrators that automatically begin titration when distillation begins.) Dissolve 100 g H₃BO₃ in 5–6 L hot deionized water, mix, and add more hot deionized water to a volume of about 9 L. Cool to room temperature, add 100 mL bromocresol green solution and 70 mL methyl red solution, and dilute to a final volume of 10 L. Commercially available.

(h) *Hydrochloric acid standard solution*.—0.1000M. Prepare as in 936.15 (see A.1.06) or use premade solution of certified specification range 0.0995–0.1005M, and use 0.1000M for calculation. Commercially available.

(i) *Reference standards*.—Ammonium sulfate, tryptophan, lysine-HCl, or glycine *p*-toluenesulfonic acid, for use as standard; 99.9%.

(j) *Sucrose*.—N-free.

D. Preparation of Analytical Sample

Grind dry laboratory sample to fineness of grind (ca 0.7–1 mm), which gives a relative standard deviation (RSD) of ≤2.0% for 10 successive determinations of N in ground mixture of corn grain and soybeans (2 + 1). Fineness required to achieve this precision must be used for all dry mixed feeds and other nonuniform materials. Mix liquids to uniformity.

E. Determination

(a) *Digestion*.—Turn on block digester and heat to 420°C. Weigh materials, as indicated below, recording each test portion weight (W) to the nearest mg for weights of ≥1 g, and to the nearest 0.1 mg

for weights of <1.0 g. Do not exceed 1.2 g. For materials with 3–25% protein, weigh approximately 1.0 g test portion; with 25–50% protein, approximately 0.5 g test portion; and >50% protein, approximately 0.3 g test portion.

(1) *Dry feed, forage, cereal, grain, oilseeds*.—Weigh 1 g test portion of ground, well-mixed test portion onto a tared, low N weighing paper. Fold paper around material and drop into a numbered Kjeldahl tube.

(2) *Liquid feed*.—Weigh slightly >1 g test portion of well-mixed analytical sample into a small tared beaker. Quantitatively transfer to a numbered Kjeldahl tube with <20 mL deionized water. Alternatively, weigh slightly >1 g well-mixed test portion into a small tared beaker. Transfer to a numbered Kjeldahl tube and reweigh beaker. The differential weight loss corresponds to the amount of test portion actually transferred to the tube.

(b) *Standards*.—Perform quality control analysis and analyses of standards with each batch. The standards available from Hach Co. (PO Box 389, Loveland, CO 80539, USA; Tel: +1-800-227-4224 or +1-970-669-3050), Sigma (St. Louis, MO, USA), J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), the National Institute of Standards and Technology (NIST; Gaithersburg, MD, USA) are listed in Table 2001.11C.

Table 2001.11C. Standards

Standard	Approximate weight, g	Theoretical yield, % N
Ammonium <i>p</i> -toluenesulfonate (Hach 22779-24)	0.5	7.402
Glycine <i>p</i> -toluenesulfonate (Hach 22780-24)	0.6	5.665
Nicotinic acid <i>p</i> -toluenesulfonate (Hach 22781-24)	0.2	4.743
Lysine monohydrochloride (Sigma L-5626)	0.1	15.34
Acetanilide (Baker A068-05)	0.3	10.36
Tryptophan (Sigma T 8659)	0.2	13.72
Ammonium salts		
Diammonium hydrogen phosphate (100% assay)	0.2	21.21
Ammonium chloride (100% assay)	0.2	26.18
Ammonium sulfate (100% assay)	0.2	21.2
Ammonium dihydrogen phosphate (NIST 200)	0.3	12.18
Citrus leaves (NIST 1572)	1.0	2.86
Urea (NIST 2141)	0.1	46.63

The various ammonium salts and glycine *p*-toluenesulfonate serve primarily as a check on distillation efficiency and accuracy in titration steps because they are digested very readily. Lysine and nicotinic acid *p*-toluenesulfonate serve as a check on digestion efficiency because they are difficult to digest.

Include a reagent blank tube containing a folded low N weighing paper with each batch.

(c) *Digestion*.—Add 2 catalyst tablets to each tube. Add 12 mL H₂SO₄ to each tube, using pipetting dispenser; add 15 mL for high fat materials (>10% fat). Mixtures may be held overnight at this point. If mixture foams, slowly add 3 mL 30–35% H₂O₂. Let reaction subside in perchloric acid fume hood or in exhaust system.

Attach heat side shields to tube rack. Place fume manifold tightly on tubes, and turn water aspirator on completely. Place rack of tubes in preheated block. After 10 min, turn water aspirator down until acid fumes are just contained within exhaust hood. A condensation zone should be maintained within the tubes. After bulk of sulfur oxide fumes are produced during initial stages of digestion, reduce vacuum source to prevent loss of H₂SO₄. Digest additional 50 min. Total digestion time is approximately 60 min.

Turn digester off. Remove rack of tubes with exhaust still in place, and put in the stand to cool for 10–20 min. Cooling can be increased by using commercial air blower or by placing in hood with hood sash pulled down to increase airflow across tubes. When fuming has stopped, remove manifold, and shut off aspirator. Remove side shields. Let tubes cool. Wearing gloves and eye protection, predilute digests manually before distilling. Carefully add a few milliliters of deionized water to each tube. If spattering occurs, the tubes are too hot. Let cool for a few more minutes. Add water to each tube to a total volume of approximately 80 mL (liquid level should be about half way between the 2 shelves of the tube rack). This is a convenient stopping point.

If digest solidifies, place tube containing diluted digest in block digester, and carefully warm with occasional swirling until salts dissolve. If distilling unit equipped with steam addition for equilibration is used, the manual dilution steps can be omitted. About 70 mL deionized water is then automatically added during the distillation cycle.

(e) *Distillation*.—Place 40% NaOH in alkali tank of distillation unit. Adjust volume dispensed to 50 mL. Attach digestion tube containing diluted digest to distillation unit, or use automatic dilution feature, if available. Place graduated 500 mL Erlenmeyer titration flask containing 30 mL H₃BO₃ solution with indicator on receiving platform, and immerse tube from condenser below surface of H₃BO₃ solution. (When an automatic titration system is used that begins titration immediately after distillation starts, 1% H₃BO₃ may be substituted.) Steam distill until ≥150 mL distillate is collected (≥180 mL total volume). Remove receiving flask. Titrate H₃BO₃ receiving solution with standard 0.1000M HCl to violet endpoint (just before the solution goes back to pink). Lighted stir plate may aid visualization of endpoint. Record milliliters of HCl to at least the nearest 0.05 mL.

This is done automatically by using a steam distiller with automatic titration. Follow the manufacturer's instructions for operation of the specific distiller or distiller/titrator.

F. Verification of Nitrogen Recovery

Run N recoveries to check accuracy of procedure and equipment.

(a) *Nitrogen loss*.—Use 0.12 g (NH₄)₂SO₄ and 0.67 g sucrose per flask. Add all other reagents as in E, and distill under same conditions as in E. Recoveries must be ≥99%.

(b) *Distillation and titration efficiency*.—Distill 0.12 g (NH₄)₂SO₄, omitting digestion. Recoveries must be ≥99.5%.

(c) *Digestion efficiency*.—Use 0.3 g acetanilide or 0.18 g tryptophan, with 0.67 g sucrose per flask. Add all other reagents as stated in E. Digest and distill under same conditions as used for a determination. Recoveries must be ≥98%.

G. Calculations

$$\text{Kjeldahl nitrogen, \%} = \frac{(V_s - V_b) \times M \times 14.01}{W \times 10}$$

$$\text{Crude protein, \%} = \% \text{ Kjeldahl N} \times F$$

where V_s = volume (mL) of standardized acid used to titrate a test; V_b = volume (mL) of standardized acid used to titrate reagent blank; M = molarity of standard HCl; 14.01 = atomic weight of N; W = weight (g) of test portion or standard; 10 = factor to convert mg/g to percent; and F = factor to convert N to protein.

F factors are 5.70 for wheat, 6.38 for dairy products, and 6.25 for other feed materials.

Reference: *J. AOAC Int.* **85**, 309(2002).

Subchapter 3 UREA

4.3.01

AOAC Official Method 941.04 Urea and Ammoniacal Nitrogen in Animal Feed Urease Method First Action 1941 Final Action 2002

A. Reagents

(a) *Defoaming solution*.—Dow Corning Corp. Antifoam B Emulsion.

(b) *Urease solution*.—Prepare fresh solution by dissolving standardized urease in H₂O so that each 10 mL neutralized solution will convert N of ≥0.1 g pure urea.

Standardization.—To determine alkalinity of commercial urease preparation, dissolve 0.1 g in 50 mL H₂O and titrate with 0.1M HCl, using methyl red, **984.13B(c)** (see 4.2.09). Add same volume 0.1N HCl to each 0.1 g urease in preparing urease solution. To determine enzyme activity, prepare ca 50 mL neutralized 1% solution. Add different amounts of solution to 0.1 g pure urea and follow with enzyme digestion and distillation as in determination. Calculate activity of urease preparation from amount of this urease solution that completely converted urea, as determined by complete recovery of N by distillation.

(c) *Calcium chloride solution*.—Dissolve 25 g anhydrous CaCl₂ in 100 mL H₂O.

ANEXO C. Certificado provisto por el NIST para el material de referencia de cárnicos utilizado en la validación



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 1546a

Meat Homogenate

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for validation of methods for determining fatty acids, cholesterol, proximates, calories, elements, vitamins, and amino acids in canned meat products and similar materials. This SRM can also be used for quality assurance when assigning values to in-house reference materials. The meat homogenate is a mixture of pork and chicken products blended together in a commercial process. A unit of SRM 1546a consists of four cans, each containing approximately 85 g of material.

Certified Mass Fraction Values: The certified mass fraction values of selected fatty acids, cholesterol, selected elements, and selected vitamins in SRM 1546a, reported on an as-received basis, are provided in Tables 2 through 4. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1]. Analyses for value assignment were performed by NIST and collaborating laboratories. Certified values were calculated as the mean of the mean values from NIST methods and the median of the mean results provided by collaborating laboratories, where appropriate. The associated uncertainties are expressed at an approximately 95 % level of confidence [2–4].

Reference Mass Fraction Values: Reference mass fraction values, reported on an as-received basis, are provided for additional fatty acids (Table 5), additional elements (Table 6), additional vitamins (Table 7), proximates and calories (Table 8), and amino acids (Table 9). A NIST reference value is a noncertified value that is the best estimate of the true value based on available data; however, the value does not meet the NIST criteria for certification [1] and is provided with associated uncertainties that may reflect only measurement reproducibility, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods. The reference mass fraction values were derived from results reported by NIST or collaborating laboratories.

Information Mass Fraction Values: Information mass fraction values for choline ion and taurine are provided in Table 10. A NIST information value is a value that may be of interest to the SRM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value, therefore no uncertainty is provided [1]. Information values cannot be used to establish metrological traceability.

Expiration of Certification: The certification of SRM 1546a is valid, within the measurement uncertainty specified, until **31 January 2024**, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate (see "Instructions for Storage and Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet or register online) will facilitate notification.

Coordination of the technical measurements leading to the certification of this SRM was performed by M.M. Phillips, K.E. Sharpless, and L.J. Wood of the NIST Chemical Sciences Division and D. Howell and W. Koshute of the Grocery Manufacturers Association (GMA, Washington, DC).

Analytical measurements at NIST were performed by K.D. Chieh, J.L. Molloy, R.L. Paul, B.J. Porter, M.M. Phillips, M.M. Schantz, L.T. Sniegoski, M.J. Welch, and L.J. Wood of the NIST Chemical Sciences Division and B.E. Lang of the NIST Biosystems and Biomaterials Division.

Carlos A. Gonzalez, Chief
Chemical Sciences Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 02 May 2014

Robert L. Watters, Jr., Director
Office of Reference Materials

Analyses for value assignment were also performed by the following laboratories participating in a GMA Food Industry Analytical Chemists Share Group (FIACSG) interlaboratory comparison exercise: Campbell Soup, Camden, NJ; Conagra Foods, Omaha, NE; Covance Laboratories, Inc., Madison, WI; Del Monte Foods, Walnut Creek, CA; Eurofins Central Analytical Laboratories, Metairie, LA; Eurofins Chemical Control, Cuneo, Italy; Eurofins Nutrition Analysis Center, Des Moines, IA; Eurofins Scientific Development Nantes, France; Eurofins Steins Laboratorium, Vejle, Denmark; General Mills, Inc., Golden Valley, MN; Hormel Foods Corporation, Austin, MN; Krueger Food Laboratories, Billerica, MA; Land O'Lakes, Arden Hills, MN; Mars Petcare, Kansas City, MO; Nestle, Dublin, OH; Schwan Food Company, Salina, KS; Silliker Ibérica, Barcelona, Spain; Silliker Beijing, Beijing, China; Silliker Illinois Analytical Laboratory, Crete, IL; Silliker Ontario, Markham, ON Canada; The J.M. Smucker Co., Orville, OH; The National Food Laboratory, Livermore, CA.

Statistical analysis was provided by J.H. Yen of the NIST Statistical Engineering Division.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Office of Reference Materials.

NOTICE TO USERS: SRM 1546a IS INTENDED FOR LABORATORY USE ONLY, NOT FOR HUMAN CONSUMPTION.

INSTRUCTIONS FOR STORAGE AND USE

Storage: The SRM should be stored at room temperature or under refrigeration in the original unopened cans. The certification does not apply to contents of previously opened cans as the stability of all analytes has not been investigated.

Use: Before use, the contents of the can should be mixed thoroughly to ensure homogeneity. One technique recommended is to transfer the entire contents of a can to a plastic bag, then manually squeeze the bag to blend the material. Care should be taken to avoid separating fat from the material. For certified values to be valid, minimum test portions of the following masses should be used: 1.0 g for cholesterol analysis, between 1.5 g and 2.0 g for fatty acid analysis, 3.5 g for elemental analysis, and 2.0 g for vitamin analysis. Results obtained in analyses should include their own estimates of uncertainty and can be compared to the certified values using procedures described in reference 5.

SOURCE, PREPARATION, AND ANALYSIS⁽¹⁾

Source and Preparation: SRM 1546a is a mixture of pork, mechanically-separated chicken, ham, salt, sucrose, water, and spices and was prepared by the Hormel Foods Corporation, Austin, MN, by a commercial process that included cooking, grinding, blending, and sieving prior to canning under sterile conditions. A small quantity of sodium nitrite was added as a preservative prior to canning.

Analytical Approach for Determination of Fatty Acids and Cholesterol: Value assignment of the mass fractions of fatty acids in SRM 1546a was based on the combination of measurements made using two extraction procedures and two different analytical methods at NIST and by collaborating laboratories, where appropriate. NIST provided results using gas chromatography (GC) with flame ionization detection (FID) and GC with mass spectrometric (MS) detection as described below. Value assignment of the cholesterol mass fraction was based on measurements made by NIST using an isotope dilution (ID) GC/MS method.

NIST Analyses for Fatty Acids by GC-FID: Two 1.5 g to 2.0 g test portions from each of 10 cans of SRM 1546a were added to pressurized fluid extraction cells that were half filled with Hydromatrix (Varian, Palo Alto, CA). The meat homogenate was mixed with the Hydromatrix and additional Hydromatrix was added to fill the cell. The mixtures were spiked with an internal standard solution containing tricosanoic acid, palmitic acid-*d*₃₅, and myristic acid-*d*₂₇. The meat homogenate was extracted into hexane:dichloromethane:methanol (70:25:5 volume fraction) containing approximately 1 mg/g butylated hydroxytoluene (BHT). Following extraction, sodium sulfate was added to absorb excess water. Extracts were combined with methanolic (*m*-trifluoromethylphenyl) trimethylammonium hydroxide (1:1 volume fraction), vortexed, and allowed to stand for at least 30 min prior to analysis by GC-FID. GC-FID was performed using a 0.25 mm × 100 m biscyanopropyl polysiloxane fused silica capillary column. Calibrants were prepared gravimetrically, at levels intended to approximate the levels of the fatty

⁽¹⁾ Certain commercial equipment, instruments, or materials are identified in this certificate to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

Reference Values for Proximates and Calories: Each reference value is the median of the mean results provided by collaborating laboratories. The uncertainty provided is an expanded uncertainty about the mean to cover the measurand with approximately 95 % confidence. The expanded uncertainty is calculated as $U = ku_c$, where u_c represents the combined uncertainty consistent with the ISO/JCGM Guide and with its Supplement 1, and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [2,3]. The measurands are the mass fractions of selected proximates and caloric content in meat homogenate as determined by the collaborating laboratories and the methods they used. The reference values for selected proximates are metrologically traceable to the SI unit of grams per 100 grams. The reference value for caloric content is metrologically traceable to the SI unit of kilocalorie per 100 grams.

Table 8. Reference Values for Proximates and Calories in SRM 1546a

	Mass Fraction (g/100 g)	Coverage Factor, k
Solids	39.73 ± 0.22	2.10
Ash	3.09 ± 0.05	2.10
Protein ^(a)	15.68 ± 0.18	2.09
Carbohydrates	1.65 ± 0.47	2.10
Fat (as the sum of fatty acids as triglycerides)	18.96 ± 0.40	2.10
	Energy (kcal per 100 g)	Coverage Factor, k
Calories ^(b)	242 ± 4	2.11

^(a) A factor of 6.25 was used to convert nitrogen results to protein.

^(b) The reference value for calories is the median of lab mean caloric calculations from the interlaboratory comparison exercise. If the mean proximate values above are used for calculation, with caloric equivalents of 9, 4, and 4 for fat (as the sum of fatty acids as triglycerides), protein, and carbohydrate, respectively, the mean caloric content is 240 kcal per 100 grams.

REFERENCES

- [1] May, W.; Parris, R.; Beck II, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; *Definition of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements*; NIST Special Publication 260-136; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (20); available at <http://www.nist.gov/srm/upload/SP260-136.PDF> (accessed May 2014).
- [2] JCGM 100:2008; *Evaluation of Measurement Data — Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM 1995 with Minor Corrections); Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) (2008); available at http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_1_28_E.pdf (accessed May 2014); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://www.nist.gov/pml/pubs/tn1297/index.cfm> (accessed May 2014).
- [3] JCGM 101:2008; *Evaluation of Measurement Data – Supplement 1 to the Guide to Expression of Uncertainty in Measurement, Propagation of Distributions Using a Monte Carlo Method*; JCGM (2008); available at http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_101_28_E.pdf (accessed May 2014).
- [4] Efron, B.; Tibshirani, R.J.; *An Introduction to the Bootstrap*; Chapman & Hall, London, UK (1993).
- [5] Sharpless, K.E.; Duewer, D.L.; *Standard Reference Materials for Analysis of Dietary Supplements*; J. AOAC Int., Vol. 91, pp. 1298–1302 (28).
- [6] Ellerbe, P.; Meiselman, S.; Sniegoski, L.T.; Welch, M.J.; White V, E., *Determination of Serum Cholesterol by a Modification of the Isotope Dilution Mass Spectrometric Definitive Method*, Anal. Chem., Vol. 614, pp. 1718–1723 (1989).
- [7] AOAC Official Method 996.06; *Official Methods of Analysis*; 18th edition, AOAC International, Gaithersburg, MD (2000).
- [8] Huber, P.J.; *Robust Statistics*; John Wiley: New York (1981).

Users of this SRM should ensure that the Certificate of Analysis in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program: telephone (301) 975-2200; fax (301) 948-3730; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.

ANEXO D. Certificado provisto por el NIST del material de referencia de cereal utilizado en la validación



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 3233

Fortified Breakfast Cereal

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for validation of methods for determining proximates, sugars, dietary fiber, vitamins, elements, and amino acids in fortified breakfast cereals and similar materials. This SRM can also be used for quality assurance when assigning values to in-house reference materials. The SRM is a wheat-based fortified breakfast cereal prepared by a commercial manufacturer. A unit of SRM 3233 consists of one bottle containing approximately 60 g of material and sealed inside an aluminized pouch.

Certified Mass Fraction Values: The certified mass fraction values of selected elements and vitamins in SRM 3233 are provided in Tables 1 and 2, respectively. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1]. Analyses for value assignment were performed by NIST and collaborating laboratories. Certified values were calculated as the mean of the mean values from NIST methods, the mean from U.S. Department of Agriculture (USDA) methods, and the median of the mean results provided by collaborating laboratories, where appropriate. All values were combined without weighting. The associated uncertainties are expressed at the 95 % level of confidence [2–4]. Values are reported on a dry-mass basis in mass fraction units [5].

Reference Mass Fraction Values: Reference mass fraction values are provided for additional elements (Table 3), vitamins (Table 4), proximates, sugars, and calories (Table 5), dietary fiber (Table 6), and amino acids (Table 7). A NIST reference value is a noncertified value that is the best estimate of the true value based on available data; however, the value does not meet the NIST criteria for certification [1] and is provided with associated uncertainties that may reflect only measurement reproducibility, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods. The reference mass fraction values were derived from results reported by NIST or collaborating laboratories. Values are reported on a dry-mass basis in mass fraction units [5].

Information Mass Fraction Values: Information mass fraction values for several elements determined using a single method at NIST are provided in Table 8. Information mass fraction values for several forms of dietary fiber determined by a single collaborating laboratory are provided in Table 9. A NIST information value is a value that may be of interest to the SRM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value, therefore no uncertainty is provided. Values are reported on a dry-mass basis in mass fraction units [5].

Expiration of Certification: The certification of SRM 3233 is valid, within the measurement uncertainty specified, until **20 June 2017**, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate (see “Instructions for Storage and Use”). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet or register online) will facilitate notification.

Coordination of the technical measurements leading to the certification of this SRM was performed by K.E. Sharpless and L.J. Wood of the NIST Chemical Sciences Division and S. Ehling of the Grocery Manufacturers Association (GMA, Washington, DC).

Carlos A. Gonzalez, Chief
Chemical Sciences Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 05 September 2014
Certificate Revision History on Last Page

Robert L. Watters, Jr., Director
Office of Reference Materials

Analytical measurements at NIST were performed by C. Bryan, J. Camara, S.K.R. Chinthalapati, W.C. Davis, L. Francini, J.L. Molloy, I.O. Mugenya, K.E. Murphy, Y. Nuevo Ordóñez, R. Oflaz, D.J. O'Kelly, T.O. Okumu, R.L. Paul, M.M. Phillips, B.J. Porter, C.A. Rimmer, J.B. Thomas, B.E. Tomlin, T.W. Vetter, L.J. Wood, and L.L. Yu of the NIST Chemical Sciences Division. Analyses for value assignment were also performed by R. Goldschmidt and W.R. Wolf of the Food Composition Methods Development Laboratory, Agricultural Research Service, USDA (Beltsville, MD), and the following laboratories participating in a GMA Food Industry Analytical Chemists Committee's (FIACC's) interlaboratory comparison exercise: Campbell Soup Company, Camden, NJ; Conagra Foods, Omaha, NE; Covance, Inc., Madison, WI; Del Monte Foods, Walnut Creek, CA; Eurofins Central Analytical Laboratories, Metairie, LA; Eurofins Scientific, Des Moines, IA; General Mills, Inc., Golden Valley, MN; Hormel Foods Corporation, Austin, MN; Krueger Food Laboratories, Billerica, MA; Land O'Lakes, Arden Hills, MN; Schwan Food Company, Salina, KS; Silliker, Madison, WI; The J.M. Smucker Co., Orville, OH; The National Food Laboratory, Livermore, CA. Five of these laboratories measured sugars: Campbell Soup Company; Covance, Inc.; Eurofins Central Analytical Laboratories; Hormel Foods Corporation; and Krueger Food Laboratories. Four of the laboratories plus one other measured dietary fiber: Covance, Inc.; Eurofins Central Analytical Laboratories; General Mills, Inc.; Megazyme International Ireland Ltd., Bray, County Wicklow, Ireland; and Silliker.

Statistical analysis was provided by J.H. Yen of the NIST Statistical Engineering Division.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Office of Reference Materials.

NOTICE TO USERS: SRM 3233 IS INTENDED FOR LABORATORY USE ONLY, NOT FOR HUMAN CONSUMPTION.

INSTRUCTIONS FOR STORAGE AND USE

Storage: The SRM should be stored at controlled room temperature (20 °C to 25 °C) in the original unopened bottles. For elemental analyses, the bottle can be re-capped and test portions removed and analyzed until the material reaches its expiration date. For vitamin analyses, the bottle can be re-capped and test portions removed and analyzed for several months after the bottle was first opened. Water-soluble vitamins are stable in previously opened and tightly recapped bottles for at least one year when stored at room temperature or under refrigeration (4 °C).

Use: Before use, the contents of the bottle should be mixed thoroughly by rotating and/or rolling. Allow the contents to settle for one minute prior to opening to minimize the loss of fine particles. For certified values to be valid, test portions of the following masses should be used: between 0.3 g and 0.5 g for elemental analysis and between 0.5 g and 10 g for vitamin analysis. Test portions should be analyzed as received and results converted to a dry-mass basis by determining moisture content (using one of the methods described below) on a separate test portion. Results obtained in analyses should include their own estimates of uncertainty and can be compared to the certified values using procedures described in reference 6.

SOURCE, PREPARATION, AND ANALYSIS⁽¹⁾

Source and Preparation: The SRM is a fortified breakfast cereal. Two hundred kilograms (440 lbs) of fortified breakfast cereal was received as flakes in a single large box. The contents of the box were ground to 180 µm (80 mesh), blended, and bottled by High-Purity Standards (Charleston, SC). The cereal powder was placed in 4 oz amber bottles that had been flushed with nitrogen. Each bottle contains 60 g of cereal powder. The bottles were capped and sealed with heat-shrink tape, then individually sealed in Mylar bags. Following bottling, SRM 3233 was irradiated by Neutron Products, Inc. (Dickerson, MD) to an absorbed dose of 9.0 kGy to 11.5 kGy.

Analytical Approach for Determination of Elements: Value assignment of the mass fractions of the elements in SRM 3233 was based on the combination of measurements from two different analytical methods at NIST and collaborating laboratories, where available. NIST provided measurements by using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID-ICP-MS), instrumental neutron activation analysis (INAA), and radiochemical neutron activation analysis (RNAA).

⁽¹⁾ Certain commercial equipment, instruments or materials are identified in this certificate to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

Reference Values for Proximates, Sugars, Calories, and Dietary Fiber: Each reference value is the median of the mean results provided by collaborating laboratories. The uncertainty provided is an expanded uncertainty about the mean to cover the measurand with approximately 95 % confidence. The expanded uncertainty is calculated as $U = k u_c$, where u_c represents the combined uncertainty, incorporating an uncertainty component for moisture correction, consistent with the ISO/JCGM Guide, and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [2]. The measurands are the mass fractions of the proximates, sugars, calories, and dietary fiber in fortified breakfast cereal listed in Tables 5 and 6, as measured by the collaborating laboratories and the methods they used. The reference values for proximates, sugars, and dietary fiber are metrologically traceable to the SI unit of mass, expressed as a percent. The reference value for caloric content is metrologically traceable to unit kilocalorie per 100 grams.

Table 5. Reference Values (Dry-Mass Basis) for Proximates, Sugars, and Calories in SRM 3233

	Mass Fraction (%)	Coverage Factor, k
Ash	11.87 ± 0.25	2.11
Protein ^(a)	7.25 ± 0.18	2.13
Fat (as the sum of fatty acids as triglycerides)	2.02 ± 0.40	2.16
Hexadecanoic Acid (C16:0) (Palmitic Acid)	0.367 ± 0.072	2.23
Octadecanoic Acid (C18:0) (Stearic Acid)	0.173 ± 0.051	2.23
(Z)-9-Octadecenoic Acid (C18:1 n-9) (Oleic Acid)	0.278 ± 0.027	2.26
(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic Acid (C18:2 n-6) (Linoleic Acid)	0.867 ± 0.155	2.26
(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoic Acid (C18:3 n-3) (α -Linolenic Acid)	0.056 ± 0.007	2.31
Carbohydrates	77.88 ± 0.86	2.03
Total Sugars	15.8 ± 1.5	2.78
Fructose	0.81 ± 0.39	2.78
Glucose	1.04 ± 0.36	2.78
Maltose	0.46 ± 0.09	4.30
Sucrose	13.42 ± 0.75	2.78
	Energy (kcal per 100 g)	Coverage Factor, k
Calories ^(b)	362.4 ± 3.8	2.03

^(a) A factor of 5.7 was used to convert nitrogen results to protein.

^(b) The reference value for calories is the median of lab mean caloric calculations from the interlaboratory comparison exercise. If the mean proximate values above are used for calculation, with caloric equivalents of 9, 4, and 4 for fat (as the sum of fatty acids), protein, and carbohydrate, respectively, the mean caloric content is 358.7 kcal/100 g.

REFERENCES

- [1] May, W.; Parris, R.; Beck II, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; *Definition of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements*; NIST Special Publication 260-136; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2000); available at <http://www.nist.gov/srm/upload/SP260-136.PDF> (accessed Sep 2014).
- [2] JCGM 100:2008; *Evaluation of Measurement Data — Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM 1995 with Minor Corrections); Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) (2008); available at http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf (accessed Sep 2014); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://www.nist.gov/pml/pubs/tn1297/index.cfm> (accessed Sep 2014).
- [3] JCGM 101:2008; *Evaluation of Measurement Data – Supplement 1 to the Guide to Expression of Uncertainty in Measurement, Propagation of Distributions Using a Monte Carlo Method*; JCGM (2008); available at http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_101_2008_E.pdf (accessed Sep 2014).
- [4] Efron, B.; Tibshirani, R.J.; *An Introduction to the Bootstrap*; Chapman & Hall, London, UK (1993).
- [5] Thompson, A.; Taylor, B.N.; *Guide for the Use of the International System of Units (SI)*; NIST Special Publication 811; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2008); available at <http://www.nist.gov/pml/pubs/sp811/index.cfm> (accessed Sep 2014).
- [6] Sharpless, K.E.; Duewer, D.L.; *Standard Reference Materials for Analysis of Dietary Supplements*; J. AOAC Int., Vol. 91, pp. 1298–1302 (2008).
- [7] Paul, R.L.; *Determination of Arsenite in Food and Dietary Supplement Standard Reference Materials by Neutron Activation Analysis*, Anal. Chem., Vol. 83, pp. 152–156 (2011).
- [8] AOAC International; *Official Methods of Analysis*, 18th ed.; <http://www.coma.aoc.org> (accessed Sep 2014).
- [9] Huber, P.J.; *Robust Statistics*; John Wiley: New York (1981).

Certificate Revision History: 05 September 2014 (Removed reference value for solids; editorial changes); 12 February 2013 (Changed unit size; removed test portion size for fiber analysis; editorial changes); 28 September 2012 (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the Certificate of Analysis in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program: telephone (301) 975-2200; fax (301) 948-3730; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.

ANEXO E. Certificado provisto por el NIST del material de referencia para lácteos utilizado en la validación



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 1849a

Infant/Adult Nutritional Formula

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for validation of methods for determining proximates, fatty acids, cholesterol, vitamins, elements, amino acids, and nucleotides in infant and adult nutritional formulas and similar materials. This SRM can also be used for quality assurance when assigning values to in-house reference materials. The SRM is a milk-based, hybrid infant/adult nutritional powder prepared by a manufacturer of infant formula and adult nutritional products. A unit of SRM 1849a consists of 10 packets, each containing approximately 10 g of material.

Certified Mass Fraction Values: Certified values for fatty acids, cholesterol, elements, vitamins, and carnitine in SRM 1849a are provided in Tables 1 through 3. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1]. Analyses for value assignment were performed by NIST and collaborating laboratories. Certified values were calculated as the unweighted mean of the mean values from NIST methods, the median of the mean results provided by collaborating laboratories, and the mean provided by the manufacturer, where appropriate. The associated uncertainties are expressed at an approximately 95 % level of confidence [2–4]. Values are reported on an as-received (not dry-mass) basis in mass fraction units [5].

Reference Mass Fraction Values: Reference values are provided for additional fatty acids (Table 4); proximates, lactose monohydrate, and calories (Table 5); additional vitamins, *myo*-inositol, and chlorine (Table 6); amino acids and taurine (Table 7); and nucleotides (Table 8). A NIST reference value is a noncertified value that is the best estimate of the true value based on available data; however, the value does not meet the NIST criteria for certification [1] and is provided with associated uncertainties that may reflect only measurement reproducibility, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods. The reference mass fraction values were derived from results reported by NIST, collaborating laboratories, or the manufacturer. Values are reported on an as-received (not dry-mass) basis in mass fraction units [5].

Information Mass Fraction Values: Information values for free choline ion and nucleotides plus nucleosides are provided in Table 9. A NIST information value is a value that may be of interest to the SRM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value, therefore no uncertainty is provided [1]. Information values cannot be used to establish metrological traceability.

Expiration of Certification: The certification of SRM 1849a is valid, within the measurement uncertainty specified, until 30 November 2021, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate (see “Instructions for Storage and Use”). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet or register online) will facilitate notification.

Coordination of the technical measurements leading to the certification of this SRM was performed by M.M. Phillips, K.E. Sharpless, and L.J. Wood of the NIST Chemical Sciences Division, S. Ehling of the Grocery Manufacturers Association (GMA, Washington, DC), and M.K. Mountford of the Infant Nutrition Council of America (Atlanta, GA).

Carlos A. Gonzalez, Chief
Chemical Sciences Division

Robert L. Watters, Jr., Director
Office of Reference Materials

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 29 October 2015
Certificate Revision History on Last Page

Analytical measurements at NIST were performed by T.A. Butler, J. Camara, B.E. Lang, R. Oflaz, M.M. Phillips, B.J. Place, S.A. Rabb, C.A. Rimmer, L.T. Sniegoski, J.B. Thomas, M.J. Welch, and L.J. Wood of the NIST Chemical Sciences Division.

Collaborating Laboratories: Analysts at the following laboratories analyzed SRM 1849a for value assignment as part of a GMA Food Industry Analytical Chemists Committee (FIACC) interlaboratory comparison exercise: Abbott Nutrition, Columbus, OH, USA; Campbell Soup Company, Camden, NJ, USA; Conagra Foods, Omaha, NE, USA; Covance, Inc., Madison, WI, USA; Del Monte Foods, Walnut Creek, CA, USA; Eurofins Chemical Control, Cuneo, Italy; Eurofins Central Analytical Laboratories, Metairie, LA, USA; Eurofins Scientific, Des Moines, IA, USA; General Mills, Inc., Golden Valley, MN, USA; Hormel Foods Corporation, Austin, MN, USA; Land O'Lakes, Arden Hills, MN, USA; Nestlé USA, Dublin, OH, USA; Schwan Food Company, Salina, KS, USA; Silliker, Madison, WI, USA; Silliker Shanghai Ltd., Shanghai, China; Silliker Canada, Markham, ON, Canada; Silliker Ibérica, Barcelona, Spain; and The J.M. Smucker Co., Orville, OH, USA. As part of a separate interlaboratory comparison exercise organized through the International Formula Council, the following laboratories also provided results that were combined with data from the GMA FIACC laboratories: Fonterra, Waitoa, NZ and Nestlé, Nunspeet, The Netherlands. Analyses for value assignment were also performed by Hong Kong Government Laboratory.

Statistical analysis was provided by J.H. Yen of the NIST Statistical Engineering Division.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Office of Reference Materials.

NOTICE AND WARNING TO USERS

SRM 1849a IS INTENDED FOR LABORATORY USE ONLY, NOT FOR HUMAN CONSUMPTION. THIS MATERIAL CONTAINS SOME NUTRIENTS AT LEVELS NOT PERMITTED IN INFANT FORMULA AND IS NOT AN INFANT FORMULA.

INSTRUCTIONS FOR STORAGE AND USE

Storage: The original unopened packets in SRM 1849a should be stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ or lower. The certification only applies to the initial use and the same results are not guaranteed if the remaining powder is used at a later date.

Use: Before use, shake the unopened packet to ensure the contents are mixed thoroughly. For certified values to be valid, test portions of the following masses should be used: 0.5 g for fatty acid analysis, 0.5 g for cholesterol analysis, between 0.2 g and 2 g for elemental analysis, and between 1 g and 5 g for vitamin analysis. The stability of analytes in previously opened and stored packets has not been investigated. Results obtained in analyses should include their own estimates of uncertainty and can be compared to the certified values using procedures described in reference 6.

SOURCE, PREPARATION, AND ANALYSIS⁽¹⁾

Source and Preparation: The SRM is a milk-based hybrid infant/adult nutritional powder, prepared by a manufacturer of infant formula and adult nutritional products. A base liquid containing all constituents was conventionally heat processed, homogenized, and spray-dried. The product was packaged into single-use nitrogen-flushed pouches, each containing 10 g of powder. The material was stored below $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ following packaging and is stored at NIST at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ to enhance long-term stability.

Analytical Approach for Determination of Fatty Acids and Cholesterol: Value assignment of the mass fractions of fatty acids in SRM 1849a were based on the combination of measurements made at NIST using gas chromatography (GC) with flame ionization detection (FID) and by collaborating laboratories. Value assignment of the cholesterol mass fraction was based on measurements made by NIST using an isotope dilution (ID) GC method with mass spectrometric (MS) detection.

NIST Analyses for Fatty Acids Using GC-FID: Mass fractions of fatty acids were measured by GC-FID from single 0.5 g test portions from each of 7 packets of SRM 1849a. Samples were combined with wet Hydromatrix (Varian, Palo Alto, CA) and transferred to a glass extraction thimble. An internal standard solution containing tridecanoic acid triglyceride and octacosanoic acid methyl ester was added, and samples were extracted for 22 h using a hexane/acetone (4:1, volume fraction) solution. Following extraction, extracts were concentrated in toluene, and 1 mL of MethPrep II

⁽¹⁾Certain commercial equipment, instruments or materials are identified in this certificate to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

Reference Values for Proximates, Lactose Monohydrate, and Calories: Each reference mass fraction value is the combined mean from the mean of the results provided by the material manufacturer and the median of the mean results provided by collaborating laboratories, where available. The uncertainty provided with the value is an expanded uncertainty about the mean to cover the measurand with approximately 95 % confidence. The expanded uncertainty is calculated as $U = ku_c$, where u_c represents the combined uncertainty, consistent with the ISO/JCGM Guide and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [2–4]. For values based on more than one data source, the combined uncertainty incorporates the observed difference between the results from the methods and their respective uncertainties. The measurands are the mass fractions of proximates and lactose monohydrate in nutritional formula as determined by the methods indicated as listed in Table 5. Metrological traceability is to the SI derived unit for mass fraction (expressed as grams per 100 grams). The measurand is the caloric content in nutritional formula as determined by the method indicated as listed in Table 5. Metrological traceability is to the SI derived unit for energy (expressed as kilocalories per 100 grams).

Table 5. Reference Values for Proximates, Lactose Monohydrate, and Calories in SRM 1849a

	Mass Fraction (g/100 g)	Coverage Factor, k
Solids ^(a)	98.28 ± 0.15	2.09
Ash ^(a,b)	4.695 ± 0.020	2.00
Fat (extracted) ^(a,b)	30.43 ± 0.95	2.00
Protein ^(a,b,c)	13.225 ± 0.056	2.00
Carbohydrates ^(a)	51.6 ± 1.3	2.11
Lactose Monohydrate ^(a)	47.6 ± 5.5	2.45
	Energy (kcal per 100 g)	Coverage Factor, k
Calories ^(d)	520.8 ± 6.4	2.13

^(a) Collaborating laboratories

^(b) Manufacturer

^(c) Results for nitrogen were converted to protein using a factor of 6.38.

^(d) The reference value for calories is the median of lab mean caloric calculations from the interlaboratory comparison exercise. If the mean proximate values above are used for calculation, with caloric equivalents of 9, 4, and 4 for fat (as the sum of fatty acids), protein, and carbohydrate, respectively, the mean caloric content is 521.2 kcal/100 g.

REFERENCES

- [1] May, W.; Parris, R.; Beck II, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; *Definition of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements*; NIST Special Publication 260-136 (2000); available at <http://www.nist.gov/srm/upload/SP260-136.PDF> (accessed Oct 2015).
- [2] JCGM 100:2008; *Evaluation of Measurement Data — Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM 1995 with Minor Corrections); Joint Committee for Guides in Metrology (2008); available at http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf (accessed Oct 2015); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://www.nist.gov/pml/pubs/tn1297/index.cfm> (accessed Oct 2015).
- [3] JCGM 101:2008; *Evaluation of Measurement Data – Supplement 1 to the Guide to Expression of Uncertainty in Measurement-Propagation of Distributions Using a Monte Carlo Method*; Joint Committee for Guides in Metrology; International Bureau of Weights and Measures (BIPM), Sèvres, France (2008); available at http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_101_2008_E.pdf (accessed Oct 2015).
- [4] Efron, B.; Tibshirani, R.J.; *An Introduction to the Bootstrap*; Chapman & Hall, London, UK (1993).
- [5] Thompson, A.; Taylor, B.N.; *Guide for the Use of the International System of Units (SI)*; NIST Special Publication 811; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2008); available at <http://www.nist.gov/pml/pubs/sp811/index.cfm> (accessed Oct 2015).
- [6] Sharpless, K.E.; Diewer, D.L.; *Standard Reference Materials for Analysis of Dietary Supplements*; J. AOAC Int., Vol. 91, pp. 1298–1302 (2008).
- [7] Ellerbe, P.; Meiselman, S.; Sniegoski, L.T.; Welch, M.J.; White V, E.; *Determination of Serum Cholesterol by a Modification of the Isotope Dilution Mass Spectrometric Definitive Method*; Anal. Chem., Vol. 614, pp. 1718–1723 (1989).
- [8] AOAC International Official Method 996.06; *Official Methods of Analysis*; 18th edition, AOAC International, Gaithersburg, MD (2000).
- [9] Hyun, T.H.; Tamura, T.; *Trienzyme Extraction in Combination with Microbiologic Assay in Food Folate Analysis: An Updated Review*; Exp. Biol. Med., Vol. 230, pp. 444–454 (2005).

Certificate Revision History: **29 October 2015** (Expiration date changed; Fatty acid values updated to certified values using collaborating laboratories data and NIST data and moved from Table 4 to Table 1; values for summed fatty acids updated from reference to certified values based on inclusion of NIST data and moved from Table 5 to Table 1; editorial changes); **15 June 2015** (Corrects footnote for Riboflavin in Table 3; editorial changes); **19 December 2014** (Corrects mean caloric content value listed in the footnote for Table 5; editorial changes); **16 October 2014** (Certified fatty acid values changed to reference values and moved from Table 1 to Table 4, fatty acid values only include collaborating laboratories data; updated protein value in Table 5; corrected niacinamide value in Table 3; changed footnotes in Table 3; editorial changes); **29 April 2014** (Updated a fatty acid name in Table 4; editorial changes); **17 January 2014** (Certified values added for α -tocopheryl acetate and retinyl palmitate; reference value added for free α -tocopherol; total α -tocopherol value updated using a NIST method; chlorine and myo-inositol values updated using a second method; footnotes added to Table 3 to clarify the forms of thiamine and pyridoxine; editorial changes); **07 August 2012** (Certified value added for iodine; manganese value updated using a third method; information value added for chlorine; collaborating laboratories removed from appendix and listed in the certificate body; footnote added to Table 3 to clarify the form of choline; editorial changes); **05 April 2012** (Correction of the names for Vitamin B₁ and B₆ in Table 3 to indicate the base form used for listed values; editorial changes); **30 January 2012** (Corrected alternate name for eicosanoic acid in Table 1; editorial changes); **01 December 2011** (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the Certificate of Analysis in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program: telephone (301) 975-2200; fax (301) 948-3730; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.

ANEXO F. Resultado de la intercomparación de cárnicos solicitada a LGC



**QMAS - Quality in Meat and Fish Analysis PT
Scheme
MT6174 - ECUACHEMLAB
Individual Report**

Round: 237

Issue Number 1

Issued 19 February 2016



Science
for a safer world

LGC | 1 Chamberhall Business Park | Chamberhall Green | Bury | Lancashire | BL9 0AP | UK |
+44(0)161 762 2500 | ptcustomerservices@LGCGroup.com | www.lgcstandards.com



0001

Sample Details

Samples were despatched on 18 January 2016.
The reporting deadline was 12 February 2016.

The following samples were distributed in QMAS Round 237:

Sample	Matrix
731	150g pork & duck liver pate
732	30g sandwich ham
733	150g meat
734	150g prawns
747	150g meat

Further information regarding assigned values, performance assessment and technical comments can be found under the individual sample and analyte results.

Individual Report

This individual report contains a summary of all the results submitted and the performance assessments for your laboratory and your individual analysts. Please note that nominated laboratory results are represented by a blue highlight in the analyst box.

Data statistics given in the individual report are for the method you have used for each analyte. Further detail can be obtained from the main report.

Full details of the scheme, sample types, analytes and data analysis can be found in the corresponding Main Report, along with any technical comments, if applicable. The Main Report is the definitive version.

If you have any questions regarding your results which are not answered in the Main Report, please contact us using the details on the front of the report. If you would like to order any samples for re-test, please contact our customer service department or your local office.

Results Summary

Sample	Results Reported	Satisfactory Results	Questionable Results	Unsatisfactory Results	Not Assessed [^]
731 - Meat Based Sample	4	4	0	0	0
Round Total	4	4	0	0	0

[^] Results which are Not Assessed should be reviewed by comparing them with the assigned value and other relevant statistics given in the main report. Participants, according to their internal quality criteria, may consider Not Assessed results to be satisfactory, questionable or unsatisfactory. Further information regarding why results may not be assessed is given in the Scheme Information section of the main report.

Please note surplus PT samples are available as QC materials once the round has closed. These samples can be purchased at a reduced rate if you have taken this sample during the main round.

No unsatisfactory results in this round

No questionable results in this round

731 - Meat Based Sample

Analyte	Analyst	Method	Result	Units	z score (** z' score)	Assigned Value	Ux AV	SDPA	Exp.SDPA	No of results	Median	Mean	Robust SD	SD
Fat	Lab Result	Acid hydrolysis & soxhlet	30.74	%	-1.13	32.19	0.23	1.287	N/A	15	31.73	31.49	0.845	1.466
Ash	Lab Result	Drying at 550°C	2.33	%	0.30	2.30	0.02	0.100	N/A	18	2.31	2.29	0.074	0.078
Protein	Lab Result	Kjeldahl	12.90	%	0.95	12.66	0.07	0.253	N/A	25	12.66	12.64	0.311	0.343
Moisture	Lab Result	Other	49.69	%	1.85	48.91	0.11	0.400	N/A	2	49.39	49.39	0.445	0.424

** Please note, participant performance for this analyte has been assessed using a z' score, rather than a z score, in order to account for the measurement uncertainty of the assigned value which is not negligible when compared to the SDPA.

ANEXO G. Resultados de la intercomparación de cereal solicitada a LGC

**QFCS - Quality in Food Chemistry PT Scheme
FC5086 - ECUACHEMLAB
Individual Report**

Round: 238

Issue Number 1

Issued 18 March 2016



LGC | 1 Chamberhall Business Park | Chamberhall Green | Bury | Lancashire | BL9 0AP | UK |
+44(0)161 762 2500 | ptcustomerservices@LGCGroup.com | www.lgcstandards.com



Sample Details

Samples were despatched on 15 February 2016
Reporting deadline was 11 March 2016

The following samples were despatched in QFCS Round 238:

770:	Wheat based digestive biscuits
772:	Lasagne meal
773:	Pears
774:	Serrano ham
778:	Sesame oil
781:	Gluten free flour (contaminated with low level gluten)
782:	Mixed fat spread
783:	Tomato paste

Further information regarding assigned values, performance assessment and technical comments can be found under the individual sample and analyte results.

Individual Report

This individual report contains a summary of all the results submitted and the performance assessments for your laboratory and your individual analysts. Please note that nominated laboratory results are represented by a blue highlight in the analyst box.

Data statistics given in the individual report are for the method you have used for each analyte. Further detail can be obtained from the main report.

Full details of the scheme, sample types, analytes and data analysis can be found in the corresponding Main Report, along with any technical comments, if applicable. The Main Report is the definitive version.

If you have any questions regarding your results which are not answered in the Main Report, please contact us using the details on the front of the report. If you would like to order any samples for re-test, please contact our customer service department or your local office.

Results Summary

Sample	Results Reported	Satisfactory Results	Questionable Results	Unsatisfactory Results	Not Assessed [^]
770 - Nutritional analysis (1)	5	5	0	0	0
Round Total	5	5	0	0	0

[^] Results which are Not Assessed should be reviewed by comparing them with the assigned value and other relevant statistics given in the main report. Participants, according to their internal quality criteria, may consider Not Assessed results to be satisfactory, questionable or unsatisfactory. Further information regarding why results may not be assessed is given in the Scheme Information section of the main report.

Please note surplus PT samples are available as QC materials once the round has closed. These samples can be purchased at a reduced rate if you have taken this sample during the main round.

No unsatisfactory results in this round

No questionable results in this round

770 - Nutritional analysis (1)

Analyte	Analyst	Method	Result	Units	z score (** z' score)	Assigned Value	Ux AV	SDPA	Exp.SDPA	No of results	Median	Mean	Robust SD	SD
Fat	Lab Result	Acid hydrolysis & soxhlet	20.52	%	-0.45	20.83	0.15	0.690	N/A	17	21.07	21.00	0.519	0.660
Ash	Lab Result	Drying at 550°C	1.78	%	-0.80	1.86	0.01	0.100	N/A	21	1.85	1.81	0.074	0.115
Protein	Lab Result	Kjeldahl	6.80	%	0.00	6.80	0.05	0.300	N/A	27	6.78	6.80	0.208	0.380
Moisture	Lab Result	Drying at 130°C	2.21	%	-0.40	2.41	0.07	0.5	N/A	9	2.41	2.56	0.178	0.377
Total Sugars	Lab Result	HPLC	16.75	%	0.66	15.44	0.51	2.000	N/A	17	14.90	14.93	1.705	1.843

** Please note, participant performance for this analyte has been assessed using a z' score, rather than a z score, in order to account for the measurement uncertainty of the assigned value which is not negligible when compared to the SDPA.

ANEXO H. Certificado de análisis del sulfato de amonio estándar primario

Certificate of Analysis

Page 1 of 1

R-003



1 Reagent Lane
Fair Lawn, NJ 07410
201.796.7100 tel
201.796.1329 fax

Certificate of Analysis

Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System Standard ISO9001:2008 standard by DNV Certificate number CERT-08052-2006-AQ-HOU-ANAB

This is to certify that units of the above mentioned lot number were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Certain products (USP/FCC/NF/EP/BP/JP grades) are sold for use in food, drug, or medical device manufacturing. Fisher does not claim regulatory coverage under 21 CFR nor maintain DMF's with the FDA. The following are the actual analytical results obtained:

Catalog Number	A938	Mfg. Date	12/20/2011
Lot Number	116128		
Description	AMMONIUM SULFATE, PRIMARY STANDARD		
Country of Origin	United States	Recommended Retest Date	Dec-2016

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	WHITE CRYSTALS
ASSAY	%	Inclusive Between 20.98 21.38	21.04
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
MESH SIZE	PASS/FAIL	= Pass test (80% through #20)	Pass test (80% through #20)
PH 5% SOLN @ 25 DEG C		Inclusive Between 5.0 6.0	5.7



Edgar E. Hase

Lab Manager Fair Lawn

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as a extension of this catalog number listed above. If there are any questions with this certificate, please call Chemical Services at (800) 227-6701.

ANEXO I. Procedimiento interno para la estimación de la incertidumbre

ECUACHEMLAB Cía. Ltda. Laboratorio Químico y Microbiológico del Ecuador		
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS	Edición:	01
	Documento:	PO-16-5.4
	Página:	1 de 4
PROCEDIMIENTO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN		

1.- OBJETIVOS

Establecer un procedimiento para la estimación de la incertidumbre de la medición para los métodos de análisis efectuados por **Ecuachemlab Cía. Ltda.**

2.- ALCANCE

Este procedimiento aplica desde la identificación de la necesidad de estimar la incertidumbre de la medición hasta la expresión de los resultados tanto para métodos Normalizados, no Normalizados u Oficiales que hayan sido modificados.

3.- DEFINICIONES

Coficiente de variación: es una medida de dispersión que describe la cantidad de variabilidad en relación con la media.

Desviación Estándar: Es la raíz cuadrada positiva de la varianza.

Error de la Medición: El resultado de una medición menos el valor del mesurando (no cuantificable de manera precisa debido a que el valor real del mesurando se encuentra dentro del rango acotado por la incertidumbre).

Evaluación de tipo A (de incertidumbre): Método de evaluación de la incertidumbre mediante el análisis estadístico de serie de observaciones.

Evaluación de tipo B (de incertidumbre): Método de evaluación de la incertidumbre por medios distintos al análisis estadístico de serie de observaciones.

Incertidumbre expandida, U : Magnitud que define un intervalo en torno al resultado de una medición y en el que se espera encontrar una fracción importante de la distribución de valores que podrían ser atribuidos razonablemente al mesurando. Se obtiene multiplicando la incertidumbre típica combinada por el "factor de cobertura".




Incertidumbre típica combinada, $u(y)$: Incertidumbre típica del resultado de una medición, cuando el resultado se obtiene a partir de los valores de otras magnitudes. Es el resultado de la combinación de la incertidumbre típica de los componentes.

Incertidumbre: Es un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse de manera razonable al "mesurando".

Mensurando: La cantidad específica a la medición.

Nivel de Confianza: La probabilidad de que el mesurando se encuentre dentro del rango de incertidumbre definido.

Varianza: Una medida de la dispersión de un conjunto de mediciones que se obtiene mediante la suma del cuadrado de las diferencias de las observaciones con respecto al promedio, dividida entre el número de observaciones menos uno.

Elaborado por:  Quím. Al. Tania Bastidas Jefe Área Físico Químico Fecha: 25-09-15	Revisado por:  Quím. Al. Gabriela Delgado Gerencia de Calidad Fecha: 29-09-15	Aprobado por:  Dr. Bladimir Acosta Gerencia General Fecha: 30-09-15
--	--	--

ECUACHEMLAB Cia. Ltda. Laboratorio Químico y Microbiológico del Ecuador		
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS	Edición:	01
	Documento:	PO-15-5.4
	Página:	2 de 3
PROCEDIMIENTO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN		

4.- RESPONSABILIDADES

La **Gerencia General** es responsable de:

- Velar por el cumplimiento del presente procedimiento.
- Facilitar los recursos y las condiciones para que sea estimada de la mejor manera, la incertidumbre de la medición de los métodos de análisis.

La **Gerencia de Calidad** es responsable de supervisar que se encuentren establecidas las incertidumbres de medición de los métodos de análisis.

El **Jefe de Área** es responsable de supervisar la obtención de datos para la evaluación de la incertidumbre de medición, tratarlos estadísticamente y analizarlos.

El **Personal Técnico** es responsable de realizar todas las actividades necesarias para la obtención de la incertidumbre de la medición de los métodos de análisis.

5.- ACTIVIDADES

La determinación de la incertidumbre de la medición se realizará en métodos donde:

- Los resultados de la medición son cuantitativos
- Las decisiones se basan en resultados cuantitativos
- Existe un requisito definido por el cliente, método o la regulación aplicable.

Los métodos en los que no se requiere la evaluación de la incertidumbre son:

- Aquellos cualitativos (presencia o ausencia), es decir pruebas en donde el resultado se obtiene de la comparación con material de referencia cuyo resultado numérico es asignado de manera subjetiva y mediante un juicio.
- Cuando en un certificado de calidad se especifique los valores de incertidumbre, así como la forma de presentar los resultados calculados.

La **Gerencia de Calidad** y/o el **Jefe de Área** determinan todos los factores que pueden influir en los valores medidos mediante un modelo matemático y selecciona cuál o cuáles de ellos se deben tomar en cuenta y/o controlar, para la obtención de la incertidumbre de medida.

Los factores que contribuyen a la incertidumbre de la medición, pueden incluir, pero no están limitados a:

- Factores humanos
- Condiciones ambientales
- Métodos de prueba y validación de métodos
- Equipo
- Trazabilidad de la medición
- Muestreo (donde sea aplicable)
- El manejo de los elementos de la medición.

		
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS	Edición:	01
	Documento:	PO-15-5.4
	Página:	3 de 3
PROCEDIMIENTO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN		

- Incertidumbre de calibración de equipos e instrumentos de medida.

La manera en que dichos factores contribuyen a la incertidumbre total de las mediciones dependerá de la naturaleza o tipo de análisis en donde se la determine. El laboratorio tomará en cuenta dichos factores en el desarrollo de sus métodos, en la calificación y entrenamiento de su personal, en la selección del equipo a utilizar y en la interpretación de los resultados obtenidos.

En general, se tomará en cuenta, para el cálculo de la incertidumbre, las estimaciones de entrada, que se evaluarán en dos grupos

Tipo A: Se evalúa la incertidumbre mediante el análisis estadístico de una serie de observaciones. (Repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, etc.).

Tipo B: Se evalúa la incertidumbre en base a la experiencia, certificados de calidad, calibración, resolución, etc.

El **Jefe de Área** al momento de realizar la estimación de la incertidumbre de la medición deben considerar y determinar todas las variables que se requieran tomar en consideración como componentes influyentes en el valor de la incertidumbre, en base a la utilización de diagramas de causa y efecto, lluvia de ideas, análisis de varianza entre otros, que le permitan dilucidar la relevancia e influencia de las diferentes variables en la magnitud del mensurando. El resultado de este análisis será almacenado en el **Registro de Análisis para No Conformidades R-01-4.11**, con la necesaria aprobación de la **Gerencia de Calidad** para su puesta a punto.

Una vez que se han tomado en cuenta todos los factores antes analizados, se plantea el modelo matemático a seguir para el cálculo de la incertidumbre en el **Registro de Modelos Matemáticos para Cálculos de Incertidumbre R-05-5.4**, el **Jefe de Área**, procede a guiar al **Personal Técnico** en la obtención de todos los datos de validación que permitan calcular el valor de la incertidumbre de la medición, mediante software de cálculo, y evidencia los resultados en el **Registro de Declaración de la Incertidumbre del método. R-03-5.4**.


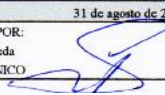
6.- DOCUMENTOS Y/O REFERENCIAS

- Norma NTE INEN-ISO/IEC 17025:2005
- Criterios Generales para la Acreditación de Laboratorios de Ensayo y calibración SAE CR GA01 R00

7.- REGISTROS

- Registro de Declaración de la Incertidumbre del método. R-03-5.4
- Registro de Modelos Matemáticos para Cálculos de Incertidumbre R-05-5.4
- Registro de Análisis para No Conformidades R-01-4.11

ANEXO J. Certificado de calibración de la balanza analítica Mettler Toledo AX205

Elicrom Cia. Ltda.		CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN				 Acreditación N° OAE L.C. G 18-008 LABORATORIO DE CALIBRACIÓN				
		Ciudadela Guayaquil, calle 1era. mz. 21 solar 10 Guayaquil - Ecuador Pbx: 04-2282007 Fax: ext. 403 http://www.elicrom.com mail: ventas@elicrom.com								
		CERTIFICADO NÚMERO				1859-09-15				
IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE										
EMPRESA:		ECUACHEMLAB LABORATORIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL ECUADOR CIA. LTDA.								
DIRECCIÓN:		PASAJE S/N N3-62 Y SIMON BOLIVAR, ARMENIA 1								
TELÉFONO:		3614718								
IDENTIFICACIÓN DEL EQUIPO										
EQUIPO:		BALANZA ANALITICA		UNIDAD DE MEDIDA:		Gramos (g)				
MARCA:		METTLER TOLEDO		RESOLUCIÓN (d):		0,0001				
MODELO:		AX205		VALOR DE VERIFICACIÓN (e):		0,001				
SERIE:		1125061710		CAPACIDAD MÁXIMA:		220				
CÓDIGO:		EAFQ-009		CAPACIDAD MÍNIMA (OIML):		0,1				
CLASE DE EXACTITUD (OIML):		1 ESPECIAL		UBICACIÓN:		LABORATORIO FÍSICO QUÍMICO				
PATRÓN/EQUIPO(S) UTILIZADO (S)										
CÓDIGO	NOMBRE	MARCA	CLASE	SERIE	FECHA CAL.	FECHA PROX. CAL.				
EL.PT.404	JUEGO DE PESAS 50 mg - 200 g	KERN	CLASE E2	G1326511	17-dic-13	17-dic-15				
EL.PT.054	BAROMETRO	CONTROL COMPANY	1081	140380202	02-jun-14	02-jun-16				
EL.PT.037	TERMOHIGRÓMETRO	TAYLOR	1523	NO ESPECIFICA	14-jul-15	14-ene-16				
CALIBRACIÓN										
PROCEDIMIENTO:		PEC.EL.01		CONDICIONES AMBIENTALES:		Temperatura máxima °C 21,1 Temperatura mínima °C 21,1				
MÉTODO EMPLEADO:		COMPARACIÓN DIRECTA CON PESAS PATRÓN								
ENSAYO DE EXCENTRICIDAD										
UBICACIÓN	INDICACIÓN	ERROR	E.M.P.	¿CUMPLE?						
No. 1	199,9996	-0,0004	0,0020	Cumple						
No. 2	199,9995	-0,0005	0,0020	Cumple						
No. 3	199,9996	-0,0004	0,0020	Cumple						
No. 4	199,9998	-0,0002	0,0020	Cumple						
No. 5	199,9997	-0,0003	0,0020	Cumple						
LINEALIDAD / HISTÉRESIS										
Nominal de masa	0,05	0,1	1	50	110	150	170	190	215	220
Lectura balanza ↑	0,0500	0,1000	1,0000	50,0000	109,9995	149,9993	169,9996	189,9993	214,9997	219,9996
Lectura balanza ↓	0,0500	0,1000	1,0000	50,0001	109,9996	149,9992	169,9996	189,9995	214,9993	219,9996
Masa certificada	0,05000	0,10001	1,00011	50,00010	109,99961	149,99970	169,99968	189,99985	215,00000	220,000138
Incert. Patrón	0,000004	0,000050	0,000010	0,000030	0,000070	0,000080	0,00011	0,00013	0,00012	0,00013
Error de Histéresis	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0000	0,0002	0,0004	0,0000
Error de Linealidad	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	-0,0005	-0,0007	-0,0004	-0,0006	-0,0005	-0,0004
E.M.P. *	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0020	0,0020	0,0020	0,0020	0,0030	0,0030
¿CUMPLE?	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
ENSAYO DE REPETIBILIDAD										
No. Pesada	Indicación									
No. 1	99,9996									
No. 2	99,9996									
No. 3	99,9997									
No. 4	99,9998									
No. 5	99,9996									
No. 6	99,9996									
E.M.P.	0,0020									
MAX-MIN	0,0002									
¿CUMPLE?	Cumple									
Contribución a la incertidumbre por:	Tipo de Distribución:	Cocf. de Sensibilidad	Incertidumbre Gramos (g)							
Repetibilidad	T de Student	1	0,0000837							
Resolución	Rectangular	1	0,0000289							
Excentricidad	Conv. recítrian.	1	0,0000601							
Linealidad	Gaussiana	1	0,0001715							
Histéresis	Gaussiana	1	0,0000000							
Deriva de los instrumentos	Rectangular	1	0,0000719							
Efecto de convección	Rectangular	1	0,0000299							
Peso Patrón/Densidad del aire	Gaussiana	1	0,0001308							
SUMA DE CUADRADOS			0,00000064							
Incertidumbre Combinada			0,00025							
Grados Efectivos de Libertad (Veff)			418							
Factor de Cobertura (K)			2,0							
INCERTIDUMBRE ALEATORIA (EXPANDIDA)			0,00051							
ECUACIÓN DE INCERTIDUMBRE TOTAL										
DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD										
La balanza cumple los requisitos 3.6.1 (Repetibilidad), 3.6.2 (Excentricidad) y 3.5 (Errores Máximos Permitidos) de la OIML R 76-1:2006										
OBSERVACIONES										
* e.m.p = Error Máximo Permitido por la OIML R 76-1:2006										
El cálculo de la incertidumbre expandida se realizó en base a la guía OAE G02 R01, multiplicando la incertidumbre típica por el factor de cobertura (k=2,00), que para una distribución de t de Student con (Veff = 418) grados efectivos de libertad corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente el 95,45%. La incertidumbre típica de medición se ha determinado conforme al documento EA-4-02. Este certificado no podrá reproducirse excepto en su totalidad sin la aprobación escrita del laboratorio Elicrom Calibración. El presente certificado se refiere solamente al equipo arriba descrito al momento del ensayo.										
CALIBRACIÓN REALIZADA POR:		Marlon Muñoz								
FECHA DE CALIBRACIÓN:		31 de agosto de 2015		FECHA PRÓXIMA		agosto-16				
AUTORIZADO POR:		Ing. Sabino Pineda			RECIBIDO POR:					
GERENTE TÉCNICO					RESPONSABLE - CLIENTE					

ANEXO K. Declaración de la validación del método

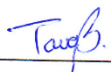
ECUACHEMLAB Cía. Ltda.
Laboratorio Químico y Microbiológico del Ecuador

REGISTRO DE VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS	Edición: 01
	Fecha: 28-03-2016

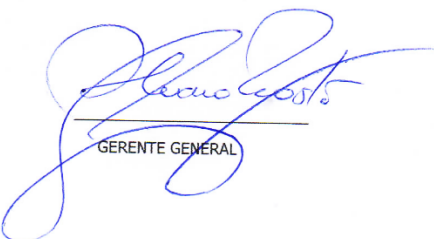
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LA VALIDACIÓN:

	CRITERIO	VALOR	EVALUACIÓN
SERIE DE REPETICIONES	%SDR	≤ 5	ACEPTA
REPETIBILIDAD	VALOR F	≤ 2.25	ACEPTA
T-STUDENT	VALOR T	≤ 2.10	ACEPTA
REPRODUCIBILIDAD	VALOR F	≤ 2.25	ACEPTA
EXACTITUD	Z-SCORE	$\geq -2 \text{ Z} \leq 2$	ACEPTA
RECUPERABILIDAD	% Recuperabilidad	95% - 105%	ACEPTA
INCERTIDUMBRE	u	$\leq 30\%$ RANGO BAJO	ACEPTA

Habiendo cumplido satisfactoriamente con los criterios de aceptación, se declara como validado el método de determinación de Proteína cruda PA-FQ-160, para las matrices de: cárnicos y derivados, cereales y derivados, lácteos y derivados. Para su constancia firman:


JEFE DE AREA


GERENTE DE CALIDAD


GERENTE GENERAL

ANEXO L. Procedimiento interno de análisis de proteína implementado en Ecuachemlab

		
PROCEDIMIENTO DE ANALISIS	Edición:	02
	Documento:	PA- FQ - 160
	Página:	1 de 6
DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA AOAC Official Method 2001.11 18th Edition 2005		

1. OBJETIVO:

Establecer las directrices necesarias para realizar la determinación de proteína cruda en alimentos.

2. ALCANCE:

Aplicable a todos los alimentos:

- Cereales y derivados.
- Lácteos y derivados.
- Cárnicos y derivados.




3. PRINCIPIO.


Consiste en la digestión de la muestra con ácido sulfúrico a 420 °C utilizando catalizador para transformar el nitrógeno de la proteína en (NH₄)₂SO₄. El amoniaco es liberado por destilación en medio alcalino, y es recogido sobre H₃BO₃ y cuantificado por titulación con ácido clorhídrico normalizado.

4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

- El manejo de las muestras se realiza en base al procedimiento Instructivo de Transporte, Manipulación, Recepción, Protección, y Disposición de las muestras IG-01-5.8.
- Para cereales y sus derivados realizar una homogenización previa, agitando el recipiente que la contiene y proceder a pesar.
- Para granos y muestras heterogéneas, triturar las muestras en partículas lo más finas posibles, homogenizar la muestra y proceder a pesar.
- Para muestras de leche y derivados, se procede a homogenizar bien la muestra por agitación y se procede a pesar.
- En caso de cárnicos que se encuentren almacenados en refrigeración, esperar que la muestra adquiera temperatura ambiente, si la muestra ya se encuentra a temperatura ambiente trocear en pedazos pequeños, triturar, homogenizar y proceder a pesar.

5. PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Elaboró:  <hr/> Andrea Salazar Analista Físico Químico	Revisó:  <hr/> Quim. Al. Gabriela Delgado Gerente de Calidad	Aprobó:  <hr/> Dr. Bladimir Acosta Gerente General
Fecha: 28-03-2016	Fecha: 29-03-2016	Fecha: 29-03-2016

		
PROCEDIMIENTO DE ANALISIS	Edición:	02
	Documento:	PA - FQ- 160
	Página:	2 de 5
DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA AOAC Official Method 2001.11 18th Edition 2005		

5.1 Preparación del ácido Bórico al 4%:

Pesar aproximadamente 40,00 g de ácido bórico y colocar en un vaso de precipitación adicionando 700 ml agua desmineralizada caliente y llevarlo al ultrasonido hasta disolución total, sacar del ultrasonido dejar enfriar y trasvasar a un balón aforado de 1000 ml, añadir 10 ml de indicador de verde de bromocresol y 7 ml de rojo de metilo y llevar a volumen

5.2 Preparación del Hidróxido de Sodio 40% p/p

Pesar aproximadamente 400,00 g de hidróxido de sodio y llevarlo a volumen de 1000 ml con agua desmineralizada

5.3 Preparación del Ácido Clorhídrico 0,1 N

Colocar 16,8 ml de Ácido Clorhídrico concentrado p.a. en un balón aforado de 2000 ml y aforar con agua desmineralizada. Valorar la solución de Ácido clorhídrico.

6. LÍMITES

MATRIZ	Límite de Repetibilidad Lr	Límite de Reproducibilidad LR
	(%)	(%)
Cereales y derivados	0.39	0.43
Lácteos y derivados	0.24	0.22
Cárnicos y derivados	0.28	0.32

7. RANGO DE TRABAJO.

MATRIZ	RANGO
	(%)
Cereales y derivados	7.00 – 34.00
Lácteos y derivados	0.30 – 24.00
Cárnicos y derivados	9.00 – 23.00

8. EQUIPOS

- Balanza analítica EAFQ-009
- Digestor de Proteína EAFQ-015; EAFQ-018
- Destilador de Proteína EAFQ-007
- Equipo de Sistema de purificación de agua EAFQ-013

PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

Edición:	02
Documento:	PA - FQ- 160
Página:	3 de 5

DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA
AOAC Official Method 2001.11 18th Edition 2005

- Tubos de Kjeldhal
- Pipeta graduada
- Probeta graduada

9. REACTIVOS

- Tabletas de Kjeldhal (catalizador)
- Acido Sulfúrico grado técnico
- Hidróxido de Sodio al 40%
- Acido Bórico al 4%
- Acido Clorhídrico 0,1 N (Solución Normalizada)
- Rojo de Metilo 0.1 %
- Verde de Bromocresol 0.1 %
- Agua desmineralizada

10. MATERIALES DE REFERENCIA

- Infant/Adult Nutritional Formula MR-78
- Meat Homogenate MR-05
- Formula Breakfast Cereal MR-77
- Salchicha Vienesas MR-26
- Mortadela Italiana MR-17
- Pollo con Piel MR-19
- Lomitos Van Capms MR-13
- Maiz Mediano MR-15
- Quinoa Especial MR-23
- Lenteja especial MR-12
- Cereales la Pradera Soy Bean MR-06
- Miraflores Mantequilla Pasteurizada MR-16
- Vita Leche descremada UHT MR-29
- Arequipe MR-01
- Leche en polvo Nestle La Vaquita MR-18
- Queso Maduro Cheddar Javeriano MR-21

11. NORMA DE SEGURIDAD Y VERIFICACION DE EQUIPOS

- Verificar que los equipos a utilizar se encuentren debidamente conectados y encendidos.
- Verificar que la balanza se encuentre nivelada, limpia y en perfectas condiciones.
- Verificar antes de utilizar el equipo que los niveles de los reactivos en los tanques estén con suficiente cantidad.
- Cuando se preparan las muestras para la digestión al momento de adicionar las tabletas de Kjeldahl, ácido sulfúrico y agua se debe utilizar guantes.

PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

Edición:	02
Documento:	PA - FQ- 160
Página:	4 de 5

DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA
AOAC Official Method 2001.11 18th Edition 2005

- Cuando se vayan a desechar las muestras después de la destilación se lo debe hacer con cuidado considerando que los tubos alcanzan altas temperaturas, al igual que la solución en su interior.
- Realizar la preparación de los reactivos ácido bórico, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico como indica este procedimiento de análisis


12. PROCEDIMIENTO

11.1 Digestión

- Pesar la cantidad adecuada de muestra:
 - Cereales y derivados entre 0.5 y 1 g
 - Lácteos solidos entre 0.5 y 1 g
 - Lácteos líquidos entre 1 y 2 g
 - Cárnicos y derivados entre 0.5 y 1 g
 - Otros de 0.5 – 2.0 g
- Pesar la muestra dentro de un molde de papel libre de nitrógeno, y colocarla dentro del tubo de Kjeldhal.
- Agregar a cada tubo una tableta de catalizador y 12 ml de ácido sulfúrico concentrado con cuidado.
- Ubicar los tubos dentro de las celdas del digestor, se debe realizar siempre dentro de la Sorbona.
- Encender el digestor que está programado a 420 °C. Una vez que ha llegado a 420 °C +/- 10°C se debe tomar el tiempo de 30 minutos para completar la digestión. Comprobar que las muestras estén claras y transparentes.
- Una vez transcurrido el tiempo necesario apagar el equipo y dejar enfriar, luego sacar los tubos de la sorbona verificar que no haya desprendimiento de vapores.
- Adicionar 50 ml agua destilada cuidadosamente, si se da una reacción violenta es porque los tubos están muy calientes, entonces se los debe dejar enfriar unos diez minutos más.
- En caso de que las sales solidifiquen se deben calentar ligeramente los tubos y agitarlos hasta que las sales se hayan disuelto y entonces se adiciona el agua.

11.2 Destilación

- Verificar que exista la suficiente cantidad de NaOH al 40% y H3BO3 en el tanque correspondiente y que el volumen de adición automática se encuentre ajustado para cada uno de los reactivos.
- Verificar el volumen de ácido clorhídrico HCl 0,1 N en el tanque de titulante
- El equipo destilará y titulará automáticamente desplegando un valor de volumen de HCl 0.1 N utilizado para titular la muestra

		
PROCEDIMIENTO DE ANALISIS	Edición:	02
	Documento:	PA - FQ- 160
	Página:	5 de 5
DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA AOAC Official Method 2001.11 18th Edition 2005		

- Una vez concluida la destilación se registra el valor del volumen consumido y se procederá a los cálculos

13. CÁLCULO Y REPORTE DE RESULTADOS

$$\% \text{ Proteína} = \frac{V \text{ HCl} \times N \text{ HCl} \times 0,014 \times \text{factor} \times 100}{\text{g muestra}}$$

De donde:

N = normalidad de HCl

V = volumen en ml de HCl utilizado

g = gramos de muestra

Factores de Conversión según Norma NTE INEN 1334-2:2008:

- Leche y productos lácteos: 6.38
- Carne, pescado, Huevos, otros: 6.25

El resultado se reportará como % de Proteína registrandolo en el Informe de Resultados Área Físico Químico R-03-4.1, de acuerdo a la orden de trabajo correspondiente.

14. CRITERIO DE ACEPTACION Y RECHAZO

Cuando se realiza el análisis de una muestra de intercomparación se utilizará el Z-Score, el mismo que deberá ser: ≥ -2 $Z \leq 2$.

Adicionalmente se correrá un blanco todas las veces que se realice el análisis y patrón una vez a la semana.

15. INCERTIDUMBRE DEL METODO.

MATRIZ	INCERTIDUMBRE
	(%)
Cereales y derivados	%Proteína x 0.021
Lácteos y derivados	%Proteína x 0.014
Cárnicos y derivados	%Proteína x 0.030

16. REFERENCIAS.

- Métodos Oficiales AOAC 2005, Edición 18

