



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



Tema:

**“Determinación de Vitamina B₂ (Riboflavina) por
Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en el
Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda.”**

Trabajo de Titulación, modalidad de Experiencia Práctica de Investigación y/o Intervención, previa la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Mario Fernando Semanate Bautista

Tutor: Ing. Mg. Manolo Alexander Córdova Suárez

Ambato – Ecuador

Septiembre 2016

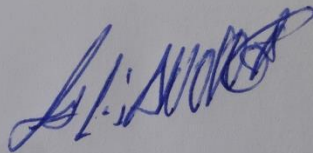
APROBACIÓN POR EL TUTOR

Ing. Manolo Alexander Córdova Suárez

Certifico:

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

Ambato, 27 de Junio de 2011



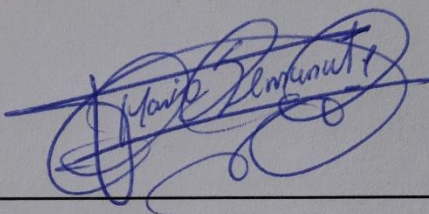
Ing. Mg. Manolo Alexander Córdova Suárez

C.C 1802842508

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Mario Fernando Semanate Bautista, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, previo la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Mario Fernando Semanate Bautista

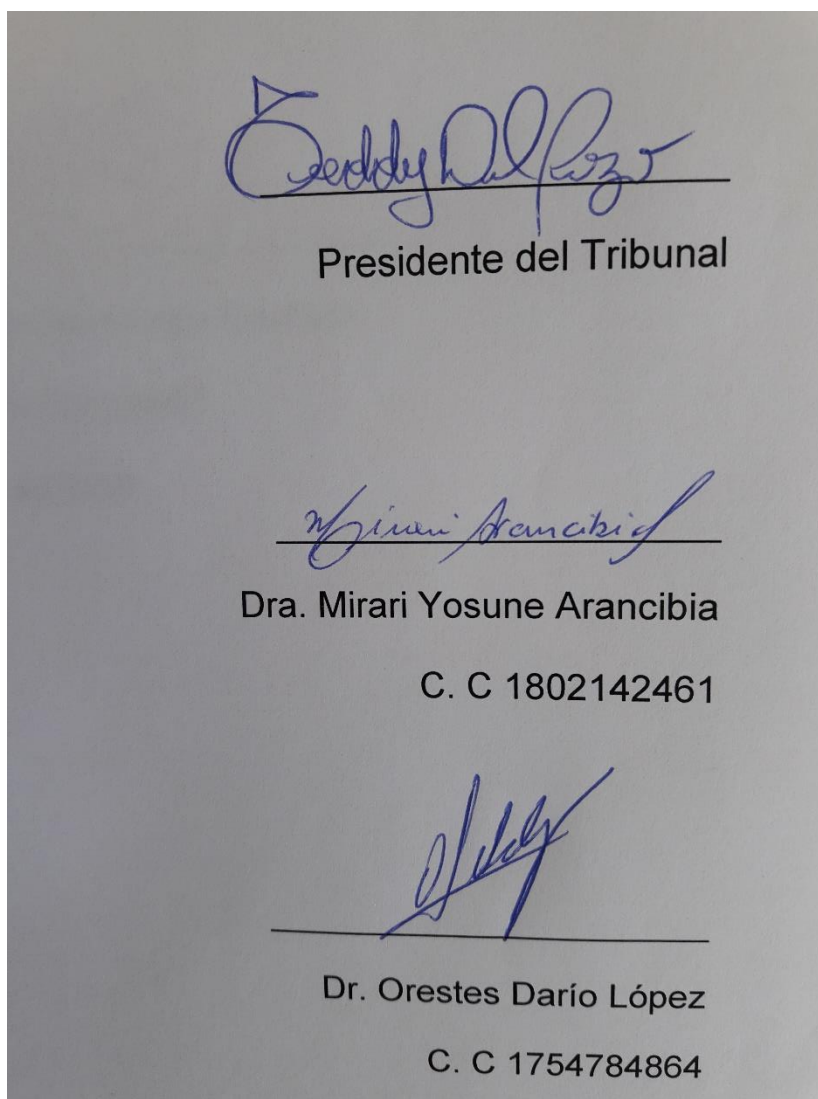
CC: 0503720567

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Experiencias Prácticas 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:

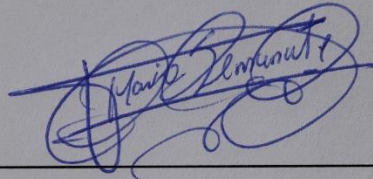


Ambato, 2 de Agosto de 2016.

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación 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 Trabajo 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.



Mario Fernando Semanate Bautista

CC: 0503720567

AUTOR

DEDICATORIA

A MI PADRE,
POR TU DEDICACIÓN Y EMPEÑO EN CADA MOMENTO DE MI VIDA

Mario Semanate

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres y Hermanos por su apoyo incondicional y dedicación en cada momento de mi vida. A mis compañeros de aula y tesis que han demostrado ser más que compañeros unos verdaderos amigos.

En especial a mi Tutor y amigo Ing. Mg. Manolo Córdova. A mis amigas, Ing. Nancy Quinaluisa e Ing. Paola Hidalgo por el desarrollo y consecución del presente trabajo de titulación.

A la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la FCIAL por las cátedras impartidas a lo largo de la carrera. Al Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda. por abrirme las puertas de su empresa y realizar la parte experimental del trabajo de titulación, especialmente por despertar en mí el interés por la investigación en el campo analítico en el área cromatográfica.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de Investigación.....	3
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos Específicos	4

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos	5
2.1.1 Validación de Métodos	5
2.1.2 Método para la determinación de Riboflavina.....	6
2.1.3 Importancia de las vitaminas	7
2.2 Hipótesis.....	8
2.2.1 Hipótesis Nula	8
2.2.2 Hipótesis Alternativa.....	8
2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis	8
2.3.1 Variable Independiente	8
2.3.2 Variable Dependiente	8

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Materiales	9
3.1.1	Equipos	9
3.1.2	Reactivos	10
3.2	Metodología	10
3.2.1	Preparación de la Fase Móvil	10
3.2.2	Preparación de la curva de calibración	11
3.2.3	Preparación de la muestra	11
3.2.4	Preparación del blanco	13
3.2.5	Condiciones Cromatográficas	13
3.2.6	Obtención del Cromatograma	13
3.2.7	Análisis e Interpretación del Cromatograma	14
3.3	Validación del método	14
3.4	Parámetros de validación	15
3.4.1	Linealidad	15
3.4.2	Límite de Cuantificación (LC)	18
3.4.3	Rango de trabajo	19
3.4.4	Precisión	19
3.4.5	Tratamiento estadístico	22
3.4.6	Exactitud	22
3.4.7	Incertidumbre	23

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Obtención de los Datos Primarios	27
4.1.1	Primer Nivel (MR-10)	27

4.1.2	Segundo Nivel (MR-60)	28
4.1.3	Tercer Nivel (MR-63)	29
4.1.4	Cuarto Nivel (MR-64)	30
4.2	Linealidad	31
4.3	Límite de detección (LD)	35
4.4	Rango de Trabajo	37
4.5	Precisión	37
4.5.1	Tratamiento estadístico	40
4.6	Análisis de Exactitud	43
4.6.1	Análisis de Incertidumbre	44
4.6.2	Especificación	45
4.6.3	Identificación de las fuentes de Incertidumbre	45
4.6.4	Cuantificación y combinación	46

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones	51
5.2	Recomendaciones	52
6.	BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1:** Materiales de Referencia
- Tabla 2:** Niveles establecidos para la Validación
- Tabla 3:** Modelo para la estimación de la linealidad
- Tabla 4:** Modelo para el análisis de varianza (ANOVA) aplicado a cada nivel de concentración
- Tabla 5:** Datos Primarios MR-10. Técnico 1
- Tabla 6:** Datos Primarios MR-10. Técnico 2
- Tabla 7:** Datos Primarios MR-60. Técnico 1
- Tabla 8:** Datos Primarios MR-60. Técnico 2
- Tabla 9:** Datos Primarios MR-63. Técnico 1
- Tabla 10:** Datos Primarios MR-63. Técnico 2
- Tabla 11:** Datos Primarios MR-64. Técnico 1
- Tabla 12:** Datos Primarios MR-64. Técnico 2
- Tabla 13:** Datos de las curvas de calibración para la determinación de riboflavina
- Tabla 14:** Estimación Lineal de las curvas en forma integrada
- Tabla 15:** Límites de la recta de calibrado integrada (global)
- Tabla 16:** Blancos preparados
- Tabla 17:** Resumen de las concentraciones de riboflavina por nivel
- Tabla 18:** Concentraciones de vitamina B2 para evaluar el Nivel 1
- Tabla 19.** mg de riboflavina/100g de muestra
- Tabla 20.** Análisis de varianza ANOVA (Nivel 1)
- Tabla 21.** Análisis de varianza ANOVA (Nivel 2)
- Tabla 22.** Análisis de varianza ANOVA (Nivel 3)
- Tabla 23.** Análisis de varianza ANOVA (Nivel 4)

Tabla 24. Resumen ANOVA

Tabla 25. Determinación de la concentración del MRC-77

Tabla 26. Determinación de la concentración del MRC-78

Tabla 27. Identificación de las fuentes de Incertidumbre

Tabla 28. Incertidumbres del material volumétrico

Tabla 29. Incertidumbre combinada de los estándares preparados

Tabla 30. Incertidumbre por reproducibilidad (μ_R)

Tabla 31. Incertidumbre combinada del método y expandida del método

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Principales Cromatogramas

ANEXO B: Tablas de ANOVA en Infostat

ANEXO C: Certificado del Material de Referencia MRC-77

ANEXO D: Certificado del Material de Referencia MRC-78

ANEXO E: Certificados de calidad de reactivos

ANEXO F: Fotografías de materiales y equipos

ANEXO G: Procedimiento de análisis para la determinación de Vitamina B₂

ANEXO H: Características del HPLC utilizado y certificado de instalación

ANEXO I: Certificados de calibración de balanza, pipeta automática y baño termostático.

RESUMEN

La validación de métodos analíticos es un proceso indispensable que los laboratorios deben implementar para garantizar que los resultados obtenidos en los análisis son fiables y reproducibles con un fundamento y análisis estadístico. De igual manera la metodología empleada para la validación muestra un gran desempeño en las condiciones de trabajo de Ecuachemlab Cía. Ltda. Para la determinación de Vitamina B₂ (Riboflavina) por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) se empleó la metodología descrita en el Método AOAC 970.65 modificado y la norma ISO/IEC 17025 que describe las directrices y parámetros para la validación del método asegurando la validez de los resultados. Los parámetros analíticos que se determinaron son: linealidad, rango de trabajo, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud e incertidumbre. Los resultados obtenidos muestran para la linealidad un coeficiente de correlación superior a $r=0,999$ para cada curva de calibración, el LD es igual a 0,002 µg/ml y el LC es de 0,08 µg/ml. El rango de trabajo comprende una concentración de 0,008 µg/ml de riboflavina como límite inferior y 1,003 µg/ml de riboflavina como límite superior. El coeficiente de variación por repetibilidad y reproducibilidad es menor al 3 y 5% respectivamente, para determinar la exactitud se consideró un Z-score que se encuentra dentro de los límites establecidos para cada MRC. Finalmente se determinó una Incertidumbre Combinada y Expandida para los tres primeros niveles establecidos de +/-0,04 y +/-0,08 mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra respectivamente. Para el último nivel se estableció un valor de Incertidumbre Combinada de +/-0,05 e Incertidumbre Expandida igual a +/-0,09 mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra, trabajando a un intervalo de confianza del 95% con un factor de cobertura $k=2$.

Palabras claves: Validación, Ecuachemlab Cía. Ltda., incertidumbre.

ABSTRACT

The validation of analytical methods is an essential process that laboratories must implement to ensure that the results of analyzes are reliable and reproducible with a basis and statistical analysis. Similarly, the methodology used for validation shows a great performance in working conditions of Ecuachemlab. For the determination of Vitamin B₂ (Riboflavin) using high-performance liquid chromatography (HPLC), the methodology described in the AOAC 970.65 Method modified and ISO / IEC 17025 were used. They describe the guidelines and parameters for validation of the method used to ensure the validity results. The analytical parameters determined for method validation are linearity, working range, detection and quantification limits, precision, accuracy and uncertainty. The results, for linearity show a coefficient of correlation higher than $r = 0.999$ for each calibration curve, LD is equal to 0.002 ug / ml and the LC is 0.08 ug / ml. The working range comprises a concentration of 0.008 mg / ml of riboflavin as a lower limit and 1,003 ug / ml of riboflavin as an upper limit. The coefficient of variation for repeatability and reproducibility is less than 3 and 5% respectively. To determine the accuracy, a Z-score within the limits for each MRC was considered. Finally it was identified a combined and expanded uncertainty for the first three levels set of ± 0.04 and ± 0.08 mg vitamin B₂ per 100 g of sample respectively. For the last level value it was established an uncertainty value of 0.05 \pm combined and expanded uncertainty equal to ± 0.09 mg vitamin B₂ per 100 g of sample, working at a confidence interval of 95% with a coverage factor $k = 2$.

INTRODUCCIÓN

La validación de métodos analíticos es un proceso mediante el cual se establece que un método cumple con las características de desempeño y los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. El resultado de la validación es probar la aptitud de los métodos, documentar su validez y cumplir con los estándares de calidad (**EURACHEM, 2005; Pappa, 2013**). El principio del método para la extracción y cuantificación de la vitamina B₂ consiste en un tratamiento enzimático de la muestra, seguido por una hidrólisis ácida, para luego ser leído por HPLC. Finalmente el principio activo es detectado por el espectrofluorómetro (**Horwitz & Latimer, 2012**).

La cromatografía permite la separación de componentes de una mezcla para poder ser detectados posteriormente (**Swadesh, 2000**). La técnica de análisis de elución y más reportada bibliográficamente para la determinación de vitaminas es la técnica cromatográfica, gaseosa y de líquidos donde se utiliza por lo general en fase normal columnas de sílice y en fase reversa columnas tradicionales C18 (**Sierra, y otros, 2007**).

La riboflavina es una vitamina involucrada en la producción de energía en la cadena de transporte de electrones. La ingesta de alimentos que contengan esta vitamina es necesaria para el correcto funcionamiento del cuerpo humano (**Bueno, y otros, 2009**), siendo la necesidad de ingesta diaria en una persona adulta de alrededor 1,6 mg/día (**Viñas, y otros, 2004**). Esta se encuentra principalmente en la carne, pescado, lácteos y en los vegetales de color verde (**Souza, Ferreira, Bezerra, & Aoyama, 2005**), es por este motivo que la determinación de esta vitamina dentro de la industria de los alimentos es imprescindible. Dentro de los métodos más utilizados para la cuantificación de dicha sustancia figuran los fluorimétricos, microbiológicos y espectrofotométricos, sin embargo, la cromatografía líquida (HPLC) presenta ventajas sobre los métodos citados debido a la gran sensibilidad y especificidad que ha demostrado en el análisis de vitaminas (**Bueno, y otros, 2009**).

El presente trabajo tiene la finalidad de validar una metodología analítica para la determinación de Riboflavina (Vitamina B₂) en el Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda. El proceso de validación descrito en el trabajo de titulación está constituido por los siguientes parámetros: linealidad, límites de detección y cuantificación, límites de repetibilidad y reproducibilidad, precisión, exactitud e incertidumbre.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de Investigación

Determinación de Vitamina B₂ (Riboflavina) por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en el Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda.

1.2 Justificación

La validación de métodos es un componente esencial que un laboratorio debe implementar para producir datos analíticos fiables, evalúa el desempeño del método y establece un valor de incertidumbre, acorde con el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE) y basados en la Norma Internacional para laboratorios de ensayo y calibración NTE INEN ISO/IEC 17025.

Entre los diferentes tipos de laboratorios, se encuentran los orientados al análisis de alimentos y se encargan de emitir resultados válidos para cada uno de sus parámetros.

Uno de los laboratorios que ofrece este servicio es Ecuachemlab Cía. Ltda. Los clientes potenciales para el laboratorio son las Industrias en Alimentos y productos procesados, que realizan estrictos controles de calidad para garantizar al cliente que sus productos cumplen con las especificaciones técnicas y nutricionales.

Es de gran importancia conocer el valor nutricional que proporcionan los alimentos en la dieta, un grupo muy destacado son las vitaminas, que cumplen

funciones específicas en los seres humanos. Por esta razón es necesario desarrollar e implementar un método para cuantificar la Vitamina B₂ (Riboflavina) por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), cumpliendo con las directrices establecidas en el Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar la concentración de Vitamina B₂ (Riboflavina) por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en el Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Elaborar un procedimiento para la determinación de Vitamina B₂ (Riboflavina) por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).
2. Determinar los parámetros analíticos de validación.
3. Establecer la aplicabilidad del método para la determinación de Vitamina B₂ (Riboflavina) por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos

2.1.1 Validación de Métodos

La validación de un método analítico es el proceso que permite demostrar que los resultados obtenidos son fiables y repetibles, y que el método es adecuado para su respectiva aplicación en el laboratorio (**Crubellati & Di Risio, 2009**). El resultado de la validación es probar la aptitud de los métodos y documentar su validez, mediante la determinación de parámetros analíticos de calidad. Además la validación determina con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos (**Duffau, y otros, 2010**).

En base a la Guía para la Validación (**EURACHEM, 2005**), se establecieron los siguientes parámetros: la linealidad que define la habilidad del método para obtener resultados de prueba proporcionales a la concentración del analito.

El límite de detección es la menor concentración del analito presente en una muestra que puede medirse con una certeza estadística razonable y el límite de cuantificación es la menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión (repetibilidad) y una exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas de prueba. El límite de repetibilidad (Lr) y el límite de reproducibilidad (LR) corresponden al valor menor o igual a aquél de la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba individuales, obtenidos bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, el cual se espera con una probabilidad de 95%.

La exactitud es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. Mientras que el valor de incertidumbre corresponde al parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando **(EURACHEM, 2005)**.

2.1.2 Método para la determinación de Riboflavina

Existen diversos métodos y técnicas que permiten determinar la concentración de vitaminas, estos métodos incluyen ensayos microbiológicos, técnicas de espectrofotometría, fluorimetría, quimioluminiscencia, la espectrometría de absorción atómica, electroforesis capilar y finalmente la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) **(Skoog, y otros, 2001; Li & Chen, 2001)**.

La HPLC se ha aplicado con éxito para el análisis de la vitamina B₂ en diferentes matrices biológicas. Este método proporciona sensibilidad y selectividad y supera algunos de los problemas asociados con los métodos químicos **(Lacueva, Mattivi, & Tonon, 1998)**. Los métodos de HPLC proporcionan una separación rápida, un alto grado de resolución, reproducibilidad, y cuantificación de vitaminas aplicando diferentes métodos de detección y preparación **(Chatzimichalakis, y otros, 2004)**.

La HPLC con detección de fluorescencia se ha utilizado ampliamente para la determinación de riboflavina en productos alimenticios **(Tang, Cronin, & Brunton, 2006)**. La fluorometría es un fenómeno electrónico de emisión molecular que se presenta inmediatamente después de aplicarle al analito una fuente luminosa como energía de excitación. La vitamina B₂ presenta gran fluorescencia inherente y puede detectarse muy específicamente con alta sensibilidad a un pH neutro **(Ovalles, y otros, 2002)**.

El método para la extracción de riboflavina implica una hidrólisis ácida en ebullición que libera la riboflavina presente en las proteínas. Sin embargo la hidrólisis enzimática asegura una completa extracción de la vitamina asociada a los grupos ésteres de fosfato de las muestras analizadas **(Tang, Cronin & Brunton, 2006; Viñas, y otros, 2004)**.

2.1.3 Importancia de las vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos que cumplen funciones vitales en el organismo **(Melo & Cuamatzi, 2007)**. Las vitaminas son constituyentes naturales de los alimentos y se dividen en dos grupos principales, las que presentan solubilidad en agua denominadas hidrosolubles y las que son solubles en grasa conocidas como liposolubles **(Vidović, y otros, 2008)**.

Las vitaminas hidrosolubles participan como coenzimas en los procesos ligados al metabolismo de los nutrientes orgánicos como: hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Pertenecen a este grupo las vitaminas del complejo B, el ácido fólico, ácido pantoténico, biotina y la vitamina C **(Melo & Cuamatzi, 2007)**.

La vitamina B₂ o riboflavina interviene en reacciones de producción de energía para los procesos biológicos, es precursora de las coenzimas FMN (Flavin Mono Nucleótido) y del FAD (Flavin Adenin Dinucleótido) indispensables para la actividad enzimática de las flavoproteínas implicadas en procesos metabólicos de óxido-reducción, favorece la formación de anticuerpos y glóbulos rojos **(Melo & Cuamatzi, 2007; Gil, Umaña, Pinillos. Lopera & Gallardo, 2014)**.

2.2 Hipótesis

2.2.1 Hipótesis Nula

El método para la determinación de Vitamina B2 (Riboflavina) cumple con los objetivos de validación y estándares de calidad establecidos.

2.2.2 Hipótesis Alternativa

El método para la determinación de Vitamina B2 (Riboflavina) no cumple con los objetivos de validación y estándares de calidad establecidos.

2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1 Variable Independiente

Método por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPCL).

2.3.2 Variable Dependiente

Determinar la concentración de Vitamina B₂ (Riboflavina).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

- Materiales de Referencia Certificados por el National Institute of Standards & Technology (NIST), (Standard Reference Material[®] 1849a (MRC-78) y[®] 3233 (MRC-77), USA).
- Columna para HPLC C18 (4,6 x 250) mm, 5 μ m (Agilent ZORBAX, USA).
- Termómetro (Thermo Scientific, USA).
- Pipetas automáticas (Oxford, USA).
- Balones de aforo
- Viales (Agilent ZORBAX, USA) para HPLC.
- Micro filtro poro 0,45 μ m x 13mm (Amp[®], USA).
- Agua desmineralizada tipo 1

3.1.1 Equipos

- HPLC (Perkin Helmer series 2000, USA).
- Software de análisis certificado versión N200 (Chromatography Data System, SURWIT TECHNOLOGY INC, Hangzhou-China).
- Detección por fluorometría (Espectrofluorómetro Perkin Helmer series 2000, USA).
- Equipo de Sistema de purificación de agua MILLI Q-SYSTHEMIS Millipore SAS67120 MOISHEI (Merck, USA).
- Balanza Analítica (Mettler Toledo modelo AX 05, México).
- Baño de agua marca (Thermo Scientific modelo 2865, USA).
- Ultrasonido (Spectrum, USA).
- PH-metro (Mettler Toledo, México)

3.1.2 Reactivos

- Ácido Clorhídrico fumante 37% (Merck, Alemania).
- Acetato de Sodio Anhidro AR/ACS CH_3COONa (LOBA Chemia, India).
- N,N-Dimetilformamida grado HPLC (Merck, Alemania).
- Fosfato dibásico de potasio K_2HPO_4 (LOBA Chemia, India).
- Ácido acético glacial concentrado (Merck, Alemania).
- Alfa-amilasa (Amp[®], USA).
- Papaína (Amp[®], USA).
- Estándar de Vitamina B₂ (Riboflavina), (CHEM SERVICE INC, USA).

3.2 Metodología

La metodología que se empleó para la consecución del trabajo experimental es el Método AOAC 970.65 modificado, Método fluorométrico por HPLC (Horwitz & Latimer, 2012).

3.2.1 Preparación de la Fase Móvil (K_2HPO_4 10 mM:N, N-Dimetilformamida proporción 70:30)

Para la preparación de la solución de K_2HPO_4 10 mM, se pesaron 1,70 g de fosfato dibásico de potasio y se disolvió con 500 mL de agua desmineralizada. Seguidamente se colocó en un ultrasonido (Spectrum, USA) durante 10 minutos aproximadamente, hasta que se haya disuelto en su totalidad. La solución fue retirada hasta que se encontró a temperatura ambiente para ser llevada a un volumen final de 1 L con agua desmineralizada y ajustar el pH a 7,2 con HCl 1N.

La fase móvil se preparó tomando 700 mL de K_2HPO_4 10 mM junto con 300 mL del reactivo N, N-Dimetilformamida en una botella de tapa azul, se llevó a un ultrasonido por 15 minutos con el fin de homogenizar la solución y eliminar las burbujas presentes en la solución.

3.2.2 Preparación de la curva de calibración

3.2.2.1 Preparación del Estándar

En una balanza analítica (Mettler Toledo, México) se pesó 25,2 mg de estándar de riboflavina en un vaso de precipitados. Seguidamente se añadieron 25 mL de agua desmineralizada y se llevó a un ultrasonido por 5 minutos hasta que se disuelva completamente. Se trasvasó cuantitativamente a un balón volumétrico de 500 mL junto con 100 μ L de ácido acético glacial. Finalmente se aforó con agua desmineralizada.

Dado que la solución estándar de riboflavina es fotosensible y tiende a degradarse con facilidad, se envolvió con papel aluminio dicha solución con el fin de evitar que absorba luz y se refrigeró para preservarla durante 3 meses. Esta solución fue utilizada para realizar cinco curvas de calibración en condiciones de reproducibilidad.

3.2.2.2 Preparación de los estándares

Se tomaron 5 mL de la solución estándar de riboflavina y se transfirieron a un balón de 50 mL para ser aforado con agua desmineraliza. A partir de esta dilución, se tomaron alícuotas de 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 mL y se aforó cada una de ellas a 50 mL con agua desmineralizada. Se colocaron en un ultrasonido durante 5 minutos. Finalmente se microfiltraron en viales, para posteriormente ser leídas por HPLC.

3.2.3 Preparación de la muestra

En la Tabla 1, se reportan los códigos utilizados para la identificación de los materiales de referencia.

Tabla 1. Materiales de Referencia

Material de referencia (MR)	Harina Ya fortificada	Cerelac-Nestlé	Pediasure-Abbott	Nutricalcin-SERES
Código	MR-10	MR-60	MR-63	MR-64

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

3.2.3.1 Hidrólisis Enzimática

Se pesó 1 g de todos los materiales de referencia a excepción del MR-64 para el cual se pesó 0,5 g de muestra en un Erlenmeyer, los pesos de cada material de referencia se muestra en el apartado 4.1 (Obtención de los datos primarios). Seguido, se adicionaron 0.2 g de alfa-amilasa junto con 0.25 g de papaína. Se añadieron 20 mL de agua destilada a una temperatura de 45-50°C.

Finalmente se cubrieron los Erlenmeyers con papel aluminio y se llevaron a un baño termostático (Thermo Scientific, USA) a 50°C por 30 minutos.

3.2.3.2 Hidrólisis ácida

Se retiraron las muestras del baño termostático y se añadió a cada una 15 mL de agua desmineralizada junto con 2.5 mL de HCl 1N. Se colocaron en un baño maría hirviendo por 30 minutos agitando ocasionalmente para evitar la formación de grumos. Una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 2.5 mL de acetato de sodio anhidro 2.5 M.

A continuación se transfirió cuantitativamente a un balón de 50 mL (volumen final) y se aforó con agua desmineralizada. Finalmente se realizó un filtrado de las diferentes muestras para luego microfiltrar aproximadamente 1 mL en los viales.

3.2.4 Preparación del blanco

El procedimiento para la preparación del blanco es similar al descrito en el apartado anterior, a excepción de que no se incluyó ningún material de referencia.

3.2.5 Condiciones Cromatográficas

Se colocó la columna (Agilent ZORBAX, USA) dentro del termostato del HPLC (Perkin Helmer, USA) estableciendo una temperatura de 40°C y verificando que la dirección del flujo especificada en la columna sea la correcta. Luego se acondicionó el equipo y la columna bombeando la fase móvil previamente preparada a un flujo de 0,2 mL/min durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se aumentó el flujo a 0,7 mL/min. Cada muestra se detectó por el espectroflorímetro (Perkin Helmer, USA), a longitudes de onda de excitación de 450 nm y 528 nm de emisión. Finalmente se colocaron los viales en el automuestreador y se programó el volumen de inyección de 10 uL para todas muestras.

3.2.6 Obtención del Cromatograma

Una vez controladas las condiciones cromatográficas, con la ayuda del Software de análisis (Chromatography Data System, SURWIT TECHNOLOGY INC, Hangzhou-China), se programó el tiempo de corrida (11 min) por muestra. Este tiempo debe ser igual al tiempo programado manualmente en el automuestreador del HPCL. Se estableció la ubicación del cromatograma y el prefijo con el que será guardado, por ejemplo (B2-08-03-21043).

A continuación se verificó la línea base en el software y se programó en el automuestreador la ubicación del vial que contiene la muestra. El tiempo de retención de la vitamina B₂ es de 9 minutos aproximadamente (Anexo A). Una vez transcurrido el tiempo de corrida, cada cromatograma se guarda automáticamente. Los parámetros tales como el flujo, temperatura de la

columna, tipo de detector y volumen de inyección fueron controlados manualmente de acuerdo al procedimiento de validación y el método AOAC antes mencionado.

3.2.7 Análisis e Interpretación del Cromatograma

En el software de análisis se crearon cinco curvas de calibración utilizando los cromatogramas respectivos para cada una. Una vez cargadas las curvas, el programa automáticamente determina por linealidad las concentraciones de las muestras en unidades de μg riboflavina/mL de solución.

3.3 Validación del método

Se realizó la validación del método en una sola matriz para alimentos, para el desarrollo del proceso se estableció un diseño de un solo factor completamente aleatorizado (DCA) con cuatro niveles de concentración (MR) y el blanco. La respuesta experimental es la concentración de vitamina B₂ expresada en mg de riboflavina/100 g muestra que se representa en la Tabla 2.

Tabla 2. Niveles establecidos para la Validación

Descripción	NIVEL			
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
Material de referencia (MR)	Harina Ya fortificada	Cerelac-Nestlé	Pediasure-Abbott	Nutricalcin-SERES
Código	MR-10	MR-60	MR-63	MR-64
Concentración bibliográfica mg/100 g de muestra	0,25	0,45	0,98	10

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

3.4 Parámetros de validación

Los parámetros que se evaluaron para la validación del método son: linealidad, límites de detección y cuantificación, rango de trabajo, precisión, exactitud e incertidumbre.

3.4.1 Linealidad

Se realizaron cinco curvas de calibración de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 3.2.2 (Preparación de la curva de calibración). Se realizó la estimación de la ecuación de la recta, bajo condiciones de reproducibilidad y se determinó el valor del coeficiente de correlación lineal que considera un criterio de aceptabilidad igual o superior a $r \geq 0,999$. La ecuación que se utilizó para determinar la linealidad del método es la siguiente:

$$y = mx + b$$

Ec.1

Dónde:

y = Área que representa cada estándar (u^2)

x= Concentración del estándar de riboflavina ($\mu\text{g/ml}$)

m= Pendiente de la recta

b= Ordenada al origen

Se prepararon cinco estándares de vitamina B₂ y se leyeron por HPLC, como función respuesta se obtuvieron las áreas de cada estándar. En el Anexo A se muestran los cromatogramas obtenidos para la primera curva realizada. Estos valores se utilizaron para graficar la curva de calibración y este procedimiento se realizó en el transcurso de 5 días por los dos técnicos en condiciones de reproducibilidad, con el fin de obtener 5 rectas de calibrado.

Tabla 3. Modelo para la estimación de la linealidad

Eje X Concentración (µg/ml)	Eje Y (Área u ²)				
	Curva 1 Téc. 1	Curva 2 Téc. 2	Curva 3 Téc. 1	Curva 4 Téc. 2	Curva 5 Téc. 1
X1	C1-Y1	C2-Y1	C3-Y1	C4-Y1	C5-Y1
X2	C1-Y2	C2-Y2	C3-Y2	C4-Y2	C5-Y2
X3	C1-Y3	C2-Y3	C3-Y3	C4-Y3	C5-Y3
X4	C1-Y4	C2-Y4	C3-Y4	C4-Y4	C5-Y4
X5	C1-Y5	C2-Y5	C3-Y5	C4-Y5	C5-Y5

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Con el fin de asegurar que las curvas de calibración se ajustan correctamente al modelo matemático de la ecuación de la recta [Ec.1], se calcularon los valores de la ordenada al origen (b), la pendiente (m) y el coeficiente de correlación lineal (r) superior a 0,999.

Además se aplicó el método de mínimos cuadrados para confirmar que la suma de los cuadrados de las distancias verticales entre cada punto experimental sea mínima o tienda a cero para las curvas de calibración (Miller, 2008) y asegurar estadísticamente la confiabilidad y exactitud de las curvas realizadas. Se determinó el valor de la pendiente [Ec.2], ordenada en el origen [Ec.3], coeficiente de correlación lineal [Ec.4], desviación estándar de la pendiente [Ec.5], desviación estándar de la ordenada [Ec.6] y error tipo [Ec.7].

$$m = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Ec.2

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

Ec.3

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Ec.4

$$S_m = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 - [m^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2]}{n - 2}}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ec.5

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 - [m^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2]}{n - 2}} \times \sqrt{\frac{1}{n - \frac{(\sum x_i)^2}{\sum x_i^2}}}$$

Ec.6

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 - [m^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2]}{n - 2}}$$

Ec.7

Dónde:

x= datos de concentración

y= datos de área

\bar{x} = media de datos de concentración

\bar{y} = media de datos de área

m= pendiente

n= número de datos

Límite de Detección (LD)

Se prepararon 10 blancos independientes y se determinó el promedio del ruido generado en cada cromatograma que es igual a la desviación estándar.

Según la Guía de Validación (EURACHEM, 2005) el LD es igual a 3 veces la desviación estándar.

$$LD = 3 (s)$$

Ec.8

Dónde:

LD = Límite de detección

s= desviación estándar (promedio del ruido generado)

Para expresar ésta área en unidades de concentración (μg de riboflavina por ml de solución de riboflavina) se comparó este valor con la concentración y el área obtenidos en el primer estándar de la curva de calibración [Ec.9].

Cálculo del LD:

$$LD = \frac{C_{Est} (\mu\text{g/mL})}{A_{Est} (u^2)} \times A_{LC} (u^2) = \frac{ug \text{ de Riboflavina}}{mL \text{ de solución}}$$

Ec.9

Dónde:

C_{Est} = Concentración del estándar

A_{Est} = Área del estándar

A_{LD} = Área del LD

3.4.2 Límite de Cuantificación (LC)

Se prepararon 10 blancos independientes y se determinó el ruido generado en cada cromatograma que es igual a la desviación estándar. Según la Guía de Validación (EURACHEM, 2005) el LC es igual a 10 veces la desviación estándar.

$$LC = 10 (s)$$

Ec.10

Dónde:

LC = Límite de cuantificación

s= desviación estándar (promedio del ruido generado)

Para expresar ésta área en unidades de concentración (μg de riboflavina por ml de solución de riboflavina) se comparó este valor con la concentración y el área obtenidos en el primer estándar de la curva de calibración [Ec.11].

Cálculo del LC:

$$LC = \frac{C_{Est} (\mu\text{g/mL})}{A_{Est} (u^2)} \times A_{LC} (u^2) = \frac{ug \text{ de Riboflavina}}{mL \text{ de solución}}$$

Ec.11

Dónde:

C_{Est} = Concentración del estándar

A_{Est} = Área del estándar

A_{LC} = Área del LC

3.4.3 Rango de trabajo

Se estableció el rango de trabajo tomando el valor del LC como límite inferior, y el valor de concentración donde la curva de calibración se desvía de la linealidad (última concentración del estándar en la curva de calibración) como límite superior para la determinación de vitamina B₂.

3.4.4 Precisión

Se determinó la precisión del método bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en los cuatro niveles de concentración establecidos. El modelo aplicado a cada nivel de concentración se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Modelo para el análisis de varianza (ANOVA) aplicado a cada nivel de concentración

Réplica	NIVEL (mg/100g)	
	Técnico 1	Técnico 2
1	R1-1	R1-2
2	R2-1	R2-2
3	R3-1	R3-2
4	R4-1	R4-2
5	R5-1	R5-2
6	R6-1	R6-2

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Se compararon los valores de F experimental y de F crítico reportado en la tabla de ANOVA por nivel. Además se determinó el %CV no mayor al 3% y 5% en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad respectivamente **(EURACHEM, 2005)**.

3.4.4.1 Repetibilidad

Se realizaron 6 repeticiones por técnico de cada material de referencia. Para asegurar la validez de los datos se calculó el límite de repetibilidad (Lr) [Ec.14], la desviación estándar por repetibilidad (S_r) [Ec.12] y el coeficiente de variación (% cvr) [Ec.13] menor o igual al 3%.

$$S_r = \sqrt{CME}$$

Ec.12

$$\%CVr = \frac{S_r}{\bar{X}} \times 100$$

Ec.13

Dónde:

CME= Cuadrados medios dentro de los grupos

\bar{X} = Promedio de los datos

En base a la Guía (**EURACHEM, 2005**), el Lr se da por la Ec.14.

$$Lr = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times S_r$$

Ec.14

Dónde:

t_{∞} = t-Student (el valor de t en dos sentidos a un nivel de confianza del 95% es 1,96)

S_r = desviación estándar medida bajo condiciones de repetibilidad

3.4.4.2 Reproducibilidad

Se obtuvieron 6 datos de cada técnico por nivel y se determinó el límite de reproducibilidad (LR) [Ec.17], la desviación estándar por reproducibilidad (S_R) [Ec.15] y el coeficiente de variación (%CVR) [Ec.16] menor o igual al 5%.

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + \frac{CMT_r - CME}{n}}$$

Ec.15

$$\%CVR = \frac{S_R}{\bar{X}} \times 100$$

Ec.16

CME= cuadrados medios dentro de los grupos (error)

CMT_r= cuadrados medios entre grupos (tratamientos)

n= número de repeticiones

\bar{X} = Promedio

En base a la Guía (**EURACHEM, 2005**), LR se da por la Ec.

$$LR = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times S_R$$

Ec.17

Dónde:

t_{∞} = t-Student (el valor de t en dos sentidos a un nivel de confianza del 95% es 1,96)

S_R = desviación estándar medida bajo condiciones de reproducibilidad

3.4.5 Tratamiento estadístico

Con el fin de establecer si la metodología de validación para el análisis de precisión, se encuentra dentro de un parámetro aceptable y confiable, se utilizó la hoja de cálculo Excel y el paquete estadístico Infostat. Es recomendable utilizar pruebas de significancia estadísticas en el proceso de validación para comprobar si los datos obtenidos no presentan diferencia significativa, para lo cual se aplicó la Prueba F-Fisher.

Adicionalmente, como se describe en el apartado 3.4.4 (Presición), se realizó un análisis estadístico conocido como análisis de varianza (ANOVA), para comparar las diferencias entre cada grupo de datos, es decir, los resultados obtenidos por los dos técnicos y dentro de cada grupo de datos.

3.4.6 Exactitud

Se determinaron tres concentraciones por MRC en tres días consecutivos en unidades de mg de riboflavina/Kg de muestra. La media se comparó con los resultados reportados en el certificado otorgado por el NIST. Adicionalmente se calculó el Z_{score} [Ec.18], los resultados obtenidos deben estar dentro del rango -2 y 2 para comprobar la capacidad del método y obtener resultados lo más próximos a un valor verdadero.

$$Z_{score} = \frac{\bar{X} - Xi}{U}$$

Ec.18

Dónde:

X_i = Valor reportado en el certificado

\bar{X} = Media de los valores obtenidos

U = Incertidumbre del MRC

3.4.7 Incertidumbre

Para el cálculo de la Incertidumbre, se tomó como referencia la Guía para la Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas (EURACHEM/CITAC, 2012). La estimación de la incertidumbre asociada a una medición se puede resumir en 4 etapas.

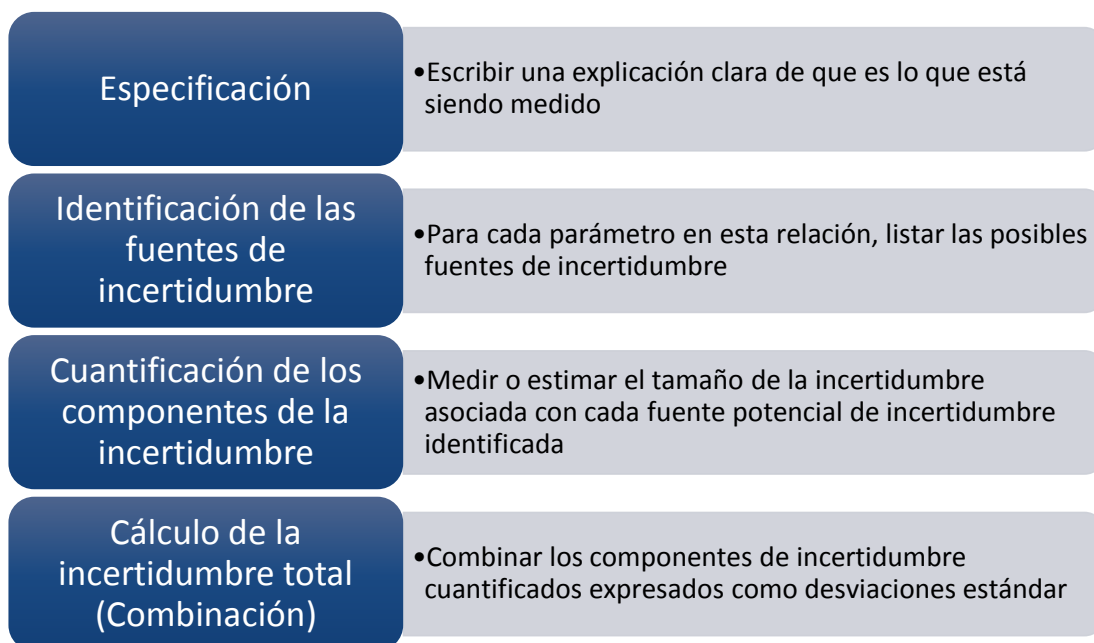


Figura 1. Etapas para la estimación de la Incertidumbre

Se identificaron las principales contribuciones a la Incertidumbre de acuerdo a la ley de propagación de las incertidumbres conocida también como Ley de Taylor. Las incertidumbres que intervienen tanto para la preparación de la muestra y curva de calibración, deben ser expresadas como desviación estándar, y el resultado se conoce como Incertidumbre Estándar (μ_y) para cada variable.

Incertidumbre estándar por repetibilidad

$$\mu_r = \frac{S_r}{\sqrt{n}}$$

Ec.19

Incertidumbre estándar por reproducibilidad

$$\mu_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$$

Ec.20

Dónde:

S_r = desviación estándar de repetibilidad

S_R = desviación estándar de reproducibilidad

n = número de datos

Incertidumbre estándar a partir de certificados de calibración

$$\mu = \frac{U}{k}$$

Ec.21

Dónde:

U = incertidumbre expandida

k =factor de cobertura

Incertidumbre estándar a partir de tolerancia del material volumétrico

(considerando una distribución triangular)

$$\mu_{MV} = \frac{U_{máx}}{\sqrt{6}}$$

Ec.22

Dónde:

$U_{máx}$ = incertidumbre máxima del material

Para estimar la Incertidumbre Estándar Combinada (u) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\mu_c(y) = \sqrt{\sum \mu_y^2}$$

Ec.23

Dónde:

$\mu_c(y)$ = Incertidumbre Estándar Combinada

μ_y = Incertidumbre estándar de cada variable involucrada

Incertidumbre combinada de concentración

$$\mu_{conc}(y) = y \sqrt{\sum \left(\frac{\mu_p}{p}\right)^2}$$

Ec.24

Dónde:

$\mu_c(y)$ = Incertidumbre Estándar Combinada

μ_p/p = Incertidumbres de cada variable, expresadas como desviaciones estándar relativa de cada variable involucrada

y = Concentración de la variable

Además, se estimó la Incertidumbre Expandida (U) que es igual a la Incertidumbre Estándar combinada multiplicada por el factor de cobertura (k) [Ec.25].

$$U = \mu_c(y) \times k$$

Ec.25

Dónde:

$\mu_c(y)$ = incertidumbre combinada

k = factor de cobertura

Sin embargo, es conveniente calcular el factor de cobertura (k), en una distribución t con un número efectivo de grados de libertad, a partir de la fórmula de Welch-Satterthwaite [Ec.26] a un nivel de confianza del 95% (**GUM, 2008**).

$$v_{eff} = \frac{\mu_y^4}{\sum_{i=0}^n \frac{\mu_i(y)^4}{v_i}}$$

Ec.26

Dónde:

μ_y = incertidumbre combinada del método

$\mu(y)$ = incertidumbre estándar de cada componente

v_i = grados de libertad de cada componente

Para obtener el valor de los grados de libertad para cada componente (v_i) se debe tomar en cuenta lo siguiente:

- Para incertidumbre tipo B $v \rightarrow \infty$
- Para incertidumbre tipo A $v \approx n-1, n-2$ ó $n-3$ (de acuerdo al número de variables involucradas y n corresponde al número de datos).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación y el análisis de los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio se realizaron mediante la tabulación e interpretación de los mismos, para su posterior análisis estadístico. Para la determinación de la concentración de vitamina B₂, en el transcurso del trabajo experimental, se obtuvieron seis réplicas por material de referencia. Los resultados obtenidos de dos técnicos fueron comparados con el fin de validar parámetros como repetibilidad y reproducibilidad.

4.1 Obtención de los Datos Primarios

4.1.1 Primer Nivel (MR-10)

La concentración de vitamina B₂ para el MR-10 se determinó mediante el análisis previo de los cromatogramas obtenidos en el software N2000 (Anexo A). Los resultados obtenidos indican valores comprendidos entre 0,23 y 0,25 mg/100 g de muestra para el técnico 1 (Tabla 5). Estos valores son similares a los obtenidos por el técnico 2 (Tabla 6), estableciendo que no existe variabilidad en la determinación de este material de referencia.

Tabla 5. Datos Primarios MR-10. Técnico 1

Réplica	Masa (g)	Concentración (µg/ml)	Concentración (mg/100g)
1	1,1003	0,055	0,24
2	1,0601	0,051	0,24
3	1,0644	0,049	0,23
4	1,0680	0,050	0,23
5	1,0742	0,049	0,23
6	1,0020	0,047	0,24
		\bar{X}	0,23

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

Tabla 6. Datos Primarios MR-10. Técnico 2

Réplica	Masa (g)	Concentración (µg/ml)	Concentración (mg/100g)
1	1,0515	0,054	0,23
2	1,0818	0,052	0,24
3	1,0512	0,051	0,24
4	1,1515	0,053	0,23
5	1,0818	0,051	0,24
6	1,1819	0,054	0,23
		\bar{X}	0,23

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

4.1.2 Segundo Nivel (MR-60)

La concentración de vitamina B₂ para el MR-60 se determinó mediante el análisis previo de los cromatogramas obtenidos en el software N2000 (Anexo A). Los resultados indican valores comprendidos entre 0,75 y 0,77 mg/100 g de muestra para el técnico 1 (Tabla 7). Estos valores son similares a los obtenidos por el técnico 2 (Tabla 8), estableciendo que no existe variabilidad en los datos para la determinación de este material de referencia.

Tabla 7. Datos Primarios MR-60. Técnico 1

Réplica	Masa (g)	Concentración (µg/ml)	Concentración (mg/100g)
1	1,0001	0,153	0,76
2	1,0815	0,162	0,75
3	1,0302	0,157	0,76
4	1,0109	0,156	0,77
5	1,0301	0,159	0,77
6	0,9899	0,149	0,75
		\bar{X}	0,76

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

Tabla 8. Datos Primarios MR-60. Técnico 2

Réplica	Masa (g)	Concentración (µg/ml)	Concentración (mg/100g)
1	1,0418	0,161	0,77
2	1,0317	0,157	0,76
3	1,0014	0,154	0,77
4	1,1109	0,169	0,76
5	1,1201	0,168	0,75
6	1,0608	0,162	0,76
		\bar{X}	0,76

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

4.1.3 Tercer Nivel (MR-63)

La concentración de vitamina B₂ para el MR-63 se determinó mediante el análisis previo de los cromatogramas obtenidos en el software N2000 (Anexo A). Los resultados obtenidos indican una media aritmética de 1,48 mg/100 g de muestra tanto para el técnico 1 (Tabla 9) como para el técnico 2 (Tabla 10). Se estableció que no existe variabilidad en los datos para la determinación de este material de referencia.

Tabla 9. Datos Primarios MR-63. Técnico 1

Réplica	Masa (g)	Concentración (µg/ml)	Concentración (mg/100g)
1	1,0009	0,291	1,45
2	1,0513	0,314	1,49
3	1,0998	0,326	1,48
4	1,0198	0,305	1,50
5	1,0315	0,308	1,49
6	1,0520	0,314	1,49
		\bar{X}	1,48

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

Tabla 10. Datos Primarios MR-63. Técnico 2

Réplica	Masa (g)	Concentración (µg/ml)	Concentración (mg/100g)
1	1,0091	0,294	1,46
2	0,9803	0,287	1,46
3	1,0068	0,306	1,52
4	1,0216	0,306	1,50
5	1,0815	0,319	1,47
6	1,0915	0,322	1,48
		\bar{X}	1,48

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

4.1.4 Cuarto Nivel (MR-64)

La concentración de vitamina B₂ para el MR-64 se determinó mediante el análisis previo de los cromatogramas obtenidos en el software N2000 (Anexo A). Los resultados indican una media aritmética de 6,97 mg/100 g de muestra tanto para el técnico 1 (Tabla 11) como para el técnico 2 (Tabla 12). Se estableció que no existe variabilidad en los datos para la determinación de este material de referencia.

Tabla 11. Datos Primarios MR-64. Técnico 1

Réplica	Masa (g)	Concentración (µg/ml)	Concentración (mg/100g)
1	0,5003	0,695	6,95
2	0,4925	0,688	6,99
3	0,5121	0,714	6,97
4	0,5229	0,728	6,96
5	0,5389	0,754	7,00
6	0,5512	0,771	6,99
		\bar{X}	6,97

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

Tabla 12. Datos Primarios MR-64. Técnico 2

Réplica	Masa (g)	Concentración (µg/ml)	Concentración (mg/100g)
1	0,5136	0,716	6,97
2	0,5084	0,709	6,97
3	0,5101	0,709	6,95
4	0,5113	0,712	6,96
5	0,4976	0,694	6,98
6	0,5117	0,717	7,01
		\bar{X}	6,97

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

4.2 Linealidad

Para determinar la concentración de riboflavina presente en los MR y MRC se realizaron cinco curvas de calibración en el transcurso de cinco días en condiciones de reproducibilidad. Con los datos obtenidos se graficó en el eje de las abscisas las concentraciones de los estándares de riboflavina en µg/ml y en el eje de las ordenadas el área que representa cada estándar expresadas en unidades cuadradas (u²) (ver Tabla 13).

Tabla 13. Datos de las curvas de calibración para la determinación de riboflavina

Est.	Concent. Eje X (µg/ml)	Eje Y (Área u ²)				
		Curva 1 Téc. 1	Curva 2 Téc. 2	Curva 3 Téc. 1	Curva 4 Téc. 2	Curva 5 Téc. 1
1	0,100	381483,81	407491,06	391162,97	384407,00	383482,41
2	0,251	914595,13	914147,00	887726,13	909208,00	903932,38
3	0,501	1785637,50	1769295,88	1729818,88	1763064,75	1738980,38
4	0,752	2608833,50	2548209,50	2617121,25	2617020,25	2675372,50
5	1,003	3454139,50	3333729,50	3374134,50	3357896,00	3519159,25

Elaborado por: Semanate M., 2016.

A continuación se representa gráficamente la estimación de la ecuación de la recta para cada curva de calibración y su respectivo valor del coeficiente de correlación lineal (r).

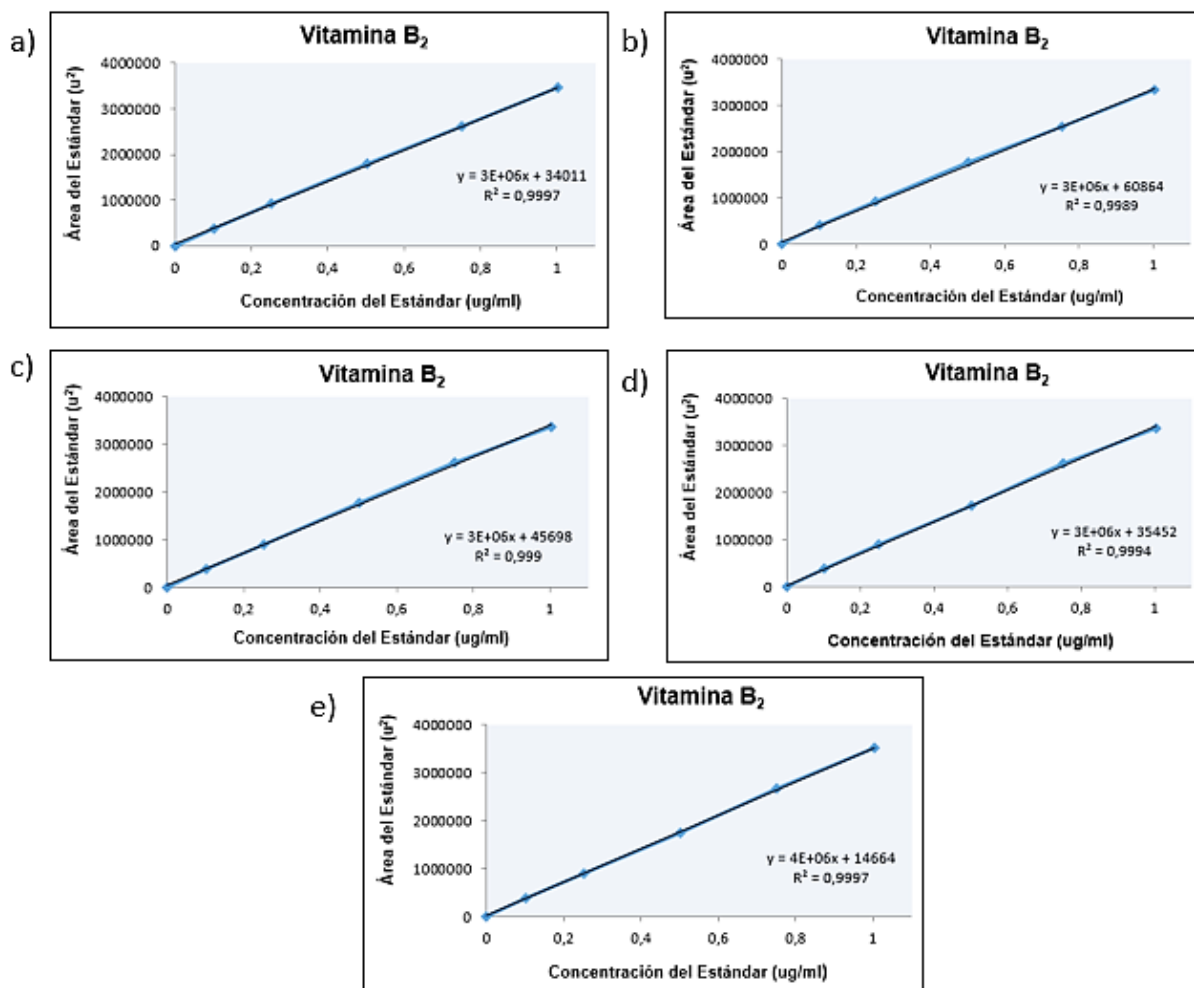


Figura 2. Estimación de la ecuación de la recta. a) Primer día. $r=0,9998$. b) Segundo día. $r=0,9994$. c) Tercer día. $r=0,9995$. d) Cuarto día. $r=0,9997$. e) Quinto día. $r=0,9998$.

Para cada una de las curvas realizadas en condiciones de reproducibilidad, se obtuvieron coeficientes de correlación lineal que considera un criterio de aceptabilidad superior a $r=0,999$. En consecuencia, todas las curvas se ajustan al modelo lineal y al evaluar las rectas de calibrado obtenidas no existe diferencia. Además, se estimó por regresión lineal la concentración de riboflavina presente en cada muestra analizada en unidades de μg de riboflavina/ml de solución.

Adicionalmente se determinó por el método de mínimos cuadrados los valores globales de la ecuación de la recta, establecidos en el apartado 3.4.1. integrando todas las curva de calibración.

Tabla 14. Estimación Lineal de las curvas en forma integrada

Estadístico	Valor Global
m	3354855,59
b	65113,26
r	0,9999
Sm	28802,33
Sb	17737,07
Syx	21089,92

Elaborado por: Semanate M., 2016.

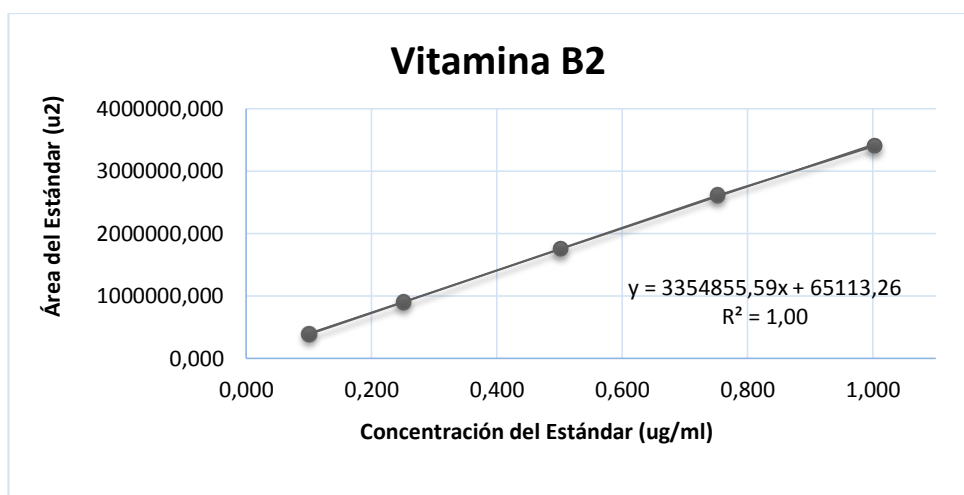


Figura 3. Ecuación global de las curvas de calibración integradas para la determinación de riboflavina

En base a la estimación global de la recta de calibrado (ver Tabla 14), se establecieron los límites superiores e inferiores de las curvas de calibración [Ec.27 y Ec.28], que determinan el rango de confianza de medición y así asegurar que las curvas realizadas posteriormente se encuentren dentro de estos los límites (ver Tabla 15). Si las curvas no se encuentran dentro de los límites establecidos es recomendable eliminar y corregir si fuese el caso.

Valor t-student

$$t_{crit}=(1-\alpha;v)$$

$$t_{crit}=(0,05;3)$$

$$t_{crit}= 2,353$$

Límite superior

$$LS = b + t_{crit} \times S_{yx}$$

Ec. 27

$$LS = 65113,26 + (2,353 \times 21089,92)$$

$$LS = 114737,83 u^2$$

Límite inferior

$$LI = b - t_{crit} \times S_{yx}$$

Ec. 28

$$LI = 65113,26 - (2,353 \times 21089,92)$$

$$LI = 15488,69 u^2$$

Límites aplicados a cada concentración de estándar

Cálculo demostrativo: Primer estándar (0,100 µg/mL)

$$\text{Área} = 3354855,59[\text{Conc}] + LS$$

$$\text{Área} = 3354855,59[0,100] + 114737,83$$

$$\text{Área} = 451216,43 u^2$$

$$\text{Área} = 3354855,59[\text{Conc}] + LI$$

$$\text{Área} = 3354855,59[0,100] + 15488,69$$

$$\text{Área} = 351967,28 u^2$$

Tabla 15. Límites de la recta de calibrado integrada (global)

EST. ($\mu\text{g/mL}$)	Límite superior (u^2)	Límite Inferior (u^2)
0,100	451216,43	351967,28
0,251	955934,32	856685,18
0,501	1797130,81	1697881,67
0,752	2638327,30	2539078,16
1,003	3579523,79	3314410,53

Elaborado por: Semanate M., 2016.

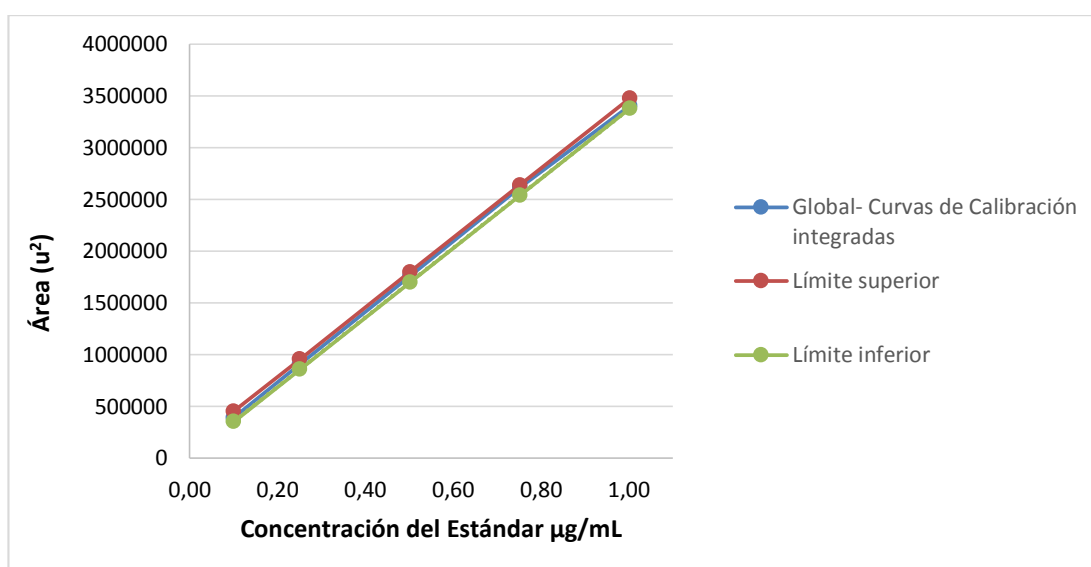


Figura 4. Límites de la recta de calibrado integrada (global)

Con el fin de comparar la diferencia entre las curvas de calibración realizadas bajo condiciones de reproducibilidad, se estableció que no existe variabilidad en la función respuesta (área de cada estándar). Además se realizó un análisis global de las curvas obtenidas y se determinó que se puede utilizar cualquier curva para el análisis de las muestras en la determinación de vitamina B₂.

4.3 Límite de detección (LD)

A continuación se reportan los resultados del ruido generado en los blancos preparados para determinar el LD y LC (ver Tabla 16).

Tabla 16. Blancos preparados

N° de corrida	Ruido generado (Área u²)
1	3066,083
2	3025,515
3	2970,800
4	3028,257
5	2629,000
6	3299,300
7	3210,670
8	3105,357
9	3290,716
10	3258,605
\bar{X}	3088,430

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

Cálculo del LD:

$$LD = 3(3088,430 u^2)$$

$$LD = 9265,291 u^2$$

$$LD = \frac{0,1003 ug/mL}{391162,969 u^2} \times 9265,29 u^2$$

$$LD = 0,002 \frac{ug \text{ de Riboflavina}}{mL \text{ de solución}}$$

El valor del LD es igual a 0,002 µg de riboflavina por mL de solución, que determina la concentración mínima de vitamina B₂ que puede ser detectada con una certeza razonable por HPLC bajo las condiciones de trabajo del equipo.

Límite de cuantificación (LC)

En la Tabla 16 se reporta el promedio del ruido generado de 10 blancos preparados para la determinación del LC.

Cálculo del LC:

$$LC = 10(3088,430 u^2)$$

$$LC = 30884,303 u^2$$

$$LC = \frac{0,1003 \text{ ug/mL}}{391162,969 u^2} \times 30884,303 u^2$$

$$LC = 0,008 \frac{\text{ug de Riboflavina}}{\text{mL de solución}}$$

El LC es de 0,08 µg de riboflavina por mL de solución, éste valor determina la menor concentración de vitamina que se puede cuantificar por HPLC bajo las condiciones de trabajo del mismo, por debajo de éstos valores no se puede considerar la presencia de vitamina B₂.

4.4 Rango de Trabajo

El rango de trabajo para la validación de vitamina B₂ establece como límite inferior al límite de cuantificación igual a 0,008 y como límite superior a la concentración del último estándar de la curva de calibración de 1,003 (expresados en unidades de µg de riboflavina/mL de solución).

4.5 Precisión

Con el fin de determinar si el técnico 1 y técnico 2, involucrados en el análisis experimental pueden obtener resultados confiables y similares estadísticamente por MR, se realizó un análisis de precisión en términos de repetibilidad (6 réplicas) y reproducibilidad (2 técnicos), se establecieron 4 niveles de concentración (Ver Tabla 17).

Tabla 17. Resumen de las concentraciones de riboflavina por nivel

Réplica	CONCENTRACIÓN (mg/100g)							
	NIVEL 1		NIVEL 2		NIVEL 3		NIVEL 4	
	Téc. 1	Téc. 2	Téc. 1	Téc. 2	Téc. 1	Téc. 2	Téc. 1	Téc. 2
1	0,24	0,23	0,76	0,77	1,45	1,46	6,95	6,97
2	0,24	0,24	0,75	0,76	1,49	1,46	6,99	6,97
3	0,23	0,24	0,76	0,77	1,48	1,52	6,97	6,95
4	0,23	0,23	0,77	0,76	1,50	1,50	6,96	6,96
5	0,23	0,24	0,77	0,75	1,49	1,47	7,00	6,98
6	0,24	0,24	0,75	0,76	1,49	1,48	6,99	7,01
\bar{X}	0,24	0,24	0,76	0,76	1,48	1,48	6,98	6,97

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Cálculo demostrativo: Nivel 1

Tabla 18. Concentraciones de vitamina B₂ para evaluar el Nivel 1

Réplica	Nivel 1 CONCENTRACIÓN (mg/100g)	
	Técnico 1	Técnico 2
1	0,24	0,23
2	0,24	0,24
3	0,23	0,24
4	0,23	0,23
5	0,23	0,24
6	0,24	0,24
\bar{X}	0,24	
ANOVA CME	2,833E-05	
ANOVA CMTr	8,333E-06	

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Repetibilidad

Desviación estándar

$$S_r = \sqrt{CME}$$

$$S_r = \sqrt{2,833E - 05}$$

$$S_r = 0,0053$$

Coefficiente de variación

$$\%CVR = \frac{S_r}{\bar{X}} \times 100$$

$$\%CVR = \frac{0,005}{0,24} \times 100$$

$$\%CVR = 2,26$$

Límite de repetibilidad

$$Lr = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times S_r$$

$$Lr = 1,96 \times \sqrt{2} \times 0,02$$

$$Lr = 0,05 \text{ mg de riboflavina/100g de muestra}$$

Reproducibilidad

Desviación estándar

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + \frac{CMT_r - CME}{n}}$$

$$S_R = \sqrt{0,0053^2 + \frac{(8,333E - 06) - (2,833E - 05)}{6}}$$

$$S_R = 0,005$$

Coefficiente de variación

$$\%CVR = \frac{S_R}{\bar{X}} \times 100$$

$$\%CVR = \frac{0,005}{0,24} \times 100$$

$$\%CVR = 2,12$$

Límite de reproducibilidad

$$LR = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times S_R$$

$$LR = 1,96 \times \sqrt{2} \times 0,019$$

$$LR = 0,05 \text{ mg de riboflavina/100g de muestra}$$

Tabla 19. Desviaciones estándar y coeficientes de variación de los niveles de concentración riboflavina

NIVEL	Sr	%CV_r	%CVR	SR
N1	0,0053	2,26	2,12	0,0050
N2	0,0083	1,09	1,00	0,0076
N3	0,0083	0,56	0,52	0,0076
N4	0,0202	0,29	0,27	0,0186

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Por lo tanto, los coeficientes de variación de repetibilidad (%CV_r) y reproducibilidad (%CV_R), que se muestran en la tabla 19, se obtuvieron utilizando los resultados del análisis de varianza ANOVA y se encuentran detallados en el apartado 4.5.1. (Tratamiento estadístico), son aceptados de acuerdo a la Guía de Validación (**EURACHEM, 2005**). Así, el %CV_r es menor al 3% y el %CV_R es menor al 5% para cada uno de los niveles, lo que corroboran con el análisis establecido asegurando la validez de los datos para cada material de referencia.

Adicionalmente se calculó el Lr y LR que es igual a 0,05 mg de riboflavina/100g de muestra para cada límite, la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba individuales (réplicas o duplicados de análisis) debe ser menor o igual al valor de cada límite establecido en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad (**EURACHEM, 2005**).

4.5.1 Tratamiento estadístico

Con el propósito de determinar experimentalmente si cada técnico puede obtener resultados confiables y similares estadísticamente en una misma muestra en diferentes réplicas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los niveles de concentración de vitamina B₂ que se muestran a continuación:

Tabla 20. Análisis de varianza ANOVA (Nivel 1)

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<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>
Entre grupos (Tratamientos)	8,3333E-06	1	8,3333E-06	0,294	0,599	4,965
Dentro de los grupos	0,0003	10	2,8333E-05			
Total	0,0003	11				

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Tabla 21. Análisis de varianza ANOVA (Nivel 2)

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<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>
Entre grupos (Tratamientos)	8,3333E-06	1	8,3333E-06	0,122	0,734	4,965
Dentro de los grupos	0,0007	10	6,8333E-05			
Total	0,0007	11				

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Tabla 22. Análisis de varianza ANOVA (Nivel 3)

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<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>
Entre grupos (Tratamientos)	8,3333E-06	1	8,3333E-06	0,122	0,734	4,965
Dentro de los grupos	0,0007	10	6,8333E-05			
Total	0,0007	11				

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Tabla 23. Análisis de varianza ANOVA (Nivel 4)

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<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>
Entre grupos (Tratamientos)	3,33333E-05	1	3,3333E-05	0,08	0,780	4,965
Dentro de los grupos	0,0041	10	0,00040667			
Total	0,0041	11				

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Tabla 24. Resumen ANOVA

Concentración (mg/100g)	F calculado	F crítico	Conclusión
Nivel 1	0,294	4,965	No existe diferencia significativa
Nivel 2	0,122	4,965	No existe diferencia significativa
Nivel 3	0,122	4,965	No existe diferencia significativa
Nivel 4	0,08	4,965	No existe diferencia significativa

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Previo al tratamiento estadístico de los datos, se realizó el análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) para cada nivel de ensayo, mediante la utilización del paquete estadístico Infostat (ver Anexo B) y la hoja de cálculo Excel. Se determinó que no existieron diferencias significativas en las varianzas de los grupos muestrales (tratamientos) a un nivel confianza del 95% al comparar los valores obtenidos de la prueba de Fisher, el F calculado es menor que el valor crítico en todos los niveles (ver Tabla 24). Además, los resultados obtenidos comprenden la capacidad de los dos técnicos involucrados en el análisis de las muestras para obtener resultados confiables en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad previamente establecidas.

4.6 Análisis de Exactitud

Para determinar la exactitud del método, se analizaron dos MRC solicitados al NIST (National Institute of Standards and Technology) con el fin de comparar los resultados obtenidos experimentalmente y los valores establecidos en el certificado. En la Tabla 25 se reportan las concentraciones del MRC-77 y la concentración media de riboflavina utilizada para determinar la exactitud es de 76,53 mg de riboflavina/Kg de muestra.

Tabla 25. Determinación de la concentración del MRC-77

Nº	Masa (g)	Concentración (µg/ml)	Concentración (mg/Kg)
1	0,5115	0,783	76,51
2	0,5153	0,786	76,22
3	0,5138	0,790	76,86
		\bar{X}	76,53

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

Cálculo Z-score para el MRC-77

$$z_{score} = \frac{\bar{X} - X_i}{U}$$
$$z_{score} = \frac{76,53 - 76}{2}$$
$$z_{score} = 0,26$$

En la Tabla 26 se reportan las concentraciones del MRC-78 y la concentración media de riboflavina utilizada para determinar la exactitud es de 20,40 mg de riboflavina/Kg de muestra.

Tabla 26. Determinación de la concentración del MRC-78

Nº	Masa (g)	Concentración (µg/ml)	Concentración (mg/100g)
1	0,4929	0,201	20,42
2	0,5074	0,208	20,48
3	0,5009	0,203	20,29
		\bar{X}	20,40

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

Cálculo Z-score para el MRC-78

$$z_{score} = \frac{\bar{X} - X_i}{U}$$
$$z_{score} = \frac{20,40 - 20,37}{0,52}$$

$$z_{score} = 0,05$$

Se determinó la concentración media de vitamina B₂ por MRC, para el MRC-77 de 76,53 y el reportado en el certificado es de 76+/- 2 (mg de riboflavina/Kg de muestra). Para el MRC-78 la media es igual a 20,40 y el establecido en el certificado es de 20,37+/- 0,52 (mg de riboflavina/Kg de muestra).

Los dos MRC analizados se encuentran dentro del rango permitido o intervalo de aceptación dado por la incertidumbre del certificado. El valor reportado para el cálculo de z_{score} es menor a 2 para cada material de referencia, estableciendo la validez de los resultados. El método empleado para determinar la concentración de Vitamina B₂ es exacto y muestra un gran desempeño en las condiciones de trabajo del laboratorio.

4.6.1 Análisis de Incertidumbre

Para el análisis de Incertidumbre se determinó el valor de la Incertidumbre Estándar Combinada (u) y Expandida (U) tanto para la curva de calibración como para las muestras analizadas. Además se consideró un valor de

Incertidumbre Expandida para cada nivel de trabajo con un factor de cobertura igual a dos ($k=2$) a un nivel de confianza del 95%.

Además, se identificaron las 4 etapas para la estimación de la incertidumbre del método.

4.6.2 Especificación

Determinación de vitamina B₂ (Riboflavina) expresada en mg de vitamina/100 g de muestra por HPLC.

4.6.3 Identificación de las fuentes de Incertidumbre

Durante todo el proceso para la determinación de vitamina se identificaron todas las contribuciones a la incertidumbre del método.

Tabla 27. Identificación de las fuentes de Incertidumbre

Fuente de incertidumbre	Criterio de aceptación	Observación
Recepción e ingreso de la muestra	Se desestima (fuente bajo control)	Existen instructivos y procedimientos (Sistema gestión de calidad) para este proceso
Almacenamiento, manejo y preparación de la muestra	Se desestima (fuente bajo control)	Existen instructivos y procedimientos (Gerencia de Calidad) para este proceso
Análisis de la muestra Preparación de la curva de calibración Lectura por HPLC	Obligatoriamente se estima (fuente no está bajo control)	Se deben considerar todos los errores involucrados en el proceso
Cálculos	Se desestima (fuente bajo control)	Existen hojas de control y cálculo validadas. La Gerencia de Calidad se encarga de controlar y verificar el desarrollo de los mismos.
Informe de resultados	Se desestima (fuente bajo control)	La Gerencia de Calidad se encarga de verificar el reporte de resultados y la Gerencia general autoriza la salida de los informes.

Elaborado por: Semanate M., 2016.

4.6.4 Cuantificación y combinación

A continuación se representa un diagrama de causa-efecto conocido también como espina de pescado, que describe las principales contribuciones para el cálculo de incertidumbre del método.

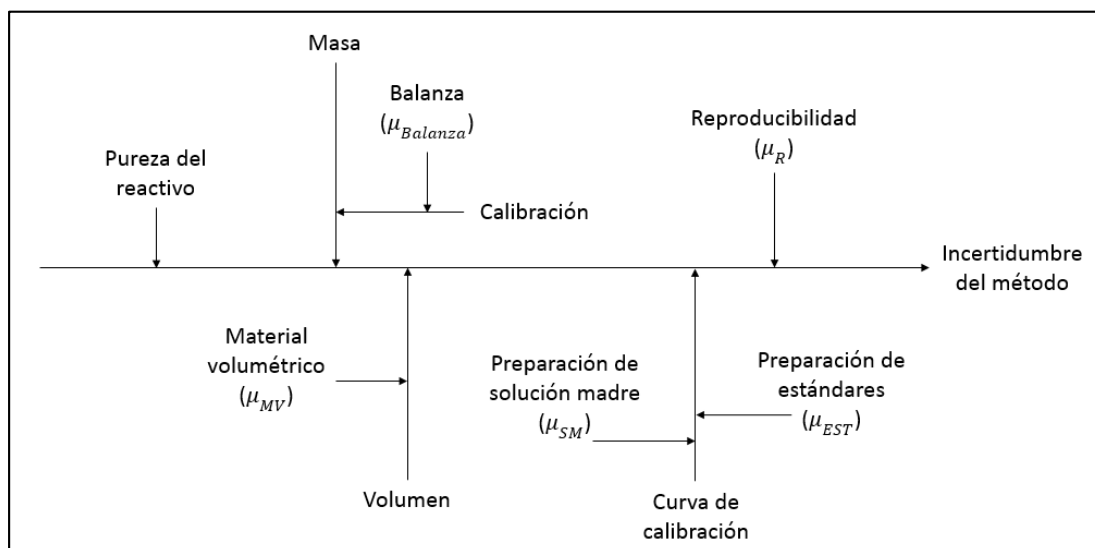


Figura 5. Diagrama general causa-efecto (espina de pescado) para el cálculo de la incertidumbre combinada del método

Balanza

La incertidumbre combinada de la balanza (Mettler Toledo) se especifica directamente en el certificado de calibración adjunto (ver ANEXO I).

$$\mu_{Balanza} = \frac{U}{k}$$

$$\mu_{Balanza} = \frac{0,00051}{2}$$

$$\mu_{Balanza} = 0,00025 \text{ g}$$

Pipeta automática

La incertidumbre combinada de la pipeta (Oxford, USA) se especifica directamente en el certificado de calibración adjunto (ver ANEXO I).

Cálculo demostrativo: Alícuota 1 mL

$$\mu_{P.Auto.} = \frac{U}{2} + Error$$

$$\mu_{P.Auto.} = \frac{0,0054}{2} + 0,020$$

$$\mu_{P.Auto.} = 0,02 \text{ mL}$$

Material Volumétrico

Se utilizó la ecuación Ec.22 de acuerdo al tipo de certificado de cada uno de los materiales.

Cálculo demostrativo: balón de aforo de 500 mL

$$\mu_{MV} = \frac{0,2}{\sqrt{6}}$$

$$\mu_{MV} = 0,0816 \text{ mL}$$

Tabla 28. Incertidumbres del material volumétrico

Descripción	Certificado	Uso	Volumen (mL)	Incertidumbre (mL)	μ_{MV} (mL)
Pipeta aforada	Calidad	Alícuota	5	0,015	0,0061
Balón	Calidad	Solución madre	500	0,2	0,0816
Balón	Calidad	Dilución	50	0,06	0,0245

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Fuente: ECUACHEMLAB, 2016.

Incertidumbre típica combinada de la solución madre (μ_{SM})

Cálculo demostrativo:

$$\mu_{SM} = Conc \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{Balón}}{Vol. aforo}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Balanza}}{Peso}\right)^2}$$

$$\mu_{SM} = 50,4 \text{ } \mu\text{g/mL} \times \sqrt{\left(\frac{0,0816 \text{ mL}}{500 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{0,00025 \text{ g}}{0,0252 \text{ g}}\right)^2}$$

$$\mu_{SM} = 0,50 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Incertidumbre típica combinada de la primera dilución (μ_D)

Cálculo demostrativo:

$$\mu_D = Conc \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{Balón}}{Vol. aforo}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Pipeta}}{Vol. aforo}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{SM}}{Conc}\right)^2}$$

$$\mu_D = 5,1 \mu\text{g/mL} \times \sqrt{\left(\frac{0,0816 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{0,0061 \text{ mL}}{5 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{0,50 \mu\text{g/mL}}{50,4 \mu\text{g/mL}}\right)^2}$$

$$\mu_D = 0,050 \mu\text{g/mL}$$

Incertidumbre típica combinada de la preparación de estándares

Cálculo demostrativo: Estándar 1

$$\mu_{EST} = Conc \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{SM}}{Conc}\right)^2 + \left(\frac{\mu_D}{Conc}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Balón}}{Vol. aforo}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Pipeta Auto.}}{Alícuota}\right)^2}$$

$$\mu_{EST} = 0,100 \mu\text{g/mL} \times \sqrt{\left(\frac{0,50 \mu\text{g/mL}}{50,4 \mu\text{g/mL}}\right)^2 + \left(\frac{0,50 \mu\text{g/mL}}{0,050 \mu\text{g/mL}}\right)^2 + \left(\frac{0,0816 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{0,022 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}\right)^2}$$

$$\mu_{EST} = 0,002 \mu\text{g/mL}$$

Tabla 29. Incertidumbre combinada de los estándares preparados

Est. ($\mu\text{g/mL}$)	μ_{EST} ($\mu\text{g/mL}$)
0,100	0,002
0,251	0,004
0,501	0,007
0,752	0,011
1,003	0,014

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Incertidumbre por reproducibilidad (μ_R)

La desviación estándar de reproducibilidad se calculó previamente en 4.4 (Precisión), (ver tabla 11).

Cálculo demostrativo: Nivel 1

$$\mu_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$$

$$\mu_R = \frac{0,005}{\sqrt{12}} = 0,002 \text{ mg}/100\text{g}$$

Tabla 30. Incertidumbre por reproducibilidad (μ_R)

Concentración (mg/100 g)	n	S _R	μ_R (mg/100g)
Nivel 1	12	0,0050	0,0014
Nivel 2	12	0,0076	0,0022
Nivel 3	12	0,0076	0,0022
Nivel 4	12	0,0186	0,0054

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Incertidumbre típica combinada del método (μ_{MET})

Cálculo demostrativo: Nivel 1

$$\mu_{MET} = Conc_{Nivel} \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{CC}}{Conc_{Est}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_R}{\bar{X}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Balón}}{Vol. aforo}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Balanza.}}{Peso}\right)^2}$$

Ec.

$$\mu_{MET} = 0,23 \text{ mg}/100\text{g} \times \sqrt{\left(\frac{0,014 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}}{1,003 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}}\right)^2 + \left(\frac{0,0014 \text{ mg}/100\text{g}}{0,23 \text{ mg}/100\text{g}}\right)^2 + \left(\frac{0,0816 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{0,0025 \text{ g}}{1,0932 \text{ g}}\right)^2}$$
$$\mu_{MET} = 0,04 \frac{\text{mg}}{100 \text{ g de muestra}}$$

Cálculo del factor de cobertura k

Como se menciona en el apartado 3.4.7 (Incertidumbre) se calculó un factor de cobertura para cada nivel de concentración, utilizando la Ec.26 trabajando a un nivel de confianza del 95%.

Cálculo demostrativo:

$$v_{eff} = \frac{\mu_y^4}{\sum_{i=0}^n \frac{\mu_i(y)^4}{v_i}}$$

$$v_{eff} = \frac{\mu_y^4}{\frac{\mu_{Balanza}^4}{\infty} + \frac{\mu_{Balón}^4}{\infty} + \frac{\mu_{pipeta}^4}{\infty} + \frac{\mu_R^4}{n-1} + \frac{\mu_{CC}^4}{n-2}}$$

$$v_{eff} = \frac{0,04^4}{\frac{0,014^4}{12-1} + \frac{0,0014^4}{12-2}} = 666$$

Valor t-student

$$k=(1-\alpha;v)$$

$$k = t(0,05;666)$$

$$k=1,65 \approx 2,0$$

Tabla 31. Incertidumbre combinada del método y expandida del método

NIVEL	CONCENTRACIÓN (mg/100g)	μ_{MET} (mg/100g)	Factor de cobertura (k)	U_{MET}
Nivel 1	0,23	0,04	2,0	0,08
Nivel 2	0,76	0,04	2,0	0,08
Nivel 3	1,48	0,04	2,0	0,08
Nivel 4	6,97	0,045	2,0	0,09

Elaborado por: Semanate M., 2016.

Para los tres primeros niveles la Incertidumbre Expandida (U) es igual a +/- 0,08 y la Incertidumbre Estándar Combinada (u) corresponde a +/- 0,04 mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra. El último nivel representa un rango más amplio de trabajo que comprende un valor de Incertidumbre Expandida (U) de +/- 0,09 y la Incertidumbre Estándar Combinada (u) es igual a +/- 0,05 mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. Se determinaron los parámetros analíticos de validación como la linealidad, rango de trabajo, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud e incertidumbre establecidos para el método en mención. Los resultados obtenidos muestran un coeficiente de correlación lineal superior a $r=0,999$ para todas las curvas de calibración, el LD es igual a 0,002 ug/mL y el LC es de 0,08 ug/mL. El rango de trabajo comprende una concentración de riboflavina desde 0,008 hasta 1,003 $\mu\text{g/mL}$, un coeficiente de variación por repetibilidad y reproducibilidad menor al 3 y 5% respectivamente. El valor del Z-score se encuentra dentro de los límites establecidos para cada MRC y finalmente una Incertidumbre Combinada y Expandida para los tres primeros niveles establecidos de $\pm 0,04$ y $\pm 0,08$ mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra respectivamente. Para el último nivel se estableció un valor de Incertidumbre Combinada de $\pm 0,05$ e Incertidumbre Expandida igual a $\pm 0,09$ expresado en unidades de mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra.
2. Se elaboró un procedimiento para la determinación de Vitamina B₂ por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia empleando la metodología descrita en el Método AOAC 970.65 modificado. Este documento describe las directrices y parámetros establecidos en el trabajo de validación que son una guía para los posteriores análisis en el laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda.

3. Se estableció la aplicabilidad del método para la determinación de Vitamina B₂, por el método HPLC, cumpliendo con las directrices descritas en la norma ISO/IEC 17025 y el método validado, asegurando la validez de los resultados utilizando un análisis estadístico para demostrar que no existe diferencia significativa en la repetibilidad y reproducibilidad en las condiciones de trabajo previamente establecidas a un nivel de confianza del 95%.

5.2 Recomendaciones

El método empleado implica el desperdicio de muchos reactivos, por lo que se recomienda implementar un manejo adecuado de los desechos.

Una vez implementado el método se debería validar otras vitaminas como la tiamina.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bueno, C., Campas, O., Díaz, S., Izaguirre, E., Zamorano, W., Alvarado, M., Cervantes, J. (2009). CUANTIFICACIÓN DE RIBOFLAVINA (VITAMINA B₂) EN PRODUCTOS LÁCTEOS POR HPLC. *Revista Chilena de Nutrición*, 36, 136-142. Recuperado el 15 de Junio de 2016, de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182009000200005
- Chatzimichalakis, P., Samanidou, V., Verpoorte, R., & Papadoyannis, I. (2004). *Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction. Journal of separation science*. 27(14).
- Crubellati, R., & Di Risio, C. (2009). *Aspectos Prácticos de Validación e Incertidumbre en Medidas Químicas. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo* (Primera ed.). CYTED, Buenos Aires.
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., & Aguilera, M. &. (2010). *Validación de métodos y determinación de la*

incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos" (Primera ed.). Chile.

EURACHEM. (2005). *Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*. México:CENAM:Publicación Técnica CNM-MRD-PT-030: Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito.

EURACHEM/CITAC. (2012). *Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. (Third Edition ed.). London. Recuperado el 22 de Mayo de 2016, de <http://www.eurachem.org>

Gil, L., Umaña, J., Pinillos, J., Lopera, S., & Gallardo, C. (2014). *EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE RIBOFLAVINA POR MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) EN HARINAS DE LENTEJA*. Colombia: Lens e. Alimentos Hoy, 22(32).

GUM. (2008). En *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (1995 with minor corrections)*. Published by ISO in the name of BIPM. IEC, IFCC, IUPAC, IUPAP and OIML.

Horwitz, W., & Latimer, G. (2012). *Official Methods of Analysis; AOAC International* (Décimo Novena ed.).

Lacueva, A., Mattivi, F., & Tonon, D. (1998). Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavin-adenine dinucleotide in wine and other beverages by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A.*, 823(1), 355-363. Recuperado el 22 de Junio de 2016, de <http://www.sciencedirect.com/sci-hub.cc/science/article/pii/S0021967398005858>

Li, H. B., & Chen, F. (2001). Simultaneous determination of nine water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of separation science*, 24(4), 271-274. Recuperado el 24 de Mayo de 2016, de [http://onlinelibrary.wiley.com/sci-hub.cc/doi/10.1002/1615-9314\(20010401\)24:4%3C271::AID-JSSC271%3E3.0.CO;2-L/full?2-L/full](http://onlinelibrary.wiley.com/sci-hub.cc/doi/10.1002/1615-9314(20010401)24:4%3C271::AID-JSSC271%3E3.0.CO;2-L/full?2-L/full)

- Melo, V., & Cuamatzi, Ó. E. (2007). *Bioquímica de los procesos metabólicos* (Segunda ed.). México: Reverté. Recuperado el 14 de Mayo de 2016, de <https://books.google.com.ec/books?id=KHec9weY8Y0C&pg=PA328&dq=riboflavina&hl=es&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwi9kuuwuhufJAhUkkYyKHQaSCDAQ6AEIMjAE#v=onepage&q=riboflavina&f=false>
- Miller, J. (2008). En *Estadística para Química Analítica*. Inglaterra: Addison-Wesley Iberoamérica.
- Norma, I. S. (2005). IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración.
- Ovalles, D., León, L., Calderón, L., & Buchheister, M. (2002). *Desarrollo de un método espectrofluorométrico. Laboratorio de Análisis de Medicamentos*. Universidad de los Andes. Mérida., República Bolivariana de Venezuela.
- Pappa, H. (2013). Validación y verificación de procedimientos analíticos. Argentina: Nuevos enfoques. U.S. Pharmacopeial Convention. Recuperado el 15 de Mayo de 2016, de <http://eurolabsa.com.ar>
- Sierra, N., Rojas, J., Cuadra, I., Sisa, A., & Castro, G. (2007). Validación de una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea de vitaminas A, D3 y E en inyectables de uso veterinario. *Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas*, 43, n. 4, out./dez., 623-630. Recuperado el 20 de Mayo de 2016, de <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n4/15.pdf>
- Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. (2001). *Química Analítica* (Séptima ed.). México: McGraw-Hill.
- Souza, A., Ferreira, C., Bezerra, M., & Aoyama, H. (2005). Riboflavina: Una vitamina multifuncional. *Química Nova*, 28(5), 887-891. Recuperado el 15 Abril de 2016, de <http://www.scielo.br/pdf/%0D/qn/v28n5/25919.pdf>
- Swadesh, J. (2000). *HPLC: Practical and Industrial Applications*. (Second Edition ed.). New York. Recuperado el 28 de Mayo de 2016, de <https://books.google.com.ec/books?id=ITLBQAAQBAJ&printsec=front>

cover&dq=HPLC&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=HPLC&f=false

- Tang, X., Cronin, D., & Brunton, N. (2006). A simplified approach to the determination of thiamine and riboflavin in meats using reverse phase HPLC. *Journal of food composition and analysis*, 19(8), 831-837. Recuperado el 20 de Mayo de 2016, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157506000032>
- Vidović, S., Stojanović, B., Veljković, J., Pražić-Arsić, L., Roglić, G., & Manojlović, D. (2008). *Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method*. *Journal of Chromatography A*. 1202(2). .
- Viñas, P., Balsalobre, N., López, C., & Hernández, M. (2004). Liquid chromatographic analysis of riboflavin vitamers in foods using fluorescence detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(7), 1789-1794. Recuperado el 12 de Junio de 2016, de <http://pubs.acs.org.sci-hub.cc/doi/abs/10.1021/jf030756s>

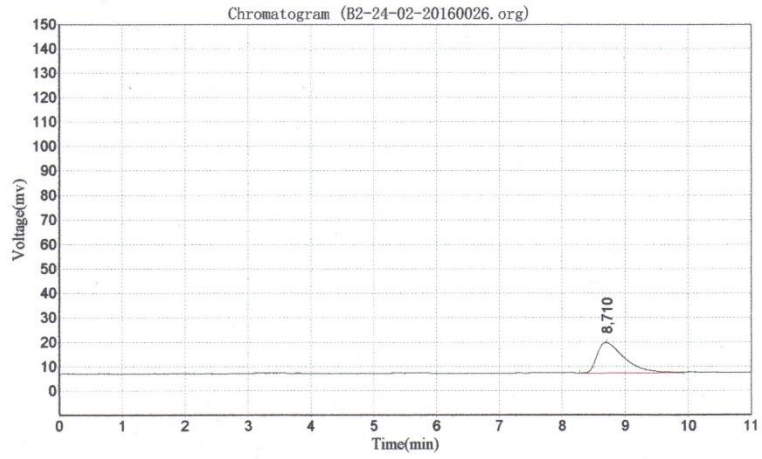
ANEXOS

ANEXO A

VITAMINA B2 ESTANDAR-1 CURVA 1

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.
 Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-24-02-20160026.org

Analyst: Mario Semanate
 Date/Time: 2016-03-21, 21:51:40
 Quantification: Area/Area%



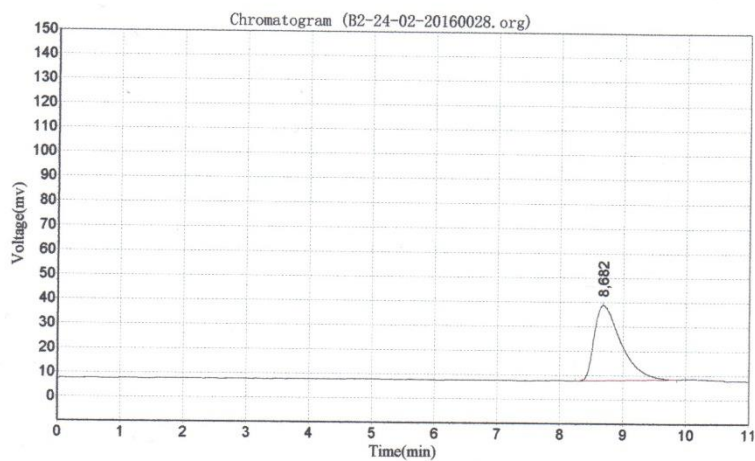
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		8,710	12478,442	381483,813	100,0000
Total			12478,442	381483,813	100,0000

VITAMINA B2 ESTANDAR-2 CURVA 1

Company: Ecuachemlab
 Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-24-02-20160028.org

Analyst: Mario Semanate
 Date/Time: 2016-03-21, 21:53:59
 Quantification: Area/Area%



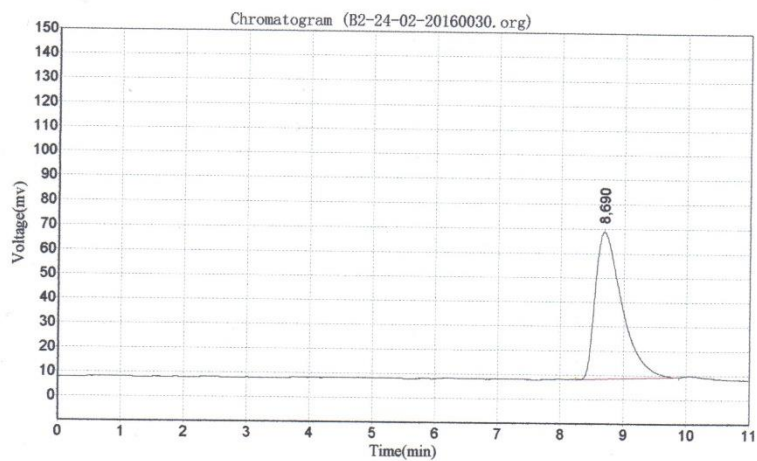
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		8,682	30717,406	914595,125	100,0000
Total			30717,406	914595,125	100,0000

VITAMINA B2 ESTANDAR-3 CURVA 1

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.
Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-24-02-20160030.org

Analyst: Mario Semanate
Date/Time: 2016-03-21, 21:56:00
Quantification: Area/Area%



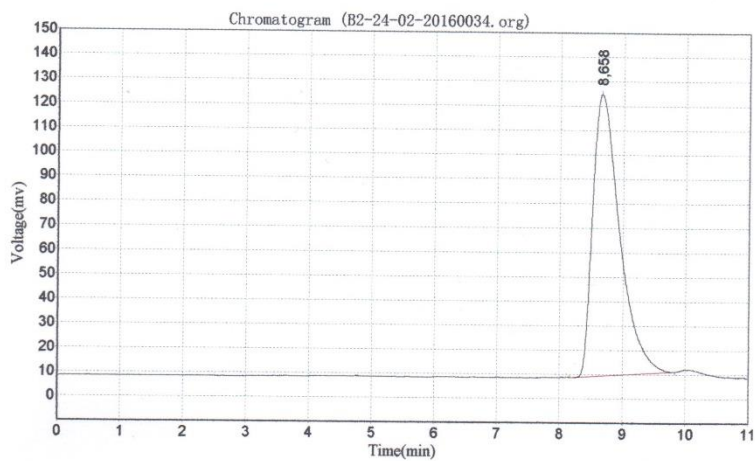
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		8,690	60163,602	1785637,500	100,0000
Total			60163,602	1785637,500	100,0000

VITAMINA B2 ESTANDAR-5 CURVA 1

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.
 Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-24-02-20160034.org

Analyst: Mario Semanate
 Date/Time: 2016-03-21, 22:00:55
 Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		8,658	115256,367	3454139,500	100,0000
Total			115256,367	3454139,500	100,0000

VITAMINA B2 ESTANDAR-5 CURVA 1

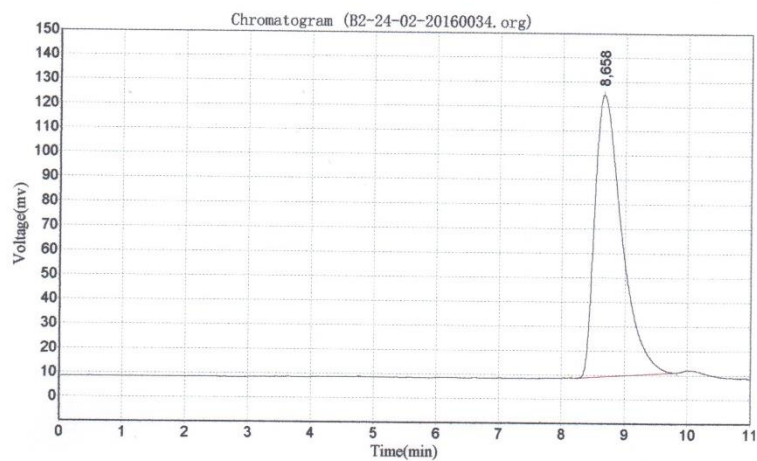
Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.

Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-24-02-20160034.org

Analyst: Mario Semanate

Date/Time: 2016-03-21, 22:00:55

Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		8,658	115256,367	3454139,500	100,0000
Total			115256,367	3454139,500	100,0000

VITAMINA B2 - (MR-10)

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.

Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-04-03-

20160001.org

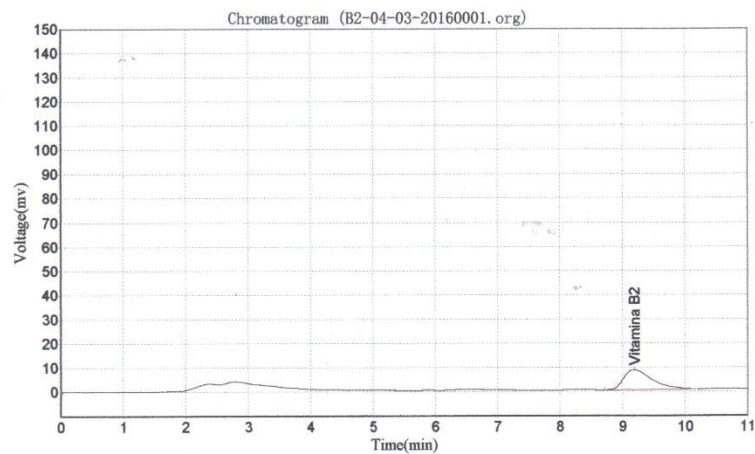
Method File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\Curva-1-B2-

26-02.mtd

Analyst: Mario Semanate

Date/Time: 2016-04-06, 16:58:34

Quantification: Area/ESTD



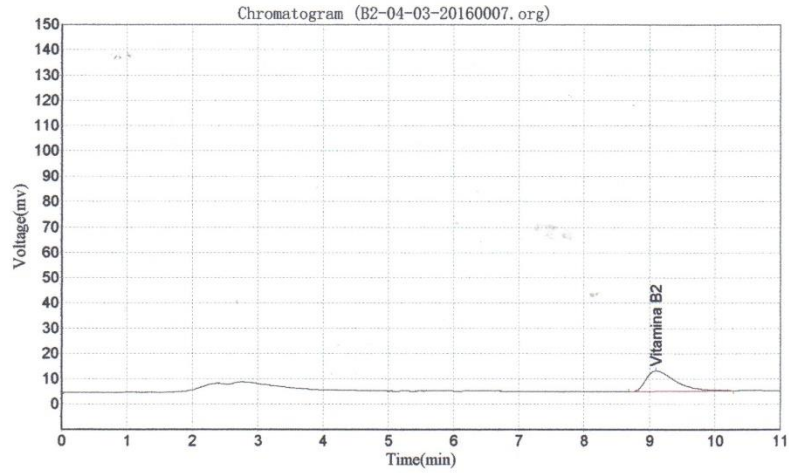
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.(ug/ml)
1	Vitamina B2	9,190	8181,225	257278,000	0,0549
Total			8181,225	257278,000	0,0549

VITAMINA B2 - (MR-10)

Company: Ecuachemlab
 Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-04-03-20160007.org
 Method File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\Curva-1-B2-26-02.mtd

Analyst: Mario Semanate
 Date/Time: 2016-04-06, 17:04:36
 Quantification: Area/ESTD



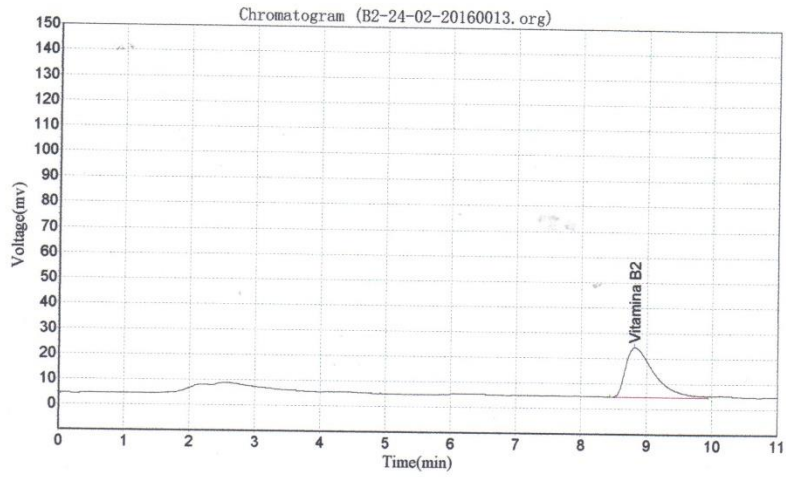
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.(ug/ml)
1	Vitamina B2	9,100	8122,077	252438,609	0,0535
Total			8122,077	252438,609	0,0535

VITAMINA B2 - (MR-60)

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.
 Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-24-02-20160013.org
 Method File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\Curva-1-B2-26-02.mtd

Analyst: Mario Semante
 Date/Time: 2016-04-06, 17:17:17
 Quantification: Area/ESTD



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.(ug/ml)
1	Vitamina B2	8,817	19534,344	594772,188	0,1525
Total			19534,344	594772,188	0,1525

VITAMINA B2 - (MR-60)

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.

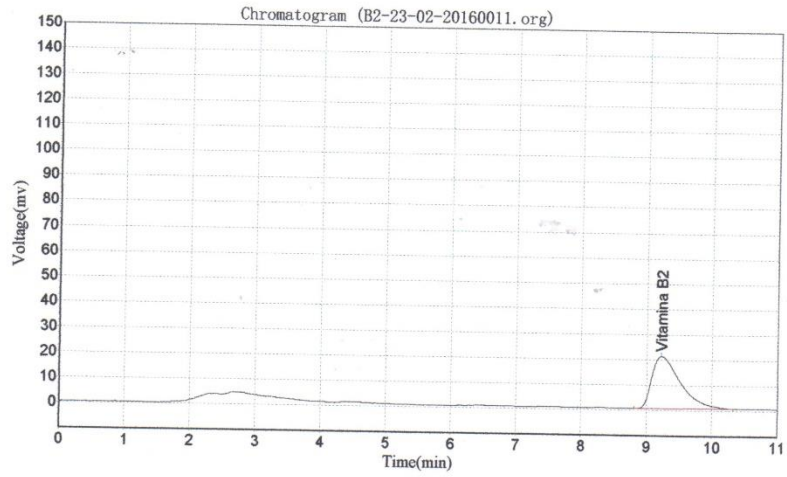
Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-23-02-20160011.org

Method File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\Curva-1-B2-26-02.mtd

Analyst: Mario Semanate

Date/Time: 2016-04-06, 17:58:50

Quantification: Area/ESTD



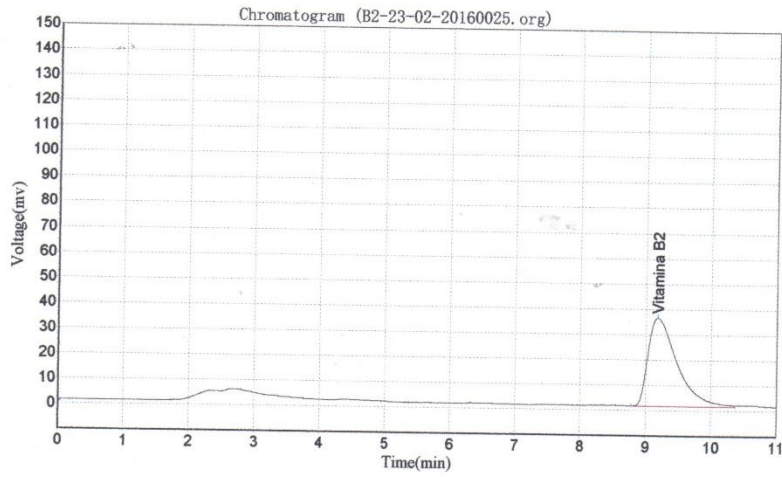
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.(ug/ml)
1	Vitamina B2	9,220	20620,182	622883,000	0,1606
Total			20620,182	622883,000	0,1606

Shandong University, China

VITAMINA B2 - (MR-63)

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.
 Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-23-02-20160025.org
 Analyst: Mario Semanate
 Date/Time: 2016-04-06, 17:50:50
 Method File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\Curva-1-B2-26-02.mtd
 Quantification: Area/ESTD



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.(ug/ml)
1	Vitamina B2	9,177	34871,438	1072520,750	0,2906
Total			34871,438	1072520,750	0,2906

VITAMINA B2 - (MR-63)

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.

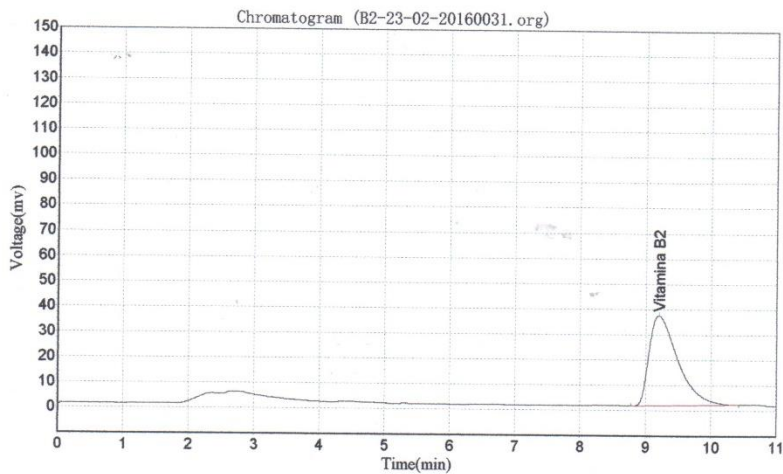
Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-23-02-20160031.org

Method File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\Curva-1-B2-26-02.mtd

Analyst: Mario Semanate

Date/Time: 2016-04-06, 18:06:50

Quantification: Area/ESTD



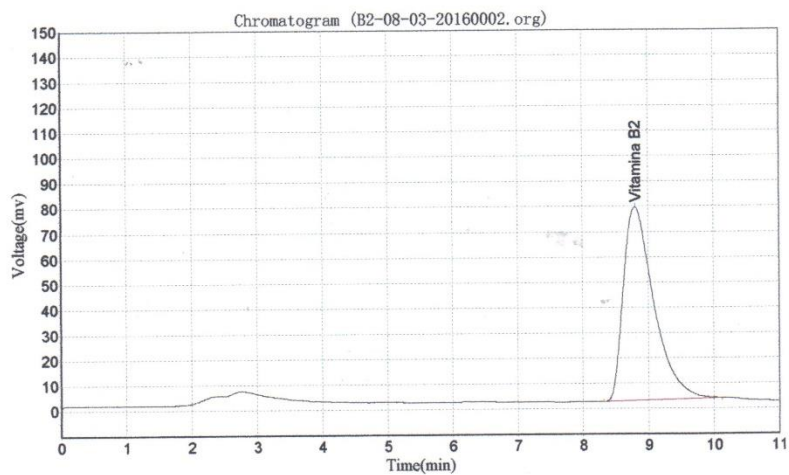
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.(ug/ml)
1	Vitamina B2	9,197	35619,367	1083944,750	0,2939
Total			35619,367	1083944,750	0,2939

VITAMINA B2 - (MR-64)

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda
Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-08-03-20160002.org
Method File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\Curva-1-B2-26-02.mtd

Analyst: Mario Semanate
Date/Time: 2016-04-06, 22:22:49
Quantification: Area/ESTD



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.(ug/ml)
1	Vitamina B2	8,805	76479,633	2471941,000	0,6952
Total			76479,633	2471941,000	0,6952

VITAMINA B2 - (MR-64)

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.

Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-08-03-

20160012.org

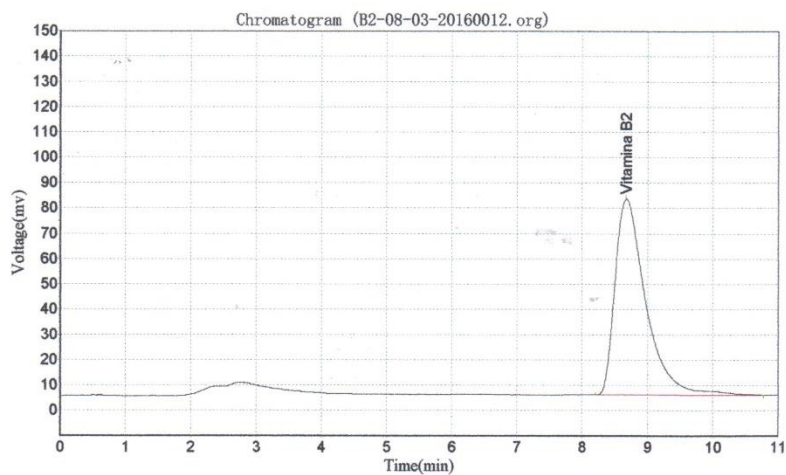
Method File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\Curva-1-B2-

26-02.mtd

Analyst: Mario Semanate

Date/Time: 2016-04-06, 22:32:25

Quantification: Area/ESTD



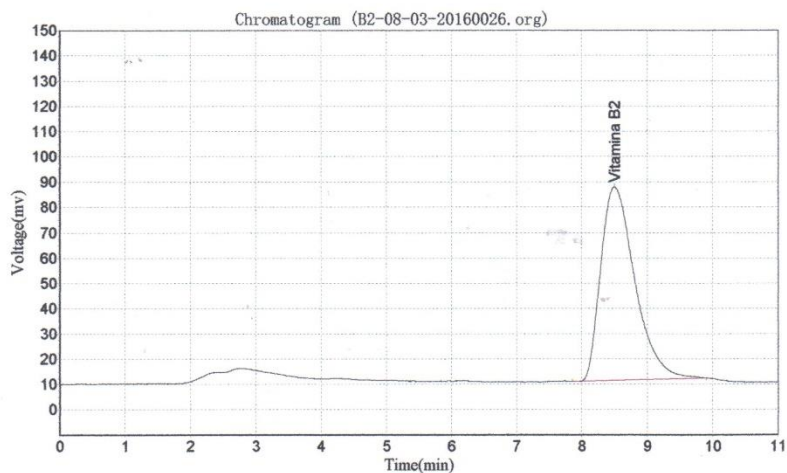
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.(ug/ml)
1	Vitamina B2	8,677	77474,117	2542307,250	0,7155
Total			77474,117	2542307,250	0,7155

VITAMINA B2 - (MRC-77)

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.
 Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-08-03-20160026.org
 Method File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\Curva-1-B2-26-02.mtd

Analyst: Mario Semanate
 Date/Time: 2016-04-06, 22:40:48
 Quantification: Area/ESTD



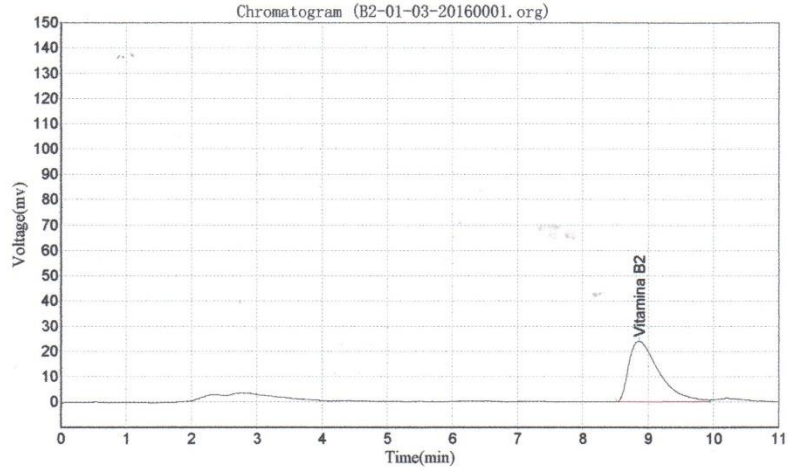
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.(ug/ml)
1	Vitamina B2	8,498	76462,953	2774925,000	0,7827
Total			76462,953	2774925,000	0,7827

VITAMINA B2 - (MRC-78)

Company: Ecuachemlab Cia. Ltda.
 Data File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\B2-01-03-20160001.org
 Method File: F:\Vitamina B2\Validacion\Muestras\Curva-1-B2-26-02.mtd

Analyst: Mario Semanate
 Date/Time: 2016-04-06,22:45:51
 Quantification: Area/ESTD



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.(ug/ml)
1	Vitamina B2	8,862	23976,531	763717,688	0,2013
Total			23976,531	763717,688	0,2013

ANEXO B

ANOVA PRIMER NIVEL

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tratamientos	12	0,03	0,00	2,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,3E-06	1	8,3E-06	0,29	0,5995
Columna1	8,3E-06	1	8,3E-06	0,29	0,5995
Error	2,8E-04	10	2,8E-05		
Total	2,9E-04	11			

ANOVA SEGUNDO NIVEL

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tratamientos	12	0,01	0,00	1,09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,3E-06	1	8,3E-06	0,12	0,7342
Columna1	8,3E-06	1	8,3E-06	0,12	0,7342
Error	6,8E-04	10	6,8E-05		
Total	6,9E-04	11			

ANOVA TERCER NIVEL

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tratamientos	12	1,9E-03	0,00	1,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,3E-06	1	8,3E-06	0,02	0,8935
Columna1	8,3E-06	1	8,3E-06	0,02	0,8935
Error	4,4E-03	10	4,4E-04		
Total	4,4E-03	11			

ANOVA CUARTO NIVEL

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tratamientos	12	0,01	0,00	0,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,3E-05	1	3,3E-05	0,08	0,7805
Columna1	3,3E-05	1	3,3E-05	0,08	0,7805
Error	4,1E-03	10	4,1E-04		
Total	4,1E-03	11			

ANEXO C



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

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

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 05 September 2014
[Certificate Revision History on Last Page](#)

SRM 3233

Page 1 of 11

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.

NIST Analyses for Ba, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, I, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Sn, Sr, V, and Zn Using ICP-OES and/or ICP-MS: Barium, calcium, copper, iron, magnesium, manganese, phosphorus, potassium, sodium, strontium, and zinc were measured by ICP-OES using duplicate 0.5 g test portions taken from each of 10 bottles of SRM 3233. Samples for ICP-OES were digested in a nitric acid/hydrofluoric acid mixture using a microwave sample preparation system. Barium, chromium, cobalt, molybdenum, nickel, strontium, tin, and vanadium were measured by ICP-MS in duplicate 0.25 g test portions taken from each of 10 bottles. Samples were digested in nitric acid using a microwave sample preparation system. Iodine was measured by ICP-MS in single 0.3 g test portions taken from each of six bottles. Samples were digested in aqueous tetramethylammonium hydroxide using a microwave sample preparation system. Quantitation for ICP-OES and ICP-MS was based on the method of standard additions. Tin was not homogeneously distributed in SRM 3233, with values ranging between 0.04 µg/g and 0.3 µg/g, and a value for tin could not be assigned (see "Homogeneity Assessment"). Similarly, values for chromium ranged from 3 µg/g to 5 µg/g, values for nickel ranged from 2 µg/g to 4 µg/g, and values were not assigned.

NIST Analyses for Cd and Pb Using Isotope Dilution ICP-MS: Cadmium and lead were measured by ID-ICP-MS using duplicate 0.5 g test portions taken from each of six bottles of SRM 3233. Samples were spiked with ¹¹¹Cd and ²⁰⁹Pb and were digested in nitric acid using a microwave sample preparation system. Sample digests were evaporated to near dryness and a portion was reconstituted in dilute nitric acid for Pb analysis. To remove spectral interferences in the cadmium determination, the remaining portions of the sample digests were evaporated to dryness and reconstituted in water and concentrated hydrochloric acid to convert the nitrate form to the chloride. Samples were evaporated to dryness and again reconstituted in concentrated hydrochloric acid, which was again evaporated. Salts were dissolved in hydrochloric and hydrofluoric acids and loaded onto an anion exchange resin. Interferents were eluted using hydrochloric and hydrofluoric acids. The cadmium-containing fraction was eluted using nitric acid. This fraction was evaporated to dryness and redissolved in nitric acid prior to analysis. Lead was not homogeneously distributed in SRM 3233, with values ranging between 0.04 µg/g and 0.4 µg/g, and a value for lead could not be assigned (see "Homogeneity Assessment").

NIST Analysis for As Using RNAA: Arsenic was measured by RNAA using single 0.25 g test portions taken from each of six bottles of SRM 3233. Individual disks were formed from the test portions using a stainless steel die and hydraulic press. Samples were packaged individually in clean polyethylene bags and irradiated in one polyethylene irradiation vessel for 5 h at 20 MW, which provided a thermal neutron fluence rate of $3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Samples were combined with ⁷⁵As prior to chemical separation. Samples were dissolved in a mixture of nitric and perchloric acids, and arsenic separated from the matrix as described in reference 7. The 559 keV line from decay of ⁷⁶As was used for quantitation. The 239 keV line from decay of ⁷⁷As was evaluated for yield determination.

NIST Analyses for Al, Cl, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, V, and Zn Using INAA: Aluminum, chlorine, chromium, iron, magnesium, manganese, molybdenum, sodium, vanadium, and zinc were measured by INAA using duplicate 0.225 g test portions taken from each of six bottles of SRM 3233. Powders were pressed into cylindrical pellets, and samples, standards, and controls were packaged individually in clean polyethylene bags and irradiated individually at 20 MW. For analysis of the short-lived nuclides (aluminum, chlorine, magnesium, manganese, sodium, and vanadium) by INAA, each sample, standard, or control material was individually irradiated together with one flux monitor foil for 60 s at a reactor power of 20 MW. The count was done after 5 min decay at a sample-to-detector distance of 14 cm for 5 min counting time. For the analysis of chromium, iron, molybdenum, and zinc samples by INAA, standards, and controls were irradiated for 4 h; irradiation capsules were then inverted 180 degrees, and materials were irradiated another 4 h. Molybdenum was counted for 8 h after a decay of more than 168 h. Chromium, cobalt, iron, and zinc were counted for 8 h after a decay of more than 120 days.

Analytical Approach for Determination of Vitamins: Value assignment of the mass fractions of the vitamins in SRM 3233 was based on the combination of results provided from various analytical methods at NIST, USDA, and collaborating laboratories.

NIST Analyses for Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A (as retinyl palmitate) and vitamin E (as α -tocopheryl acetate) were measured at NIST using liquid chromatography with mass spectrometric detection (LC/MS). Calibrants were prepared gravimetrically, at levels intended to approximate the levels of the fat-soluble vitamins in the SRM. Internal standards were employed; a single solution was used for the calibrants and samples.

Retinyl Palmitate and α -Tocopheryl Acetate: Duplicate 10 g test portions of powder from each of 12 bottles were accurately weighed into 50 mL polyethylene centrifuge tubes, and internal standard solutions containing tocol and retinyl palmitate-*d*₄ were added. Analytes were extracted into hexane by sonication and mixing/rotation for 60 min three times. Three additional extractions were performed using sonication in ethyl acetate and 60 min of mixing/rotation three times. The supernatants for the individual test portions were combined and were evaporated to approximately 25 mL under nitrogen. The extracts were washed with water, the organic phase was evaporated to dryness, and the residue was reconstituted in ethanol. Separations were performed on a C₁₈ column with an isocratic

mobile phase of 60 % methanol and 40 % acetonitrile containing 5 mmol/L ammonium acetate. Retinyl palmitate, retinyl palmitate-*d*₄, tocopherol, and α -tocopherol acetate were monitored at *m/z* 269, *m/z* 273, *m/z* 388, and *m/z* 473, respectively. Retinyl palmitate was not homogeneously distributed in SRM 3233, with values ranging between 2 μ g/g and 12 μ g/g, and a value for retinol could not be assigned (see "Homogeneity Assessment").

NIST Analyses for Water-Soluble Vitamins: Water-soluble vitamins were measured by using LC methods with absorbance detection, MS, or isotope dilution (ID) tandem mass spectrometry (MS/MS). Calibrants were prepared gravimetrically, at levels intended to approximate the levels of the vitamins in the SRM. In cases where an internal standard was employed, a single solution was used for the calibrants and samples.

Ascorbic Acid: Ascorbic acid (vitamin C) was measured by LC using a C₁₈ column with absorbance detection at 243 nm. Duplicate 2 g test portions from each of 10 bottles were dissolved in 30 g to 35 g of HPLC-grade water. An internal standard, 4-pyridoxic acid, was added. Metaphosphoric acid was added to stabilize the vitamin C in the mixture. Dithiothreitol was added to the mixture to convert dihydroascorbic acid to total ascorbic acid. The mixture was sonicated for 30 min and centrifuged at room temperature for 15 min. A 1 mL aliquot of the test mixture was removed and filtered using a 0.45 μ m nylon filter prior to analysis using a gradient LC method with a potassium phosphate (dibasic)/acetonitrile mobile phase.

Thiamine, Riboflavin, Niacinamide, Niacin, Pantothenic Acid, Pyridoxine, and Pyridoxal: Thiamine, riboflavin, niacinamide, niacin, pantothenic acid, pyridoxine, and pyridoxal were measured by LC/MS in duplicate 0.5 g test portions taken from each of 12 bottles. Six internal standards were added: ¹³C₃-thiamine chloride; ²H₄-niacinamide; ²H₄-niacin; calcium ¹³C₃, ¹⁵N-pantothenate; ¹³C₄-pyridoxine hydrochloride; and ²H₃-pyridoxal hydrochloride. The analytes and internal standards were extracted into dilute acetic acid for analysis by positive-ion mode LC/MS. A gradient method with an ammonium formate buffer/methanol mobile phase and a C₁₈ column were used for LC/MS determination of vitamins B₁ hydrochloride, B₂, and pyridoxine, niacinamide, niacin, pantothenic acid, and pyridoxal. Thiamine and ¹³C₃-thiamine were measured at *m/z* 265 and *m/z* 268, respectively. Niacinamide and ²H₄-niacinamide were measured at *m/z* 123 and *m/z* 127, respectively. Niacin and ²H₄-niacin were measured at *m/z* 124 and *m/z* 128, respectively. Pantothenic acid and ¹³C₃, ¹⁵N-pantothenic acid were measured at *m/z* 220 and *m/z* 224, respectively. Pyridoxine and ¹³C₄-pyridoxine were measured at *m/z* 170 and *m/z* 174, respectively. Pyridoxal and ²H₃-pyridoxal were measured at *m/z* 168 and *m/z* 171, respectively. Riboflavin was measured at *m/z* 377, with ¹³C₄-pyridoxine as the internal standard.

Cyanocobalamin: Cyanocobalamin (vitamin B₁₂) was measured in two 2.0 g test portions taken from each of six bottles. Cyanocobalamin was extracted into deionized water, samples were centrifuged, and the supernatants were filtered through 0.45 μ m nylon filters. Yttrium was added as an internal standard. The samples were analyzed for cyanocobalamin, inorganic cobalt, and yttrium using a C₁₈ column, a mobile phase of ethylenediaminetetraacetic acid in methanol and water, and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) with detection at *m/z* 59 for cyanocobalamin and *m/z* 89 for yttrium.

Folic Acid: Folic acid measurements were made on two 1.0 g test portions taken from each of 12 bottles. Internal standard ¹³C₅-folic acid was added. A sodium phosphate buffer containing ascorbic acid was added, and samples were vortex-mixed, subjected to gentle shaking at 37 °C, boiled, and cooled on ice. Supernatants from centrifuged samples were filtered through 0.45 μ m filters. The filtered supernatants were analyzed for folic acid and ¹³C₅-folic acid by positive mode LC/MS/MS. A gradient LC method with a water/acetonitrile/formic acid mobile phase and a C₁₈ reversed-phase column were used for the determination of both folic acid and ¹³C₅-folic acid. The transitions *m/z* 442.4 → *m/z* 295.1 and *m/z* 447.4 → *m/z* 295.1 were monitored for folic acid and ¹³C₅-folic acid, respectively.

USDA Analyses for Water-Soluble Vitamins: Thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, and folic acid were measured by using ID-LC/MS. Thiamine, niacinamide, and pyridoxine were measured in the same sample extracts using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with ID-MS. Using newly prepared samples, the six vitamins were measured using ultra performance liquid chromatography (UPLC) methods with ID-MS. Results from the methods were similar and were therefore considered as a single data set, with the uncertainty as the standard error of the mean.

Collaborating Laboratories' Analyses: The GMA FIACC laboratories were asked to use their usual methods to make single measurements of proximates, calories, vitamins, elements, and amino acids on test portions taken from each of two bottles of SRM 3233. In a second exercise, a subset of these laboratories measured sugars in each of two bottles. In a third exercise, several GMA laboratories and one other laboratory measured dietary fiber in each of six bottles using four AOAC Official Methods of Analysis: 985.29 Total Dietary Fiber in Foods (Enzymatic-Gravimetric Method); 991.42 Insoluble Dietary Fiber in Foods and Food Products (Enzymatic-Gravimetric Method, Phosphate Buffer); 2009.01 Total Dietary Fiber in Foods (Enzymatic-Gravimetric-Liquid Chromatographic Method); and 2011.25 Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber in Foods (Enzymatic-Gravimetric-Liquid Chromatography) [8].

SRM 3233

Page 4 of 11

Because of variability among data provided by laboratories participating in an interlaboratory comparison exercise, the median of laboratory means is used, with the uncertainty estimated using the median absolute deviation (MADe) [9].

Determination of Moisture: Moisture content of SRM 3233 was determined at NIST (see "Instructions for Storage and Use") by (1) freeze-drying to constant mass over 7 days; (2) drying over magnesium perchlorate in a desiccator at room temperature for 28 days; and (3) drying for 2 h in a forced-air oven at 80 °C. Unweighted results obtained using all three techniques were averaged to determine a conversion factor of (0.983 ± 0.007) gram dry mass per gram as-received mass, which was used to convert data from an as-received to a dry-mass basis; the uncertainty shown on this value is an expanded uncertainty. An uncertainty component for the conversion factor (0.36 %) obtained from the moisture measurements is incorporated in the uncertainties of the certified and reference values, reported on a dry-mass basis, that are provided in this certificate.

Homogeneity Assessment: The homogeneity of vitamins and elements was assessed at NIST using the methods and test portion sizes described above. Homogeneity of constituents measured solely by collaborating laboratories (e.g., proximates) was not assessed, although the data were treated as though these analytes were homogeneously distributed. Retinyl palmitate and certain elements showed a lack of homogeneity; in these cases, either values are not provided (chromium, lead, nickel, tin, retinyl palmitate) or the uncertainties incorporate a component for inhomogeneity (cobalt, molybdenum). For the other elements and the vitamins, analysis of the variance did not show statistically significant heterogeneity.

Value Assignment: The collaborating laboratories reported the individual results for each of their analyses for a given analyte. The mean of each laboratory's results was then determined. For calculation of assigned values for analytes that were measured only by the collaborating laboratories, the median of the laboratory means was used. For analytes that were also measured by NIST, the median of the individual collaborating laboratory means, the USDA's mean, and the mean of the individual sets of NIST data were averaged, as appropriate.

Certified Mass Fraction Values for Elements: Each certified mass fraction value is the mean from the combination of the mean of results from analyses by NIST and the median of the mean of results provided by collaborating laboratories, where available. The uncertainty provided with each value 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 incorporates the observed difference between the results from the methods and their respective uncertainties and an uncertainty component for moisture correction, consistent with the ISO/JCGM Guide and with its Supplement 1, and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [2-4]. The measurands are the total mass fractions of the elements in fortified breakfast cereal. The certified values are metrologically traceable to the SI unit of mass, expressed as milligrams per kilogram on a dry-mass basis.

Table 1. Certified Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for Elements in SRM 3233

	Mass Fraction (mg/kg)	Coverage Factor, k
Barium ^(a,b)	2.766 ± 0.033	2.00
Cadmium ^(c)	0.0819 ± 0.0020	2.15
Calcium ^(a,d)	36910 ± 920	2.00
Copper ^(a,d)	3.97 ± 0.28	2.00
Iron ^(a,d,e)	766 ± 36	2.00
Magnesium ^(a,d,e)	1093 ± 37	2.00
Manganese ^(a,d,e)	33.1 ± 1.1	2.00
Phosphorus ^(a,d)	2592 ± 68	2.00
Potassium ^(a,d)	3060 ± 140	2.00
Sodium ^(a,d,e)	6830 ± 120	2.00
Strontium ^(a,b)	8.34 ± 0.17	2.00
Zinc ^(a,d,e)	628 ± 16	2.00

^(a) NIST ICP-OES

^(b) NIST ICP-MS

^(c) NIST ID ICP-MS

^(d) Collaborating laboratories

^(e) NIST INAA

Certified Mass Fraction Values for Vitamins: Each certified mass fraction value is the mean from the combination of the mean results from each set of analyses by NIST, the median of the mean of results provided by collaborating laboratories, and the mean result provided by the material manufacturer, where available. The uncertainty provided with each 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 incorporates the observed difference between the results from the methods and their respective uncertainties and an uncertainty component for moisture correction, consistent with the ISO/JCGM Guide and with its Supplement 1, and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [2-4]. The measurands are the total mass fractions of the vitamins in fortified breakfast cereal. The certified values are metrologically traceable to the SI unit of mass, expressed as milligrams per kilogram on a dry-mass basis.

Table 2. Certified Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for Vitamins in SRM 3233

	Mass Fraction (mg/kg)	Coverage Factor, k
Thiamine (Vitamin B ₁) ^(a,b,c,e)	60.2 ± 9.4	2.00
Riboflavin (Vitamin B ₂) ^(b,d,e)	76 ± 2	2.00
Niacinamide ^(c,e)	799 ± 27	2.00
Total Vitamin B ₃ as Niacinamide ^(b,c,e)	822 ± 39	2.00
Pantothenic Acid ^(b,c,e)	540 ± 40	2.00
Pyridoxine ^(c,e)	78.0 ± 4.7	2.00
Total Vitamin B ₆ as Pyridoxine ^(b,c,h)	81.9 ± 9.0	2.00
Folic Acid ^(b,c,f)	15.1 ± 1.2	2.00
Total α -Tocopherol (Vitamin E) ^(h,i)	1350 ± 220	2.00

^(a) Reported as thiamine ion (265.36 g/mol), not thiamine chloride or thiamine chloride hydrochloride.

^(b) Collaborating laboratories

^(c) NIST ID-LC/MS

^(d) NIST LC/MS

^(e) USDA

^(f) NIST ID-LC/MS/MS

^(g) Measured as the sum of niacinamide and niacin, which was mathematically converted to niacinamide by multiplication by the ratio of the relative molecular masses.

^(h) Measured as the sum of pyridoxine and pyridoxal, which was mathematically converted to pyridoxine by multiplication by the ratio of the relative molecular masses.

⁽ⁱ⁾ α -Tocopherol was added to SRM 3233 as RRR- α -tocopheryl acetate. This certified value is expressed as α -tocopherol equivalents and includes "naturally occurring" α -tocopherol as well as the α -tocopherol acetate that was added.

Reference Mass Fraction Values for Elements: Each reference mass fraction value is the mean result of NIST analyses using one or two methods. 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, 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 uncertainties for cobalt and molybdenum also incorporate an additional uncertainty component for possible inhomogeneity. The measurands are the mass fractions of the elements in fortified breakfast cereal as measured by the method indicated. The reference values are metrologically traceable to the SI unit of mass, expressed as milligrams per kilogram.

Table 3. Reference Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for Elements in SRM 3233

	Mass Fraction (mg/kg)	Coverage Factor, k
Cobalt ^(a)	0.174 ± 0.033	2.57
Molybdenum ^(a)	1.61 ± 0.16	2.57
Vanadium ^(a,b)	0.297 ± 0.040	2.00

^(a) NIST ICP-MS

^(b) NIST INAA

SRM 3233

Page 6 of 11

Reference Mass Fraction Values for Selected Vitamins: Each reference mass fraction value is the mean result of a NIST analysis using a single method or the mean from the combination of NIST results with the median of the mean results provided by collaborating laboratories, where available. 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]. 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, consistent with the ISO/JCGM Guide and with its Supplement 1 [2–4]. The measurands are the mass fractions of the vitamins in fortified breakfast cereal as measured by the method indicated. The reference values are metrologically traceable to the SI unit of mass, expressed as milligrams per kilogram.

Table 4. Reference Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for Vitamins in SRM 3233

	Mass Fraction (mg/kg)	Coverage Factor, k
Ascorbic Acid (Vitamin C) ^(a,b)	2440 ± 620	2.00
Niacin ^(c)	16.67 ± 0.35	2.14
Pyridoxal ^(c)	2.25 ± 0.19	2.20
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂) ^(b,d)	0.210 ± 0.040	2.00

- (a) NIST LC/absorbance
 (b) Collaborating laboratories
 (c) NIST ID-LC/MS
 (d) NIST LC-ICP-MS

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 $U = k\mu_c$, where μ_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.

Table 6. Reference Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for Dietary Fiber in SRM 3233^(a)

	Mass Fraction (%)	Coverage Factor, <i>k</i>
Composite Data for Dietary Fiber Obtained Using Four AOAC Methods ^(b)		
IDF + HMW SDF	9.19 ± 0.94	2.78
IDF	6.60 ± 0.45	2.78
LMW SDF	3.02 ± 0.61	2.78
HMW SDF	2.87 ± 0.61	2.78
TDF	12.24 ± 0.78	2.78
Based on Data Obtained Using AOAC 2011.25 ^(c)		
IDF	6.6 ± 1.3	4.30
LMW SDF	3.0 ± 1.2	4.30
HMW DF	2.6 ± 1.5	4.30
TDF	11.9 ± 2.7	4.30
Based on Data Obtained Using AOAC 2009.01		
IDF + HMW SDF ^(b)	9.19 ± 0.94	2.78
LMW SDF ^(d)	2.92 ± 0.61	2.00
TDF ^(d)	12.53 ± 0.58	2.00
Based on Data Obtained Using AOAC 991.43		
SDF ^(d)	2.71 ± 0.84	2.00
TDF ^(d)	9.0 ± 1.2	2.00

^(a) DF = dietary fiber
 IDF = insoluble dietary fiber
 HMW = high molecular weight
 LMW = low molecular weight
 SDF = soluble dietary fiber
 TDF = total dietary fiber

^(b) Data reported by five laboratories.

^(c) Data reported by three laboratories.

^(d) Data reported by two laboratories.

Reference Mass Fraction Values for Amino Acids: Each reference mass fraction 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 amino acids in fortified breakfast cereal as measured by the collaborating laboratories and the methods they used. The reference values are metrologically traceable to the SI unit of mass, expressed as a percent.

Table 7. Reference Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for Amino Acids in SRM 3233

	Mass Fraction (%)	Coverage Factor, k
Alanine	0.323 ± 0.042	2.57
Arginine	0.322 ± 0.067	2.57
Aspartic Acid	0.438 ± 0.050	2.57
Cysteine	0.154 ± 0.032	3.18
Glutamic Acid	2.25 ± 0.22	2.57
Glycine	0.342 ± 0.031	2.57
Histidine	0.162 ± 0.034	2.57
Isoleucine	0.270 ± 0.014	2.57
Leucine	0.550 ± 0.047	2.57
Lysine	0.103 ± 0.040	2.57
Methionine	0.139 ± 0.019	2.78
Phenylalanine	0.373 ± 0.033	2.57
Serine	0.375 ± 0.062	2.57
Threonine	0.241 ± 0.013	2.57
Tryptophan	0.092 ± 0.045	3.18
Tyrosine	0.231 ± 0.058	2.57
Valine	0.343 ± 0.026	2.57

Information Mass Fraction Values for Elements: Each information mass fraction value is the mean result of a NIST analysis using a single method. No uncertainty is provided because there is insufficient information available for its assessment. Information values cannot be used to establish metrological traceability.

Table 8. Information Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for Elements in SRM 3233

	Mass Fraction (mg/kg)
Aluminum ^(a)	40
Chlorine ^(a)	10 000
Iodine ^(b)	0.04
	Mass Fraction (µg/kg)
Arsenic ^(c)	80

^(a) NIST INAA
^(b) NIST ICP-MS
^(c) NIST RNAA

Table 9. Information Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for Dietary Fiber in SRM 3233^(a,b)

	Mass Fraction (%)
Based on Data Obtained Using AOAC 2009.01	
HMW DF	9.59
Based on Data Obtained Using AOAC 991.43	
IDF	6.41
Based on Data Obtained Using AOAC 985.29	
IDF	6.61
HMW SDF	2.98

^(a) DF = dietary fiber
 IDF = insoluble dietary fiber
 HMW = high molecular weight
 SDF = soluble dietary fiber

^(b) Data reported by one laboratory; insufficient information is available to assign an uncertainty to this value. Information values cannot be used to establish metrological traceability.

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 Arsenic 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.eoma.aoac.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 D



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](#)

SRM 1849a

Page 1 of 13

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°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°C following packaging and is stored at NIST at -80°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.

(0.1 mol/L methanolic [*m*-trifluoromethylphenyl] trimethylammonium hydroxide, Alltech, Deerfield, IL) was added. Samples were mixed for 10 s to 15 s and allowed to sit for at least 1 h prior to analysis by GC-FID. Six independently prepared calibrants were used for quantitation. GC-FID was performed using a 0.25 mm × 100 m bis-cyanopropyl polysiloxane fused silica capillary column. Calibrants were prepared gravimetrically from SRM 2377 Fatty Acid Methyl Esters in Isooctane, at levels intended to approximate the levels of the fatty acids in the SRM following extraction. A single internal standard solution was used for the calibrants and samples. Calculations are based on linear regression of response factors for the calibrants.

NIST Analyses for Cholesterol Using ID-GC-MS: The mass fraction of cholesterol was measured using the ID-GC-MS method developed at NIST for serum cholesterol [7] and modified for the determination of cholesterol in food matrices using AOAC International Official Method 996.06 for hydrolysis [8]. Three sets of samples were prepared. Each set consisted of duplicate 0.5 g test portions from each of five packets of SRM 1849a weighed into round-bottom flasks. An aliquot of a solution containing a known mass of the internal standard, cholesterol-¹³C₃, was added to each flask. Hydrolysis of cholesterol esters was accomplished by refluxing the samples in an alcohol-KOH solution for 1 h. Hexane was then used to extract the cholesterol. A portion of the hexane extract was evaporated to dryness and N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide was added to convert cholesterol to its trimethylsilyl (TMS) derivative (cholesterol-TMS). Analyses were performed on a GC-MS system operated in the electron ionization mode with selected ion monitoring at *m/z* 458 and *m/z* 461 for the unlabeled and labeled cholesterol-TMS, respectively. The GC was equipped with a 30 m (5:95 phenyl/methyl polysiloxane [mole fraction]) non-polar fused silica column directly interfaced to the ion source. Standards consisting of mixtures of known quantities of pure unlabeled cholesterol (SRM 911c) and cholesterol-¹³C₃ were run before and after the samples to generate composite linear regressions for calculation of the quantity of cholesterol in the samples.

Analytical Approach for Determination of Vitamins: Value assignment of the mass fractions of vitamins in SRM 1849a were based on the combination of results provided from various analytical methods at NIST, collaborating laboratories, and the manufacturer, where available. NIST provided measurements by using ID with liquid chromatography (LC) and MS or tandem MS (MS/MS), LC with absorbance detection, and LC with fluorescence detection.

NIST Analyses for Retinyl Palmitate, Cholecalciferol, and Phylloquinone Using ID-LC-MS: Mass fractions of vitamin A (as retinyl palmitate), vitamin D₃ (cholecalciferol), and vitamin K₁ (phylloquinone) were measured by ID-LC-MS from duplicate 3 g to 5 g test portions of SRM 1849a from each of 10 packets. Samples were accurately weighed into 50 mL polyethylene centrifuge tubes and separate aliquots from each of four internal standard solutions containing retinyl palmitate-*d*₄, and vitamin D₃-*d*₃ and vitamin K₁-*d*₆ were added. Analytes were extracted into ethyl acetate by sonication and then mixing/rotation overnight. Five additional extractions were performed using sonication and 30 min of mixing/rotation. The supernatants for the individual test portions were combined and were evaporated to approximately 10 mL under nitrogen. They were injected without additional processing. Separations were performed on a C18 column with an isocratic mobile phase of methanol/acetonitrile (60:40, volume fraction) containing 5 mmol/L ammonium acetate. The separation was monitored using an absorbance detector at 325 nm, but MS was used for quantitation. Retinyl palmitate and retinyl palmitate-*d*₄ were monitored at *m/z* 269 and *m/z* 273, respectively. Vitamins D₃ and D₃-*d*₃ were monitored at *m/z* 385 and *m/z* 388, respectively. Vitamins K₁ and K₁-*d*₆ were monitored at *m/z* 452 and *m/z* 458, respectively. Calibrants were prepared gravimetrically, with concentrations assigned spectrophotometrically, at levels intended to approximate the levels of the fat-soluble vitamins in the SRM following extraction. A single internal standard solution was used for the calibrants and samples.

NIST Analyses for Total α-Tocopherol and α-Tocopheryl Acetate Using LC-Absorbance and/or LC-Fluorescence: Mass fractions of vitamin E (as total α-tocopherol and α-tocopheryl acetate) were measured by LC-absorbance and/or LC-fluorescence from duplicate 1 g to 2 g test portions of SRM 1849a from each of 10 packets. Samples were accurately weighed into 50 mL polyethylene centrifuge tubes. An aliquot of an ethanolic tocopherol internal standard solution was added. The sample was suspended in approximately 5 mL of water and an aliquot of dipotassium oxalate solution was added. The analytes were then extracted from the suspended sample into a mixture of ethanol/*tert*-butylmethylether/petroleum ether (10:5:7, volume fractions) by rotational agitation for 15 min. Five additional extractions were performed using 15 min of mixing/rotation. The supernatants for the individual extractions were combined, washed with water twice, and were evaporated to dryness under nitrogen. The residues were resuspended in approximately 2 mL of ethanol/ethyl acetate (50:50, volume fraction). Separations were performed on a C18 column with an isocratic mobile phase of methanol/water (90:10, volume fraction). The separation was monitored using an absorbance detector at 295 nm for α-tocopherol acetate and a fluorescence detector at an excitation wavelength of 295 nm and an emission wavelength of 330 nm for α-tocopherol. Calibrants were prepared gravimetrically, with concentrations assigned spectrophotometrically, at levels intended to approximate the levels of the fat-soluble vitamins in the SRM following extraction. A single internal standard solution was used for the calibrants and samples.

NIST Analyses for Ascorbic Acid Using LC-Absorbance: The mass fraction of vitamin C (ascorbic acid) was measured by LC absorbance in duplicate 2 g test portions from each of 10 packets of SRM 1849a. Samples were dissolved in 30 g to 35 g of HPLC-grade water and an internal standard, 4-pyridoxic acid, was added. Metaphosphoric acid was added to stabilize the vitamin C in the mixture. Dithiothreitol was added to the mixture to convert dihydroascorbic acid to total ascorbic acid. The mixture was sonicated for 30 min and centrifuged at room temperature for 15 min. A 1 mL aliquot of the test mixture was removed and filtered using a 0.45 µm nylon filter prior to analysis. Separations were performed on a C18 column using a gradient LC method with potassium phosphate (dibasic)/acetonitrile mobile phase. The separation was monitored using an absorbance detector at 243 nm. Calibrants were prepared gravimetrically, at levels intended to approximate the level of ascorbic acid in the SRM following extraction. A single internal standard solution was used for the calibrants and samples.

NIST Analyses for Thiamine, Riboflavin, Niacinamide, Pantothenic Acid, and Pyridoxine Using ID-LC-MS: Mass fractions of vitamin B₁ (thiamine), vitamin B₃ (niacinamide), vitamin B₅ (pantothenic acid), and vitamin B₆ (pyridoxine) were measured by ID-LC-MS, and vitamin B₂ (riboflavin) were measured by LC-MS in duplicate 2 g test portions taken from each of 10 packets of SRM 1849a. Four internal standards were added: ¹³C₃-thiamine chloride; ²H₄-niacinamide; calcium ¹³C₃,¹⁵N-pantothenate; and ¹³C₄-pyridoxine hydrochloride. The analytes and internal standards were extracted into dilute acetic acid for analysis by positive-ion mode LC-MS. A gradient method with an ammonium formate buffer/methanol mobile phase and a C18 column were used for LC-MS determination. Thiamine and ¹³C₃-thiamine were measured at *m/z* 265 and *m/z* 268, respectively. Niacinamide and ²H₄-niacinamide were measured at *m/z* 123 and *m/z* 127, respectively. Pantothenic acid and ¹³C₃,¹⁵N-pantothenic acid were measured at *m/z* 220 and *m/z* 224, respectively. Pyridoxine and ¹³C₄-pyridoxine were measured at *m/z* 170 and *m/z* 174, respectively. Riboflavin was measured at *m/z* 377, with ¹³C₄-pyridoxine as the internal standard. Calibrants were prepared gravimetrically, at levels intended to approximate the levels of the water-soluble vitamins in the SRM following extraction. A single internal standard solution was used for the calibrants and samples.

NIST Analyses for Folic Acid and 5-Methyltetrahydrofolate Using ID-LC-MS/MS: Mass fractions of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate were measured by ID-LC-MS/MS on two 1.0 g test portions taken from each of 10 packets of SRM 1849a. Internal standards ¹³C₅-folic acid and ¹³C₅-5-methyltetrahydrofolate were added. A sodium phosphate buffer containing ascorbic acid was added and samples were subjected to trienzyme digestion with protease, α-amylase, and deconjugase [9]. Supernatants from centrifuged samples were filtered through 0.45 µm polyvinylidene difluoride (PVDF) filters and analyzed for 5-methyltetrahydrofolate by positive mode LC-MS/MS. Folic acid and ¹³C₅-folic acid were extracted on solid-phase extraction cartridges and eluted with a water/methanol solution containing ascorbic acid and formic acid for positive mode LC-MS/MS analysis. A gradient LC method with a water/acetonitrile/formic acid mobile phase and a C18 column were used for the determination of both folic acid and 5-methyltetrahydrofolate. The transitions *m/z* 442.4 → *m/z* 295.1 and *m/z* 447.4 → *m/z* 295.1 were monitored for folic acid and ¹³C₅-folic acid, respectively. The transitions *m/z* 460.5 → *m/z* 176.1 and *m/z* 465.5 → *m/z* 176.1 were monitored for 5-methyltetrahydrofolate and ¹³C₅-5-methyltetrahydrofolate, respectively. Calibrants were prepared gravimetrically, with concentration assigned spectrophotometrically, at levels intended to approximate the levels of the folates in the SRM following extraction. A single internal standard solution was used for the calibrants and samples.

NIST Analyses for Biotin Using ID-LC-MS: The mass fraction of biotin was measured by ID-LC-MS in two 1.0 g test portions taken from each of 10 packets of SRM 1849a with ²H₂-biotin added as an internal standard. An aqueous formic acid solution was added to the samples, which were then subjected to mechanical shaking. Samples were centrifuged, and biotin and ²H₂-biotin were extracted on solid-phase extraction cartridges and eluted with a water/methanol solution containing formic acid for positive mode LC-MS analysis. An isocratic LC method with a water/methanol/formic acid mobile phase and a C18 column were used for the determination of biotin. Biotin and ²H₂-biotin were monitored at *m/z* 245 and *m/z* 247, respectively. Calibrants were prepared gravimetrically, at levels intended to approximate the levels of biotin in the SRM following extraction. A single internal standard solution was used for the calibrants and samples.

NIST Analyses for Total Choline and Free Carnitine Using ID-LC-MS: Mass fractions of choline and carnitine were measured by ID-LC-MS in two 1.0 g test portions taken from each of 10 packets of SRM 1849a with ²H₉-choline chloride and ²H₉-carnitine hydrochloride added as internal standards. The analytes and internal standards were extracted and hydrolyzed by microwave digestion into dilute hydrochloric acid for analysis by positive-ion mode LC-MS. A gradient method with an ammonium formate/acetonitrile mobile phase and a mixed-mode C18 column were used for LC-MS determination. Choline and ²H₉-choline were measured at *m/z* 104 and *m/z* 113, respectively. Carnitine and ²H₉-carnitine were measured at *m/z* 162 and *m/z* 171, respectively. Calibrants were prepared gravimetrically, at levels intended to approximate the levels of choline and carnitine in the SRM following extraction. A single internal standard solution was used for the calibrants and samples.

Analytical Approach for Determination of Elements: Value assignment of the mass fractions of elements in SRM 1849a was based on the combination of measurements made at NIST, collaborating laboratories, and the manufacturer, where available. NIST provided measurements by using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and instrumental neutron activation analysis (INAA).

NIST Analyses for Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, P, K, Se, and Zn Using ICP-OES and/or ICP-MS: Mass fractions of calcium, chromium, copper, iron, magnesium, manganese, molybdenum, phosphorus, potassium, sodium, and zinc were measured by ICP-OES in duplicate 1.0 g test portions taken from each of 10 packets of SRM 1849a. Mass fractions of chromium, molybdenum, and selenium were measured by ICP-MS using duplicate 0.5 g test portions taken from each of 10 packets of SRM 1849a. Samples were digested using nitric acid or a nitric acid/hydrofluoric acid mixture in a microwave oven. Quantitation was based on the method of standard additions.

NIST Analyses for I Using ICP-MS: The mass fraction of iodine was measured by ICP-MS in duplicate 0.5 g test portions taken from each of six packets of SRM 1849a. Samples were digested using nitric acid in a microwave oven. After digestion, the pH was raised in the sample solutions by the addition of ammonium hydroxide. Quantitation was based on the method of standard additions.

NIST Analyses for Cl, I and Mn Using INAA: Mass fractions of chlorine, iodine, and manganese were determined by INAA, in individual disks prepared from single 0.2 g test portions taken from each of 10 packets of SRM 1849a. Samples, standards, and controls were packaged individually in clean polyethylene bags and irradiated individually at 20 MW for 60 s. Nuclides were counted for 5 min after a 5 min decay, for 10 min following a 10 min decay, and for 20 min after a few hours decay.

Collaborating Laboratories' Analyses: The GMA FIACC collaborating laboratories and several other laboratories were asked to use their usual methods to make measurements on single test portions taken from each of two packets of SRM 1849a. The manufacturer of the material also provided data for several nutrients.

Homogeneity Assessment: The homogeneity of elements, fatty acids, cholesterol, and vitamins was assessed at NIST using the methods and test portion sizes described in this certificate (see "Instructions for Storage and Use"); analysis of variance at a 5 % significance level did not show statistically significant heterogeneity. All analytes have been treated as though they are homogeneously distributed in the material although the homogeneity of the other analytes was not assessed.

Value Assignment: The GMA FIACC collaborating laboratories reported the individual results for each of their analyses for a given analyte and the mean of each laboratory's results was determined. For calculation of assigned values, the median of the individual GMA FIACC collaborating laboratory means, the manufacturer's mean, Hong Kong Government Laboratory's mean, and the mean of the individual sets of NIST data were averaged, as appropriate based on available data.

Certified Mass Fraction Values for Fatty Acids as Free Fatty Acids: Each certified mass fraction value is the combined mean from the mean of NIST data, the mean of the material manufacturer's data, and the median of the mean results provided by collaborating laboratories, where available. The uncertainty provided with each value 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 incorporates the observed difference between the results from the methods and their respective uncertainties, consistent with the ISO/JCGM Guide and with its Supplement 1, and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [2-4]. The measurands are the mass fractions of selected fatty acids in nutritional formula as listed in Table 1. Metrological traceability is to the SI derived unit for mass fraction (expressed as grams per 100 grams).

Certified Mass Fraction Value for Cholesterol: The certified mass fraction for cholesterol is the mean of results obtained by NIST using ID-GC/MS. 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 $U = k u_c$, where u_c represents the combined uncertainty, consistent with the ISO/JCGM Guide [2], and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [2]. The uncertainty for cholesterol incorporates Type B uncertainties for purity of the reference compound, completeness of hydrolysis, stability of cholesterol in base, and the difference between the certification set of data and a confirming set of data using a different GC column and different ions. The measurand is the mass fraction of cholesterol in nutritional formula as listed in Table 1. Metrological traceability is to the SI derived unit for mass fraction (expressed as milligrams per gram).

Table 1. Certified Mass Fraction Values for Fatty Acids (as Free Fatty Acids) and Cholesterol in SRM 1849a

	Mass Fraction (g/100 g)	Coverage Factor, k
Octanoic Acid (C8:0) ^(a,b,c)	0.74 ± 0.14	2.00
Hexadecanoic Acid (C16:0) ^(a,b)	2.10 ± 0.15	2.00
(Z)-9-Hexadecenoic Acid (C16:1 n-7) ^(a,b)	0.0222 ± 0.0042	2.00
Octadecanoic Acid (C18:0) ^(a,b)	0.809 ± 0.046	2.00
(Z)-9-Octadecenoic Acid (C18:1 n-7) ^(a,b)	10.7 ± 1.1	2.00
(Z)-11-Octadecenoic Acid (C18:1 n-7) ^(a,b)	0.196 ± 0.023	2.00
(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic Acid (C18:2 n-6) ^(a,b,c)	5.72 ± 0.58	2.00
(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoic Acid (C18:3 n-3) ^(a,b,c)	0.591 ± 0.081	2.00
Eicosanoic Acid (C20:0) ^(a,b)	0.0822 ± 0.0061	2.00
(Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14-Eicosatetraenoic Acid (C20:4 n-6) ^(a,c)	0.123 ± 0.011	2.00
Docosanoic Acid (C22:0) ^(a,b)	0.0660 ± 0.0057	2.00
(Z,Z,Z,Z,Z)-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid (C22:6 n-3) ^(a,c)	0.0179 ± 0.0024	2.00
Tetracosanoic Acid (C24:0) ^(a,b)	0.0387 ± 0.0079	2.00
(Z)-15-Tetracosenoic Acid (C24:1 n-9) ^(a,b)	0.0202 ± 0.0022	2.00
Fat (as the sum of fatty acids as triglycerides) ^(a,b)	27.9 ± 2.2	2.00
Saturated Fatty Acids ^(a,b)	9.42 ± 0.63	2.00
Cis-Monounsaturated Fatty Acids ^(a,b)	11.1 ± 1.2	2.00
Cis-Polyunsaturated Fatty Acids ^(a,b)	6.07 ± 0.50	2.00
Omega-3 Fatty Acids ^(a,b)	0.568 ± 0.027	2.00
Omega-6 Fatty Acids ^(a,b)	5.55 ± 0.33	2.00
	Mass Fraction (mg/g)	
Cholesterol ^(d)	0.1374 ± 0.0029	2.00

^(a) NIST GC-FID

^(b) Collaborating laboratories

^(c) Manufacturer

^(d) NIST ID-GC-MS

SRM 1849a

Page 6 of 13

Certified Mass Fraction Values for Elements: Each certified mass fraction value is the combined mean from the mean of NIST data, the mean of the material manufacturer's data, and the median of the mean results provided by collaborating laboratories, where available. The uncertainty provided with each value 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 incorporates the observed difference between the results from the methods and their respective uncertainties, consistent with the ISO/JCGM Guide and with its Supplement 1, and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [2-4]. The measurands are the mass fractions of the elements in nutritional formula listed in Table 2. Metrological traceability is to the SI derived unit for mass fraction (expressed as milligrams per kilogram).

Table 2. Certified Mass Fraction Values for Elements in SRM 1849a

	Mass Fraction (mg/kg)	Coverage Factor, k
Calcium (Ca) ^(a,b,c)	5253 ± 51	2.00
Copper (Cu) ^(a,b,c)	19.78 ± 0.26	2.00
Chromium (Cr) ^(a,b,c,d)	1.072 ± 0.032	2.00
Iodine (I) ^(b,d,e)	1.29 ± 0.11	2.00
Iron (Fe) ^(a,b,c)	175.6 ± 2.9	2.00
Magnesium (Mg) ^(a,b,c)	1648 ± 36	2.00
Manganese (Mn) ^(a,b,c)	49.59 ± 0.97	2.00
Molybdenum (Mo) ^(a,b,c,d)	1.707 ± 0.040	2.00
Phosphorus (P) ^(a,b,c)	3990 ± 140	2.00
Potassium (K) ^(a,b,c)	9220 ± 110	2.00
Selenium (Se) ^(b,c,d)	0.812 ± 0.029	2.00
Sodium (Na) ^(a,b,c)	4265 ± 83	2.00
Zinc (Zn) ^(a,b,c)	151.0 ± 5.6	2.00

- ^(a) NIST ICP-OES
- ^(b) Collaborating laboratories
- ^(c) Manufacturer
- ^(d) NIST ICP-MS
- ^(e) NIST INAA

Certified Mass Fraction Values for Vitamins and Carnitine: Each certified mass fraction value is the combined mean from the mean of NIST data, the mean of the material manufacturer's data, and the median of the mean results provided by collaborating laboratories, where available. The uncertainty provided with each value 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 incorporates the observed difference between the results from the methods and their respective uncertainties, consistent with the ISO/JCGM Guide and with its Supplement 1, and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [2-4]. The measurands are the mass fractions of vitamins and carnitine in nutritional formula as listed in Table 3. Metrological traceability is to the SI derived unit for mass fraction (expressed as milligrams per kilogram).

Table 3. Certified Mass Fraction Values for Vitamins and Carnitine in SRM 1849a

	Mass Fraction (mg/kg)	Coverage Factor, k
Ascorbic Acid (Vitamin C) ^(a,b,c)	784 ± 65	2.00
Thiamine (Vitamin B ₁) ^(c,d,e)	12.57 ± 0.98	2.00
Riboflavin (Vitamin B ₂) ^(c,f)	20.37 ± 0.52	2.00
Niacinamide (Vitamin B ₃) ^(c,d)	108 ± 10	2.00
Pantothenic Acid (Vitamin B ₅) ^(c,d)	68.2 ± 1.9	2.00
Pyridoxine (Vitamin B ₆) ^(c,d,g)	13.46 ± 0.93	2.00
Folic Acid ^(b,c,h,i)	2.293 ± 0.062	2.00
Biotin ^(b,c,d)	1.99 ± 0.13	2.00
Choline Ion ^(b,c,d,i)	1090 ± 110	2.00
Carnitine ^(b,c,d)	136 ± 14	2.00
Retinol (Vitamin A) ^(b,c,d,i,k)	7.68 ± 0.23	2.00
Retinyl Palmitate (Vitamin A) ^(c,d,i)	14.30 ± 0.20	2.00
Cholecalciferol (Vitamin D ₃) ^(b,c,d,i)	0.111 ± 0.017	2.00
α-Tocopheryl Acetate (Vitamin E) ^(a,b,c,j)	158 ± 18	2.00
Total α-Tocopherol (Vitamin E) ^(b,i,l,m)	219 ± 16	2.00
Phylloquinone (Vitamin K ₁) ^(b,c,d,i)	1.06 ± 0.17	2.00

^(a) NIST LC-absorbance

^(b) Collaborating laboratories

^(c) Manufacturer

^(d) NIST ID-LC-MS

^(e) Vitamin B₁ is reported as thiamine ion (265.36 g/mol), not thiamine chloride or thiamine chloride hydrochloride.

^(f) NIST LC-MS

^(g) Vitamin B₆ is reported as pyridoxine (169.18 g/mol), not pyridoxine hydrochloride.

^(h) NIST ID-LC-MS/MS

⁽ⁱ⁾ Metrological traceability is established through the molar absorptivity of the compound.

^(j) Total choline, reported as the ion.

^(k) Retinol was added to SRM 1849a as retinyl palmitate. NIST measured retinyl palmitate and converted the mass fraction to retinol equivalents by multiplying by the ratio of the relative molecular masses of retinol and retinyl palmitate. The certified value is expressed as retinol equivalents, and represents total (*cis* + *trans*) retinol. No correction is made for differences in biological activity of the *cis* and *trans* forms.

^(l) NIST LC-fluorescence

^(m) α-Tocopherol was added to SRM 1849a as RRR-α-tocopheryl acetate. This certified value is expressed as α-tocopherol equivalents and includes "naturally occurring" α-tocopherol as well as the α-tocopheryl acetate that was added.

Reference Mass Fraction Values for Fatty Acids as Free Fatty Acids: Each reference mass fraction value is the combined mean from the mean of NIST GC-FID data and the median of the mean results provided by collaborating laboratories, where available. The uncertainty provided with each value 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 incorporates the observed difference between the results from the methods and their respective uncertainties, consistent with the ISO/JCGM Guide and Supplement, and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [2-4]. The measurands are the mass fractions of fatty acids in nutritional formula as determined by the methods indicated as listed in Table 4. Metrological traceability is to the SI derived unit for mass fraction (expressed as grams per 100 grams).

Table 4. Reference Mass Fraction Values for Fatty Acids as Free Fatty Acids in SRM 1849a

		Mass Fraction (g/100 g)	Coverage Factor, k
Hexanoic Acid (C6:0) ^(a)	Caproic Acid	0.0625 ± 0.0099	2.13
Decanoic Acid (C10:0) ^(a,b)	Capric Acid	0.57 ± 0.14	2.00
Dodecanoic Acid (C12:0) ^(b)	Lauric Acid	3.99 ± 0.28	2.45
Tetradecanoic Acid (C14:0) ^(b)	Myristic Acid	1.476 ± 0.075	2.45
Heptadecanoic Acid (C17:0) ^(a)	Margaric Acid	0.0140 ± 0.0021	2.14
Total Trans C18:1 Fatty Acids ^(a)		0.0242 ± 0.0050	2.20
(Z,E)-9,12-Octadecadienoic Acid (C18:2) ^(a)		0.0205 ± 0.0032	2.57
(E,Z)-9,12-Octadecadienoic Acid (C18:2) ^(a)		0.0186 ± 0.0029	2.57
(Z,Z,Z)-6,9,12-Octadecatrienoic Acid (C18:3 n-6) ^(a)		0.0300 ± 0.0020	2.57
(Z)-11-Eicosenoic Acid (C20:1 n-9) ^(a,b)	Gondoic Acid	0.069 ± 0.017	2.00
Total Trans Fatty Acids ^(a)		0.085 ± 0.022	2.14

^(a) Collaborating laboratories

^(b) NIST GC-FID

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 $U = k u_c$, 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,h,v)	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.

Reference Mass Fraction Values for Vitamins, *myo*-Inositol, and Chlorine: Each reference mass fraction value is the combined mean from the mean of NIST data, the mean of the material manufacturer's data, the mean of the results from Hong Kong Government Laboratory, or the median of the mean results provided by collaborating laboratories, where available. The expanded uncertainty is calculated as $U = ku_c$, where u_c represents the combined uncertainty, consistent with the ISO/JCGM Guide [2-4], and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence. 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 vitamins, *myo*-inositol, and chlorine in nutritional formula determined by the methods indicated, as listed in Table 6. Metrological traceability is to the SI derived unit for mass fraction (expressed as milligrams per kilogram).

Table 6. Reference Mass Fraction Values for Vitamins, *myo*-Inositol, and Chlorine in SRM 1849a

	Mass Fraction (mg/kg)	Coverage Factor, k
5-Methyltetrahydrofolate ^(a,b)	0.0839 ± 0.0031	2.12
Vitamin B ₁₂ ^(c,d)	0.0482 ± 0.0085	2.00
Free α -Tocopherol ^(b,e)	89.2 ± 1.9	2.09
<i>myo</i> -Inositol ^(d,f)	405.2 ± 7.6	2.00
Chlorine (Cl) ^(f,g)	7010 ± 170	2.00

^(a) NIST ID-LC-MS/MS

^(b) Metrological traceability is established through the molar absorptivity of the compound

^(c) Collaborating laboratories

^(d) Manufacturer

^(e) NIST LC-fluorescence

^(f) Hong Kong Government Laboratory

^(g) NIST INAA

Reference Mass Fraction Values for Amino Acids and Taurine: Each reference mass fraction value is the combined mean from the mean of the material manufacturer's data 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 $U = k u_c$, 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]. The measurands are the mass fractions of amino acids and taurine in nutritional formula as determined by the methods indicated as listed in Table 7. Metrological traceability is to the SI derived unit for mass fraction (expressed as grams per 100 grams).

Table 7. Reference Mass Fraction Values for Amino Acids and Taurine in SRM 1849a

	Mass Fraction (g/100 g)	Coverage Factor, k
Alanine ^(a)	0.455 ± 0.021	2.31
Arginine ^(a)	0.400 ± 0.029	2.31
Aspartic Acid ^(a)	1.070 ± 0.057	2.31
Cystine ^(a,b)	0.1286 ± 0.0071	2.00
Glutamic Acid ^(a)	2.59 ± 0.27	2.31
Glycine ^(a)	0.241 ± 0.019	2.31
Histidine ^(a)	0.315 ± 0.036	2.31
Isoleucine ^(a)	0.660 ± 0.071	2.31
Leucine ^(a)	1.261 ± 0.050	2.31
Lysine ^(a)	1.010 ± 0.071	2.31
Phenylalanine ^(a)	0.580 ± 0.021	2.31
Proline ^(a)	1.195 ± 0.086	2.31
Serine ^(a)	0.720 ± 0.030	2.31
Taurine ^(a,b)	0.0366 ± 0.0018	2.00
Threonine ^(a)	0.640 ± 0.022	2.31
Tryptophan ^(a)	0.184 ± 0.010	2.45
Tyrosine ^(a)	0.510 ± 0.043	2.31
Valine ^(a)	0.76 ± 0.11	2.31

^(a) Collaborating laboratories
^(b) Manufacturer

Reference Mass Fraction Values for Nucleotides: Each reference mass fraction value is the median of the mean results provided by collaborating laboratories. 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 $U = k u_c$, where u_c represents the combined uncertainty, consistent with the ISO/JCGM Guide [2], and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence. The measurands are the mass fractions of nucleotides in nutritional formula as determined by the method used by the collaborating laboratories. Metrological traceability is to the SI derived unit for mass fraction (expressed as milligrams per kilogram).

Table 8. Reference Mass Fraction Values for Nucleotides in SRM 1849a

	Mass Fraction (mg/kg)	Coverage Factor, k
Adenosine Monophosphate	105.1 ± 5.3	2.57
Cytidine Monophosphate	268 ± 29	2.57
Guanosine Monophosphate	146 ± 11	2.57
Uridine Monophosphate	129 ± 15	2.57

Information Mass Fraction Values for Other Measurands: Each information mass fraction value is the mean of approximately 30 measurements provided by the manufacturer.

Table 9. Information Mass Fraction Values for Other Measurands in SRM 1849a

	Mass Fraction (mg/kg)
Free Choline Ion	798
Adenosine Monophosphate + Adenosine ^(a)	108
Cytidine Monophosphate + Cytidine ^(a)	317
Guanosine Monophosphate + Guanosine ^(a)	146
Uridine Monophosphate + Uridine ^(a)	155

^(a) The mass fraction value represents the sum of the nucleotide and the nucleoside calculated as the nucleotide.

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/tm1297/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.; Duewer, 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 -tocopherol 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 E

R-018



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 SAI Global Certificate Number CERT - 0064970

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	D119	Quality Test / Release Date	4/24/2014
Lot Number	142809		
Description	N,N-DIMETHYLFORMAMIDE, ACS		
Country of Origin	Slovakia	* Suggested Retest Date	Apr-2019
Chemical Origin	Organic - synthetic		
BSE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	CLEAR, COLORLESS LIQUID
ASSAY	%	>= 99.8	99.9
COLOR	APHA	<= 15	5
DENSITY AT 25 DEGREES C	GM/ML	Inclusive Between 0.942 - 0.946	0.944
EVAPORATION RESIDUE	%	<= 0.005	<0.001
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
TITRATABLE ACID	mEq/g	<= 0.0005	0.0003
TITRATABLE BASE	mEq/g	<= 0.003	<0.0003
WATER (H2O)	%	<= 0.15	<0.02



Edgar E. Hase

Lab Manager BPF

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



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 SAI Global Certificate Number CERT - 0064970

This is to certify that units of the lot number below 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/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	P285	Quality Test / Release Date	10/22/2014
Lot Number	145585		
Description	POTASSIUM PHOSPHATE MONOBASIC, CERTIFIED ACS		
Country of Origin	India	* Suggested Retest Date	Oct-2019
Chemical Origin	Inorganic		
BSE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	COLORLESS CRYSTALS
ASSAY	%	>= 99.0	100.2
CHLORIDE	%	<= 0.001	<0.0010
HEAVY METALS (as Pb)	%	<= 0.001	<0.0010
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
INSOLUBLE MATTER	%	<= 0.01	<0.010
IRON (Fe)	%	<= 0.002	<0.0020
LOSS ON DRYING @ 105 C	%	<= 0.2	0.00
PH 5% SOLUTION @ 25 DEG C		Inclusive Between 4.1 - 4.5	4.3
SODIUM (Na)	%	<= 0.005	<0.005
SULFATE (SO4)	%	<= 0.003	<0.0030



Edgar E. Hane
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) 227-8701.
*Based on suggested storage condition.



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

Certificate of Analysis

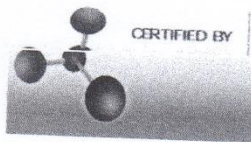
R-035

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/FP/CP/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 DMFs with the FDA. The following are the actual analytical results obtained:

Catalog Number	S209	Mfg. Date	1/6/2012
Lot Number	116727		
Description	SODIUM ACETATE, TRIHYDRATE, A.C.S		
Country of Origin	India	Recommended Retest Date	Jan-2017
Chemical Origin	Organic - non animal		
BSE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	COLORLESS CRYSTALS
ASSAY	%	Inclusive Between 99.0 101.0	99.8
CALCIUM	%	<= 0.005	0.0004
CHLORIDE	%	<= 0.001	<0.0010
HEAVY METALS (as Pb)	ppm	<= 5	<5.0
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
INSOLUBLE MATTER	%	<= 0.005	0.0030
IRON (Fe)	ppm	<= 5	<5.0
MAGNESIUM	%	<= 0.002	<0.0001
PH 5% SOLN @ 25 DEG C		Inclusive Between 7.5 9.2	8.5
PHOSPHATE (PO4)	ppm	<= 5	<5.0
POTASSIUM (K)	%	<= 0.005	0.0029
SUBSTANCES REDUCING KMNO4	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
SULFATE (SO4)	%	<= 0.002	<0.0020



Edgar E. Hane
Lab Manager Fair Lawn

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



Certificate of Analysis

1.06649.1000 Sodium sulfate anhydrous for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Batch AM0742049

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (alkalimetric)	≥ 99.0	%	100.2	%
Assay (alkalimetric, calculated on dried substance)	98.5 - 101.0	%	100.3	%
Identity	passes test		passes test	
Appearance of solution	passes test		passes test	
Insoluble matter	≤ 0.01	%	≤ 0.01	%
Acidity or alkalinity	passes test		passes test	
pH-value (5 %; water; 25 °C)	5.2 - 8.0		5.9	
Chloride (Cl)	≤ 0.001	%	≤ 0.001	%
Phosphate (PO ₄)	≤ 0.001	%	≤ 0.001	%
Total nitrogen (N)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
As (Arsenic)	≤ 0.0001	%	≤ 0.0001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.005	%	≤ 0.005	%
Fe (Iron)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
K (Potassium)	≤ 0.002	%	≤ 0.002	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.001	%	≤ 0.001	%
Loss on drying (130 °C)	≤ 0.5	%	≤ 0.5	%
Loss on ignition (800 °C)	≤ 0.5	%	≤ 0.5	%

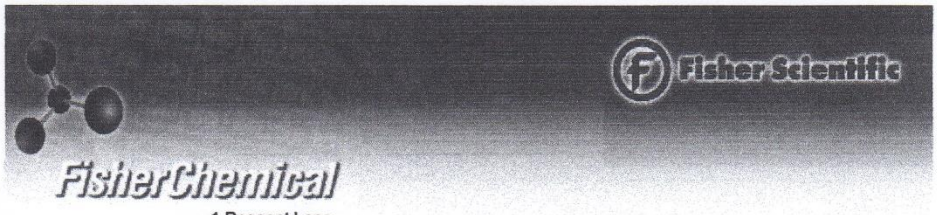
Corresponds to ACS, ISO, Reag. Ph Eur

Date of release (DD.MM.YYYY) 23.10.2014
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 30.09.2019

Dr. Matthias Ohm
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

R-057



1 Reagent Lane
 Fairlawn, NJ 07410
 201.796.7100 tel
 201.796.1329 fax

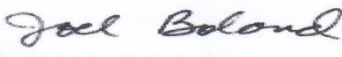
Certificate of Analysis

Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System Standard ISO9001:2000 standard by DNV Certificate number CERT-08052-2003-AQ-HOU-RAB

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	D119	Mfg. Date	3/7/2012
Lot Number	061048	Exp. Date	Jul/2017
Description N,N-DIMETHYLFORMAMIDE, ACS			
Country of Origin	United States		

Result name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	CLEAR, COLORLESS LIQUID
ASSAY	%	>= 99.8	99.9
COLOR	APHA	<= 15	5
DENSITY AT 25 DEGREES C	GM/ML	Inclusive between 0.942 0.946	0.944
EVAPORATION RESIDUE	%	<= 0.005	<0.001
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
TITRATABLE ACID	mEq/g	<= 0.0005	0.0003
TITRATABLE BASE	mEq/g	<= 0.003	<0.0006
WATER (H2O)	%	<= 0.15	<0.02

CERTIFIED BY 
 Lab Manager BPF

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.



Certificate of Analysis

1.00317.2500 Hydrochloric acid fuming 37% for analysis EMSURE® ACS,ISO,
 Reag. Ph Eur
 Batch K46497817

	Spec. Values		Batch Values	
	37.0 - 38.0	%	38.0	%
Assay (acidimetric)	passes test		passes test	
Identity	passes test		passes test	
Colour	≤ 10	Hazen	< 10	Hazen
Appearance	passes test		passes test	
Appearance of solution	passes test		passes test	
Bromide (Br)	≤ 50	ppm	20	ppm
Free chlorine (Cl)	≤ 0.4	ppm	< 0.4	ppm
Phosphate (PO ₄)	≤ 0.5	ppm	< 0.1	ppm
Sulphate (SO ₄)	≤ 0.5	ppm	< 0.5	ppm
Sulfite (SO ₃)	≤ 0.5	ppm	< 0.5	ppm
Heavy metals (as Pb)	≤ 1	ppm	< 1	ppm
Ag (Silver)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Al (Aluminium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
As (Arsenic)	≤ 0.010	ppm	< 0.010	ppm
Au (Gold)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
B (Boron)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Ba (Barium)	≤ 0.010	ppm	< 0.010	ppm
Be (Beryllium)	≤ 0.010	ppm	< 0.010	ppm
Bi (Bismuth)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Ca (Calcium)	≤ 0.300	ppm	< 0.100	ppm
Cd (Cadmium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Co (Cobalt)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Cr (Chromium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Cu (Copper)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Fe (Iron)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Ga (Gallium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Ge (Germanium)	≤ 0.020	ppm	< 0.020	ppm
Hg (Mercury)	≤ 0.010	ppm	< 0.010	ppm
K (Potassium)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Li (Lithium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Mg (Magnesium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Mn (Manganese)	≤ 0.010	ppm	< 0.010	ppm
Mo (Molybdenum)	≤ 0.010	ppm	< 0.010	ppm
NH ₄ (Ammonium)	≤ 1	ppm	< 1	ppm
Na (Sodium)	≤ 0.300	ppm	0.020	ppm
Ni (Nickel)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Pb (Lead)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Pt (Platinum)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Sn (Tin)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Sr (Strontium)	≤ 0.010	ppm	< 0.010	ppm
Ti (Titanium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm



660 Tower Lane • P. O. Box 599 • West Chester, PA 19381-0599
1-800-452-9994 • 1-610-692-3026 • Fax 1-610-692-8729
info@chemservice.com • www.chemservice.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Vitamin B2

CATALOG NUMBER N-V9-1G
LOT NUMBER 3961200
DATE CERTIFIED 01/26/15
EXPIRATION DATE 01/31/22
CAS NUMBER 83-88-5
MOLECULAR FORMULA C₁₇H₂₀N₄O₆
MOLECULAR WEIGHT 376.37
STORAGE Store in a cool dry place.
HANDLING See MSDS.
INTENDED USE For laboratory use only.
ISO GUIDE 34 CERTIFIED []

Analytical Test	Value
% PURITY (HPLC)	99.5

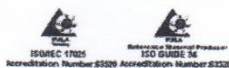
Certified By:

Mary Beth O'Donnell

Mary Beth O'Donnell
CSM/TC

COA Form
Revision 3 (3/2015)

Chem Service, Inc. is accredited to ISO 9001:2008, ISO/IEC 17025:2005 and certified to ISO 9001:2008



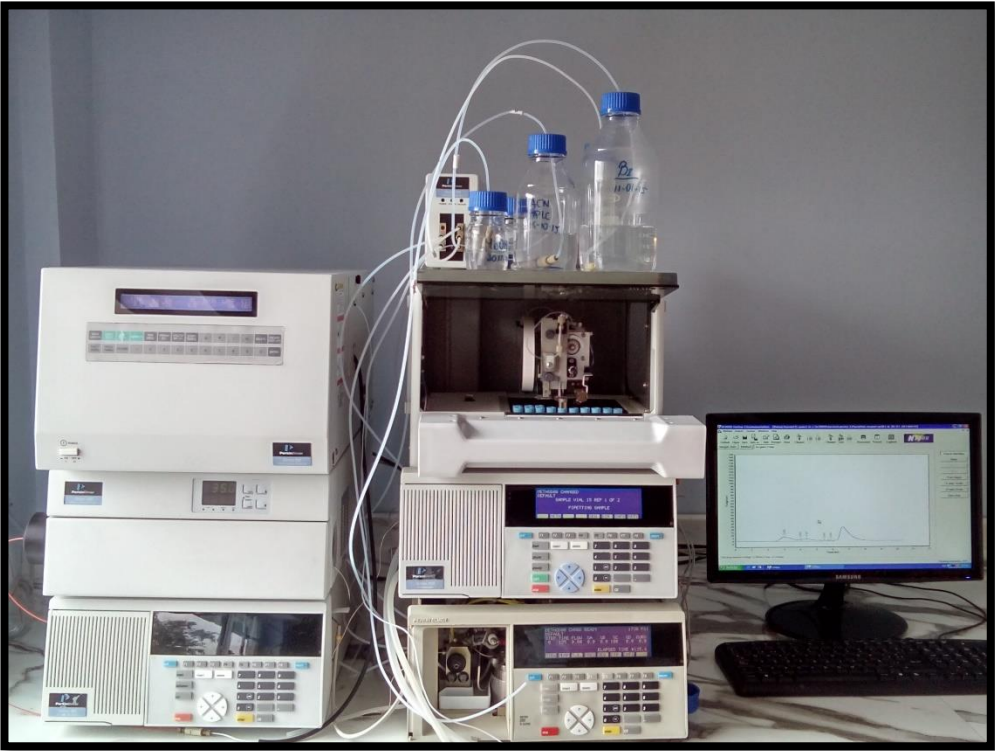
ANEXO F

COLUMNA C18-HPLC



BAÑO DE AGUA - MUESTRAS

BALANZA ANALÍTICA



HPLC-ECUACHEMLAB

ANEXO G

ECUACHEMLAB Cía. Ltda. Laboratorio Químico y Microbiológico del Ecuador		
PROCEDIMIENTO DE ANALISIS	Edición:	01
	Documento:	PA-FQ-202
	Página:	1 de 4
DETERMINACION DE VITAMINA B2 (Riboflavina) METODO CROMATOGRAFICO HPLC		

1. OBJETIVO:

Establecer las directrices necesarias para realizar la determinación de Vitamina B2 (Riboflavina) en alimentos por cromatografía HPLC.

2. ALCANCE

Es aplicable a todos los alimentos de:

- Cereales y derivados

3. PRINCIPIO

Consiste en la extracción de la Riboflavina de la muestra por medio la hidrolisis ácida y precipitación de enzimas, para luego ser leído por HPLC, principio activo que es detectado por el espectroflorímetro, Excitación 450 nm y Emisión 528 nm.

4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- 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.
- Homogenizar la muestra mediante agitación en el propio envase.
- Durante la oxidación se debe utilizar materiales ámbar o de color marrón.

5. EQUIPOS

- Balanza Analítica EAFQ - 009
- Licuadora EFQ - 017
- HPLC EAFQ – 022
- Ultrasonido EAFQ - 003
- Pipeta automática EAFQ-006
- Erlenmeyer de 125 ml
- Balones aforados de 500 y 50 ml
- Baño de agua EAFQ- 001
- Columna C18 250 x 150 mm, 5µm
- Filtro
- Papel filtro
- Viales para HPLC
- Micro filtro poro 0,45 µm

6. REACTIVOS

- Agua desmineralizada
- Alfa-amilasa
- Papaína
- Ácido Clorhídrico 1N
- Acetato de Sodio 2,5 M

7. MATERIALES DE REFERENCIA

- Estándar de Riboflavina

8. NORMAS DE SEGURIDAD Y VERIFICACIÓN DE LOS EQUIPOS

- Verificar que la balanza se encuentre calibrada, limpia y en perfectas condiciones.
- Verificar que el HPLC se encuentre en las condiciones adecuadas antes de proceder con el ensayo.

9. PROCEDIMIENTO

11.1 PREPARACIÓN DEL ESTANDAR:

- Pesar alrededor de 25 mg de estándar de riboflavina en un balón volumétrico de 500 ml, añadir 50 µl de ácido acético glacial y disolver con agua desmineralizada.
- Ultrasonar por 10 minutos o hasta disolución de la muestra, sacar y enfriar después llevar a volumen con agua desmineralizada.
- Tomar una alícuota de 5 ml a un balón aforado de 50 ml y aforar con agua desmineraliza.

11.3 PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN:

- De la solución anterior preparar 5 estándares acorde a la siguiente tabla:

Estándar de Riboflavina	Alícuota (ml)	Concentración (ug/ml)
1	1,0	0,1
2	2,5	0,25
3	5,0	0,50
4	7,5	0,75
5	10,0	1,0

- Las alícuotas anteriores, aforar en balones volumétricos de 50 ml con agua desmineralizada, ultrasonar durante 5 minutos, microfiltrar y colocar en viales.

11.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

- Pesar alrededor de 0,5 - 1 g de muestra en un erlenmeyer de 125 ml
- Adicionar 0.2 g de alfa-amilasa, 0.25 g de papaína y 15 ml de agua destilada a 45-50°C, mezclar bien para tener una suspensión homogénea.
- Tapar el erlenmeyer y colocarlo durante 30 minutos en un baño termostático a 45-50°C
- Añadir 15 ml de agua destilada entre 45-50°C y 2.5 ml de HCl 1N
- Calentar por 30 minutos a baño maría hirviendo agitando ocasionalmente para evitar formación de grumos.
- Pasado el tiempo dejar enfriar y añadir 2.5 ml de acetato de sodio 2.5 M.
- Mezclar bien y transferir cuantitativamente a un balón aforado de 50 ml, y aforar con agua destilada.
- Filtrar por papel filtro normal
- Microfiltrar e inyectar en los viales.

11.3 CONDICIONES CROMATOGRAFICAS:

Columna:	C-18
Temperatura:	40°C
Fase Móvil:	Solución de fosfato dibásico de potasio 10mM-N, N Dimetilformamida (70:30)
Flujo:	0.7 ml/min
Detección:	Espectrofluorímetro, Excitación 450 nm y Emisión 528 nm
Volumen de Inyección:	10 µl

10. CALCULO Y REPORTE DE RESULTADOS

Calcular los mg de Riboflavina por 100 g, en la hoja de cálculo respectivo.

Del análisis se reporta los resultados como mg/100 g, en el Registro de Resultados Área Físico Químico R-03-4.1, en la Orden de Trabajo correspondiente.

11. CRITERIO DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

- La determinación se hace con una sola medida, se asegura el resultado mediante el programa de aseguramiento de resultados, y se aplicarán los criterios para cada prueba.

12. INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

Tres primeros niveles establecidos:

Incertidumbre Combinada: +/-0,04 (mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra)

Incertidumbre Expandida: +/-0,08 (mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra).

Para el cuarto nivel:

Incertidumbre Combinada de +/-0,05 (mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra).

Incertidumbre Expandida igual a +/-0,09 (mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra).

13. REFERENCIAS

- Métodos Oficiales AOAC 2012, Edición 19
- Instructivo de manejo del HPLC IA-FQ-15
- Instructivo de manejo de la balanza IA-FQ-09
- Instructivo de Identificación y Codificación de Documentos IG-01-4.3
- Instructivo de Identificación y Codificación de Muestras IG-03-5.8
- Instructivo de Transporte, Manipulación, Recepción, Protección, y Disposición de las muestras IG-01-5.8.
- Informe de Resultados Área Físico Químico R-03-4.1
- Instructivo de Almacenamiento y Eliminación de Muestras IG-03-5.8

ANEXO H

Características del equipo utilizado y certificado de instalación.



CERTIFICADO DE INSTALACION No. 0003402015

FECHA ACTIVIDAD		
26	06	2015

FECHA EMISION		
30	07	2015

DATOS PERSONALES		DATOS DEL CLIENTE	
NOMBRE DE LA EMPRESA		NOMBRE DE LA EMPRESA	
BLADIMIR ACOSTA EQUIPOS Y REACTIVOS		ECUACHEMLAB CIA LTDA	
RESPONSABLE DEL TRABAJO		RESPONSABLE	Quím. Alim Tania Bastidas
Ramiro Aguirre/ Bladimir Acosta		AREA DE TRABAJO	FISICOQUIMICO
RUC	1713597845001	RUC	1792599512001
DIRECCION	Pintag Barrio San Isidro Sincholagua S/N	DIRECCION	Pasaje S/N N3-62 y Simón Bolívar
TEEFONO	2592898 / 0999441402	TELEFONO	026007470
E-MAIL	bladyacosta@gmail.com	E-MAIL	ecuachemlab@gmail.com

DESCRIPCION GENERICA			
EQUIPO	BOMBA	No DE SERIE	291N7102801
MARCA	PERKIN ELMER	TEMP. AMBIENTE	25°C
MODELO	SERIE 200	HUMEDAD AMBIENTE	45%

DESCRIPCION DE ACTIVIDADES	
<ul style="list-style-type: none"> • Verificación de operación del Display y LED • Verificación de límites de presión • Verificación de flujo • Purga de líneas • Verificación de cañería completa 	

MEDICIONES EFECTUADAS

DISPLAY / LED

PARAMETROS	APROBADO	NO APROBADO
LED	x	
DISPLAY	x	

PRUEBA DE PRESION

PARAMETROS	APROBADO	NO APROBADO
P.MIN 200psi	x	
P.MAX	x	

MEDICIONES EFECTUADAS

PRUEBA DE FLUJO

PARAMETROS	VOLUMEN mL	PASA	NO PASA
Flujo 1	10.0		
Flujo 2	10.0		
Flujo 3	10.0		
Flujo 4	10.0		
Flujo 5	10.0		
Flujo Promedio	10.0	x	

DESCRIPCION GENERICA

EQUIPO	DETECTOR FLUORESCENCIA	No DE SERIE	1512-012
MARCA	PERKIN ELMER	TEMP. AMBIENTE	25°C
MODELO	SERIE 200	HUMEDAD AMBIENTE	45%

DESCRIPCION DE ACTIVIDADES

- Limpieza interior y exterior del equipo.
- Verificación de operación del Display y LED

MEDICIONES EFECTUADAS

DISPLAY/LED

PARAMETROS	APROBADO	NO APROBADO
LED	x	
DISPLAY	x	

DESCRIPCION GENERICA

EQUIPO	DETECTOR UV VIS	No DE SERIE	292N3090507
MARCA	PERKIN ELMER	TEMP. AMBIENTE	22°C
MODELO	SERIE 200	HUMEDAD AMBIENTE	45%

DESCRIPCION DE ACTIVIDADES

- Limpieza interior y exterior del equipo.
- Verificación de operación del Display y LED

MEDICIONES EFECTUADAS

DISPLAY/ LED

PARAMETROS	APROBADO	NO APROBADO
LED	x	
DISPLAY	x	

ENERGIA DE LAMPARAS

PARAMETROS	ENERGIA	APROBADO	NO APROBADO
Energía de lámpara D2	220	x	
Energía de lámpara W	540	x	

DESCRIPCION GENERAL

EQUIPO	AUTOMUESTREADOR	No DE SERIE	293N4090704
MARCA	PERKIN ELMER	TEMP. AMBIENTE	25°C
MODELO	SERIE 200	HUMEDAD AMBIENTE	45%

DESCRIPCION DE ACTIVIDADES

- Limpieza interior y exterior del equipo.
- Verificación de operación del Display y LED
- Verificación de posicionamiento de la aguja de inyección
- Verificación de flush

MEDICIONES EFECTUADAS

DISPLAY / LED

PARAMETROS	APROBADO	NO APROBADO
LED	x	
DISPLAY	x	

SENSOR DE POSICION

PARAMETROS	POSICION #	MENSAJE ERROR	APROBADO	NO APROBADO
Vial	5		x	
Vial	43		x	
Vial	75		x	
Vial	100		x	

DESCRIPCION GENERAL

EQUIPO	HORNO DE COLUMNA	No DE SERIE	OVI020615786
MARCA	PERKIN ELMER	TEMP. AMBIENTE	25°C
MODELO	SERIE 200	HUMEDAD AMBIENTE	45%

DESCRIPCION DE ACTIVIDADES

- Limpieza interior y exterior del equipo.
- Verificación de operación del Display y LED
- Verificación de funcionamiento de temperatura

MEDICIONES EFECTUADAS

DISPLAY / LED

PARAMETROS	APROBADO	NO APROBADO
LED	x	
DISPLAY	x	

DESCRIPCION GENERICA

EQUIPO	DESGASIFICADOR	No DE SERIE	8255
MARCA	PERKIN ELMER	TEMP. AMBIENTE	25°C
MODELO	SERIE 200	HUMEDAD AMBIENTE	45%

DESCRIPCION DE ACTIVIDADES

- Limpieza interior y exterior del equipo.
- Verificación de operación del Display y LED
- Verificación de líneas
- Instalación de buzos
- Verificación de burbujas

MEDICIONES EFECTUADAS

LINEAS

PARAMETROS	APROBADO	NO APROBADO
LINEA 1	x	
LINEA 2	x	
LINEA 3	x	
LINEA 4	x	

SISTEMA HPLC

PRUEBA DE DESEMPEÑO DEL SISTEMA

Procedimiento.

1. Realizar 5 ó 6 inyecciones de un estándar o una muestra.
2. Tomar los valores de áreas y realizar estadísticos: media, desviación estándar y coeficiente de variación.

Muestra: Humectante

Dato	Área	Tiempo Retención	Cromatograma
1	339755,781	3,055	Humectantes220620150001
2	344983,406	3,052	Humectantes220620150002
3	341233,750	3,050	Humectantes220620150003
4	347341,500	3,053	Humectantes220620150004
5	346508,781	3,050	Humectantes220620150005
Media	343964,644	3,052	
Desvest	3319,864	0,002	
CV	0,965	0,070	

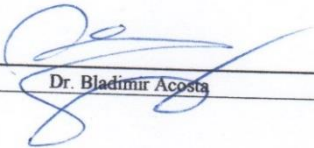
PARAMETROS	PASA	NO PASA
SDR <5%	X	

INSTALACION

Una vez realizadas la pruebas descritas, el equipo se encuentra en correcto funcionamiento se recomienda una limpieza adecuada del equipo.

Nota: Los resultados emitidos están relacionados con el equipo arriba descrito, el certificado no puede ser reproducido en su totalidad salvo autorización del cliente.

NOMBRE Y FIRMA DE LA EMPRESA


Dr. Bladimir Acosta

ANEXO I

Certificado de calibración de la Balanza

		CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN <small>Ciudadela Guayaquil, calle 1era m2 21 solar 10 Guayaquil - Ecuador Pbx: 04-2282007 Fax: ext. 403 http://www.eticrom.com mail: veritas@eticrom.com</small>								
		CERTIFICADO NÚMERO	1859-09-15							
IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE										
EMPRESA: ECUACHEMILAB LABORATORIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL ECUADOR CIA. LTDA.										
DIRECCIÓN: PASAJE S/N N3-62 Y SIMÓN BOLÍVAR, ARMENIA 1										
TELÉFONO: 3614718										
IDENTIFICACIÓN DEL EQUIPO										
EQUIPO: BALANZA ANALÍTICA		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): I ESPECIAL		UBICACIÓN: LABORATORIO FÍSICO QUÍMICO								
PATRÓN/EQUIPO(S) UTILIZADO (S)										
CÓDIGO	NOMBRE	MARCA	CLASE	SERIE	FECHA CAL.	FECHA PROB. 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	TERMOMÉTRICO	TAYLOR	1523	NO ESPECÍFICA	14-jul-15	14-ene-16				
CALIBRACIÓN										
PROCEDIMIENTO: PEC-EL.01		CONDICIONES AMBIENTALES: Temperatura máxima °C		21,1		Temperatura mínima °C				
MÉTODO EMPLEADO: COMPARACIÓN DIRECTA CON PESAS PATRÓN						21,1				
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	0,100001	1,000011	50,000010	109,999961	149,999970	169,999968	189,999985	215,000000	220,000138
Incert. Patrón	0,000004	0,0000050	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:	Coef. de Sensibilidad	Incertidumbre Gramos (g)							
Repetibilidad	T de Students	1	0,0000837							
Resolución	Rectangular	1	0,000289							
Excentricidad	Conv. rect-trian.	1	0,0000601							
Linealidad	Gausiana	1	0,0001715							
Histéresis	Gausiana	1	0,0000000							
Deriva de los instrumentos	Rectangular	1	0,0000719							
Efecto de convección	Rectangular	1	0,0000299							
Peso Patrón/Densidad del aire	Gausiana	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							
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 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 solamente al equipo arriba descrito al momento del ensayo.										
CALIBRACIÓN REALIZADA POR: Marlon Mulloz										

Certificado de calibración del Baño Termoregulador

	CERTIFICADO DE CARACTERIZACIÓN Ciudadela Guayaquil, calle 1era mz 21 solar 10 Guayaquil - Ecuador Pbr: 04-2282007 Fax: ext. 403 http://www.eligrom.com mail: ventas@eligrom.com	 Acreditación N° OAE LE C 10-910 LABORATORIO DE ENSAYOS
	CERTIFICADO No: 1858-05-15	

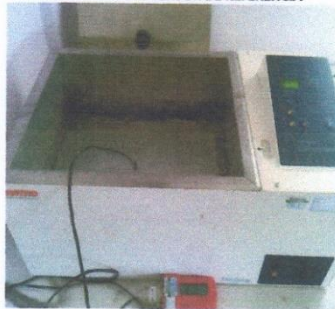
IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE	
EMPRESA:	ECUACHEMLAB LABORATORIO QUIMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL ECUADOR CIA. LTDA.
DIRECCIÓN:	PASAJE SIN NS-62 Y SIMON BOLIVAR, ARMENA 1
TELÉFONO:	3814718

IDENTIFICACIÓN DEL EQUIPO	
EQUIPO:	BAÑO MARIA
MARCA:	THERMO SCIENTIFIC
MODELO/TIPO:	2885
SERIE:	204440
CÓDIGO CLIENTE:	EAFQ-001
UNIDAD DE MEDIDA:	°C
RESOLUCIÓN:	0,1
UBICACIÓN DEL EQUIPO:	LABORATORIO FISICO QUIMICO
LUGAR DE CARACTERIZACIÓN:	LABORATORIO FISICO QUIMICO

PATRONES UTILIZADOS						
CODIGO	NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	FECHA CAL.	PROX. CAL.
EL_PT.158	TERMOMETRO DIGITAL	ELPRO	ECOLOG TN2	91849	24-jun-15	24-jun-16
EL_PT.037	TERMOHGRÓMETRO	TAYLOR	1523	NO ESPECIFICA	14-jul-15	14-ene-16

CARACTERIZACIÓN		
MÉTODO: COMPARACIÓN MEDIANTE SENSORES PATRÓN DE TEMPERATURA		
PROCEDIMIENTO: PEC.EL.08		
CONDICIONES AMBIENTALES:	23,5 °C	47,0 %HR
DESCRIPCIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN.- Se programa el registro automático de un sensor de temperatura (Datalogger) ubicado en el centro geométrico del espacio de trabajo, en intervalos de un minuto durante un mínimo de 30 minutos. Las lecturas son tomadas luego de que el equipo ha alcanzado la estabilidad en el valor de temperatura programado. Los datos se almacenan en el Datalogger y posteriormente son descargados y analizados en una computadora.		
Ubicación del sensor:	ZONA UTIL DE LA CAMARA	

UBICACIÓN DEL SENSOR DE REFERENCIA

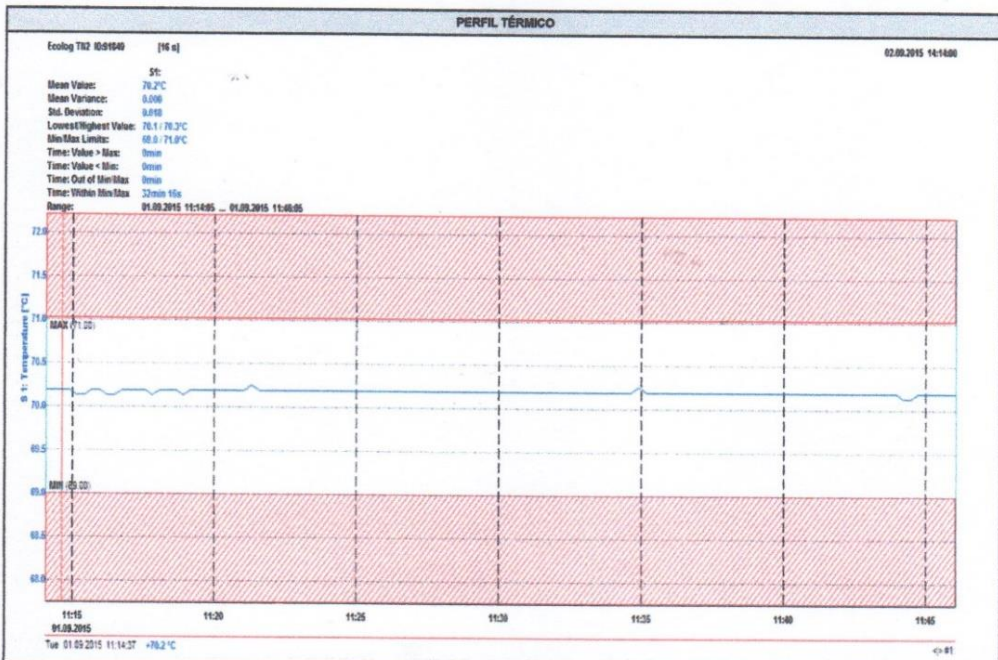


Indicación de temperatura durante el ensayo. Lecturas en el indicador del equipo bajo prueba

minutos	valor
0	70,0
5	70,0
10	70,0
15	70,0
20	70,0
25	70,0
30	70,0



	CERTIFICADO DE CARACTERIZACIÓN		
	Ciudadela Guayaquil, calle 1era mz 21 solar 10 Guayaquil - Ecuador Pbx 04-2263007 Fax: ext. 403 http://www.ellicrom.com mail: ventas@ellicrom.com		
CERTIFICADO No:		1859-05-15	Acreditación N° OAE LE C 10-010 LABORATORIO DE ENSAYOS




Valor programado en el Controlador del equipo bajo prueba (set point)	Tolerancia del Equipo (por el cliente) (±)	Temperatura media en el sensor de referencia	Temperatura media en el indicador del equipo bajo prueba	Corrección de la indicación	Estabilidad (En el tiempo)	Incertidumbre de medición
°C	°C	°C	°C	°C	°C	°C
70	1	70,3	70,0	0,3	0,1	0,16

OBSERVACIONES:

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 $(Vef = \infty)$ 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 Ellicrom Calibración. El presente certificado se refiere solamente al equipo arriba descrito al momento del ensayo. Los resultados indicados son válidos únicamente para la ubicación del sensor de referencia y abarca un cubo espacial de 5cm de arista de dicha ubicación. Las demás partes del volumen de la cámara no se considera caracterizada. La temperatura del aire en el lugar de medición se obtiene sumando la temperatura del indicador de la cámara más la corrección de la indicación.



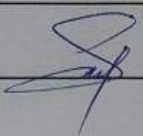
CARACTERIZACIÓN REALIZADA POR: Juan Carlos Alava

FECHA REALIZACIÓN: 01-sep-15 FECHA PROXIMA: oct-16


 AUTORIZADO POR: Ing. Sabino Pineda
 GERENTE TÉCNICO

RECIBIDO POR:
 RESPONSABLE - CLIENTE

Certificado de calibración de la Pipeta Automática

	CERTIFICADO 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		 Servicio de Acreditación Ecuatoriano Acreditación N° OAE LC C-10-009 LABORATORIO DE CALIBRACIÓN																								
	CERTIFICADO No: 0513-03-16																										
IDENTIFICACION DEL CLIENTE																											
EMPRESA:	ECUACHEMLAB LABORATORIO QUIMICO Y MICROBIOLOGICO DEL ECUADOR CIA. LTDA.																										
DIRECCION:	PICHINCHA / QUITO / S/N Km S/N S/N PASAJE S/N N3-62 Y SIMON BOLIVAR																										
TELEFONO:	3614718 / 6007470																										
IDENTIFICACIÓN DEL EQUIPO																											
EQUIPO:	PIPETA DE PISTON	CÓDIGO ASIGNADO:	NO ESPECIFICA																								
MARCA:	OXFORD	RESOLUCIÓN / SUBDIVISIONES:	0.01																								
MODELO / TIPO:	TIPO A	UNIDAD DE MEDIDA:	ml																								
SERIE:	A86008011	CAPACIDAD / RANGO:	(1 a 10) ml																								
CÓDIGO:	EAFQ-019	UBICACIÓN:	NO ESPECIFICA																								
PATRONES UTILIZADOS																											
CODIGO	NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	FECHA CAL.	PROX. CAL																					
EL.PT.091	TERMOMETRO DIGITAL	ATM	ST-0215A	NO ESPECIFICA	02-sep-15	02-sep-16																					
EL.ET. 013	BALANZA ANALITICA	SARTORIUS	CPA225D	26309068	05-may-15	05-may-16																					
EL.PT.054	BAROMETRO	CONTROL COMPANY	1081	140380202	02-jun-14	02-jun-16																					
EL.PT.361	TERMOHIGROMETRO	CENTER	342	140103646	06-abr-15	06-abr-16																					
CALIBRACIÓN																											
MÉTODO:	GRAVIMÉTRICO																										
PROCEDIMIENTO:	PEC EL.25																										
LUGAR DE CALIBRACIÓN:	LABORATORIO ELICROM																										
TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIA (°C):	23.4																										
HUMEDAD RELATIVA MEDIA (%HR)	41.6																										
PRESIÓN ATMOSFÉRICA MEDIA (hPa)	1007																										
ERROR MAX PERMITIDO	± 0.12																										
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Set Point ml</th> <th>Lectura ml</th> <th>Error (E) ml</th> <th>Incertidumbre (U) ml</th> <th> E + U ml</th> <th>Exactitud</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>1.020</td> <td>0.020</td> <td>0.0054</td> <td>0.0254</td> <td>Cumple</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>5.043</td> <td>0.043</td> <td>0.0056</td> <td>0.0486</td> <td>Cumple</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>10.102</td> <td>0.102</td> <td>0.0012</td> <td>0.1032</td> <td>Cumple</td> </tr> </tbody> </table>		Set Point ml	Lectura ml	Error (E) ml	Incertidumbre (U) ml	E + U ml	Exactitud	1	1.020	0.020	0.0054	0.0254	Cumple	5	5.043	0.043	0.0056	0.0486	Cumple	10	10.102	0.102	0.0012	0.1032	Cumple	Temp. de Referencia (°C) 20.0	
Set Point ml	Lectura ml	Error (E) ml	Incertidumbre (U) ml	E + U ml	Exactitud																						
1	1.020	0.020	0.0054	0.0254	Cumple																						
5	5.043	0.043	0.0056	0.0486	Cumple																						
10	10.102	0.102	0.0012	0.1032	Cumple																						
Nota: Promedio de 10 mediciones por cada punto																											
DECLARACIÓN DE CUMPLIMIENTO																											
El equipo cumple con los errores máximos permitidos según el requisito 7.2 - Tabla 1 de la ISO 8655-2 2002 para pipetas de pistón para los valores de 1 ml, 5 ml y 10 ml.																											
OBSERVACIONES																											
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 t (de Student) con $V_{eff} = \infty$ (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. Para la declaración de cumplimiento se toma en cuenta la suma de los valores absolutos del error y la incertidumbre.																											
CALIBRACIÓN REALIZADA POR:		Ronald Arias																									
FECHA CALIBRACIÓN		2016-03-16																									
AUTORIZADO POR:				RECIBIDO POR:																							
GERENTE TECNICO				RESPONSABLE - CLIENTE <i>Tania B</i>																							