



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



“Validación del método para la determinación de vitamina C (ácido ascórbico) en alimentos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en el Laboratorio ECUACHEMLAB CÍA. LTDA”.

Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad experiencia práctica de investigación y/o intervención, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autora: Sofia Lizeth Aguirre Arias

Tutor: Ing. Mg. Manolo Alexander Córdova Suárez

Ambato - Ecuador

Septiembre-2017

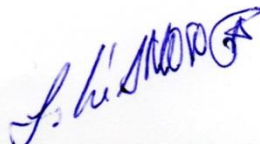
APROBACIÓN DEL TUTOR

Ing. Mg. Manolo Alexander Córdova Suárez

CERTIFICA:

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

Ambato, 6 julio 2017



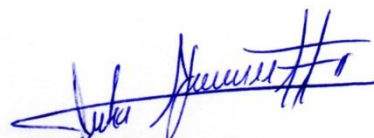
Ing. Mg. Manolo Alexander Córdova Suárez

C.I. 180284250-8

Tutor

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Sofía Lizeth Aguirre Arias, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Srta. Sofía Lizeth Aguirre Arias

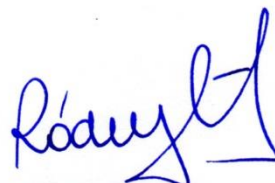
C.I. 1723610935

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

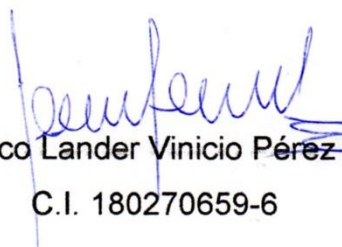


Presidente del Tribunal



PhD. Orestes Darío López Hernández

C.I. 175478486-4



Químico Lander Vinicio Pérez Aldás

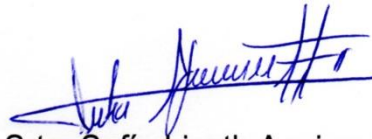
C.I. 180270659-6

Ambato, 7 agosto 2017

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato para que haga de este proyecto de experiencias prácticas de Investigación y/o Intervención o parte de el, 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 λ , con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Srta. Sofia Lizeth Aguirre Arias

C.I. 1723610935

AUTORA

DEDICATORIA

A mi hija;
Mia Paz
&
A mi Abuelo;
Cipriano

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio Ecuachemlab Cia. Ltda. Y a todo su personal incluyendo al doctor Bladimir Acosta Gerente general por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y colaborar con todas las actividades ofertadas al servicio al cliente. De manera especial a la doctora Sandra Morales y a la Química de Alimentos Tania Bastidas por el apoyo brindado durante la consecución de este trabajo y sobre todo por su amistad.

A mis padres por ese apoyo incondicional durante toda mi vida estudiantil y personal y a mis hermanos por ser ejemplo de superación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
EL PROBLEMA.....	3
1.1. Tema	3
1.2. Justificación	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. General.....	4
1.3.2. Específicos	5
CAPÍTULO II.....	6
MARCO TEÓRICO	6
2.1. Antecedentes investigativos.....	6
2.1.1. Validación de Métodos.....	6
2.1.2. Método para la determinación de Ácido Ascórbico	8
2.1.3. Importancia de las vitaminas.....	9
2.2. Hipótesis	11
2.2.1. Hipótesis Nula.....	11
2.2.2. Hipótesis Alternativa	11
2.2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis	11

Variable Independiente	12
Variable Dependiente	12
CAPÍTULO III.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Materiales	13
3.1.1 Equipos.....	13
3.1.2. Reactivos	13
3.2. Metodología	14
3.2.1. Preparación de Reactivos.....	14
3.2.2. Preparación de la curva de calibración.....	15
3.2.2.1. Preparación del estándar	15
3.2.2.2. Preparación de los Estándares.....	15
3.2.3. Preparación de la muestra.....	15
3.2.4. Condiciones cromatográficas	16
3.2.5. Obtención del Cromatograma.....	16
3.3. Validación del método	20
3.4. Parámetros de Validación.....	20
3.4.1. Linealidad.....	21
3.4.2. Límite de Detección (LD)	23
3.4.3. Límite de cuantificación (LC):	24
3.4.4. Rango de trabajo	25
3.4.5. Precisión.....	26
3.4.5.1. Repetibilidad.....	26
3.4.5.2. Reproducibilidad.....	27
3.4.6. Tratamiento estadístico	28
3.4.7. Exactitud.....	28
3.4.8. Incertidumbre.....	29
CAPÍTULO IV	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4. Obtención de los Datos Primarios	32
4.1. Niveles.....	32

4.1.1.	Primer Nivel (MR-25)	32
4.1.2.	Segundo Nivel (MR- 20)	33
4.1.3.	Tercer Nivel (MR-16)	34
4.1.4.	Cuarto Nivel (MR-10).....	35
4.2.	Linealidad	36
4.3.	Límites	42
4.3.1.	Detección (LD).....	42
4.3.2.	Cuantificación (LC)	43
4.4.	Rango de Trabajo.....	44
4.5.	Precisión.....	44
4.6.	Tratamiento Estadístico	48
4.7.	Análisis de Exactitud.....	50
4.8.	Análisis de Incertidumbre	51
4.8.1.	Especificación	52
4.8.2.	Identificación de las fuentes de Incertidumbre	52
4.8.3.	Cuantificación y combinación.....	53
4.8.4.	Cálculo de Incertidumbre Tipo B.....	54
4.8.5.	Cálculo de Incertidumbre tipo A.....	55
4.8.6.	Incertidumbre típica combinada de la preparación de estándares (μSTD)	56
4.8.7.	Cálculo de la incertidumbre combinada del método	57
4.8.8.	Cálculo de la Incertidumbre Expandida del método.....	57
4.9.	Criterios de Aceptación de la validación:	57
	CAPÍTULO V	59
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	59
5.1.	Conclusiones	59
5.2.	Recomendaciones.....	60
	Bibliografía.....	60
	ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Puntos de Medición.....	15
Tabla 2 Puntos de medición para la validación.....	20
Tabla 3 Modelo para la estimación de la linealidad	22
Tabla 4. Modelo para el análisis de varianza (ANOVA) aplicado a cada nivel de concentración.....	26
Tabla 5. Datos Primarios MR-25. Día 1	32
Tabla 6. Datos Primarios MR-25. Día 2	33
Tabla 7. Datos Primarios MR-20. Día 1	33
Tabla 8. Datos Primarios MR-20. Día 2	34
Tabla 9. Datos Primarios MR-16. Día 1	34
Tabla 10. Datos Primarios MR-16. Día 2	35
Tabla 11. Datos Primarios MR-10. Día 1	35
Tabla 12. Datos Primarios MR-10. Día 2	36
Tabla 13. Datos de las curvas de calibración para la concentración de ácido de ascórbico.....	36
Tabla 14. Estimación Lineal de las curvas en forma integrada.....	39
Tabla 15. Límites de la curva de calibración global integrada	41
Tabla 16. Estándar preparados.....	43
Tabla 17. Resumen de las concentraciones de Ácido ascórbico por nivel ..	45
Tabla 18. Concentraciones a evaluar de Ácido ascórbico. Nivel 1	45
Tabla 19. Resumen del coeficiente de variación y desviaciones estándar de cada nivel de concentración de ácido ascórbico.....	47
Tabla 20. Análisis de Varianza ANOVA. Nivel 1	48
Tabla 21. Análisis de Varianza ANOVA. Nivel 2	49
Tabla 22. Análisis de varianza ANOVA. Nivel 3.....	49

Tabla 23. Análisis de varianza ANOVA. Nivel 4.....	49
Tabla 24. Resumen del Análisis de Varianza ANOVA	50
Tabla 25. Datos del % de Recuperación de Estándar en el nivel bajo.....	51
Tabla 26. Identificación de las fuentes de Incertidumbre	52
Tabla 27. Incertidumbres de los equipos de medición utilizados	55
Tabla 28. Incertidumbres Tipo A.....	56
Tabla 29. Incertidumbre típica combinada de la Curva de Calibración	56
Tabla 30. Parámetros varios incluyentes para el cálculo de la incertidumbre	57
Tabla 31. Criterios de validación.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1 Flujograma del Proceso.....	19
Figura. 2 Etapas para la estimación de la incertidumbre	29
Figura. 3 Curva de calibración. Día 1.....	37
Figura. 4 Curva de calibración. Día 2.....	37
Figura. 5 Curva de Calibración. Día 3.....	38
Figura. 6 Curva de Calibración. Día 4.....	38
Figura. 7 Curva de Calibración. Día 5.....	39
Figura. 8 Ecuación global de las curvas de calibración integradas para la determinación de ácido ascórbico.....	40
Figura. 9 Límites de la curva de calibración global integrada	42
Figura. 10 Diagrama general Causa-Efecto (espina de pescado) para el cálculo de la incertidumbre combinada del método	54

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A.....	65
ANEXO B.....	80
ANEXO C.....	86
ANEXO D.....	92
ANEXO E.....	95
ANEXO F.....	100
ANEXO G.....	105
ANEXO H.....	109

RESUMEN

La validación de un método es un requisito importante para garantizar que los laboratorios de ensayo emitan resultados confiables y reproducibles. La validación se realizó empleando la metodología descrita por la AOAC 967.21 complementada con la metodología de (Ledezma - Gairaud, 2004), bajo norma ISO/IEC 17025. El método desarrollado produce una respuesta lineal con un coeficiente de correlación $r=0,999$ para cada curva de calibración, el LD igual a 0,0002 mg/ml y el LC igual a 0,007 mg/ml. El rango de trabajo comprende valores de 0,007 mg/ml hasta 0,1448 mg/ml para la concentración de ácido ascórbico que va desde 7,25 mg hasta 142,73 mg de vitamina C por cada 100 g de muestra. El coeficiente de variación fue menor al 2% para repetibilidad y reproducibilidad. El % de recuperabilidad se encontró en el rango establecido para HPLC con un valor igual al 99,32 %. Los límites de repetibilidad y reproducibilidad con valores de 2,16 mg/100g y 2,61 mg/100g de ácido ascórbico respectivamente. La incertidumbre combinada del método para todos los niveles de concentración empleadas con un valor igual a $\pm 0,95$ y la incertidumbre expandida con un valor igual a $\pm 1,91$ expresado en unidades de mg de vitamina C por cada 100 g de muestra; se empleó como criterio de aceptación que el valor de la incertidumbre sea menor al 30% del rango bajo dando como resultado para la incertidumbre encontrada 26,31% cumpliendo de este modo con el objetivo de validación planteado.

Palabras claves: Vitamina C (ácido ascórbico), Análisis cuantitativo, Cromatografía Líquida de alta eficacia, Laboratorio, Ecuachemlab Cia. Ltda.

ABSTRACT

Validation of a method is an important requirement to ensure reliable and reproducible results from test laboratories. Validation was performed using the methodology described by AOAC 967.21, supplemented with the methodology (Ledezma - Gairaud, 2004), under ISO / IEC 17025. The developed method produces a linear response with a correlation coefficient $r = 0.999$ for each curve Calibration, LD equal to 0.0002 mg / ml and LC equal to 0.007 mg / ml. The working range comprises values from 0.007 mg / ml to 0.1448 mg / ml for the concentration of ascorbic acid ranging from 7.25 mg to 142.73 mg of vitamin C per 100 g of sample. The coefficient of variation was less than 2% for repeatability and reproducibility. The% recoverability was found in the range established for HPLC with a value equal to 99.32%. The limits of repeatability and reproducibility with values of 2.16 mg / 100 g and 2.61 mg / 100 g of ascorbic acid, respectively. The combined uncertainty of the method for all concentration levels employed with a value equal to ± 0.95 and the expanded uncertainty with a value equal to ± 1.91 expressed in units of mg of vitamin C per 100 g shows; It was used as an acceptance criterion that the value of the uncertainty is less than 30% of the low range resulting in the uncertainty found 26.31%, thus fulfilling the objective of validation.

Keywords: Vitamin C (ascorbic acid), Quantitative Analysis, High Performance Liquid Chromatography, Laboratory, Ecuachemlab Cia. Ltda.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los laboratorios de ensayo no sólo se ocupan de analizar si un producto cumple o no con sus requisitos de calidad mediante la utilización de métodos analíticos establecidos para cada uno de ellos, sino también se esfuerzan para validar cada método analítico utilizado en el control de la calidad de los productos **(Diaz, y otros, 1998)**. Es así que el Laboratorio Ecuachemlab Cia. Ltda pretende desarrollar metodologías que cumplan con las especificaciones de normativas tanto nacionales como internacionales en todas las áreas de análisis.

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 (Muñoz, 2009). El resultado de la validación es probar la aptitud de los métodos, documentar su validez y cumplir con los estándares de calidad (Muñoz, 2009)

La cromatografía a través de la separación de componentes de una mezcla permite que estos sean detectados (Swadesh, 2000). La técnica de cromatografía de gases se emplea con más frecuencia para la determinación de vitaminas utilizando columnas de sílice en fase normal y en fase reversa columnas C18 (Sierra, Rojas, Cuadra, Sisa, & Castro, 2007)

La vitamina C es esencial para el correcto funcionamiento del cuerpo humano debido a que es importante para la síntesis de colágeno **(FAO, 1998)**, es uno de los agentes antioxidantes más fuertes **(Cameron, 1979)**, entre otros beneficios, además su deficiencia produce escorbuto. Dicha vitamina al no ser producida de forma natural por el cuerpo humano es necesario consumirla dentro de la dieta diaria **(Jane Higdon, 2006)** o en suplementos vitamínicos. Las frutas, verduras y sus derivados son las mejores fuentes de vitamina C. El valor diario de ingesta de esta vitamina varía según la edad y va desde los 40mg hasta los 120 mg, esto según lo reportado por el National Institutes of Health.

La detección de vitamina C se realiza mediante espectrometría de absorción molecular ultravioleta/visible que resulta, generalmente, de la excitación de los electrones de enlace; como consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies objeto de estudio **(Skoog, Holler, & Nieman, 2001)**.

El presente trabajo tiene como finalidad validar una metodología que permita la cuantificación de Ácido Ascórbico (Vitamina C) en alimentos procesados o en materias primas en el Laboratorio Ecuachemlab Cía Ltda. El proceso de validación descrito en el presente trabajo se compone de los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud e incertidumbre

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema

Validación del método para la determinación de Vitamina C (Ácido Ascórbico) en Alimentos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en el Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda.

1.2. Justificación

El Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE) basados en la norma NTE INEN ISO/IEC 17025:2006 se encarga de verificar que los laboratorios de calibración y ensayo cumplan con esta norma para garantizar de esta forma que los resultados emitidos sean fiables y confiables mediante la validación de los métodos sean estos estandarizados o desarrollados dentro del laboratorio.

Ecuachemlab Cía. Ltda. es un laboratorio que brinda servicio de análisis en el campo alimenticio, farmacéutico, veterinario entre otros y que a través de la acreditación busca emitir resultados de alta calidad a sus clientes mediante métodos analíticos previamente validados bajo la norma NTE INEN ISO/IEC 17025:2006 y conseguir de esta forma que los resultados entregados a ellos cumplan con la normativa exigida por los organismos reguladores en el Ecuador.

Un método debe validarse cuando se lo va aplicar a diferentes laboratorios, instrumentación y operadores (**Eurachem, 2005**), para demostrar de este modo que se puede reproducir a las nuevas condiciones y circunstancias establecidas, se debe realizar esto aun cuando se usan métodos aparentemente bien caracterizados ya sean de referencia o publicados

(Eurachem, 2005).

Respondiendo a las necesidades de las industrias del Ecuador el laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda, coloca dentro de su alcance de acreditación la validación del método para la cuantificación de vitamina C por el método HPLC en alimentos basándose en modificaciones realizadas al método **(AOAC, 2005)** y complementadas con la investigación realizada por **(Ledezma - Gairaud, 2004)**. Razón por la cual se lleva a cabo el siguiente trabajo.

Se toman los mencionados métodos ya complementados debido a que estos ya se encuentran probados y validados en dos laboratorios de ensayo en el país, por esta razón se busca probar que estos métodos funcionen cumpliendo con la modalidad de trabajo del Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda.

Las vitaminas son un grupo de alimentos que forman parte de la dieta diaria que se ingieren para poder completar la cantidad requerida por el organismo o en el caso de la Vitamina C (Ácido Ascórbico) que es necesario consumirla porque el organismo no lo produce de forma autónoma, para poder cuantificar esta vitamina en los alimentos se ha visto necesario desarrollar, implementar y validar una metodología para la determinación de la misma mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Validar el método para la determinación de Vitamina C (Ácido Ascórbico) en Alimentos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en el Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda.

1.3.2. Específicos

Determinar Vitamina C (Ácido Ascórbico) en alimentos por HPLC mediante modificaciones realizadas al método **(AOAC, 2005)** y complementadas con el método realizado por **(Ledezma - Gairaud, 2004)**.

Estimar la Incertidumbre de los resultados y los parámetros de validación del método.

- Precisión
- Exactitud y
- Linealidad

Implementar el procedimiento para la determinación de Vitamina C (Ácido Ascórbico) por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

2.1.1. Validación de Métodos

En la actualidad los laboratorios de ensayo tienen como finalidad analizar si un producto cumple o no con sus requisitos de calidad empleando métodos analíticos establecidos para cada uno de ellos, sino también enfatizan su esfuerzo en la validación de estos métodos analíticos utilizado en el control de la calidad de los productos **(Diaz, y otros, 1998)**.

La validación de un método analítico se basa en la determinación de una serie de parámetros que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan **(Printing, 1990)**. Para la elaboración de un nuevo producto es necesario la utilización de métodos analíticos que permitan cuantificar el producto en forma de materia prima o como principio activo de la formulación con un alto grado de confiabilidad **(Rampazoo, 1990)**.

La validación de un método es un requisito importante en la práctica del análisis químico. En el proceso de validación del método está supuesto que los estudios desarrollados para determinar los parámetros de desempeño se realicen empleando equipos dentro de especificaciones, que estén trabajando correctamente y que estén calibrados adecuadamente. Asimismo, el técnico que realiza las pruebas debe ser competente en el área de trabajo en estudio y tener conocimiento suficiente sobre aquello que realiza y encontrarse capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio **(Eurachem, 2005)**. El proceso de validación permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados al aplicarlo **(AEFI, 2001)**.

Para la validación de métodos analíticos se tiene en cuenta los siguientes parámetros.

Límite de detección

Se define como la concentración menor del analito que puede detectarse con un grado especificado de certeza aplicando un determinado método de análisis (Muñoz, 2009).

Límite de cuantificación

Es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión, de repetibilidad y veracidad (Muñoz, 2009).

Rango de trabajo

Es el rango de concentraciones en el cual el método da resultados proporcionales a la concentración. El extremo superior de este rango de concentración es el valor hasta donde llega la respuesta lineal de la ecuación de regresión (Muñoz, 2009).

Exactitud

La exactitud expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero. La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados.

Normalmente, la exactitud se estudia en dos componentes: la “veracidad” y la “precisión”.

Veracidad

Es el grado de coincidencia entre el valor obtenido de una concentración o cantidad medida y el valor real de la misma. La veracidad se constituye en una medida de error sistemático (Muñoz, 2009)

Precisión

Se define en términos simples como el grado de concordancia mutua entre los datos que se han obtenido de una misma forma. La precisión constituye una medida de error aleatorio (Muñoz, 2009).

2.1.2. Método para la determinación de Ácido Ascórbico

Existen diversos métodos y técnicas que nos permiten cuantificar a las vitaminas, la cromatografía líquida es una de ellas ya que representa una de las herramientas más empleadas en los laboratorios analíticos, debido a que permite el análisis de una gran variedad de moléculas de alto peso molecular, elevado punto de ebullición y termolábiles, propiedades que son de restricción para el uso de la cromatografía gaseosa (Froescheis, y otros, 2001).

Los métodos cromatográficos que hasta hoy se conocen están limitados porque la vitamina C se presenta naturalmente, en muchos alimentos, como AA (ácido L-ascórbico) y DHAA (ácido deshidroascórbico) y a menos que el DHAA sea convertido a AA, los resultados obtenidos pueden ser bajos cuando se analiza solo la forma reducida (Ledezma - Gairaud, 2004).

La HPLC con detección de absorción de radiación ultravioleta y visible tienen una gran aplicación en identificación y determinación de una enorme cantidad de especies inorgánicas y orgánicas. Los métodos de absorción molecular ultravioleta/visible probablemente sean más utilizados de entre todas las técnicas de análisis cuantitativo en los laboratorios de ensayo en el mundo (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

La detección de vitamina C se realiza mediante espectrometría de absorción molecular ultravioleta/visible, donde la absorción de radiación ultravioleta o visible resulta, generalmente, de la excitación de los electrones de enlace; como consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies objeto de estudio. La espectroscopia de absorción molecular es, por tanto, válida para identificar grupos funcionales en una molécula, sin embargo, son las aplicaciones de la espectroscopia de absorción ultravioleta y visible en la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes **(Skoog, Holler, & Nieman, 2001)**.

El método consiste en la extracción del ácido ascórbico (AA) con reactivos y condiciones que eviten al máximo su deterioro. Esto se logra utilizando una disolución extractora de ácido metafosfórico y ácido acético **(Ledezma - Gairaud, 2004)**.

2.1.3. Importancia de las vitaminas

Dentro de los procesos metabólicos que componen la nutrición de los seres vivos las vitaminas son sustancias orgánicas trascendentales (Querelles, 2015) No aportan energía, puesto que no se utilizan como combustible, pero sin ellas el organismo no es capaz de aprovechar los elementos constructivos y energéticos suministrados por la alimentación **(Picó, Garcinuño Martínez, Marcillo Ortega, & Vázquez Segura, 2013)**.

La vitamina C, o ácido ascórbico, es un compuesto hidrosoluble de 6 átomos de carbono relacionado con la glucosa. Su papel biológico principal parece ser el de actuar como cofactor en diversas reacciones enzimáticas que tienen lugar en el organismo. El ácido ascórbico actúa como coenzima de las hidroxilasas de prolina y lisina, encargadas de hidroxilar la lisina y prolina en el protocógeno, modificación necesaria para que éste pueda formar los enlaces cruzados para formar las fibrillas de colágeno **(Ciancaglini, 2001)**.

El ácido ascórbico tiene como finalidad fortalecer el sistema inmunitario ya que combate a los agentes virales **(Hernández, Pérez, & Castro, 2009)**. Además, es un valioso agente antioxidante que aumenta la producción de colágeno extracelular, importante para el funcionamiento adecuado de las células inmunitarias **(Cameron, 1979) (Hoffman, 1985)**.

La vitamina C o ácido ascórbico es un nutriente esencial para la mayoría de mamíferos y en algunas especies de pájaros y algunos peces **(Mayores, 2011)**. El hombre en especial carece de la enzima que cataliza la etapa terminal de la síntesis de ácido ascórbico, la gulonolactona oxidasa, por lo que debe adquirirlo a través de la alimentación **(Jane Higdon, 2006)**, siendo esta la razón por la que en el hombre y en otras especies el ácido ascórbico adquiere el carácter de vitamina.

La vitamina C es necesaria para la síntesis de colágeno, un importante componente estructural de los vasos sanguíneos, tendones, ligamentos, y huesos. La vitamina C, también desempeña un papel importante en la síntesis de los neurotransmisores, la norepinefrina. Los neurotransmisores son fundamentales para la función cerebral y se sabe que afectan el estado de ánimo. Además, la vitamina C es necesaria para la síntesis de carnitina, una pequeña molécula que es esencial para el transporte de grasa a orgánulos celulares llamados mitocondrias, para la conversión a energía **(FAO, 1998)**.

Otra de las funciones del AA, es la fijación de oxígeno, cuando los alimentos se embotellan o se enlatan estos contienen oxígeno, que podría reaccionar con varias moléculas del alimento, provocando rancidez, pérdida de color, entre otras características; al agregar AA, este se fija o elimina el oxígeno **(Gutiérrez, Hoyos, & Páez, 2007)**.

Además, la fijación de radicales libres y control del pardeamiento **(Roig, Rivera, & Kennedy, 1998)**, hacen que esta vitamina sea uno de los aditivos más empleados en la industrial de los alimentos.

El AA, es conocido como una vitamina termolábil; varios autores (**Johnson & Braddock, 1995**) (**Vieira & Teixeira, 2000**) han estudiado la cinética de degradación térmica en jugos y frutas naturales, bajo diferentes condiciones de tratamiento; por ejemplo, la oxidación del AA al ácido dehidroascórbico y dicetogulónico, hace que se pierda la actividad vitamínica, razón por la cual, el seguimiento de la variación en la concentración del AA en alimentos, es relevante para establecer los mecanismos que afectan su estabilidad y por tanto influyen en el tiempo de vida útil de los mismos.

La estructura de la vitamina C se ve afectada por una serie de factores como: la humedad, la luz, el aire, el calor, los iones metálicos como hierro y cobre, el oxígeno y el medio alcalino. Tras su descomposición bajo estas condiciones se transforma fácilmente en diferentes compuestos como son: el ácido oxálico, ácido L-treónico, ácido L-xilónico, ácido L-lixónico y ácido dehidroascórbico, y a su vez este último se transforma irreversiblemente en ácido 2.3 diceto-L glucónico, el cual constituye su principal producto de degradación (**Hernández, Pérez, & Castro, 2009**).

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis Nula

El método de determinación de vitamina C (Ácido Ascórbico) cumple con los objetivos de validación como indicativo de calidad del método.

2.2.2. Hipótesis Alternativa

El método de determinación de vitamina C (Ácido Ascórbico) no cumple con los objetivos de validación como indicativo de calidad del método.

2.2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

Variable Independiente

Método por cromatografía líquida de alta eficacia HPLC

Variable Dependiente

Cuantificación de vitamina C (Ácido Ascórbico) en alimentos

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

- Columna para HPLC C18 (25 x 4) mm 5 µm MERCK LiChroC ART
- Pipetas automáticas de 1 y 10 ml (Oxford, USA)
- Viales (Agilent ZORBAX, USA) para HPLC
- Micro filtro poro 0,45 µm (Amp ®)
- Balones de aforo 25, 50, 200 y 500 ml
- Embudos
- Papel filtro
- Pipetas volumétricas
- Piseta

3.1.1 Equipos

- HPLC (PerkinElmer serie 200, USA)
- Software de análisis certificado versión N2000 (Chromatography Data System. SURWIT TECHNOLOGY INC. Hangzhou-China).
- Detección UV/Visible (PerkinElmer serie 200, USA)
- Equipo de Sistema de purificación de agua MILLI Q-SYSTHESES Milipore SAS67120 MOISHEI (Merck, USA)
- Balanza analítica (Mettler Toledo modelo AX 05, México)
- pH- metro (HACH, modelo Sesión 3)
- Ultrasonido (Spectrum, USA)

3.1.2. Reactivos

- Fosfato mono básico de potasio (KH₂PO₄), (LOBA Chemia, India)
- Ácido Metafosfórico (LOBA Chemia, India)

- Ácido acético glacial concentrado (Merck, Alemania)
- Agua grado I
- Estándar de Vitamina C (ácido ascórbico), (CHEM SERVICE INC, USA).

3.2. Metodología

La metodología que se empleó para la consecución del trabajo experimental es el Método **(AOAC, 2005)** modificado, Método UV/Visible por HPLC **(Ledezma - Gairaud, 2004)**

3.2.1. Preparación de Reactivos

Preparación de la fase móvil (KH₂PO₄ 0,1M; Agua proporción 90:10)

Para la preparación de la solución KH₂PO₄ 0,1M se diluyeron 6,8 g de fosfato monobásico de potasio en 300ml de agua desmineralizada, seguidamente se colocó en el ultrasonido (Spectrum, USA) por un tiempo de 10 minutos o hasta disolución total. La solución fue retirada y a temperatura ambiente se llevó a volumen final de 500 ml y ajustar el pH a 2,5 con ácido fosfórico concentrado. La fase móvil se preparó mezclando 450 ml de la solución KH₂PO₄ con 50 ml de agua desmineralizada en un frasco de tapa azul. Se llevó al ultrasonido por 10 minutos para desgasificar.

Preparación de la solución extractora

La solución extractora es una mezcla de ácido acético glacial y ácido metafosfórico. En un balón aforado de 200 ml, se agregaron 40 ml de ácido acético glacial y se llevó a volumen con agua desmineralizada. En un vaso de precipitados se pesó 15 g de ácido metafosfórico y diluyó con los 200 ml de la solución de ácido acético glacial, se ultrasonó hasta dilución total. Se retiró y a temperatura ambiente se llevó a volumen final de 500 ml con agua desmineralizada.

3.2.2. Preparación de la curva de calibración

3.2.2.1. Preparación del estándar

En la balanza analítica (Metler Toledo, México) se pesó 25,4 mg de estándar de ácido ascórbico en un balón aforado de 50 ml; se añadió 25 ml de solución extractora y se llevó a ultrasonido por 5 minutos hasta disolución total. Se llevó a volumen final con solución extractora cuando estuvo a temperatura ambiente. Con esta solución se prepararon las cinco curvas de calibración en condiciones de reproducibilidad.

3.2.2.2. Preparación de los Estándares

A partir de la solución estándar de ácido ascórbico se tomaron 6 alícuotas de 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 y se aforaron en balones de 25 ml con solución extractora. Se colocaron al ultrasonido por 5 minutos para posterior microfiltración en viales para finalmente ser leídas en el HPLC.

3.2.3. Preparación de la muestra

Los códigos de identificación de los puntos de medición empleadas (muestras de referencia) se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Puntos de Medición

Codificación	Muestras/ MR
MR-10	Bio C
MR- 16	Cerelac
MR- 20	Pulp (néctar de durazno)
MR- 23	Pulpa de sandía

Nota: Identificación de los puntos de medición
ECUACHEMLAB, (2017)

Los puntos de medición se trataron de la siguiente manera:

En balones aforados de 50 ml limpios y secos, se pesó MR-10 0,1 g; de MR-16 y MR-20 2 g y de MR-23 3 g, a estos balones se les añadió 25 ml de solución extractora y se llevó al ultrasonido por 10 minutos. Se retiró y dejó enfriar para posteriormente completar el volumen. Se filtró primeramente en papel y seguido en microfiltros de poro 0,45 μm para finalmente el filtrado colocar en viales e inyectar en el HPLC.

3.2.4. Condiciones cromatográficas

Se colocó la columna (MERCK LiChroC ART) dentro del termostato del HPLC (PerkinElmer, USA) previo configurado a una temperatura de 30°C, verificando que la dirección del flujo sea de derecha a izquierda. Posterior se acondicionó el equipo y la columna bombeando fase móvil, antes preparada, a un flujo de 0,2 ml/min por 1 hora y a 1ml/min por 15 minutos más. Se detectaron cada una de las muestras a través del detector UV/visible (PerkinElmer, USA) a una longitud de onda de 254nm. Finalmente se colocaron los viales en el Automuestreador (PerkinElmer, USA) y se programó para inyectar 5 μl con un tiempo de corrida de 5 minutos por muestra, el mismo que deberá coincidir con el programado en el software, esto debido a que el tiempo de retención de la vitamina C (ácido ascórbico) es de 3 minutos aproximadamente.

3.2.5. Obtención del Cromatograma

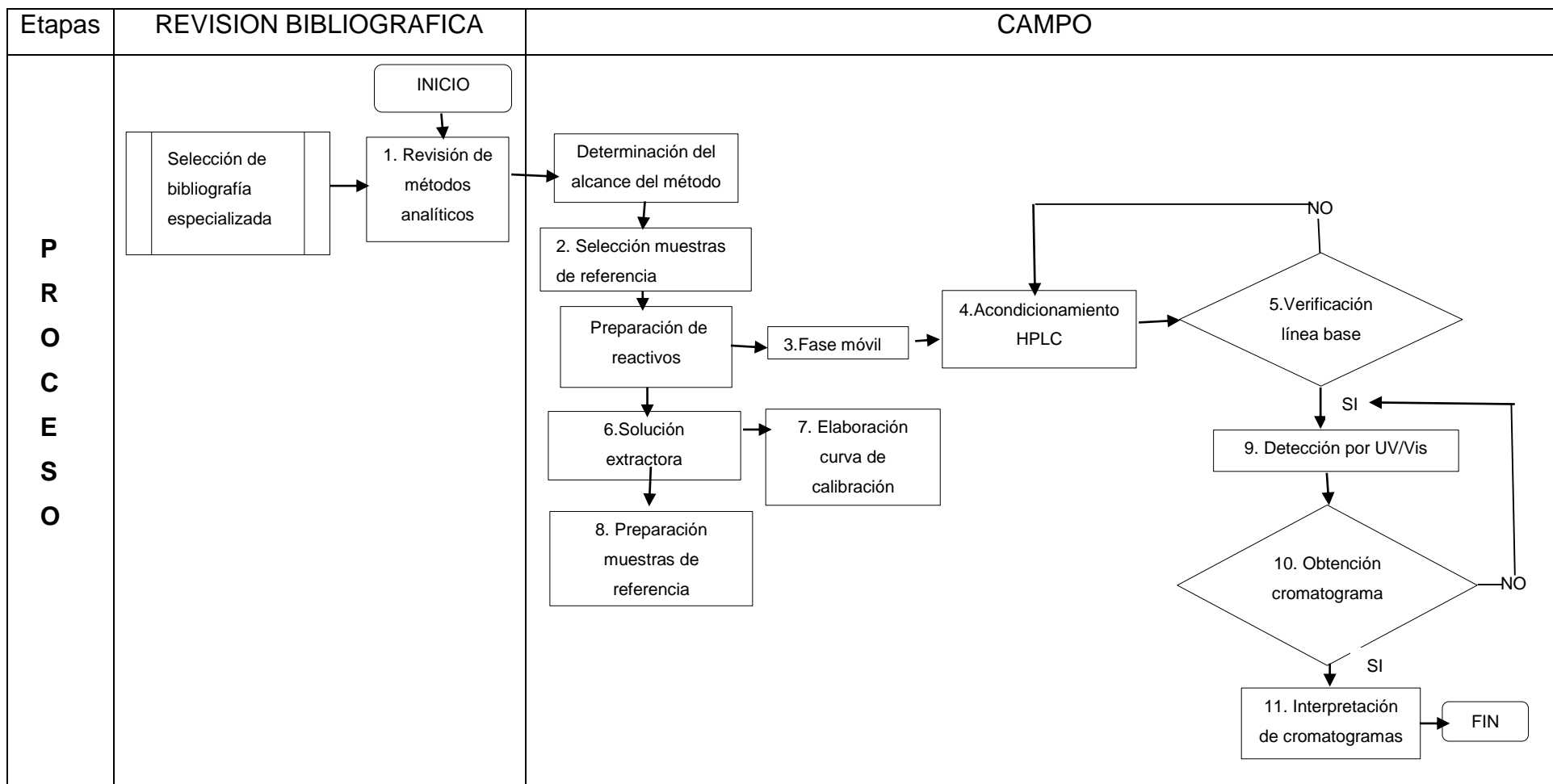
El HPLC (PerkinElmer, USA) está controlado por un Software de análisis (Chromatography Data System, SURWIT TECHNOLOGY INC, Hangzhou-China), el cual maneja las corridas por realizar y guarda automáticamente los cromatogramas realizados, se debe iniciar el software al momento de encender el equipo para comprobar la estabilización del equipo y programarlo colocando el nombre con el cual se guardará el Cromatograma, por ejemplo (29-11-20160001), el tiempo de corrida por muestra y la dirección del archivo

en el cual se guardaran los cromatogramas en orden secuencial a las corridas realizadas.

Posterior a esto se verificó que haya una línea base en el software y en el Automuestreador se programó los números de viales a analizar y el número de réplicas por vial que se realizará, una vez transcurrido el tiempo de cada corrida el Cromatograma se guardará automáticamente.

Análisis e Interpretación del Cromatograma

En el software Chromatography Data System, SURWIT TECHNOLOGY INC, Hangzhou-China se crearon 5 curvas de calibración cargando los cromatogramas de forma individual colocando la concentración exacta de cada punto de la curva y por medio de linealidad el software determinará la concentración de ácido ascórbico en mg/mL de solución.



D E S C R I P C I O N	<p>1) Revisión bibliográfica de una serie de métodos analíticos que incluye revisión en libros, papers y normas de validación.</p> <p>2) Las muestras de referencia se seleccionaron de acuerdo al alcance de validación establecido. 7 mg/100g hasta 145mg/100g de muestra.</p> <p>3) Se preparó fase móvil a pH 2,5 de acuerdo a la metodología de (Ledezma - Gairaud, 2004).</p> <p>4) Se acondicionó el equipo y la columna bombeando fase móvil, antes preparada, a un flujo de 0,2 ml/min por 1 hora y a 1ml/min por 15 minutos más.</p> <p>5) Se verificó que haya línea base, antes de empezar la detección, de no haber seguir bombeando fase móvil.</p> <p>6) Se preparó solución extractora con ácido acético al 20% y ácido metafosfórico para la preparación de las muestras de referencia y la curva de calibración.</p> <p>7) Se elaboró la curva de calibración utilizando estándar certificado de Ácido ascórbico</p> <p>8) Se prepararon las muestras de referencia siguiendo la metodología de (AOAC, 2005).</p> <p>9) Se detectaron cada una de las muestras a través del detector UV/visible.</p> <p>10) Los cromatogramas se obtuvieron de acuerdo a lo mencionado en los apartados 3.2.4 y 3.2.5</p> <p>11) La interpretación de cromatogramas se realizó en el Software de análisis (Chromatography Data System, SURWIT TECHNOLOGY INC, Hangzhou-China), provisto en el HPLC, donde se crearon las 5 curvas de calibración y por medio de linealidad el software determinará la concentración de ácido ascórbico en mg/mL de solución.</p>
--	--

Figura. 1 Flujograma del Proceso

3.3. Validación del método

La validación del método se realizó para una sola matriz alimentos, para el desarrollo experimental se estableció un diseño de un solo factor completamente aleatorizado (DCA) con cuatro niveles (muestras de referencia MR) donde el nivel 1 corresponde al nivel más bajo con una concentración de 7,25 mg/100g de muestra y el nivel 4 el más alto con una concentración de 145 mg/100g de muestra. La respuesta experimental es la concentración de vitamina C expresada en mg de ácido ascórbico/100 g muestra como se menciona en la tabla 2.

Tabla 2 Puntos de medición para la validación

NIVELES				
Descripción	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
Puntos de medición	Pulpa Sandía	Pulp (néctar de durazno)	Cerelac	Bio C
Código	MR-25	MR-20	MR-16	MR-10
Concentración bibliográfica mg/100 g de muestra	10	35	75	140

ECUACHEMLAB, 2017

3.4. Parámetros de Validación

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

3.4.1. Linealidad

Se ejecutaron cinco curvas de calibración siguiendo 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 coeficiente de correlación lineal el cual es considerado como criterio de aceptabilidad cuando su valor es igual o superior a $r \geq 0,999$. Se empleó la siguiente ecuación para determinar la linealidad del método.

$$y = mx + b$$

Ec. 1

Dónde:

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

x=Concentración del estándar de ácido ascórbico (mg/ml)

m=Pendiente de la recta

b=Ordenada al origen

Se prepararon cinco estándares de vitamina C y analizaron por HPLC, como función respuesta se obtuvieron las áreas de cada estándar. En el anexo A se muestran los cromatogramas obtenidos de la primera curva realizada.

Estos valores fueron utilizados para graficar la curva de calibración cuyo procedimiento se realizó durante 5 días en condiciones de reproducibilidad y así se obtuvieron 5 curvas.

Tabla 3 Modelo para la estimación de la linealidad

Eje X	Eje Y (Área u ²)				
Concentración	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
Std (mg/ml)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
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

Para demostrar que las curvas de calibración cumplen con la ecuación de la recta planteada (Ec.1) se calcularon los valores de la ordenada al origen (b), la pendiente (m) y el coeficiente de correlación (r) el cual fue superior a 0,999.

Complementario a esto se utilizó el método de mínimos cuadrados, este busca confirmar que la suma de los cuadrados de las distancias verticales entre cada punto experimental y la curva de calibración sea mínima o tienda a cero (**Miller, 2008**), asegurando confiabilidad estadística y exactitud de las curvas realizadas. Este método proporciona valores de: 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

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

Ec. 5

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

Ec. 6

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

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

3.4.2. Límite de Detección (LD)

Mediante una serie de diluciones se identificó la concentración más baja de analito que puede ser detectada de forma confiable por el método **(Duffau, y otros, 2010)**.

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 dicha área en unidades de concentración (mg de ácido ascórbico por ml de solución de ácido ascórbico) se comparó este valor con la concentración y el área obtenidas en el primer estándar de la curva de calibración [Ec.9].

Cálculo del LD:

$$LD = \frac{C_{std} \text{ (mg/mL)}}{A_{std} \text{ (u}^2\text{)}} * A_{LD} \text{ (u}^2\text{)} = \frac{\text{mg de ácido ascórbico}}{\text{mL de solución}}$$

Ec. 9

Dónde:

C_{std}= Concentración del estándar

A_{std}= Área del estándar

A_{LD}= Área del Límite de Detección

Para efectos de la validación se realizaron 10 blancos de muestra independientes fortificados a la menor concentración aceptable que fue de 0,000482 mg/ml.

3.4.3. 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 dicha área en unidades de concentración (mg de ácido ascórbico por ml de solución de ácido ascórbico) 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:

$$LC = \frac{C_{std} (mg/mL)}{A_{std} (u^2)} * A_{LC}(u^2) = \frac{mg \text{ de ácido ascórbico}}{mL \text{ de solución}}$$

Dónde:

C_{std}= Concentración del estándar

A_{std}= Área del estándar

A_{LC}= Área del Límite de Detección

3.4.4. 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 C.

3.4.5. 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 cinco 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)	
	Día 1	Día 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

Se compararon los valores de F crítico reportado en la tabla de ANOVA por nivel con el F experimental obtenido de las mediciones. Conjuntamente se determinó el coeficiente de variación (% CV) el cual no fue mayor al 2% en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad (**Eurachem, 2005**).

3.4.5.1. Repetibilidad

Se realizaron 6 repeticiones por técnico de cada punto de medición. 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 (%CV_r) [Ec.13] menor o igual al 2%.

$$S_r = \sqrt{CME}$$

Ec.12

$$\%CVR = \frac{Sr}{\bar{X}}$$

Dónde:

CME= cuadrados medios dentro de los grupos

\bar{X} = promedio de los datos

Según 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

3.4.5.2. 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 2%.

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

Ec. 15

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

Ec.16

Dónde:

CME= cuadrados medios dentro de los grupos

CMT_r = cuadrados medios entre grupos

n= número de repeticiones

\bar{X} = promedio

En base a la guía (**Eurachem, 2005**), LR se da por la Ec.

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

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

3.4.6. Tratamiento estadístico

Para establecer si la metodología de validación para el análisis de precisión está dentro de un parámetro aceptable y confiable, se empleó una hoja de cálculo Excel. Para el proceso de validación es recomendable emplear pruebas de significancia estadística especialmente la Prueba F-Fisher la cual se utiliza para comprobar si los datos obtenidos no presentan diferencia significativa.

Adicional a esto, se llevó a cabo un análisis estadístico denominado análisis de varianza (ANOVA), con el cual se compara las diferencias dentro de cada grupo de datos.

3.4.7. Exactitud

Para el cálculo de la exactitud se utilizó el método de análisis repetido de una muestra de concentración única conocida y se calculó el porcentaje de recuperación (%R) [Ec. 18] para el nivel bajo, el mismo que debió encontrarse entre el 98% y el 102% para HPLC según lo reportado por (**FAO, Comisión del Codex Alimentarius, 2013**), como indicativo de una buena exactitud, ya que la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero resulta pequeña. Se utilizó un estándar de referencia sobre una concentración conocida de muestra

$$\%R = \frac{X_{estimada}}{X_{verdadera}} * 100$$

Ec. 18

3.4.8. Incertidumbre

Para el cálculo de 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. 2 Etapas para la estimación de la incertidumbre

Utilizando la ley de Taylor se identificaron las principales contribuciones a la incertidumbre. Las incertidumbres que intervienen en 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:

$U_{m\acute{a}x}$ = incertidumbre máxima del material

A demás se calculó la incertidumbre Estándar Combinada (μ) utilizando 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

$\frac{\mu_p}{p}$ = Incertidumbre de cada variable, expresadas como desviaciones estándar

relativas 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].

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

Ec.25

Dónde:

$\mu_c(y)$ = incertidumbre combinada

k = factor de cobertura

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante análisis estadístico se tabularon e interpretaron los resultados obtenidos en los ensayos del laboratorio. Para la determinación de la concentración de vitamina C (ácido ascórbico), en el transcurso experimental, se obtuvieron seis réplicas por cada material de referencia. Los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad se obtuvieron al comparar los datos obtenidos en los 2 días en los cuales se llevó a cabo el trabajo experimental.

4. Obtención de los Datos Primarios

4.1. Niveles

4.1.1. Primer Nivel (MR-25)

La concentración de vitamina C para el MR-25 se determinó previo análisis de los cromatogramas obtenidos en el software N2000 (ver anexo A). Los resultados obtenidos muestran valores entre 7,14 y 7,44 mg/100g de muestra para el día 1 (tabla 5) y entre 7,10 y 7,34 mg/100g para el día 2 (tabla 6), estableciendo que no existe variabilidad en la cuantificación de este material.

Tabla 5. Datos Primarios MR-25. Día 1

N° Replica	Masa (g)	*Concentración (mg/100g)
1	3,8503	7,27
2	3,2267	7,44
3	3,0076	7,31
4	3,5789	7,26
5	3,0345	7,25
6	3,3634	7,14
	\bar{X}	7,28

Nota: *Concentración de Vitamina C

ECUACHEMLAB (2017)

Tabla 6. Datos Primarios MR-25. Día 2

N° Replica	Masa (g)	*Concentración (mg/100g)
1	3,3798	7,10
2	3,3267	7,21
3	3,5896	7,24
4	3,5411	7,34
5	3,8487	7,28
6	3,3698	7,12
	\bar{X}	7,22

Nota: *Concentración de Vitamina C

ECUACHEMLAB (2017)

4.1.2. Segundo Nivel (MR- 20)

La concentración de vitamina C para el MR-20 se determinó previo análisis de los cromatogramas obtenidos en el software N2000 (ver anexo A). Los resultados obtenidos muestran valores entre 23,01 y 23,87 mg/100g de muestra para el día 1 (tabla 7), valores que son similares para el día 2 (tabla 8), estableciendo que no existe variabilidad en la cuantificación de este material.

Tabla 7. Datos Primarios MR-20. Día 1

N° Replica	Masa (g)	*Concentración (mg/100g)
1	2,1473	23,75
2	2,1590	23,85
3	2,3183	23,29
4	2,2567	23,71
5	2,2386	23,01
6	2,2354	23,04
	\bar{X}	23,44

Nota: *Concentración de Vitamina C

ECUACHEMLAB (2017)

Tabla 8. Datos Primarios MR-20. Día 2

N° Replica	Masa (g)	*Concentración (mg/100g)
1	2,6703	23,78
2	2,7590	23,38
3	2,0081	23,16
4	2,0121	23,86
5	2,1510	23,01
6	2,0873	23,71
	\bar{X}	23,48

Nota: *Concentración de Vitamina C

ECUACHEMLAB (2017)

4.1.3. Tercer Nivel (MR-16)

La concentración de vitamina C para el MR-16 se determinó previo análisis de los cromatogramas obtenidos en el software N2000 (ver anexo A). Los resultados obtenidos muestran valores entre 44,09 y 45,75 mg/100g de muestra para el día 1 (tabla 9) y entre 44,49 y 45,62 para el día 2 (tabla 10), estableciendo que no existe variabilidad en la cuantificación de este material.

Tabla 9. Datos Primarios MR-16. Día 1

N° Replica	Masa (g)	*Concentración (mg/100g)
1	2,0280	44,38
2	2,0110	44,75
3	2,0867	44,09
4	2,0001	45,75
5	2,2990	45,24
6	2,2720	45,55
	\bar{X}	44,96

Nota: *Concentración de Vitamina C

ECUACHEMLAB (2017)

Tabla 10. Datos Primarios MR-16. Día 2

N° Replica	Masa (g)	Concentración (mg/100g)
1	2,0280	44,38
2	2,0110	44,75
3	2,0867	44,09
4	2,0001	45,75
5	2,2990	45,24
6	2,2720	45,55
	\bar{X}	44,96

Nota: \bar{X} Concentración de Vitamina C

ECUACHEMLAB (2017)

4.1.4. Cuarto Nivel (MR-10)

La concentración de vitamina C para el MR-16 se determinó previo análisis de los cromatogramas obtenidos en el software N2000 (ver anexo A). Los resultados obtenidos muestran valores entre 140,16 y 143,49 mg/100g de muestra para el día 1 (tabla 11) y entre 140,70 y 145,84 para el día 2 (tabla 12), estableciendo que no existe variabilidad en la cuantificación de este material.

Tabla 11. Datos Primarios MR-10. Día 1

N° Replica	Masa (g)	Concentración (mg/100g)
1	0,1570	142,32
2	0,1298	143,22
3	0,1544	142,68
4	0,1144	143,49
5	0,1352	140,16
6	0,1299	142,15
	\bar{X}	142,34

Nota: \bar{X} Concentración de Vitamina C

ECUACHEMLAB (2017)

Tabla 12. Datos Primarios MR-10. Día 2

N° Replica	Masa (g)	Concentración (mg/100g)
1	0,1131	144,92
2	0,1092	141,80
3	0,1680	143,75
4	0,1825	145,84
5	0,1543	140,70
6	0,1596	141,70
	\bar{X}	144,92

Nota: \bar{X} Concentración de Vitamina C

ECUACHEMLAB (2017)

4.2. Linealidad

La concentración de Ácido ascórbico en los materiales de referencia empleados se determinó mediante curvas de calibración, las cuales se realizaron en condiciones de repetibilidad en cinco días diferentes. Para graficar las curvas se colocó en el eje de las abscisas las concentraciones de los estándares de ácido ascórbico en mg/ml y en el eje de la ordenada el área a la cual representa cada uno de los estándares expresadas en unidades cuadradas (u^2) (ver Tabla 13).

Tabla 13. Datos de las curvas de calibración para la concentración de ácido de ascórbico.

Eje X Concent.		Eje Y (Área u^2)				
Std	(mg/ml)	Curva 1 Día 1	Curva 2 Día 2	Curva 3 Día 1	Curva 4 Día 2	Curva 5 Día 1
1	0,0019	22111,301	22043,551	22011,678	22025,905	22674,540
2	0,0096	99718,000	99338,875	99563,005	99866,350	99654,238
3	0,0193	205017,422	200061,422	204568,567	202654,450	203578,875
4	0,0433	513597,469	510835,906	519896,123	511239,659	513423,456
5	0,0965	1037317,563	1038600,688	1039493,476	1036789,890	1035678,450
6	0,1448	1534558,375	1518199,500	1529787,654	1527345,250	1515637,750

ECUACHEMLAB (2017)

A continuación, se muestran las curvas de calibración con su respectiva ecuación de la recta y su coeficiente de correlación lineal (r).

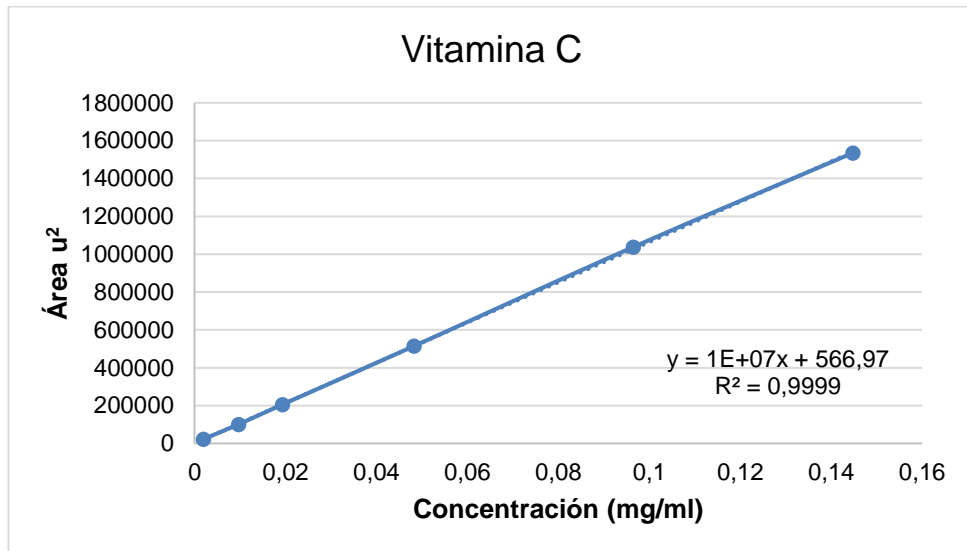


Figura. 3 Curva de calibración. Día 1

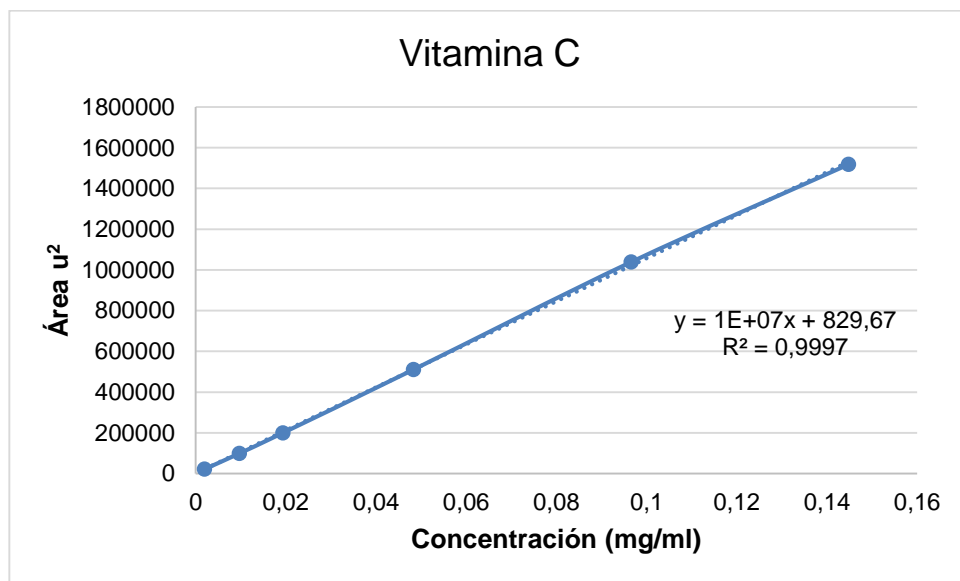


Figura. 4 Curva de calibración. Día 2

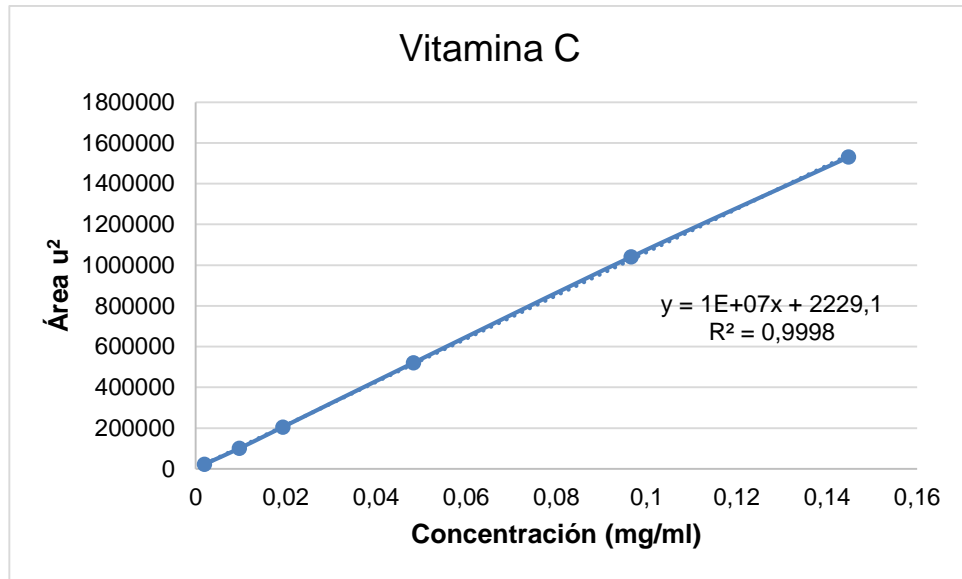


Figura. 5 Curva de Calibración. Día 3

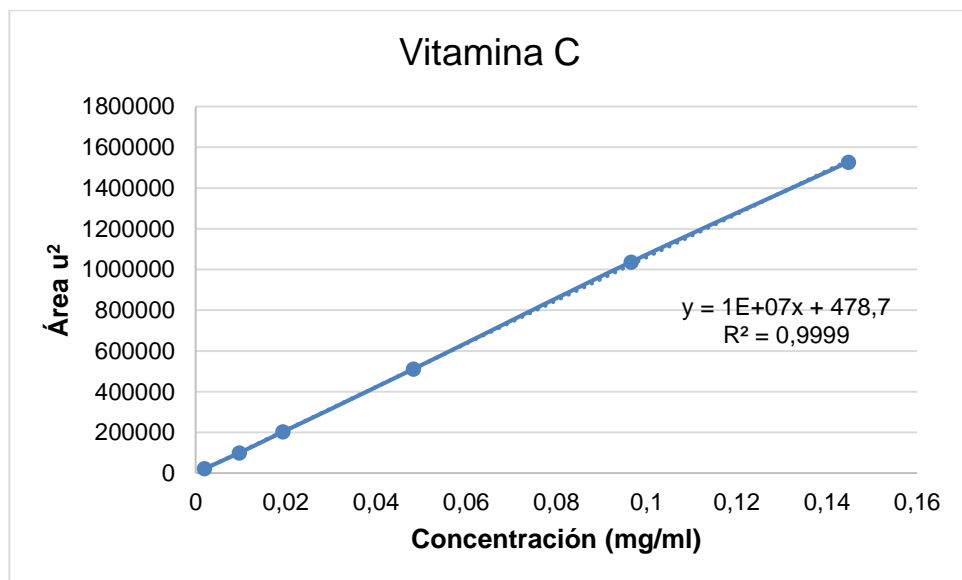


Figura. 6 Curva de Calibración. Día 4

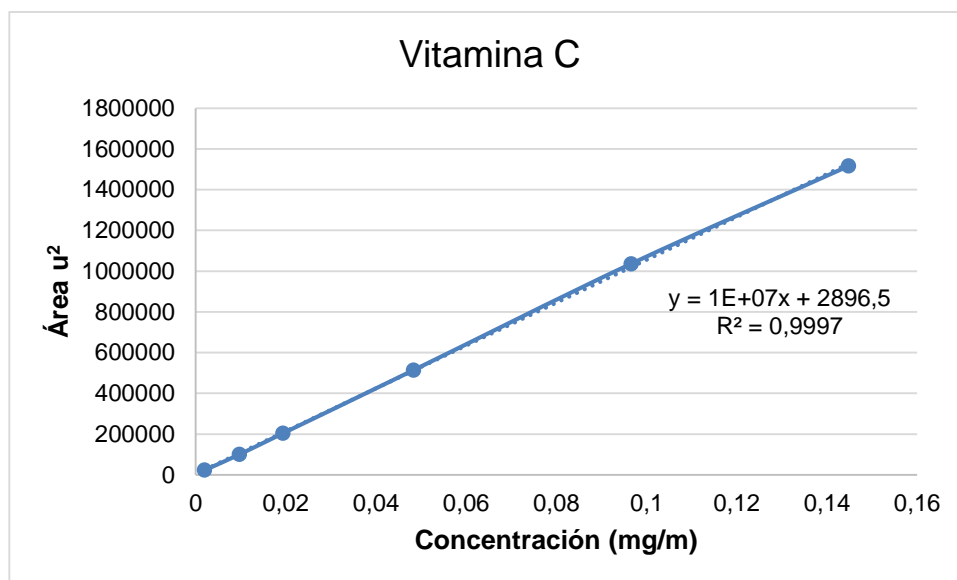


Figura. 7 Curva de Calibración. Día 5

El coeficiente de correlación lineal es considerado un criterio de aceptabilidad cuando su valor es superior a $r=0,999$, las cinco curvas realizadas en condiciones de reproducibilidad cumplen con este criterio y se ajustan al modelo de regresión lineal por lo cual son aceptadas para determinar la concentración en mg de ácido ascórbico por ml de solución de cada una de las muestras de referencia empleadas.

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 curvas de calibración.

Tabla 14. Estimación Lineal de las curvas en forma integrada

Estadístico	Valor Global
m	10588531,37
b	1400,186722
r	0,99978864
Sm	29094,73978
Sb	2160,204208
Syx	8219,354744

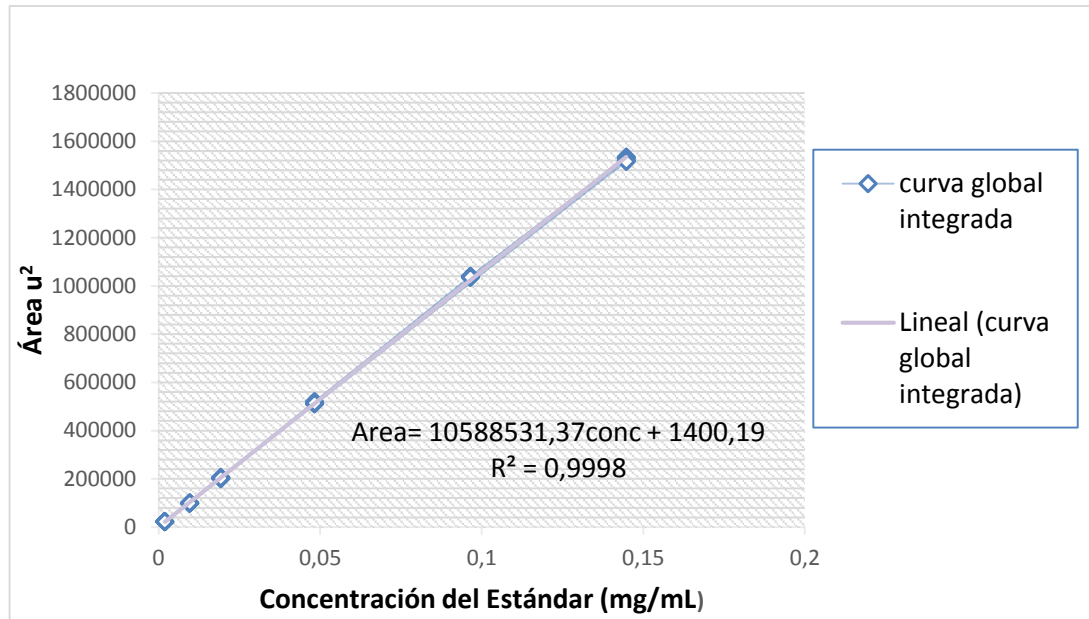


Figura. 8 Ecuación global de las curvas de calibración integradas para la determinación de ácido ascórbico

Para conocer el rango de confianza en el cual se deben realizar las mediciones se determina los límites superior e inferior de las curvas de calibración [Ec. 27 y Ec.28], en base a la estimación global de la recta de calibrado (tabla 14), de tal forma se asegura que las curvas realizadas posteriormente se encuentran dentro de estos límites. Si las curvas no se encuentran dentro de estos límites descartar 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

$$LS = b + t_{crit} * S_{yx}$$

Ec. 27

$$LS = 1400,19 + 2,353 * 8219,35$$

$$LS = 20740,32843 u^2$$

Límite Inferior

$$LI = b - t_{crit} * S_{yx}$$

Ec. 28

$$LS = 1400,19 - 2,353 * 8219,35$$

$$LS = -17939,94 u^2$$

Límites aplicados a cada concentración de estándar

Cálculo demostrativo: Primer estándar (0,0019 mg/ml)

$$\text{Área} = 10588531,37 [\text{Conc}] + LS$$

$$\text{Área} = 10588531,37 [0,0019] + 20740,32843$$

$$\text{Área} = 41180,4294 u^2$$

$$\text{Área} = 10588531,37 [\text{Conc}] + LI$$

$$\text{Área} = 10588531,37 [0,0019] + (-17939,94)$$

$$\text{Área} = 2500,146 u^2$$

Tabla 15. Límites de la curva de calibración global integrada

Estándar (mg/ml)	Límite Superior (u²)	Límite Inferior (u²)
0,0019	41180,4294	2500,146
0,0097	122940,8332	84260,550
0,0193	225141,3379	186461,054
0,0483	531742,8521	493062,569
0,0965	1042745,3758	1004065,092
0,1448	1553747,8995	1515067,616

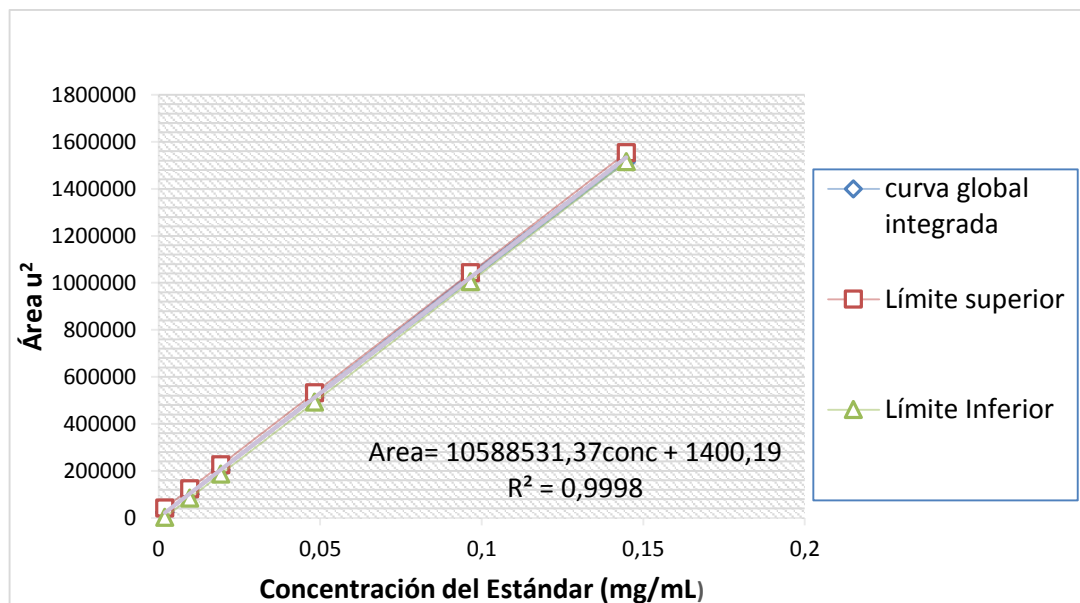


Figura. 9 Límites de la curva de calibración global integrada

Se compararon las cinco curvas de calibración realizadas en condiciones de reproducibilidad y se estableció que no existe variabilidad en el área de cada estándar (función respuesta). Además, al realizar un análisis global de las curvas se determinó que se puede emplear cualquier de las cinco curvas para el cálculo de la concentración de Ácido Ascórbico.

4.3. Límites

4.3.1. Detección (LD)

A continuación, se reportan los resultados que se obtuvieron del ruido generado en las muestras de estándar preparados para determinar el LD Y LC (tabla 16).

Tabla 16. Estándar preparados

Réplicas	Ruido generado (Área u ²)
1	8497,650
2	8175,400
3	8347,400
4	8142,300
5	8500,300
6	8433,450
7	8244,800
8	8015,900
9	8399,450
10	8205,850
\bar{X}	8296,250

ECUACHEMLAB (2017)

Cálculo del LD:

$$LD = 3(8296,250u^2)$$

$$LD = 24888,75 u^2$$

$$LD = \frac{0,0019 \frac{mg}{mL}}{22111,301u^2} \times 24888,75u^2$$

$$LD = 0,002 \frac{mg \text{ de ácido ascorbico}}{mL \text{ de solución}}$$

El valor del LD es igual 0,002 mg de ácido ascórbico por mL de solución, esto determina la mínima concentración de vitamina C que puede ser detectada por el HPLC bajo las condiciones del trabajo del equipo.

4.3.2. Cuantificación (LC)

En la tabla 16 se encuentran los resultados del ruido generado por el estándar preparado.

Cálculo del LC:

$$LC = 10(8296,250u^2)$$

$$LC = 82962,5 u^2$$

$$LC = \frac{0,0019 \frac{mg}{mL}}{22111,301u^2} \times 82962,5 u^2$$

$$LC = 0,007 \frac{mg \text{ de ácido ascórbico}}{mL \text{ de solución}}$$

El valor del LC es igual 0,007 mg de ácido ascórbico por mL de solución, esto determina la menor concentración de vitamina C que puede ser cuantificada por el HPLC bajo las condiciones del trabajo del equipo, por debajo de esos valores se considera la inexistencia de vitamina C.

4.4. Rango de Trabajo

El rango de trabajo establecido para la validación de vitamina C establece como límite inferior para la cuantificación un valor igual a 0,007 y como límite superior la última concentración de la curva de calibración de 0,1448, valores expresados en unidades de mg de ácido ascórbico/mL de solución, estos valores permiten cuantificar vitamina C en muestras con concentraciones que van desde 7,25 mg hasta 142,73 mg de ácido ascórbico por cada 100 g de muestra.

4.5. Precisión

Para determinar si en el día uno y en día dos se pueden obtener resultados confiables y similares se realizó el trabajo experimental empleando 4 niveles de concentraciones en diferentes muestras de referencia realizando el análisis de precisión en términos de repetibilidad (6 réplicas) y reproducibilidad (6 réplicas) (ver tabla 17).

Tabla 17. Resumen de las concentraciones de Ácido ascórbico por nivel

CONCENTRACIÓN (mg/100g)								
Réplica	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3		Nivel 4	
	Día1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día	Día 1	Día 2
1	7,27	7,10	23,75	23,78	44,38	44,86	142,32	144,92
2	7,44	7,21	23,85	23,38	44,75	44,49	143,22	141,80
3	7,31	7,24	23,29	23,16	44,09	45,51	142,68	143,75
4	7,26	7,34	23,71	23,86	45,75	44,79	143,49	145,84
5	7,25	7,28	23,01	23,01	45,24	45,62	140,16	140,70
6	7,14	7,12	23,04	23,71	45,55	44,51	142,15	141,70
\bar{X}	7,28	7,22	23,44	23,48	44,96	44,96	142,34	143,12

Cálculo demostrativo: Nivel 1

Tabla 18. Concentraciones para evaluar de Ácido ascórbico. Nivel 1

Concentración de Ácido Ascórbico (mg/ml)		
Réplica	Día 1	Día 2
1	7,27	7,10
2	7,44	7,21
3	7,31	7,24
4	7,26	7,34
5	7,25	7,28
6	7,14	7,12
\bar{X}	7,25	
ANOVA CMTr	0,0472	
ANOVA CME	0,055066667	

Repetibilidad

Desviación Estándar

$$S_r = \sqrt{CME}$$

$$S_r = \sqrt{0,05506}$$

$$S_r = 0,105$$

Coeficiente de variación

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

$$\%CVr = \frac{0,105}{7,25} \times 100$$

$$\%CVr = 1,448$$

Límite de repetibilidad

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

$$Lr = 1,96 \times \sqrt{2} \times 0,79$$

$$Lr = 2,16 \text{ mg de Ácido ascórbico/100g de muestra}$$

Reproducibilidad

Desviación estándar

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

$$S_R = \sqrt{0,105^2 + \frac{(0,0472 - 0,0550)}{6}}$$

$$S_R = 0,102$$

Coeficiente de variación

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

$$\%CVR = \frac{0,102}{7,25} \times 100$$

$$\%CVR = 1,413$$

Límite de reproducibilidad

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

$$LR = 1,96 \times \sqrt{2} \times 0,94$$

$$LR = 2,61 \text{ mg de Ácido ascórbico/100g de muestra}$$

Tabla 19. Resumen del coeficiente de variación y desviaciones estándar de cada nivel de concentración de ácido ascórbico.

Nivel	Sr	%CVr	SR	%CVR
1	0,105	1,448	0,102	1,413
2	0,441	1,880	0,415	1,769
3	0,479	1,066	0,504	1,120
4	2,073	1,452	1,950	1,366

Nota: Sr: Desviación estándar de repetibilidad; SR: Desviación estándar de reproducibilidad; %CVr: coeficiente de variación repetibilidad; %CVR: coeficiente de variación reproducibilidad.

ECUACHEMLAB (2017)

La desviación estándar y el coeficiente de variación que se muestran en la tabla 19 fueron calculados utilizando los resultados obtenidos del análisis de varianza ANOVA, detallada en el apartado 4.5.1. (tratamiento estadístico). Según la guía de validación (**Eurachem, 2005**) los valores aceptados para el %CVr y %CVR es menor al 2% para cada uno de los niveles medidos en HPLC, de este modo se corrobora el análisis asegurando la validez de los datos para cada material de referencia.

Además, se calcularon los Límites de repetibilidad (Lr) de los cuales se escogió el menor con un valor igual a 2,16 mg de ácido ascórbico/100 g de muestra debido a que de este modo se ajusta el método para la eliminación de errores en el proceso; y también, el límite de reproducibilidad (LR) con un valor de 2,61 mg de ácido ascórbico/ 100 g de muestra, según la (**Eurachem, 2005**), la diferencia absoluta entre dos resultados (réplicas) debe ser menor o igual al valor de cada límite establecido en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

4.6. Tratamiento Estadístico

Con la finalidad de determinar de manera experimental si se puede obtener en días diferentes resultados confiables y similares estadísticamente de una misma muestra en diferentes réplicas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los niveles de concentración de vitamina C, los cuales se muestran a continuación.

Tabla 20. Análisis de Varianza ANOVA. Nivel 1

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico
Entre grupos (Tratamientos)	0,055	5	0,011	1,4	0,343	4,38
Dentro de grupos	0,047	6	0,007			
Total	0,102	11				

Tabla 21. Análisis de Varianza ANOVA. Nivel 2

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico
Entre grupos (Tratamientos)	0,973	5	0,194	3,219	0,0934	4,38
Dentro de grupos	0,362	6	0,060			
Total	1,336	11				

Tabla 22. Análisis de varianza ANOVA. Nivel 3

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico
Entre grupos (Tratamientos)	1,149	5	0,229	0,618	0,692	4,38
Dentro de grupos	2,230	6	0,371			
Total	3,380	11				

Tabla 23. Análisis de varianza ANOVA. Nivel 4

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico
Entre grupos (Tratamientos)	21,485	5	4,297	3,250	0,091	4,387
Dentro de grupos	7,932	6	2,759			
Total	29,418	11				

Tabla 24. Resumen del Análisis de Varianza ANOVA

Concentración (mg/100g)	F calculado	F Crítico	Conclusión
Nivel 1	1,4	4,387	No existe diferencia significativa
Nivel 2	3,219	4,387	No existe diferencia significativa
Nivel 3	0,618	4,387	No existe diferencia significativa
Nivel 4	3,250	4,387	No existe diferencia significativa

Antes de realizar el tratamiento estadístico de los datos, se realizó un análisis de varianza de un solo factor por filas (ANOVA) para cada nivel de ensayo con la ayuda de una hoja de cálculo de Excel. Se determinó mediante una prueba de Fisher realizada a un nivel de confianza del 95% que no existe diferencia significativa en las varianzas de los grupos muestrales (tratamientos) al comparar el F crítico con el F calculado siendo este menor (ver tabla 24). Además, los resultados obtenidos comprenden la capacidad del método al realizarse en días diferentes en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad previamente establecidas.

4.7. Análisis de Exactitud

La exactitud del método se determinó mediante el % de recuperabilidad de una concentración conocida de estándar aplicada al nivel bajo. Se llevó a cabo esta metodología debido a que no se disponía de un programa inmediato de intercomparación ni de un material de referencia certificado.

En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos de la recuperación del estándar en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 25. Datos del % de Recuperación de Estándar en el nivel bajo

Réplicas	% Recuperación	
1	7,27	
2	7,44	
3	7,31	
4	7,26	Día 1
5	7,25	
6	7,14	
7	7,10	
8	7,21	
9	7,24	
10	7,34	Día 2
11	7,28	
12	7,12	
Promedio	7,25	
Desviación	0,10	

ECUACHEMLAB (2017)

Se calculó el porcentaje de recuperación de estándar de Ácido ascórbico según la ecuación la [Ec. 18]

$$\%R = \frac{X_{estimada}}{X_{verdadera}} * 100$$

$$\%R = \frac{7,30}{7,25} * 100$$

$$\%R = 99,32$$

Según **(FAO, Comisión del Codex Alimentarius, 2013)** el rango de aceptabilidad para el % de recuperabilidad está entre 98% y 102%. El valor del porcentaje de recuperación se encuentra dentro del rango permitido por lo que el método empleado para determinar la concentración de Vitamina C es exacto y con gran desempeño bajo condiciones de trabajo de laboratorio.

4.8. Análisis de Incertidumbre

Se determinó la Incertidumbre Estándar combinada (u) y Expandida (U) para la curva de calibración y las muestras analizadas. Además, se consideró un

valor de Incertidumbre expandida con un factor de cobertura igual a dos ($k=2$) para todas las muestras a un nivel de confianza del 95%.

También, se identificaron las 4 etapas para el desarrollo de la estimación de la incertidumbre del método.

4.8.1. Especificación

Determinación de vitamina C (Ácido Ascórbico) expresada en mg de vitamina/ 100 g de muestra por HPLC.

4.8.2. Identificación de las fuentes de Incertidumbre

A lo largo de todo el proceso de determinación de vitamina c se fueron identificando cada una las contribuciones a la incertidumbre del método.

Tabla 26. Identificación de las fuentes de Incertidumbre

Fuente de incertidumbre	Criterio de aceptación	Observación
Recepción e ingreso de la muestra	Se desestima (fuente bajo control)	Bajo el Sistema de gestión de calidad se procede guiados por instructivos y procedimientos
Almacenamiento, manejo y preparación de la muestra	Se desestima (fuente bajo control)	Bajo el Sistema de gestión de calidad se procede guiados por instructivos y procedimientos
Análisis de la muestra	Se estima obligatoriamente	Se deben considerar todos los errores aleatorios y sistemáticos involucrados en el proceso.
Preparación de la curva de calibración	(fuente no está bajo control)	
Lectura por HPLC		

Cálculos	Se desestima (fuente bajo control)	Existen hojas de control previamente validadas que son supervisadas y controladas por la gerencia de calidad.
Informe de resultados	Se desestima (fuente bajo control)	La Gerencia de Calidad verifica que los resultados sean los correctos y la Gerencia General autoriza su posterior emisión y entrega.

4.8.3. Cuantificación y combinación

La siguiente figura muestra un diagrama causa-efecto (espina de pescado) el cual describe las principales contribuciones para el cálculo de incertidumbre del método.

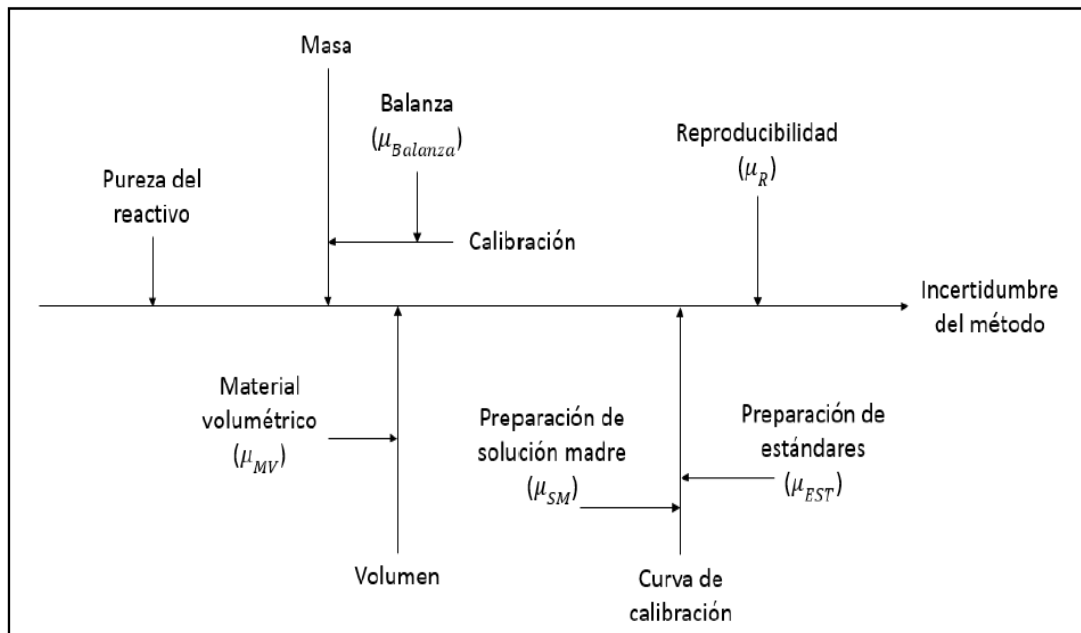


Figura. 10 Diagrama general Causa-Efecto (espina de pescado) para el cálculo de la incertidumbre combinada del método

4.8.4. Cálculo de Incertidumbre Tipo B

Balanza

La incertidumbre combinada de la balanza (Mettler Toledo) se especifica en el certificado de calibración adjunto (ver anexo B).

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

$$\mu_{Balanza} = \frac{0,00052}{2}$$

$$\mu_{Balanza} = 0,00026 \text{ g}$$

Material Volumétrico

Empleando la ecuación Ec. 22 de acuerdo con el tipo de certificado de cada uno de los materiales (ver anexo E).

Cálculo demostrativo: balón de aforo de 50 mL

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

$$\mu_{MV} = \frac{0,060}{\sqrt{6}}$$

$$\mu_{MV} = 0,024 \text{ mL}$$

Tabla 27. Incertidumbres de los equipos de medición utilizados

EQUIPO	FUENTE TIPO B	CERTIFICADO	INCERTIDUMBRE
Balanza	Calibración	0,0003	0,00026
	Resolución de equipos	0,0001	0,00004
Balón 50 ml	Desviación estándar	0,0120	0,00490
	Tolerancia	0,0600	0,02449
Balón 25 ml	Desviación estándar	0,0070	0,00286
	Tolerancia	0,0400	0,01633
Balón 200 ml	Desviación estándar	0,0330	0,01347
	Tolerancia	0,1500	0,06124
Balón 500 ml	Desviación estándar	0,0255	0,01041
	Tolerancia	0,2500	0,10206
Bureta	Calibración	0,0200	0,00816
	Resolución de equipos	0,0100	0,00408
Pureza	Ácido ascórbico	0,9500	0,54848

ECUACHEMLAB (2017)

4.8.5. Cálculo de Incertidumbre tipo A

Incertidumbre típica combinada del volumen (μ_{vol})

$$\mu_{vol} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (\mu_{desv.balón})^2 + (\mu_{toler.balón})^2 + (\mu_{calib.bureta})^2 + (\mu_{resol.bureta})^2}$$

$$\mu_{vol} = \sqrt{(0,005)^2 + (0,024)^2 + (0,003)^2 + (0,016)^2 + \dots + (0,008)^2 + (0,004)^2}$$

$$\mu_{vol} = 0,12 \text{ ml}$$

Incertidumbre típica combinada de masa (μ_{masa})

$$\mu_{masa} = \sqrt{(\mu_{calib.balanza})^2 + (\mu_{resol.balanza})^2}$$

$$\mu_{masa} = 0,00026 \text{ g}$$

Tabla 28. Incertidumbres Tipo A

Parámetros	UNIDADES	
Volumen (μ_{vol})	0,12	(ml)
Masa (μ_{masa})	0,00026	(g)

4.8.6. Incertidumbre típica combinada de la preparación de estándares (μ_{STD})

Cálculo demostrativo: Concentración 0,0019 mg/mL

$$\mu_{STD} = Conc \div \sqrt{\left(\frac{\mu_{masa}}{peso}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{vol}}{aforo}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{STD}}{pureza}\right)^2}$$

$$\mu_{STD} = 0,0019 \frac{mg}{mL} \div \sqrt{\left(\frac{0,00026g}{0,0254g}\right)^2 + \left(\frac{0,12mL}{25mL}\right)^2 + \left(\frac{0,548}{0,95}\right)^2} \times 100g \div 1000mg$$

$$\mu_{STD} = 0,00033 \text{ mg}/100g$$

Tabla 29. Incertidumbre típica combinada de la Curva de Calibración

	Concentración	Incertidumbre μ_{STD}
P1	0,0019	0,00033
P2	0,0097	0,00167
P3	0,0193	0,00334
P4	0,0483	0,00836
P5	0,0965	0,01671
P6	0,1448	0,02507

Tabla 30. Parámetros varios incluyentes para el cálculo de la incertidumbre

Parámetro	Valor (mg/100g)
Desviación. Reproducibilidad	0,942
Sesgo	0,100
Función respuesta (estimación lineal)	0,078
Curva calibración	0,08157

4.8.7. Cálculo de la incertidumbre combinada del método

$$\mu_{\text{método}} = \sqrt{(S_R)^2 + (S_{\text{exactitud}})^2 + (\text{Fun. respuesta})^2 + \sqrt{(\text{Fun. respuesta})^2 + (\mu_{p6 \text{ curva}})^2}}$$

$$\mu_{\text{método}} = \sqrt{(0,942)^2 + (0,100)^2 + (0,078)^2 + (0,081)^2}$$

$$\mu_{\text{método}} = 0,95 \text{ mg}/100\text{g}$$

4.8.8. Cálculo de la Incertidumbre Expandida del método

$$U_{\text{método}} = \mu_{\text{método}} \times k$$

$$U_{\text{método}} = 0,95 \frac{\text{mg}}{100\text{g}} \times 2$$

$$U_{\text{método}} = 1,91 \text{ mg}/100\text{g}$$

4.9. Criterios de Aceptación de la validación:

Tabla 31. Criterios de validación

INCERTIDUMBRE ≤ 30% BAJO	RANGO	30 % DEL RANGO BAJO	INCERTIDUMBRE EXPANDIDA	% DE INCERTIDUMBRE
		2,18 mg/100g	1,91 mg/100g	26,31 %

El organismo de acreditación ecuatoriano (SAE) dentro de sus criterios de validación menciona que el porcentaje de la incertidumbre del límite más bajo debe ser $\leq 30\%$, de este modo se corrobora que la incertidumbre expandida del método cumple con el objetivo de validación.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se determinó Vitamina C (Ácido Ascórbico) en alimentos empleando la técnica analítica de Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), siguiendo la metodología 967.21 de la **(AOAC, 2005)** para la elaboración de la solución extractora y la preparación de muestras y el método realizado por **(Ledezma - Gairaud, 2004)** para las condiciones cromatográficas y las corridas de las muestras de referencia y las curvas de calibración.
- Como se muestra en la tabla 31 se determinó la incertidumbre combinada del método para todos los niveles de concentración empleadas con un valor igual a 0,95 mg de vitamina por cada 100 g de muestra y la incertidumbre expandida con un valor igual a 1,91 mg de vitamina por cada 100 g de muestra; se empleó como criterio de aceptación que el valor de la incertidumbre sea menor al 30% del rango bajo dando como resultado para la incertidumbre encontrada 26,31% cumpliendo de este modo con el objetivo de validación planteado.
- se realizaron cinco curvas de calibración con un coeficiente de correlación superior a $r=0,999$ las que permiten cuantificar concentraciones en alimentos, tanto en materia prima como en producto terminado que van desde 7,25 mg hasta 142,73 mg de vitamina por cada 100 g de muestra que cubre con los valores de ingesta diaria permitida de la misma.
- La precisión medida por el límite de repetibilidad y reproducibilidad con valores de 2,16 mg/100 g y 2,61 mg/100g de ácido ascórbico

respectivamente. La exactitud fue determinada por el % de recuperabilidad con un valor igual al 99,32 % que está dentro del rango establecido para HPLC que es del 98% al 102%.

- Una vez desarrollado y validado el método se implementó en el laboratorio ECUACHEMLAB Cia. Ltda. el procedimiento PA-FQ 206 para la determinación de Vitamina C (Ácido Ascórbico) por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), en el cual se describen todos los parámetros y directrices establecidos en la validación que servirán de lineamientos para próximos trabajos realizados en el laboratorio para la emisión de resultados confiables a los clientes.

5.2. Recomendaciones

Se debería considerar que el método requiere de más pruebas que permitan asegurar la exactitud como Intercomparaciones y materiales de referencia.

Se recomienda que se implante un sistema de tratamiento de desperdicios químicos debido a que en la preparación y corrida de muestras se obtiene una cantidad considerable de desecho de reactivos.

Bibliografía

- AEFI. (2001). *Validacion de Métodos Analíticos*. Obtenido de Monografía. Comision de normas de buena fabricacion y control de calidad.
- AOAC. (2005). Official Method 967.21 Ascorbic Acid in Vitamin Preparations and Juices. 18.
- Cameron, E. P. (1979). Ascorbic acid and cancer. 39, 663-81. Recuperado el 12 de 05 de 2016
- Ciancaglini, e. a. (2001). *Using a classical method of vitamin C quantification as a tool for discussion of its role in the body* (Vol. 29). Biochem.

- Díaz, M., Hernández, I., Martínez, M., Licea, M., Gómez, L., Louro, G., . . . & González, E. (1998). Validación de Técnicas Analíticas utilizadas en el control de la calidad. Recuperado el 13 de 09 de 2016, de http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol32_2_98/far05298.pdf
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Rodríguez, L., Soto, M., Aguilera, M., & Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. *Instituto de Salud Pública de Chile*.
- Eurachem. (Noviembre de 2005). *Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*. Recuperado el 22 de Julio de 2016, de <http://www.metroquimica.com.ar/descargas/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf>
- EURACHEM/CITAC. (2012). Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. *Third Edition ed.*. Recuperado el 4 de abril de 2017
- FAO. (09 de 1998). Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Thailand. Recuperado el 12 de 05 de 2016, de <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42716/1/9241546123.pdf>
- FAO. (2013). *Comisión del Codex Alimentarius* (Vol. 21). Roma. Recuperado el 7 de Mayo de 2017
- Froescheis, O., S, H., Ringenbach, F., Wyss, R., Bucheli, F., Bausch, J., & Wiegand, U. (2001). Determination of retinol and retinyl esters in human plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection. 265-275.
- GUM. (2008). Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (1995 with minor correction). *ISO in the name of BIPM. IEC, IFCC, IUPAC, IUPAP and OIML*.
- Gutiérrez, T., Hoyos, O., & Páez, M. (Marzo de 2007). Determinación del contenido de Ácido Ascórbico en UCHUVA (*Physalis peruviana* L.), por cromatografía líquida de alta resolución. 5.
- Health, N. I. (2016 de Febrero de 2016). *NIH*. Obtenido de <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-DatosEnEspañol/>
- Hernández, Y. R., Pérez, Y. S., & Castro, A. I. (07 de Abril de 2009). *Biblioteca virtual en salud de Cuba*. Obtenido de

- http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol43_3_09/far07309.htm
- Hoffman. (1985). Micronutrient requirements of cancer patients. 145-50.
- INEN. (1984). *Agua potable*. Obtenido de Determinación de sulfatos: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0978.1984.pdf>
- Jane Higdon, P. (01 de 2006). *Ipi.oregonstate*. Recuperado el 12 de 05 de 2016, de <http://ipi.oregonstate.edu/es/mic/vitaminas/vitamina-C>
- Johnson , J., & Braddock, R. (1995). Kinetics of ascorbic acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum: Experimental rate constants. *Journal of Food Science* , 502-505.
- Ledezma - Gairaud, M. (2004). Determinacion de vitamina C total por cromatografia liquida de alta resolucion "HPLC". *Tecnologia en Marcha*, 17-4. Recuperado el 22 de Julio de 2016
- Mayores, U. p. (2011). Cuantificacion de Vitamina C. 2.
- Miller, J. (2008). *Estadística para química analítica*. Inglaterra: Addison-Wesley Iberoamerica.
- Muñoz, M. F. (01 de 2009). Validación de Métodos de ensayo para el análisis de parámetros físico-químicos en aguas limpias y residuales en el laboratorio de medio ambiente . 9-12. Sangolquí, Pichincha. Recuperado el 12 de 05 de 2016, de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/772/1/T-ESPE-026616.pdf>
- Pappa, H. (2013). Validación y verificación de procedimientos analíticos. *Pharmacopeya Convention* .
- Picó, A. G., Garcinuño Martínez, R. M., Marcillo Ortega, M. J., & Vázquez Segura, M. Á. (2013). Química Básica. 10/2013, 1028. Madrid. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=4I9GAgAAQBAJ&pg=PA1028&lpg=PA1028&dq=Las+vitaminas+son+sustancias+org%C3%A1nicas+imprescindibles+en+los+procesos+metab%C3%B3licos+que+tienen+lugar+en+la+nutrici%C3%B3n+de+los+seres+vivos.+No+aportan+energ%C3%ADa,+puest>
- Printing, M. (1990). United States Pharmacopoeial Convention. UPS XXII. 22. Easton.

- Querelles. (2015). *Profesor en línea*. Obtenido de <http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Vitaminas.htm>
- Rampazoo, P. (1990). Standardisation and Validation of Analytical Methods in the Pharmaceutical Industry. *II Farmaco*. Recuperado el 13 de 09 de 2016
- Roig, M., Rivera, Z., & Kennedy. (1998). *Journal Food Science Nutrition*, 59-72.
- Sierra, N., Rojas, J., Cuadra, I., Sisa, A., & Castro, G. (2007). Validación de una metodología por cromatografía líquida de alta eficacia para la determinación simultánea de vitaminas A, D3 y E en inyectables de uso veterinario. *Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas*, 623-630. Recuperado el 09 de Enero de 2017
- Skoog, D., Holler, J., & Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental* (Quinta ed.). Madrid: Interamericana de España.
- Swadesh, J. (2000). HPLC: Practical and Industrial Applications. *Second Edition*. Recuperado el 09 de Enero de 2017
- Vieira, M., & Teixeira, A. (2000). Mathematical modelling of the thermal degradation kinetic of vitamin C in cupuacu nectar. *Journal of Food Engineering*.

ANEXOS

ANEXO A

CROMATOGRAMAS

CURVA DE CALIBRACIÓN

Ecuachemlab Cia. Ltda.

1

Vitamina C. Estandar 1. Curva 1

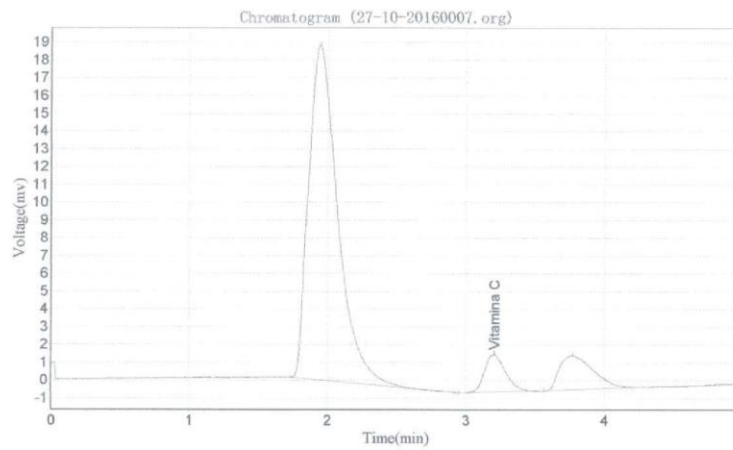
Date/Time: 2016-10-27,15:30:39

Data File: C:\N2000\data\vitamina C validacion\nuevas
curvas\27-10-2016\27-10-20160007.org

Analyst: Sofia Aguirre

Date/Time: 2017-05-02,11:46:59

Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,948	18818,768	276523,688	83,6031
2	Vitamina C	3,207	2096,076	22111,301	6,6850
3		3,773	1908,273	32122,900	9,7119
Total			22823,116	330757,889	100,0000

2017-05-02

N2000

Vitamina C. Estandar 2. Curva 1

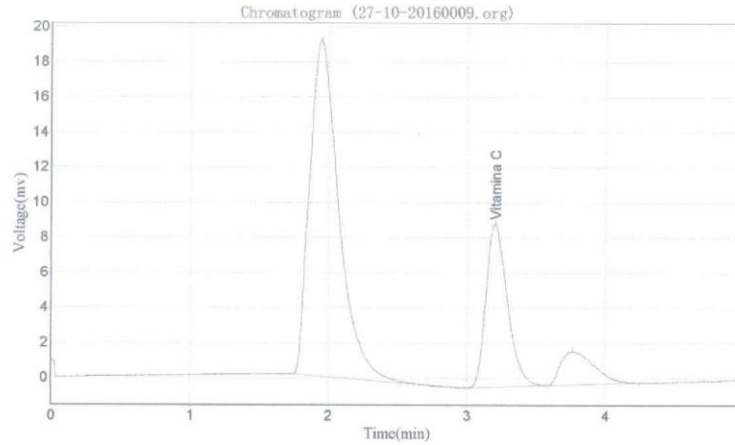
Date/Time: 2016-10-27,15:41:32

Analyst: Sofia Aguirre

Data File: C:\N2000\data\vitamina C validacion\nuevas
curvas\27-10-2016\27-10-20160009.org

Date/Time: 2017-05-02,11:49:00

Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,948	19149,316	279903,094	67,9935
2	Vitamina C	3,207	9277,250	99718,000	24,2233
3		3,765	1901,114	32040,199	7,7831
Total			30327,680	411661,293	100,0000

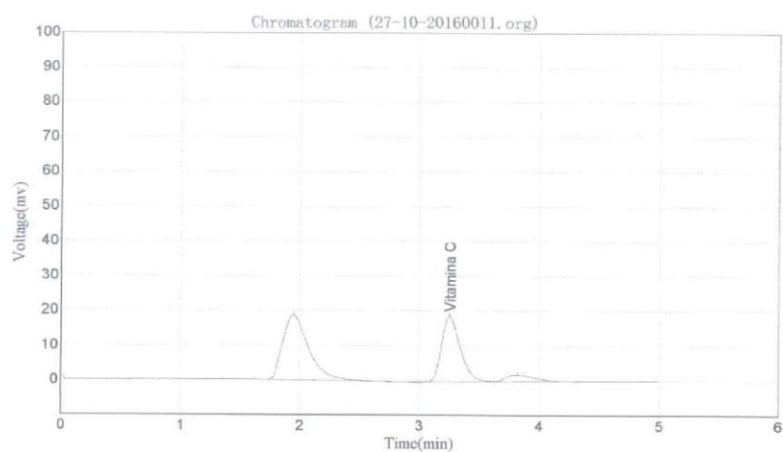
2017-05-02

N2000

Vitamina C. Estandar 3. Curva 1

Date/Time: 2016-10-27, 15:52:25
Data File: C:\N2000\data\vitamina C validacion\nuevas
curvas\27-10-2016\27-10-20160011.org

Analyst: Sofia Aguirre
Date/Time: 2017-05-02, 11:51:59
Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,948	18594,457	274943,813	53,5793
2	Vitamina C	3,257	18879,920	205017,422	39,9525
3		3,823	1939,360	33192,078	6,4683
Total			39413,737	513153,313	100,0000

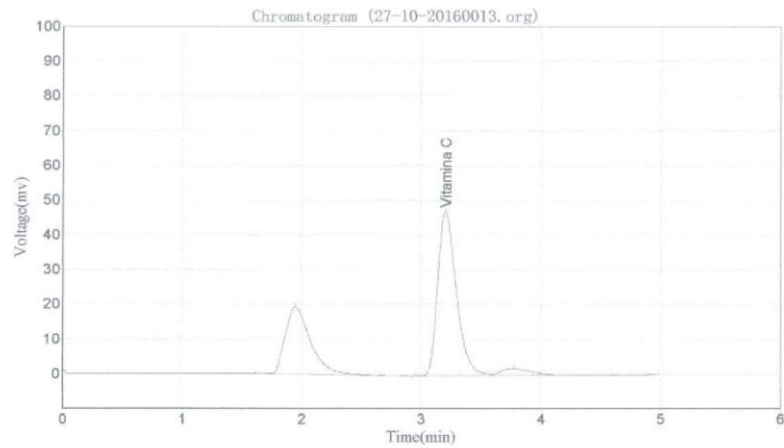
2017-05-02

N2000

Vitamina C. Estandar 4. Curva 1

Date/Time: 2016-10-27,16:05:30
 Data File: C:\N2000\data\vitamina C validacion\nuevas
 curvas\27-10-2016\27-10-20160013.org

Analyst: Sofia Aguirre
 Date/Time: 2017-05-02,11:53:06
 Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,948	19233,904	282908,563	34,0605
2	Vitamina C	3,207	47201,398	513597,469	61,8340
3		3,773	1982,840	34100,922	4,1055
Total			68418,143	830606,953	100,0000

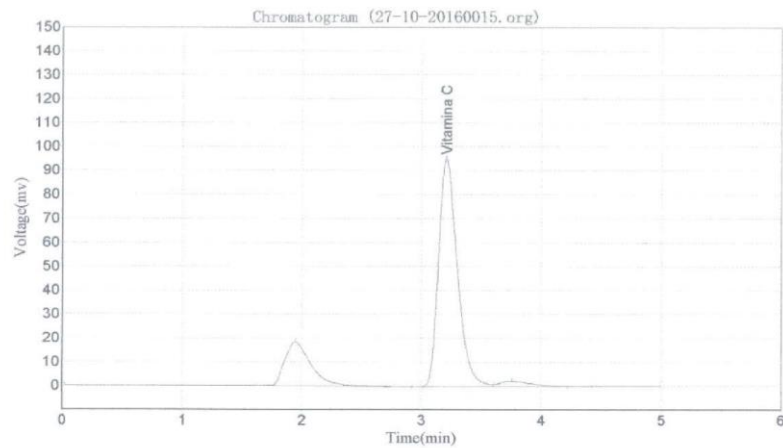
2017-05-02

N2000

Vitamina C. Estandar 5. Curva 1

Date/Time: 2016-10-27,16:16:23
 Data File: C:\N2000\data\vitamina C validacion\nuevas
 curvas\27-10-2016\27-10-20160015.org

Analyst: Sofia Aguirre
 Date/Time: 2017-05-02,11:54:54
 Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,948	18110,500	272261,313	20,2132
2	Vitamina C	3,207	95053,492	1037317,563	77,0126
3		3,757	2130,471	37366,473	2,7742
Total			115294,463	1346945,348	100,0000

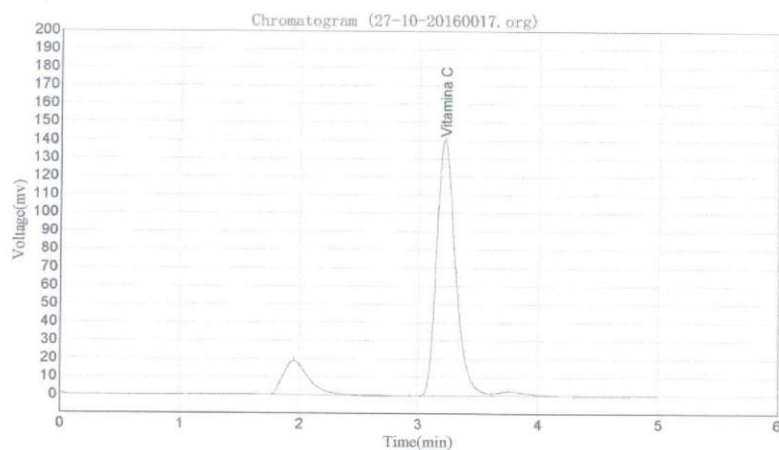
2017-05-02

N2000

Vitamina C. Estandar 6. Curva 1

Date/Time: 2016-10-27,16:27:17
Data File: C:\N2000\data\vitamina C validacion\nuevas
curvas\27-10-2016\27-10-20160017.org

Analyst: Sofia Aguirre
Date/Time: 2017-05-02,11:56:07
Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,957	18592,709	275742,906	14,8928
2	Vitamina C	3,215	140106,203	1534558,375	82,8809
3		3,748	2275,601	41220,738	2,2263
Total			160974,513	1851522,020	100,0000

2017-05-02

N2000

MUESTRAS DE REFERENCIA

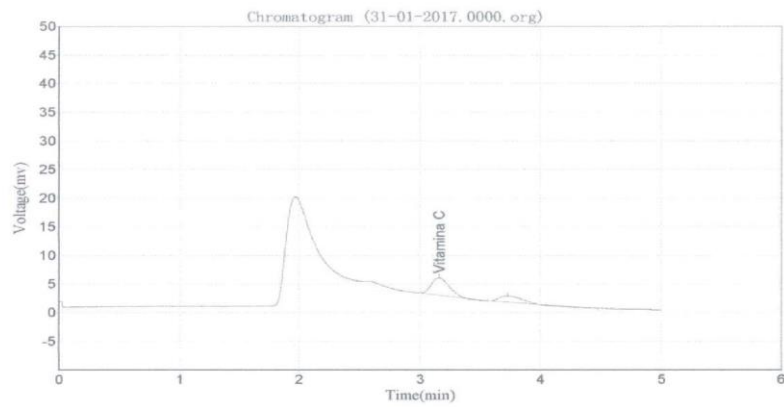
Ecuachemlab Cia Ltda

1

Vitamina C MR-25

Date/Time: 2017-01-31, 16:13:44
Data File: F:\sofia\31-01-2017.0000.org
Method File: G:\Método Captan OK.mtd

Analyst: Sofia Aguirre
Date/Time: 2017-05-02, 13:07:19
Quantification: Area/ESTD



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	Vitamina C	3,160	3046,372	29821,801	0,0028
2		3,728	1129,452	11706,550	3,6936
Total			4175,824	41528,351	3,6964

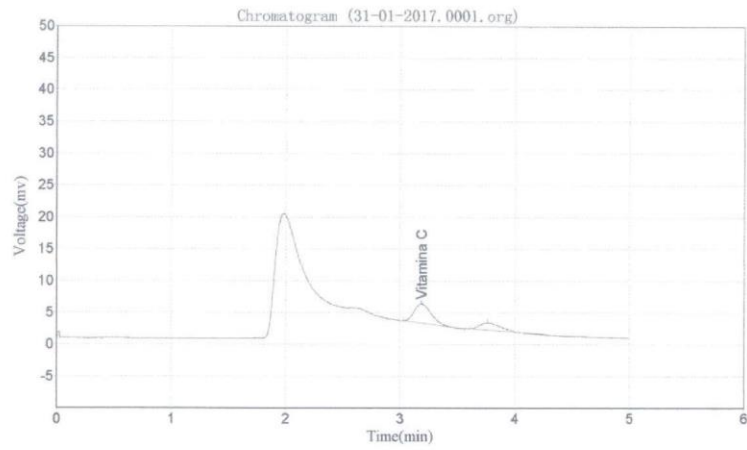
2017-05-02

N2000

Vitamina C MR-25

Date/Time: 2017-01-31, 16:19:08
Data File: F:\sofia\31-01-2017.0001.org
Method File: G:\Método Captan OK.mtd

Analyst: Sofia Aguirre
Date/Time: 2017-05-02, 13:09:01
Quantification: Area/ESTD



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	Vitamina C	3,185	2986,287	29484,246	0,0028
2		3,760	1121,333	13703,698	28,5222
Total			4107,620	43187,944	28,5250

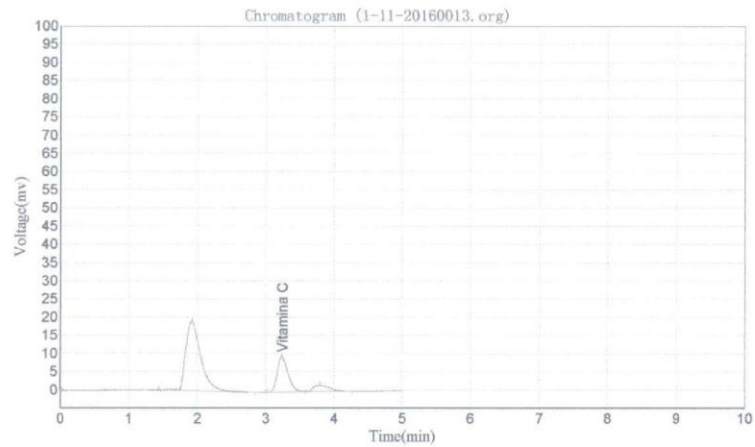
2017-05-02

N2000

Vitamina C MR-20

Date/Time: 2016-11-01, 14:40:05
Data File: F:\sofia\1-11-20160013.org
Method File: G:\Método Captan OK.mtd

Analyst: Sofia Aguirre
Date/Time: 2017-05-02, 13:01:37
Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,440	169,439	1354,841	0,3123
2		1,923	19113,418	294057,781	67,7776
3	Vitamina C	3,248	9688,047	107310,484	24,7341
4		3,798	1825,612	31133,955	7,1761
Total			30796,515	433857,062	100,0000

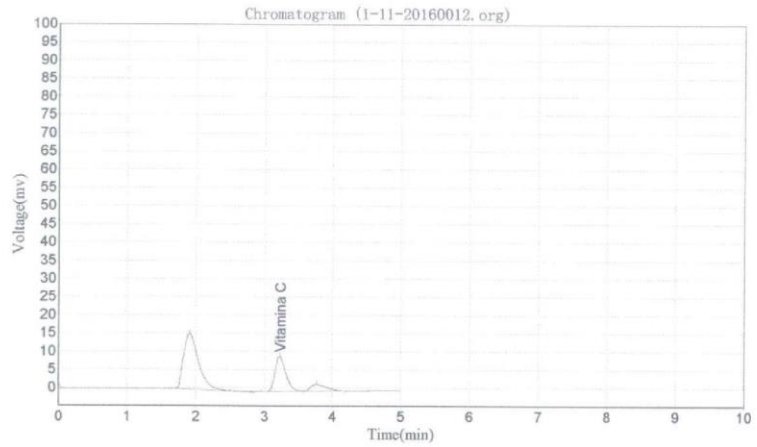
2017-05-02

N2000

Vitamina C MR-20

Date/Time: 2016-11-01,14:34:41
 Data File: F:\sofia\1-11-20160012.org
 Method File: G:\Método Captan OK.mtd

Analyst: Sofia Aguirre
 Date/Time: 2017-05-02,13:00:50
 Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,915	15345,496	229923,406	62,7741
2	Vitamina C	3,232	9675,000	105703,250	28,8593
3		3,773	1837,652	30644,318	8,3666
Total			26858,148	366270,975	100,0000

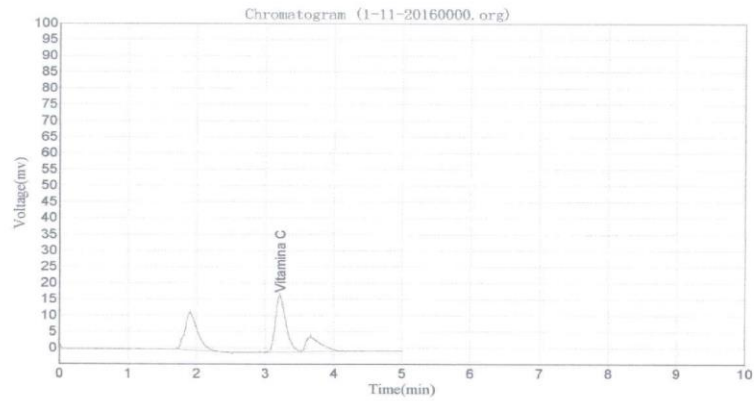
2017-05-02

N2000

Vitamina C MR-16

Date/Time: 2016-11-01,13:03:30
Data File: F:\sofia\1-11-20160000.org
Method File: G:\Método Captan OK.mtd

Analyst: Sofia Aguirre
Date/Time: 2017-05-02,12:58:40
Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,907	11363,814	148076,500	36,5326
2	Vitamina C	3,215	17205,627	188227,516	46,4384
3		3,665	4425,437	69023,148	17,0290
Total			32994,878	405327,164	100,0000

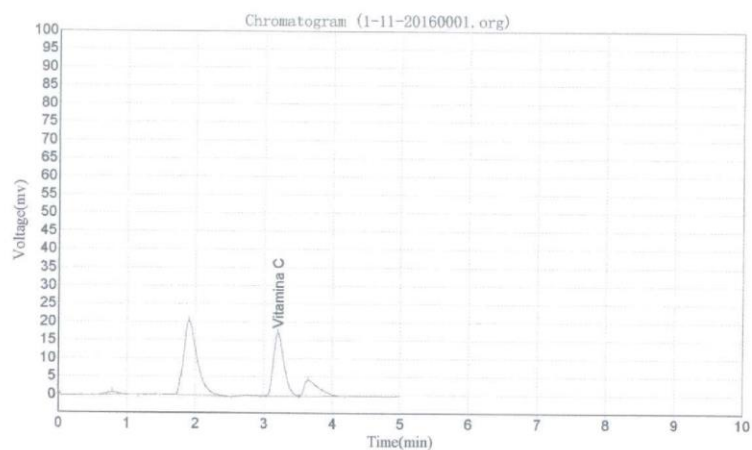
2017-05-02

N2000

Vitamina C MR-16

Date/Time: 2016-11-01,13:08:53
Data File: F:\sofia\1-11-20160001.org
Method File: G:\Método Captan OK.mtd

Analyst: Sofia Aguirre
Date/Time: 2017-05-02,12:59:51
Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		0,783	809,669	12317,800	2,2275
2		1,907	20506,537	286074,656	51,7336
3	Vitamina C	3,208	17542,520	187349,203	33,8802
4		3,647	4513,435	67234,469	12,1587
Total			43372,161	552976,128	100,0000

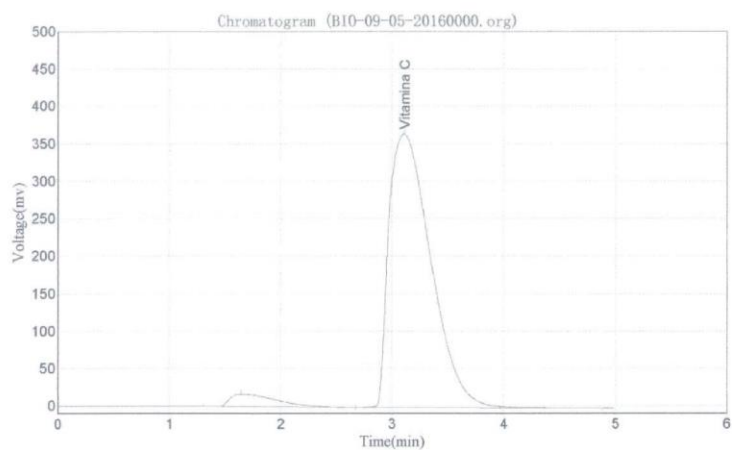
2017-05-02

N2000

vitamina C MR-10

Date/Time: 2016-05-09, 11:33:17
Data File: F:\sofia\B10-09-05-20160000.org
Method File: G:\Método Captan OK.mtd

Analyst: Sofia Aguirre
Date/Time: 2017-05-02, 13:04:14
Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,648	16796,000	483824,094	4,8657
2	Vitamina C	3,115	364973,594	9459705,000	95,1343
Total			381769,594	9943529,094	100,0000

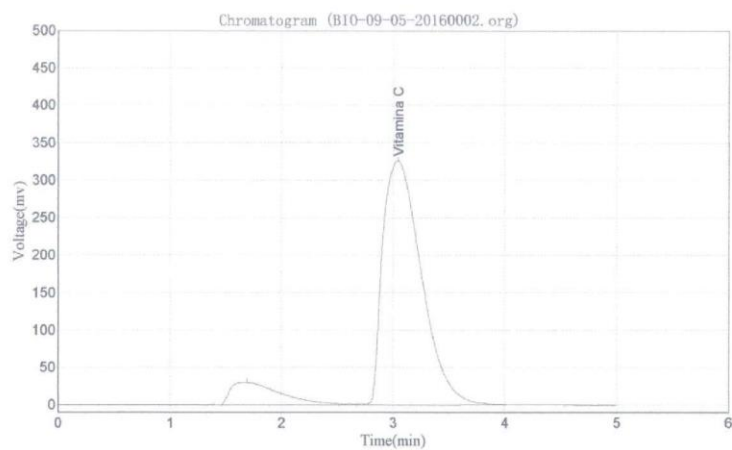
2017-05-02

N2000

Vitamina C MR-10

Date/Time: 2016-05-09, 11:48:14
Data File: F:\sofia\B10-09-05-20160002.org
Method File: G:\Método Captan OK.mtd

Analyst: Sofia Aguirre
Date/Time: 2017-05-02, 13:05:32
Quantification: Area/Area%



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,690	30573,059	986611,875	11,1172
2	Vitamina C	3,040	326362,313	7888019,000	88,8828
Total			356935,371	8874630,875	100,0000


2017-05-02


N2000

ANEXO B

CERTIFICADOS DE CALIBRACIÓN

BURETA

 **INEN** Nº 11617 CALIBRADO
C.D. EAFQ-028
Fecha: 2016-07-15
Volumen: 56

 Servicio Ecuatoriano de Normalización

**LABORATORIO NACIONAL DE METROLOGÍA
CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN**

DIVISIÓN FLUIDOS
Laboratorio de Volumen

Número de certificado: LNM-V-2016-359 Adhesivo N°: 11 617
Fecha de Calibración: 2016-07-15

Instrumento de Medida: BURETA DE VIDRIO
Marca: PYREX
Modelo o Tipo: 2103
Serie: xxxxxxxxxxxx
Intervalo de Medida: 25 ml
División de Escala: 0,1 ml
Clase: A

Código de Identificación: EAFQ-028
Propietario: ECUACHEMLAB LABORATORIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL
ECUADOR CÍA. LTDA
Dirección: Quito, Pasaje S/N N3-62 y Simóm Bolívar, Urb. La Armenia 1, Puente 9, Valle de
Los Chillos.
Observaciones: xxxxxxxxxxxx

El Servicio Ecuatoriano de Normalización, realizó en el Laboratorio de Volumen del LNM, la calibración del instrumento arriba descrito, utilizando patrones de referencia trazables a la unidad de masa del Sistema Internacional de Unidades SI, y al patrón nacional pertenecientes al Laboratorio Nacional de Metrología.

La calibración fue realizada bajo un Sistema de Gestión de la Calidad conforme con la NTE INEN-ISO/IEC 17 025:2006.

Los resultados de la calibración y su incertidumbre se exponen en las páginas siguientes y son parte de este documento, además se refieren al momento y condiciones en que se realizó la calibración.

El LNM no se responsabiliza de los perjuicios que pueda ocasionar el uso inadecuado del instrumento calibrado.

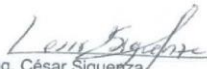
Es responsabilidad del cliente establecer la fecha de una nueva calibración del instrumento. El tiempo de validez de los resultados contenidos en este Certificado, depende tanto de las características del instrumento como de las prácticas de manejo y uso.

El usuario está obligado a tener el instrumento recalibrado en intervalos apropiados.

El presente certificado de calibración certifica los valores obtenidos expresados como los resultados de las calibraciones y no constituye un certificado de aptitud para el uso del patrón, instrumento o equipo.

Este documento no significa certificación de calidad y no debe ser utilizado con fines publicitarios. Prohibida su reproducción parcial, la reproducción total deberá hacerse con la autorización escrita de la Dirección Ejecutiva.

Fecha de emisión: 2016-07-25


Ing. César Siguerza
Director Técnico de Metrología (S)

Propietario: ECUACHEMLAB LABORATORIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL ECUADOR CÍA. LTDA
 Número de certificado: LNM-V-2016-359
 Fecha de Calibración: 2016-07-15

CONDICIONES AMBIENTALES DEL ENSAYO

TEMPERATURA: (20 ± 3) °C
 PRESIÓN ATM.: (733 a 747) hPa
 HUMEDAD REL.: (50 ± 10) %

MÉTODO UTILIZADO: LNM PC 13, Procedimiento para calibración de recipientes volumétricos método gravimétrico, basado en la Norma Internacional ISO 4 787, Material volumétrico - Métodos de prueba para la capacidad y para el uso

INCERTIDUMBRE DE MEDIDA: La incertidumbre expandida de medida informada se ha obtenido multiplicando la incertidumbre estándar de medida por el factor de cobertura k=2 que, para una distribución normal corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente el 95%; y, se le estimó de acuerdo al documento "Guide to the Expression of the Uncertainty in Measurement" de la ISO.

EQUIPO UTILIZADO: Balanza Mettler Toledo XP504, capacidad 520g, resolución 0,1mg; certificado: LNMI-PyM-2015-006

PATRÓN UTILIZADO: Agua des ionizada.

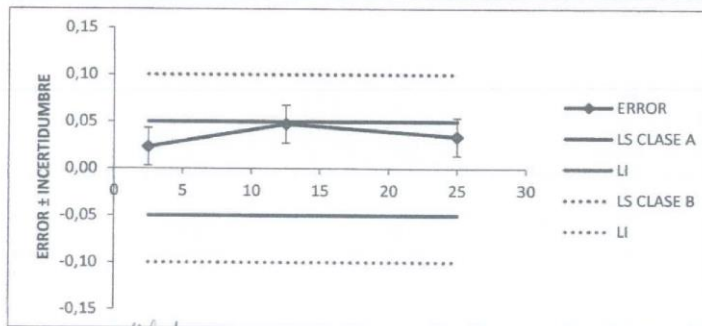
ESTADO DE RECEPCIÓN DEL INSTRUMENTO

Marcas de escala visibles	Conforme
Libre de impurezas adheridas al recipiente	Conforme
No presenta roturas ni rajaduras	Conforme

Nota:

RESULTADOS OBTENIDOS

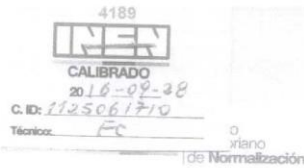
VOLUMEN NOMINAL ml	VOLUMEN MEDIDO (20°C) ml	ERROR ml	ERROR MÁXIMO PERMITIDO (ISO 385:2005)		INCERTIDUMBRE (k=2) ± ml
			Clase A ± ml	Clase B ± ml	
2,5	2,52	0,02	0,05	0,10	0,02
12,5	12,55	0,05	0,05	0,10	0,02
25	25,03	0,03	0,05	0,10	0,02



Calibrado por: 

Revisado por: 

BALANZA



LABORATORIO NACIONAL DE METROLOGÍA CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

DIVISIÓN MECÁNICA

Laboratorio de Pesas y Medidas

Número de certificado: LNM-PyM-2016-1056

Adhesivo N°: 4189

Fecha de Calibración: 2016-09-28

Instrumento de Medida: BALANZA

Marca: METTLER TOLEDO

Modelo o Tipo: AX 205 Delta Range

Serie: 1125061710

Capacidad: 220 g

División de escala Real (d): 0,0001 g

Div. de escala de Verif. (e): 0,001 g

Dispositivo de lectura: Digital

Clase de exactitud: I

Código de Identificación: EAFQ-009

Propietario: ECUACHEMLAB LABORATORIO QUÍMICO MICROBIOLÓGICO DEL ECUADOR CIA. LTDA.

Dirección: Pasaje s/n N3-62 y Simón Bolívar Urb. La Armenia 1 Puente 9

Localización: Área Físico Químico Sección Preparación de Muestras

Observaciones: *****

(0 a 80) g d=0,00001 g e= 0,001 g
> 80 g a 220 g d=0,0001 g e= 0,001 g

Declaración de conformidad: La balanza se aprueba en el rango ensayado

El Servicio Ecuatoriano de Normalización, realizó en las instalaciones de la empresa, la calibración de la balanza arriba descrita, utilizando Patrones de referencia trazables a la unidad de masa del Sistema Internacional de Unidades, SI, y al patrón nacional, pertenecientes al Laboratorio Nacional de Metrología.

La calibración fue realizada bajo un Sistema de Gestión de la Calidad conforme con la NTE INEN-ISO/IEC 17025:2006

Los resultados de la calibración y su incertidumbre se exponen en las páginas siguientes y son parte de este documento además se refieren al momento y condiciones en que se realizó la calibración.

El LNM no se responsabiliza de los perjuicios que pueda ocasionar el uso inadecuado del instrumento calibrado.

Es responsabilidad del cliente establecer la fecha de una nueva calibración del instrumento. El tiempo de validez de los resultados contenidos en este certificado, depende tanto de las características del instrumento como de las prácticas de manejo y uso.

El usuario está obligado a tener el instrumento recalibrado en intervalos apropiados.

El presente certificado de calibración certifica los valores obtenidos expresados como los resultados de las calibraciones y no constituye un certificado de aptitud para el uso del patrón, instrumento o equipo.

Este documento no significa certificación de calidad y no debe ser utilizado con fines publicitarios. Prohibida su reproducción parcial, la reproducción total deberá hacerse con la autorización escrita de la Dirección Ejecutiva.

Fecha de emisión: 2016-09-19

Sr. Alberto Terán

Jefe del Laboratorio de Pesas y Medidas

Propietario: ECUACHEMLAB LABORATORIO QUÍMICO MICROBIOLÓGICO DEL ECUADOR CIA. LTDA.
 Número de certificado: LNM-PyM-2016-1056
 Fecha de Calibración: 2016-09-28



Método utilizado: Procedimiento para la calibración de instrumentos para pesar de funcionamiento no automático LNM PC 27
Referencias: Los resultados de los ensayos de excentricidad, carga y repetibilidad son evaluados con los **errores máximos permitidos, e.m.p.**, establecidos en la norma NTE INEN -OIML R 76-1:2013

Patrones utilizados: Pesas de clase F1 Certificado de Calibración: LNMI-M-2016-058

1. ENSAYO DE EXCENTRICIDAD (Exc.)

	Posición 1 g	Posición 2 g	Posición 3 g	Posición 4 g	Exc. Máx. g	e.m.p. g
Lectura	49,99990	49,99982	49,99985	49,99988	0,00008	± 0,001

2. ENSAYO DE CARGA

	CARGA g	LECTURA ASC. g	LECTURA DESC. g	ERROR ASC. g	ERROR DESC. g	HISTERESIS g	e.m.p. g
1	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	± 0,001
2	0,10001	0,10002	0,10001	0,00001	0,00000	-0,00001	
3	0,20001	0,20001	0,20004	0,00000	0,00003	0,00003	
4	0,30002	0,30002	0,30004	0,00000	0,00002	0,00002	
5	0,50001	0,50004	0,50007	0,00003	0,00006	0,00003	
6	0,99999	1,00007	1,00007	0,00008	0,00008	0,00000	
7	1,99998	1,99999	1,99997	0,00001	-0,00001	-0,00002	
8	2,99997	3,00002	3,00001	0,00005	0,00004	-0,00001	
9	4,99998	4,99998	5,00008	0,00000	0,00010	0,00010	
10	9,99998	9,99996	10,00004	-0,00002	0,00006	0,00008	
11	19,99996	19,99996	19,99998	0,00000	0,00002	0,00002	
12	29,99995	29,99993	29,99991	-0,00002	-0,00004	-0,00002	
13	49,99998	49,99982	49,99982	-0,00016	-0,00016	0,00000	↓
14	99,9996	99,9993	99,9992	-0,0003	-0,0004	-0,0001	± 0,002
15	199,9997	199,9991	199,9989	-0,0006	-0,0008	-0,0002	↓
16							

3. ENSAYO DE REPETIBILIDAD

Capacidad	Lectura 1 g	Lectura 2 g	Lectura 3 g	Lectura 4 g	Lectura 5 g	Lectura 6 g
MEDIA	99,9992	99,9992	99,9993	99,9993	99,9992	99,9992

Capacidad g	Dif. Máx. g	e.m.p. g
MEDIA	0,0001	± 0,002

Incertidumbre de calibración: 0,00026 g K = 2

EVALUACIÓN

Ensayos	Excent.	Carga	Repet.
Cumplimiento con e.m.p.	Cumple	Cumple	Cumple

CONCLUSIÓN:	LA BALANZA SE APRUEBA EN EL RANGO ENSAYADO		
OBSERVACIONES:	*****		
Calibrado por:		Revisado por:	
	Tigo Francisco Cevallos Técnico del Laboratorio		Sr. Alberto Terán Jefe del Lab. de P y M

Propietario: ECUACHEMLAB LABORATORIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL ECUADOR CÍA. LTDA
 Número de certificado: LNM-V-2016-359
 Fecha de Calibración: 2016-07-15

CONDICIONES AMBIENTALES DEL ENSAYO

TEMPERATURA: (20 ± 3) °C
 PRESIÓN ATM.: (733 a 747) hPa
 HUMEDAD REL.: (50 ± 10) %

MÉTODO UTILIZADO: LNM PC 13, Procedimiento para calibración de recipientes volumétricos método gravimétrico, basado en la Norma Internacional ISO 4 787, Material volumétrico - Métodos de prueba para la capacidad y para el uso

INCERTIDUMBRE DE MEDIDA: La incertidumbre expandida de medida informada se ha obtenido multiplicando la incertidumbre estándar de medida por el factor de cobertura k=2 que, para una distribución normal corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente el 95%; y, se le estimó de acuerdo al documento "Guide to the Expression of the Uncertainty in Measurement" de la ISO.

EQUIPO UTILIZADO: Balanza Mettler Toledo XP504, capacidad 520g, resolución 0,1mg; certificado: LNMI-PyM-2015-006

PATRÓN UTILIZADO: Agua des ionizada.

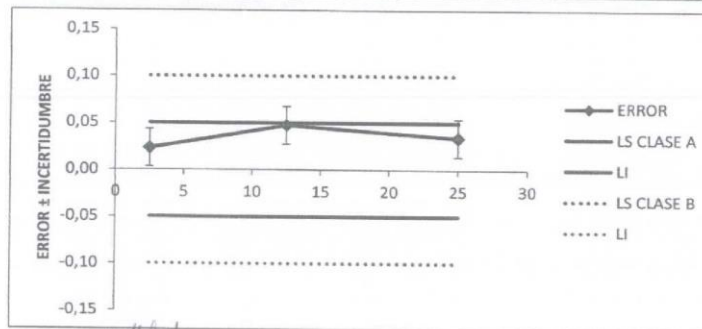
ESTADO DE RECEPCIÓN DEL INSTRUMENTO

Marcas de escala visibles	Conforme
Libre de impurezas adheridas al recipiente	Conforme
No presenta roturas ni rajaduras	Conforme

Nota:

RESULTADOS OBTENIDOS

VOLUMEN NOMINAL ml	VOLUMEN MEDIDO (20°C) ml	ERROR ml	ERROR MÁXIMO PERMITIDO (ISO 385:2005)		INCERTIDUMBRE (k=2) ± ml
			Clase A ± ml	Clase B ± ml	
2,5	2,52	0,02	0,05	0,10	0,02
12,5	12,55	0,05	0,05	0,10	0,02
25	25,03	0,03	0,05	0,10	0,02



Calibrado por: [Firma]

Revisado por: [Firma]

ANEXO C

INSTALACION DE EQUIPOS HPLC

BLADIMIR ACOSTA
EQUIPOS Y REACTIVOS

CERTIFICADO DE INSTALACION No. 0003502015

FECHA ACTIVIDAD		
27	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
TEFONO	2592898 / 0999441402	TELEFONO	026007470
E-MAIL	bladyacosta@gmail.com	E-MAIL	ecuachemlab@gmail.com

HPLC 002

DESCRIPCION GENERICA			
EQUIPO	BOMBA	No DE SERIE	291N30901701
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 UV VIS	No DE SERIE	292N3090604
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	

ENERGIA DE LAMPARAS

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

DESCRIPCION GENERICA			
EQUIPO	DETECTOR INDICE DE REFRACCION	No DE SERIE	2822JO1221
MARCA	HEWLETT PACKARD	TEMP. AMBIENTE	25°C
MODELO	HP 1047 A	HUMEDAD AMBIENTE	45%

DESCRIPCION DE ACTIVIDADES	
<ul style="list-style-type: none"> • 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	AUTOMUESTREADOR	No DE SERIE	293N0102807
MARCA	PERKIN ELMER	TEMP. AMBIENTE	25°C
MODELO	SERIE 200	HUMEDAD AMBIENTE	45%

DESCRIPCION DE ACTIVIDADES	
<ul style="list-style-type: none"> • 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 GENERICA			
EQUIPO	HORNO DE COLUMNA	No DE SERIE	OVI010615572
MARCA	PERKIN ELMER	TEMP. AMBIENTE	25°C
MODELO	SERIE 200	HUMEDAD AMBIENTE	45%

DESCRIPCION DE ACTIVIDADES	
<ul style="list-style-type: none"> • 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	1100797
MARCA	PERKIN ELMER	TEMP. AMBIENTE	25°C
MODELO	SERIE 200	HUMEDAD AMBIENTE	45%

DESCRIPCION DE ACTIVIDADES	
<ul style="list-style-type: none"> • 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: Azúcares

Dato No	Área	Tiempo Retención	Cromatograma
1	180444,406	7,923	Azucares260820150013
2	178738,406	7,932	Azucares260820150014
3	175832,797	7,923	Azucares260820150015
4	177492,406	7,915	Azucares260820150016
5	177121,406	7,915	Azucares260820150017
6	176146,297	7,915	Azucares260820150018
Media	177629,2863	7,9205	
Desvest	1723,853539	0,006862944	
CV %	0,970478222	0,086647863	

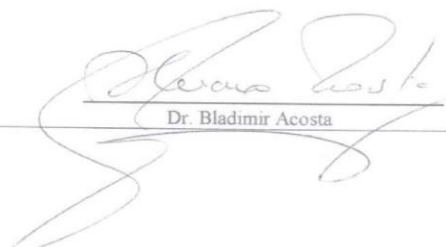
PARAMETROS	PASA	NO PASA
SDR <5%	X	

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 D

CERTIFICADO DEL ESTÁNDAR



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

L-Ascorbic acid

CATALOG NUMBER	N-12301-1G
LOT NUMBER	3489400
DATE CERTIFIED	01/08/15
EXPIRATION DATE	01/31/22
CAS NUMBER	50-81-7
MOLECULAR FORMULA	C6H8O6
MOLECULAR WEIGHT	176.12
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

Chem Service, Inc. guarantees the purity to be +/- 0.5% deviation prior to the expiration date shown on the label and exclusive of any customer contamination.

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 9002:2008



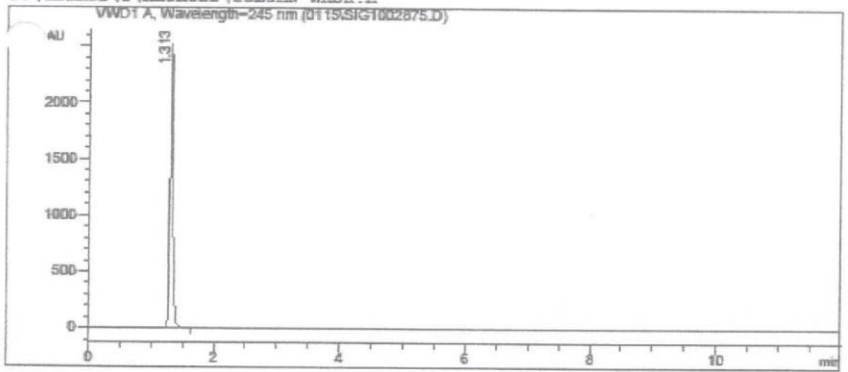


660 Tower Lane • P O Box 599 • West Chester, PA 19381-0599
 1-800-452-9994 • 1-610-692-3026 • Fax 1-610-692-8729
 info@chemservice.com • www.chemservice.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Injection Date : Thu, 8. Jan. 2015 Location : Vial I
 Sample Name : N-12201 Inj. No. : 0
 Acq Operator : Inj. Vol. : 1 µl
 Column : Eclipse XDB-C18 4.6mm X 150mm 5µm

C:\Chem22\1\METHODS\COLUMN WASH.M



Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm

Peak	RT [min]	Type	Width [min]	Area	Area %
1	1.213	BB	0.055	8789.846	100.000


Chem Service, Inc. is accredited to ISO Guide 34:2009, ISO/IEC 17025:2005 and certified to ISO 9001:2008



ANEXO E


CERTIFICADO MATERIAL VOLUMETTRICO

BALON DE 25 mL

www.glasscolabs.com
VOLUMETRIC FLASK CLASS A 
ISO 9001:2008

CATALOGUE NO	: 130.202.03
NOMINAL VOLUME	: 25.00 ml
TOLERANCE	: ± 0.040 ml
COMPLIANCE	: ISO 1042:1998
BATCH NO	: 09.14
MEAN VOLUME	: 24.997 ml
STANDARD DEVIATION	: 0.007 ml
TESTING DEVICE NAME	: SARTORIUS
BALANCE	: ABAL-10.420g/0.001g
WEIGHTS	: 25g
THERMOMETER	: DM-18;-50 to300 DEG C/0.1DEG C
OPERATOR	: BINDU
DATE OF ISSUE	: 02.09.14

BATCH TEST CERTIFICATE
Batch tested in ISO 17025:2005 certified laboratory.

www.glasscolabs.com
VOLUMETRIC FLASK CLASS A 
ISO 9001:2008

CATALOGUE NO	: 130.202.03
NOMINAL VOLUME	: 25.00 ml
TOLERANCE	: ± 0.040 ml
COMPLIANCE	: ISO 1042:1998
BATCH NO	: 09.14
MEAN VOLUME	: 24.997 ml
STANDARD DEVIATION	: 0.007 ml
TESTING DEVICE NAME	: SARTORIUS
BALANCE	: ABAL-10.420g/0.001g
WEIGHTS	: 25g
THERMOMETER	: DM-18;-50 to300 DEG C/0.1DEG C
OPERATOR	: BINDU
DATE OF ISSUE	: 02.09.14

BATCH TEST CERTIFICATE
Batch tested in ISO 17025:2005 certified laboratory.

BALÓN 50 mL

www.glasscolabs.com

VOLUMETRIC FLASK CLASS A

CATALOGUE NO	:	130.202.04
NOMINAL VOLUME	:	50.00 ml
TOLERANCE	:	±0.080 ml
COMPLIANCE	:	ISO 1042:1998
BATCH NO	:	09.14
MEAN VOLUME	:	
CONTAINED	:	49.989 ml
STANDARD DEVIATION	:	0.012 ml
TESTING DEVICE NAME	:	SARTORIUS
BALANCE	:	ABAL-10,420g/0.001g
WEIGHTS	:	50g
THERMOMETER	:	DM-18;-50 to300 DEG C/0.1DEG C
OPERATOR	:	BINDU
DATE OF ISSUE	:	02.09.14



ISO 9001:2008

BATCH TEST CERTIFICATE
Batch tested in ISO 17025:2005 certified laboratory.

www.glasscolabs.com

VOLUMETRIC FLASK CLASS A

CATALOGUE NO	:	130.202.04
NOMINAL VOLUME	:	50.00 ml
TOLERANCE	:	±0.080 ml
COMPLIANCE	:	ISO 1042:1998
BATCH NO	:	09.14
MEAN VOLUME	:	
CONTAINED	:	49.989 ml
STANDARD DEVIATION	:	0.012 ml
TESTING DEVICE NAME	:	SARTORIUS
BALANCE	:	ABAL-10,420g/0.001g
WEIGHTS	:	50g
THERMOMETER	:	DM-18;-50 to300 DEG C/0.1DEG C
OPERATOR	:	BINDU
DATE OF ISSUE	:	02.09.14




ISO 9001:2008

BATCH TEST CERTIFICATE
Batch tested in ISO 17025:2005 certified laboratory.

BALON DE 200 mL

www.glassolabs.com
VOLUMETRIC FLASK CLASS A

CA LOGUE NO	:	130.202.06	
NOMINAL VOLUME	:	200.00 ml	
TOLERANCE	:	±0.15 ml	
COMPLIANCE	:	ISO 1042/DIN 12664	
BATCH NO	:	11.10	
MEAN VOLUME	:	199.948 ml	
CONTAINED	:	0.033 ml	
STANDARD DEVIATION	:	SARTORIUS	
TESTING DEVICE NAME	:	ABAL-03,420g/0.001g	
BALANCE	:	AUTO	
WEIGHTS	:	DM-05; -50 to 150	
THERMOMETER	:	DEG C/0.1DEG C	
OPERATOR	:	MONCA	
DATE OF ISSUE	:	11.01.11	

BALÓN DE 500 mL

DURAN® Charakterzertifikat Batch Certificates

Artikelbezeichnung
Article description

DURAN® MESSKOLBEN (NS 1926)
DURAN® VOLUMETRIC FLASK (NS 1926)

Artikelnummer
Item No.

216784406

Chargennummer
Batch No.

13.06

Nennvolumen
Nominal volume

500,0000 ml

Toleranz
Tolerance

± 0,2500 ml
DIN EN ISO 1042

Mittelwert
Mean value

500,0054 ml

Standardabweichung
Standard deviation

0,0255 ml

Prüfmittel
Testing devices

Waage
Balance
Thermometer
Thermometer

LA32000
3200 g
0,001 g
GTMU-IP1
+15...35 °C
0,2 % MB

Prüfer
Operator

U. Below

Ausstellungsdatum
Date of issue

02.10.2013



DURAN Group GmbH
Ulmo-Scholz-Straße 21
37372 Wernheim/Man

www.duran-group.com

ANEXO F

**INSTRUCTIVO
PROCEDIMIENTO PA-FQ 206**

ECUACHEMLAB Cía. Ltda. Laboratorio Químico y Microbiológico del Ecuador		
PROCEDIMIENTO DE ANALISIS	Edición:	01
	Documento:	PA-FQ-206
	Página:	1 de 5
DETERMINACION DE VITAMINA C (Ácido Ascórbico) METODO CROMATOGRAFICO HPLC		

1. OBJETIVO:

Establecer las directrices necesarias para realizar la determinación de Vitamina C (ácido ascórbico) en alimentos por cromatografía HPLC.

2. ALCANCE

Es aplicable a todos los alimentos de:

- Cereales y derivados
- Frutas y derivados
- Y en cualquier tipo de muestra donde el método sea aplicable.

3. PRINCIPIO

Consiste en la extracción de la Vitamina C (Ácido ascórbico) de la muestra formando un complejo con ácido acético y ácido meta fosfórico, liberando el ácido ascórbico de la muestra, para luego ser leído por HPLC, principio activo que es detectado por una longitud de onda de 254 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, antes de realizar el tratamiento de la muestra.

5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

- No determinado

6. RANGO DE TRABAJO

- No determinado

Elaborado por:  Quim. Al. Tania Bastidas Jefe Área Físico Químico	Revisado por:  Quim. Al. Gabriela Delgado Gerencia de Calidad	Aprobado por:  Dr. Bladimir Acosta Gerencia General
---	---	---

PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

Edición:	01
Documento:	PA-FQ-206
Página:	2 de 5

**DETERMINACION DE VITAMINA C (Ácido Ascórbico)
METODO CROMATOGRAFICO HPLC**

7. EQUIPOS

- Balanza Analítica EAFQ - 009
- Licuadora EFQ - 017
- HPLC EAFQ - 022
- Ultrasonido EAFQ - 003
- Pipeta automática EAFQ - 006
- Columna C18 250 x 150 mm, 5µm
- Papel filtro
- Balones aforados de 50 ml y 25 ml
- Viales para Hplc
- Micro filtro de poro 0,45 µm

8. REACTIVOS

- Agua grado I
- Ácido meta Fosfórico
- Ácido Acético Glacial
- Fosfato di ácido de Potasio

9. MATERIALES DE REFERENCIA

- Estándar de Ácido Ascórbico MR - 39

10. 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.

11. PROCEDIMIENTO

11.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Solución de Ácido Acético Glacial: En un balón aforado de 200 ml agregar 40 ml de ácido acético Glacial y llevar a volumen con agua grado I.

Solución Extractora: pesar aproximadamente 15 g de Ácido Meta fosfórico, disolver con 200 ml de la solución de Ácido Acético en un balón de 500ml, llevar al ultrasonido hasta que se disuelva completamente y luego aforar con agua grado I.

PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

Edición:	01
Documento:	PA-FQ-206
Página:	3 de 5

**DETERMINACION DE VITAMINA C (Ácido Ascórbico)
METODO CROMATOGRAFICO HPLC**

Fosfato di ácido de Potasio 0,1 M: pesar 13,6 g y aforar con agua grado I en un balón de 1000 ml, llevar a pH 2,5 con Acido Fosfórico.

11.2 PREPARACIÓN DEL ESTANDAR:

- Pesar alrededor de 25 mg de estándar de Ácido Ascórbico en un balón volumétrico de 50 ml y disolver con solución extractora.
- Ultrasonar por 10 minutos o hasta disolución, retirar y enfriar; después llevar a volumen, tomar una alícuota de 1 ml a un balón aforado de 10 ml y enrazar con solución extractora, micro filtrar en micro filtro de poro de 0,45 µm y leer.

$$C_{ST} \text{ (mg/ml)} = \frac{g_{\text{estándar}} * 1 * \text{alícuota}_1 * 1000}{\text{Aforo}_1 * \text{Aforo}_2}$$

Dónde:

$C_{\text{STACIDO ASCORBICO}}$ = concentración del estándar en mg/ml
 $g_{\text{estándar}}$ = peso en gramos de estándar
 Aforo_1 = primer aforo (50 ml)
 alícuota_1 = primera alícuota (1 ml)
 Aforo_2 = segundo aforo (10 ml)

11.3 PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN:

- De la solución anterior preparar 4 estándares acorde a la siguiente tabla:

Estándar de Ácido Ascórbico	Alícuota (ml)	Concentración (mg/ml)
1	0.1	0.005
2	0.5	0.025
3	2.5	0.125
4	5.0	0.250
5	7.5	0.375

- Las alícuotas anteriores, aforar en balones volumétricos de 10 ml con solución extractora, ultrasonar durante 5 minutos, microfiltrar y colocar en viales.

ECUACHEMLAB Cía. Ltda.
Laboratorio Químico y Microbiológico del Ecuador

PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

Edición:	01
Documento:	PA-FQ-206
Página:	4 de 5

**DETERMINACION DE VITAMINA C (Ácido Ascórbico)
METODO CROMATOGRAFICO HPLC**

11.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

- Pesar alrededor de 1g de muestra cuando la muestra sea sólida en un balón aforado de 25 ml.
- Cuando la muestra sea líquida pesar alrededor de 2g en un balón aforado de 25 ml.
- Llevar al ultrasonido por 5 minutos o hasta disolución de la muestra, retirar la muestra y dejar que se enfríe, inmediatamente llevar a volumen con solución extractora.
- Filtrar por papel filtro normal y tomar una alícuota de muestra para micro filtrar por micro filtro de poro 0.45 μ m y leer.

11.5 CONDICIONES CROMATOGRAFICAS:

Columna: C18 250 x 150 mm, 5 μ m
Temperatura: 30°C
Fase Móvil: Fosfato di acido de potasio 0.1m (pH: 2.5): Agua grado I (90:10)
Flujo: 0,5 ml/min
Detección: UV 254 nm
Volumen de Inyección: 5 μ l

12. CALCULO Y REPORTE DE RESULTADOS

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

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

13. CRITERIO DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

- La determinación se hace con una sola medida, se asegura el resultado mediante el Programa de Aseguramiento de Resultados P-01-5.9, y se aplicarán los criterios para cada prueba.

ANEXO G

CERTIFICADOS DE ANÁLISIS

Ácido meta fosfórico



ISO 9001-2008 REGISTERED

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name :- meta-PHOSPHORIC ACID AR
Mol. Formula :- $(\text{HPO}_3)_n$
Code no. :- 05256
CAS No. :- 37267-86-0
Lot no. :- A100741406
Mfg date :- JUN-2014
Exp date :- MAY-2019

Analyzed on - 07/06/14

Sr. no.	Tests	Specifications	Results
1	Description	White glacial sticks	White glacial sticks
2	Assay (as HPO_3)	56 - 60%	59.57%
3	Assay (as NaPO_3)	40 - 44%	40.37%
4	Chloride (Cl)	Max. 0.001%	<0.001%
5	Nitrate (NO_3)	Max. 0.0005%	<0.0005%
6	Reducing substance (as H_2PO_4)	Max. 0.01%	<0.01%
7	Arsenic (As)	Max. 0.0001%	<0.0001%
8	Lead (Pb)	Max. 0.001%	<0.001%
9	Cadmium (Cd)	Max. 0.001%	<0.001%
10	Iron (Fe)	Max. 0.001%	<0.001%
11	Cobalt (Co)	Max. 0.0015%	<0.0015%
12	Copper (Cu)	Max. 0.001%	<0.001%
13	Manganese (Mn)	Max. 0.0005%	<0.0005%
14	Nickel (Ni)	Max. 0.001%	<0.001%
15	Zinc (Zn)	Max. 0.001%	<0.001%

This above product complies as per the specifications of LOBA CHEMIE PVT. LTD.

LOBA/QC/FM/01

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



Works: Plot No. D-22, MIDC, Tarapur Industrial Area, Tarapur, Boisar, Taluka - Palghar, Dist. Thane, Pin-401506 Tel: 91 02525-278163/64/65
Regd. office: 107 Wode House Road, Jehanghir Villa, Colaba, Mumbai- 400005 Tel: 91 22 6663 6663, Fax: 91 22 22151099

info@lobachemie.com www.lobachemie.com

Acetonitrilo



1350460
2284A

26-01-2017

Certificate of Analysis

1.00030.4000 Acetonitrile gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv® Reag. Ph
Eur
Batch I832030

	Batch Values	
Purity (GC)	≥ 99.9	%
Identity (IR)	conforms	
Evaporation residue	≤ 2.0	mg/l
Water	≤ 0.02	%
Colour	≤ 10	Hazen
Density (d 20 °C/20 °C)	0.78	
Refractive index (n 20/D)	1.344	
Boiling range (80-82°C)	≥ 95	% (v/v)
Acidity	≤ 0.0002	meq/g
Alkalinity	≤ 0.0002	meq/g
Gradient grade (at 210 nm)	0.1	mAU
Gradient grade (at 254 nm)	0.1	mAU
Fluorescence (as quinine at 254 nm)	0.1	ppb
Fluorescence (as quinine at 365 nm)	0.1	ppb
Transmission (at 193 nm)	74	%
Transmission (at 195 nm)	88	%
Transmission (from 230 nm)	≥ 98	%

Filtered by 0.2 µm filter.

Suitable for UPLC / UHPLC / Ultra HPLC - instruments.

Conforms to Acetonitrile for chromatography and Acetonitrile R1 according to Reag.Ph Eur;
conforms to the requirements of ACS for liquid chromatography suitability.

Date of release (DD.MM.YYYY) 29.04.2016

Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 30.04.2019

Dr. Ute Volkwein

Responsible laboratory manager quality control

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

Fosfato monobásico de potasio

2402-17
labhouse
NF: 299
500g

LOBA
Chemie
LABORATORY REAGENTS
& FINE CHEMICALS

ISO 9001-2008 REGISTERED

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Analyzed on: - 14/01/15

Product Name : - POASSIUM DIHYDROGEN ORTHOPHOSPHATE ANHYDROUS AR/ACS
Mol. Formula : - KH_2PO_4
Mol. Weight : - 136.09
Code no. : - 05357
CAS No. : - 7778-77-0
Lot no. : - B145841501
Mfg date : - JAN-2015
Exp date : - DEC-2019

<u>Sr. no.</u>	Tests	Specifications	Results
1	Description	White crystalline powder	White crystalline powder
2	Assay (By acidimetry)	Min. 99.5%	100.33%
3	pH (5% in water at 25°C)	4.1 to 4.5	4.5
4	Insoluble matter in water	Max. 0.01%	0.01%
5	Chloride (Cl)	Max. 0.001%	0.00095%
6	Sulphate (SO_4)	Max. 0.003%	0.0012%
7	Total nitrogen (N)	Max. 0.001%	<0.001%
8	Heavy metals (as Pb)	Max. 0.001%	0.001%
9	Iron (Fe)	Max. 0.001%	0.000648%
10	Sodium (Na)	Max. 0.005%	0.00467%
11	Loss on drying at 105°C for 2 hrs.	Max. 0.2%	0.15%

This above product complies as per the specifications of LOBA CHEMIE PVT. LTD.

LOBA/QC/FM/01

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

Works : Plot No. D-22, MIDC, Tarapur Industrial Area, Tarapur, Boisar, Taluka-Palghar, Dist. Palghar, Pin-401506 Tel: 91 02525-300000/300030
Regd office : 107 Wode House Road, Jehanghir Villa, Colaba, Mumbai - 400005 Tel: 91 22 6663 6663, Fax: 91 22 22151099

info@lobachemie.com . www.lobachemie.com

ANEXO H

FOTOGRAFIAS



HPLC



ULTRASONIDO CON MUESTRAS



BALANZA ANALÍTICA