

aoxlab	Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-131
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-05-28

Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína.

AOXLAB S.A.S.

	Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-131
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-05-28

DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-131 Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína

Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Laura S. Guerra Foronda	Directora Técnica		2024-05-27
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Directora calidad		2024-05-28
Aprobó:	Laura S. Guerra Foronda	Directora Técnica		2024-05-28
Localización del documento:	Plataforma SGC			


Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2018-08-09	1	Ninguno (versión original).	EAAG	WFRP	YELP
Vigente	2024-05-28	2	Se ajusta la estructura del documento. Se actualizan los ítem de equipos y reactivos. Se mejora el ítem de preparación de la muestra. Se incluyen los formatos relacionados.	LSGF	APPP	LSGF

	Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-131
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-05-28

ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE.....	4
1.1 Objetivo.....	4
1.2 Alcance.....	4
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	4
2.1 Definiciones.....	4
2.2 Notaciones.....	5
3. REFERENCIAS.....	5
4. DESARROLLO.....	6
4.1 Equipos de medición.....	6
4.2 INSPECCIÓN VISUAL.....	6
4.2.1 Revisión general.....	6
4.2.2 Estabilización.....	6
4.2.3 Verificación de equipos.....	6
4.2.4 Manejo de la muestra.....	6
4.2.5 Medidas de seguridad.....	7
4.3 INSTRUCCIONES DE ENSAYO.....	7
4.3.3.1 Estándar (solución Patrón 250mg/L).....	8
4.3.3.2 Estándar de trabajo (25 mg/L).....	8
4.3.3.3 Curva de calibración:.....	8
4.3.5 Condiciones Cromatográficas.....	9
4.4 INFORME.....	9
4.5 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD.....	10
5. RESPONSABILIDADES.....	10
6. FORMATOS RELACIONADOS.....	11
7. ANEXOS.....	11

	Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-131
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-05-28

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Describir los pasos para realizar la determinación de Cafeína de acuerdo con los parámetros de la ISO 20481 [2] y los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [1].

1.2 Alcance

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Determinación de Cafeína	ISO 20481	Cromatografía líquida de alta resolución

Este método se aplica a las siguientes matrices:

- Café y derivados
- Cacao y derivados
- Bebidas

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

Calibración [4].

Operación que, bajo condiciones especificadas, en un primer paso, establece una relación entre los valores de las magnitudes con su incertidumbre de medición provista por patrones de medición y las indicaciones correspondientes con incertidumbres de medición asociadas y, en segundo paso, usa esta información para establecer una relación para obtener un resultado de medición de una indicación.

Ensayo/prueba [3].

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento

Procedimiento [3].

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

Cafeína [5]

	Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-131
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-05-28

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, sólido cristalino, blanco y de sabor amargo, que actúa como una droga psicoactiva, levemente disociativa y estimulante por su acción antagonista no selectiva de los receptores de adenosina.

2.2 Notaciones.

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


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

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

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

3. REFERENCIAS.

- [1] ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- [2] NTC-ISO 20481 Determinación del contenido de cafeína usando Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)
- [3] ISO 9000:2015 Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary/ Sistemas de gestión de la calidad-- Fundamentos y vocabulario.
- [4] VIM: 2012, International vocabulary of metrology -- Basic and general concepts and associated terms.
- [5] Fisone G, Borgkvist A, Usiello A (2004). «Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action». Cell. Mol. Life Sci. 61 (7–8): 857-72.

	Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína	Identificación: PROC-TC-131
		Revisión: 2
	AOXLAB S.A.S	Inicio de vigencia: 2024-05-28

4. DESARROLLO

4.1 Equipos de medición

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:

- Balanza analítica
- Vortex
- Cromatógrafo líquido de alta resolución, HPLC
- Micropipetas
- Viales de 2ml
- Jeringas de 5ml
- Filtros para jeringa: acrodiscos de 0,22 µm
- Balones volumétricos de 50ml

4.2 INSPECCIÓN VISUAL.

4.2.1 Revisión general.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se garantizan las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que la muestra se encuentra empacada y sellada herméticamente, y etiquetada con el sticker de identificación interna del laboratorio. Se debe contar con al menos 100 gramos de muestra para realizar este análisis.

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

4.2.2 Estabilización


Una vez revisada la muestra, se aplican las siguientes instrucciones:

Los patrones y equipos de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo y la muestra se mantienen en el lugar de ensayo, y encendidos (si es el caso), antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica.

4.2.3 Verificación de equipos

A fin de confirmar que los equipos a utilizar en el ensayo se encuentran en condiciones adecuadas para realizar el servicio, se inspecciona que se haya realizado la verificación diaria de la balanza analítica. El cromatógrafo líquido de alta resolución debe encenderse y ajustarse a los parámetros de medida, acondicionando el sistema al menos 30 minutos antes de iniciar la corrida cromatográfica.

4.2.4 Manejo de la muestra

	Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-131
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-05-28

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

Al tomar de la porción de análisis, la muestra debe estar a temperatura ambiente y correctamente homogeneizada. Si es líquida, mezclar hasta homogeneidad aparente mediante agitación magnética, y con la ayuda de un gotero o una pipeta tomar la cantidad necesaria de muestra, mientras se continúa con la agitación.

Si la muestra es sólida, moler o triturar en su totalidad hasta homogeneidad aparente.

4.2.5 Medidas de seguridad

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio: Verificar que el sticker de calibración y mantenimiento del equipo se encuentre vigente (ubicados en el módulo 1 del laboratorio) y no requiere alguna intervención. Verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio". En caso de que se encuentre alguna anomalía al respecto, dar aviso a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.

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

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

4.3 INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

4.3.1 Aptitud del sistema


Para la aptitud del sistema cromatográfico Se corre El nivel 3 De la curva de calibración del Estándar de cafeína por triplicado y se evalúa la desviación estándar relativa, los platos teóricos de la columna y la asimetría. Se genera por medio del software un informe de aptitud y se guarda en la carpeta de aptitud del sistema.

Requisitos de aptitud.

- Desviación estándar Relativa (RSD): < 2,0 %
- Platos Teóricos: > 1000
- Asimetría: <2,0 %

4.3.2 Reactivos y/o soluciones

- Metanol Grado HPLC

	Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-131
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-05-28

- Agua Tipo I
- Estándar Cafeína
- Fase móvil: Metanol: Agua (24:76)

4.3.3 Preparación del estándar de trabajo

4.3.3.1 Estándar (solución Patrón 250mg/L)

Pesar 25 mg en balón volumétrico de 100 mL. Agregue suficiente agua tipo I para llenar el balón hasta la mitad. Agitar en vortex hasta completa homogenización, luego llevar a volumen con agua tipo I y mezclar.

La solución es estable a 4°C durante un mes.

4.3.3.2 Estándar de trabajo (25 mg/L)

Con una pipeta volumétrica, tomar 5mL de solución Estándar Patrón y viértalos en un balón volumétrico de 50 mL. Complete a volumen con agua y mezcle. Prepare siempre que se realice el ensayo nueva solución estándar de trabajo.


4.3.3.3 Curva de calibración:

- A partir del estándar de trabajo se recomienda inyectar en el equipo los siguientes volúmenes:
- Nivel 1: 1 uL equivalente a 0,5 ug/mL
- Nivel 2: 3 uL equivalente a 1,5 ug/mL
- Nivel 3: 5 uL equivalente a 2,5 ug/mL
- Nivel 4: 10 uL equivalente a 5,0 ug/mL
- Nivel 5: 25 uL equivalente a 12,5 ug/mL
- Nivel 6: 50 uL equivalente a 25,0 ug/mL

4.3.4 Preparación de la muestra

Pese aproximadamente 0,5g de muestra para productos sólidos, 0,2g para café instantáneo y 2mL para productos líquidos, transfíralos a un balón volumétrico de 50ml. Si la muestra es de café adicionar 25 mL de agua tipo I caliente, para las demás muestra adicionar 25mL de agua tipo I, agitar por 1 minuto en vortex, dejar enfriar y lleve a 50mL con agua tipo I. Filtrar a vial de 2mL con microfiltro de 0,22um e inyectar.

NOTA: si la apariencia de la solución anterior es muy oscura es necesario tomar una alícuota de la muestra y realizar la dilución necesaria con agua tipo I, o realizar una dilución de 1ml en 50ml. Agitar por 30 segundos en vortex, aforar y filtrar con acrodiscos de 0.22 µm.

	Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína	Identificación: PROC-TC-131
		Revisión: 2
	AOXLAB S.A.S	Inicio de vigencia: 2024-05-28

En caso de que la concentración de la solución anterior quede por encima del límite máximo de la curva (equivalente a 25mg/L), hacer una dilución de inyección programando el HPLC.

4.3.5 Condiciones Cromatográficas

- **Modo:** HPLC
- **Detector:** UV 272 nm
- **Columna:** Kinetex C18 EVO100 A 5 um 150x 4,6mm
- **Fase móvil:** Metanol: Agua (24:76)
- **Flujo:** 1 mL/min (Flujo Isocrático)
- **Temperatura columna:** 35 °C
- **Volumen de inyección:** 50 uL

4.4 INFORME

Los datos de peso, volumen de extracción, diluciones, lotes de reactivos y soluciones preparadas serán registrados en el formato FOR-TC- 131 “Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de cafeína”.


Los resultados se analizan de la siguiente manera:

En el cromatógrafo se corre una curva de calibración del estándar de trabajo de cafeína descrito en el punto [6.2.3] cuyo rango de concentración va desde 0.5 ug/mL – 25.0 ug/mL, en él se verifica que le coeficiente de correlación sea mínimo de 0.99. Se analiza duplicado por matriz para las muestras preparadas descritas en el punto [6.3] (en las cuales su diferencia en resultados no debe variar en 5%), se adiciona un blanco y el nivel 3 de la curva por triplicado para la aptitud del sistema, con las condiciones cromatográficas descritas en el punto [6.4].

El software lab solutions calcula la muestra en concentraciones de ug/mL. La concentración y los demás parámetros necesarios para el cálculo del resultado como peso (g), dilución (mL) y factor de dilución debe ser consignado en el cuadro de mando SOFT-TC-005 “Cuadro de mando para el ensayo de cafeína” en la ruta L:\LABORATORIO\REGISTROS\REGISTROS RT\Cuadros de Mando. El reporte de resultados se genera a través del software por medio de las plantillas establecidas en la ruta: DOCUMENTOS/HPLC/HPLC0207/REPORTES/CAFEÍNA.

$$\text{Concentración muestra} \left(\frac{\text{ug}}{\text{mL}} \right) * \frac{1 \text{ mg}}{1000\text{ug}} * \frac{\text{Vol dilución muestra (mL)}}{\text{Peso muestra (g)}} * F.D * 100$$

El Reporte que se genera en el software se guarda con la siguiente codificación (HP_Año_Cod procedimiento_Mes_Dia_Lote diario_ID de la muestra).

	Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-131
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-05-28

El resultado para muestra sólidas se reporta en mg/100g.

El resultado para muestras líquidas se reporta en mg/100mL.

4.5 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Se debe analizar en cada lote de análisis un estándar de verificación por triplicado, se debe hacer un duplicado y un blanco por lote. La verificación del estándar no debe pasar un %RSD del 5%.

El reporte de la verificación del estándar se genera por medio del software Lab Solutions en la ruta DOCUMENTOS/HPLC/HPLC0207/REPORTES/CAFEÍNA.

5. RESPONSABILIDADES.

Director técnico.


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

Líder de Calidad.

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

Líder de Laboratorio.

- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.

	Procedimiento de ensayo Determinación de Cafeína AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-131
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-05-28

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

Analista.

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

6. FORMATOS RELACIONADOS

FOR-TC- 131 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de cafeína".
SOFT-TC-005 "Cuadro de mando para el ensayo de cafeína".

7. ANEXOS.

No aplica