

|   |  |  |
|---|--|--|
|  | <b>Procedimiento de ensayo Determinación de Ácidos Orgánicos</b><br>AOXLAB S.A.S | <b>Identificación:</b><br>PROC-TC-163    |
|   |  | <b>Revisión:</b> 1                       |
|   |  | <b>Inicio de vigencia:</b><br>2018-11-14 |

# Procedimiento de ensayo Determinación de Ácidos Orgánicos



AOXLAB S.A.S.

|   |  |  |
|---|--|--|
|  | <b>Procedimiento de ensayo Determinación de Ácidos Orgánicos</b><br>AOXLAB S.A.S | <b>Identificación:</b><br>PROC-TC-163    |
|   |  | <b>Revisión:</b> 1                       |
|   |  | <b>Inicio de vigencia:</b><br>2018-11-14 |

## DOCUMENTO CONTROLADO

### PROC-TC-0163 Procedimiento de ensayo Determinación de Ácidos Orgánicos

Copia controlada No. : 1

|                                    | Nombre                     | Puesto o función  | Firma  | Fecha      |
|------------------------------------|----------------------------|---|--|------------|
| <b>Elaboró:</b>                    | Edwin Alexander Arboleda   | Analista  |  | 2018/10/17 |
| <b>Revisó:</b>                     | Wlner Ferney Ruiz Patiño   | Líder Laboratorio   |   | 2018/10/23 |
| <b>Aprobó:</b>                     | Yasmín Eliana Lopera Pérez | Gerente y Director Técnico  |  | 2018/11/14 |
| <b>Localización del documento:</b> |                            | <a href="http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/">http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/</a> |  |            |

### Control de Cambios

| Estado  | Fecha de Inicio de vigencia | Revisión | Descripción del cambio realizado | Realizó | Revisó | Aprobó |
|---------|-----------------------------|----------|----------------------------------|---------|--------|--------|
| Vigente | 2018/11/14                  | 1        | Ninguno (versión original).      | EAA     | WFRP   | YELP   |
|         |                             |          |                                  |         |        |        |
|         |                             |          |                                  |         |        |        |
|         |                             |          |                                  |         |        |        |
|         |                             |          |                                  |         |        |        |
|         |                             |          |                                  |         |        |        |
|         |                             |          |                                  |         |        |        |

### ÍNDICE

|   |   |  |
|---|---|--|
|  | <b>Procedimiento de ensayo Determinación<br/>de Ácidos Orgánicos</b><br><b>AOXLAB S.A.S</b> | <b>Identificación:</b><br>PROC-TC-163    |
|   |   | <b>Revisión: 1</b>                       |
|   |   | <b>Inicio de vigencia:</b><br>2018-11-14 |

| Sección                                       | Página |
|---|--------|
| 1. OBJETIVO Y ALCANCE.                        | 4      |
| 1.1 Objetivo.                                 | 4      |
| 1.2 Alcance.                                  | 4      |
| 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.                 | 5      |
| 2.1 Definiciones.                             | 5      |
| 2.2 Notaciones.                               | 5      |
| 3. REFERENCIAS.                               | 5      |
| 4. EQUIPOS DE MEDICIÓN.                       | 6      |
| 5. INSPECCIÓN VISUAL.                         | 6      |
| 5.1 Revisión general                          | 6      |
| 5.2 Estabilización.                           | 6      |
| 5.3 Verificación de patrones y otros equipos. | 7      |
| 5.4 Manejo de la muestra.                     | 7      |
| 5.5 Medidas de seguridad.                     | 8      |
| 6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.                   | 8      |
| 6.1. Reactivos y/o soluciones:                | 8      |
| 6.2. Preparación del estándar de trabajo      | 9      |
| 6.2.1 Estándar (solución Madre)               | 9      |
| 6.2.2 Estándar de trabajo                     | 9      |
| 6.2.3 Curva de calibración:                   | 9      |
| 6.3 preparación de la muestra                 | 9      |
| 6.4 Condiciones Cromatográficas               | 10     |
| 7. INFORME.                                   | 10     |
| 8. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD                | 11     |
| 9. RESPONSABILIDADES.                         | 11     |
| 9.1 Líder de Calidad.                         | 11     |
| 9.2 Líder de Laboratorio.                     | 11     |
| 9.3 Analistas.                                | 11     |
| 10. FORMATOS RELACIONADOS.                    | 11     |
| 11. ANEXOS.                                   | 11     |
|   |        |

|   |  |  |
|---|--|--|
|  | <b>Procedimiento de ensayo Determinación de Ácidos Orgánicos</b><br>AOXLAB S.A.S | <b>Identificación:</b><br>PROC-TC-163    |
|   |  | <b>Revisión:</b> 1                       |
|   |  | <b>Inicio de vigencia:</b><br>2018-11-14 |

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo.

Describir los pasos para realizar la determinación de Ácidos orgánicos de acuerdo a los parámetros de AOAC 986,13 [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 Ácidos Orgánicos | AOAC 986,13 Ed 20 [2]        | Cromatografía líquida de alta resolución |

Este método se aplica a las siguientes matrices:

- Fruta elaborada
- Café y derivados
- Cacao y derivados
- Hierbas, Especias, Salsas
- Bebidas
- Lácteos
- Granos
- Carne
- Proteína vegetal
- Fruta
- Leguminosas

El intervalo de trabajo del método es de xx-xx/100 g.

|   |  |  |
|---|--|--|
|  | <b>Procedimiento de ensayo Determinación<br/>de Ácidos Orgánicos</b><br>AOXLAB S.A.S | <b>Identificación:</b><br>PROC-TC-163    |
|   |  | <b>Revisión:</b> 1                       |
|   |  | <b>Inicio de vigencia:</b><br>2018-11-14 |

## 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.

#### **Ácidos Orgánicos**

Los ácidos orgánicos son una variedad de ácidos que se concentran habitualmente en los frutos de numerosas plantas. Son compuestos orgánicos que poseen al menos un grupo ácido. Se distinguen el ácido cítrico, fórmico, acético, málico, tartárico, salicílico, oxálico, y los grasos.

### 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] AOAC Official Method 986,13 (Quinic, Malic and Citric Acids in Cranberry juice cocktail and apple juice)

[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] ISO/IEC 17000:2004 Conformity assessment -- Vocabulary and general principles.

|   |  |  |
|---|--|--|
|  | <b>Procedimiento de ensayo Determinación<br/>de Ácidos Orgánicos</b><br>AOXLAB S.A.S | <b>Identificación:</b><br>PROC-TC-163    |
|   |  | <b>Revisión: 1</b>                       |
|   |  | <b>Inicio de vigencia:</b><br>2018-11-14 |

#### 4. EQUIPOS DE MEDICIÓN.

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

| No. Inventario | Patrones (o materiales), equipos y/o componentes clave | Marca            | Modelo           | No. Serie    |
|----------------|--|------------------|------------------|--------------|
| 0006           | Balanza analítica                                      | RADWAG           | AS 220/C/2       | 348577/12    |
| 0007           | Centrifuga   | EPPENDORF        | 5427             | 5427AJ213219 |
| 0003           | Vortex   | VELP SCIENTIFICA | F202A0173        | 251121       |
| 0205           | Cromatógrafo líquido de alta resolución                | SHIMADZU         | LC-2030C 3D Plus | L21455510235 |

#### 5. INSPECCIÓN VISUAL.

##### 5.1 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.

##### 5.2 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.

##### 5.3 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,

|   |  |  |
|---|--|--|
|  | <b>Procedimiento de ensayo Determinación<br/>de Ácidos Orgánicos</b><br>AOXLAB S.A.S | <b>Identificación:</b><br>PROC-TC-163    |
|   |  | <b>Revisión:</b> 1                       |
|   |  | <b>Inicio de vigencia:</b><br>2018-11-14 |

acondicionando el sistema al menos 30 minutos antes de iniciar la corrida cromatográfica.

#### 5.4 Manejo de la muestra.

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. Sí 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.

Sí la muestra es sólida, moler o triturar en su totalidad hasta homogeneidad aparente, y realizar un cuarteo atendiendo los siguientes pasos:

- Colocar la muestra previamente homogeneizada sobre una superficie lisa, limpia y seca, donde no existan corrientes de aire fuertes.
- Limpiar los instrumentos a utilizar (espátula o cuchara).
- Mezclar la muestra echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.
- Juntar todo el material dándole forma circular con espesor uniforme.
- Dividir el material en cuatro sectores iguales.
- Eliminar los sectores opuestos quedando la masa del material reducida a la mitad.
- Mezclar los dos sectores restantes echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.

#### 5.5 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.

|   |  |  |
|---|--|--|
|  | <b>Procedimiento de ensayo Determinación<br/>de Ácidos Orgánicos</b><br>AOXLAB S.A.S | <b>Identificación:</b><br>PROC-TC-163    |
|   |  | <b>Revisión:</b> 1                       |
|   |  | <b>Inicio de vigencia:</b><br>2018-11-14 |

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.

## 6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

Antes de realizar el ensayo, tener en cuenta que:

- Verificar la vigencia de estándares y reactivos
- Verificar la limpieza del material a trabajar
- Realizar idoneidad del sistema cromatográfico (Aptitud del sistema)
- Analizar los datos obtenidos
- Acondicionar el equipo con el método mínimo 30 min antes de la corrida.

### 6.1. Reactivos y/o soluciones:

- Metanol Grado HPLC
- Fosfato monobásico de potasio
- Ácido Fosfórico 85%
- Acetonitrilo
- Estandar Ácido málico
- Estandar Ácido cítrico
- Estandar Ácido láctico
- Estandar Ácido Acético
- Estandar Ácido Quínico
- Agua Tipo 1
- Cartucho C18

|   |  |  |
|---|--|--|
|  | <b>Procedimiento de ensayo Determinación de Ácidos Orgánicos</b><br>AOXLAB S.A.S | <b>Identificación:</b><br>PROC-TC-163    |
|   |  | <b>Revisión:</b> 1                       |
|   |  | <b>Inicio de vigencia:</b><br>2018-11-14 |

## 6.2. Preparación del estándar de trabajo

### 6.2.1 Estándar (solución Madre)

Pesar en balón volumetrico de 25 mL una cantidad de 25 mg de cada estandar, adicionar 15 ml de agua tipo I y agitar en vortex hasta completa homogenización, luego llevar a volumen con agua tipo I.

### 6.2.2 Estándar de trabajo

Tomar de cada solución madre de Ácidos Orgánicos 1 mL en un balón volumétrico de 10 mL y aforar con agua tipo I y agitar en vortex hasta completa homogenización. Filtrar el estándar en un vial con protección actínica con tamaño de membrana de 0,22um

### 6.2.3 Curva de calibración:

Injectar en el equipo cromatográfico por duplicado los siguientes volúmenes:

Nivel 1: 1 uL

Nivel 2: 5 uL

Nivel 3: 10 uL

Nivel 4: 20 uL

Nivel 5: 50 uL

Nivel 6: 100 uL

## 6.3 preparación de la muestra

Acondicione el cartucho (C18) eluyendo 10 mL CH<sub>3</sub>CN – H<sub>2</sub>O (50 + 50) hasta 10 ml. retirar Jeringa y pasar 10 ml de aire a través del cartucho. Eluir con 10 ml de prueba a través del cartucho acondicionado. Deseche primero 4–5 ml y recoger los siguientes 4–5 ml.

Filtrar la solución en un vial con protección actínica con tamaño de membrana de 0,22um

|   |  |  |
|---|--|--|
|  | <b>Procedimiento de ensayo Determinación<br/>de Ácidos Orgánicos</b><br>AOXLAB S.A.S | <b>Identificación:</b><br>PROC-TC-163    |
|   |  | <b>Revisión:</b> 1                       |
|   |  | <b>Inicio de vigencia:</b><br>2018-11-14 |

**Nota:** Si la muestra es sólida preparar la solución muestra de la siguiente manera.

- Pesar 1,5 g de muestra solida en un tubo falcón y agregar 40 ml de agua hirviendo, mezclar en vortex 60 s y garantizar la extracción de los ácidos orgánicos, luego llevar a volumen de 50 mL con agua tipo I y hacer el procedimiento descrito en el punto <6.3>

#### 6.4 Condiciones Cromatográficas

- **Modo:** HPLC
- **Detector:** UV 214 nm
- **Columna:** Kinetex C18 F5 2,6 um 100x 4,6mm
- **Fase móvil:** Buffer Fosfato monobásico de potasio 0,2 M pH:2,4 (pesar 27,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en un beaker, adicionar 950 mL de agua tipo I y llevar a pH2,4 con ácido fosfórico, luego graduar a volumen de 1L con agua tipo I y filtrar con membrana de nylon de tamaño 0,22um).
- **Flujo:** 0,8 mL/min (Flujo Isocrático)
- **Temperatura columna:** 35 °C
- **Volumen de inyección:** 10 uL

#### 7. INFORME

Los datos serán registrados en el formato FOR-TC- 133 “Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de Ácidos orgánicos”

Los resultados se analizan de la siguiente manera:

En el cromatógrafo se corre una curva de calibración del estándar de trabajo de Ácidos Organicos descrito en el punto [6.2.4] y también se corre por duplicado las muestras preparadas descritas en el punto [6.3], 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 de lab solutions calcula la muestra por medio de la regresión lineal arrojando una concentración. Ese dato de la concentración se registra en el cuadro de mando de Excel del laboratorio para análisis instrumental, Soft-TC\_ xxx “Formato

|   |  |  |
|---|--|--|
|  | <b>Procedimiento de ensayo Determinación<br/>de Ácidos Orgánicos</b><br>AOXLAB S.A.S | <b>Identificación:</b><br>PROC-TC-163    |
|   |  | <b>Revisión:</b> 1                       |
|   |  | <b>Inicio de vigencia:</b><br>2018-11-14 |

cuadro de mando de análisis de ácidos orgánicos”, en la ruta de acceso\LABORATORIO\REGISTROS RT. Esa Concentración se multiplica por el factor de dilución de la muestra y se obtiene el resultado de ácidos orgánicos.

## 8. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, se debe verificar los requisitos de aptitud del sistema del equipo cromatográfico. Además se debe siempre correr un blanco y evaluar los resultados de cada matriz en las cartas control, lo que permite realizar el análisis de tendencias, de acuerdo con PROC -TC – 077.

## 9. RESPONSABILIDADES.

### 9.1 Director técnico.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

Aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.

### 9.2 Líder de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento

### 9.3 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.

### 9.4 Analista.

Aplicar el presente documento.

## 10. FORMATOS RELACIONADOS.

**SOFT-TC-XX** Formato cuadro de mando de Determinación de Ácidos Orgánicos.

FOR-TC-133 “Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de ácidos orgánicos”.

## 11. ANEXOS.

N.A