


<b>aoxlab</b>	Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos  AOXLAB S.A.S	Identificación: <b>PROC-TC-169</b>
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: <b>2023-10-23</b>




# Procedimiento de ensayo de Determinación de colesterol en alimentos


**AOXLAB S.A.S.**

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b> AOXLAB S.A.S	<b>Identificación:</b> <a href="#">PROC-TC-169</a>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <a href="#">2023-10-23</a>

## DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-169 Procedimiento de ensayo de determinación de colesterol en alimentos  
Copia controlada No.: [1](#)

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
<b>Elaboró:</b>	Santiago Valencia Álvarez	Analista de Laboratorio		2023-10-23
<b>Revisó:</b>	Angela P. Patiño Pérez	Directora de Calidad		2023-10-23
<b>Aprobó:</b>	Dario Pardo Pardo	Director Técnico		2023-10-23
<b>Localización del documento:</b>	<a href="http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/">http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/</a>			

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión: 3</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>


## Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2018-12-21	1	Ninguno (versión original).	JMFR	WFRP	YELP
Obsoleto	2021-11-29	2	Se cambia el método de referencia por el AOAC 994.10. Se realiza en el nuevo formato para los procedimientos.	SVA	DPP	YELP
Vigente	2023-10-23	3	Se cambian las condiciones cromatográficas, se adiciona el material de referencia o muestra de retención en el control de calidad.	SVA	APPP	DPP


	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión: 3</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

## ÍNDICE

<b>1. OBJETIVO Y ALCANCE.....</b>	<b>6</b>
1.1 Objetivo.....	6
1.2 Alcance.....	6
<b>2 DEFINICIONES Y NOTACIONES.....</b>	<b>6</b>
2.1 Definiciones.....	6
2.2 Notaciones.....	8
<b>3 REFERENCIAS.....</b>	<b>8</b>
<b>4 DESARROLLO.....</b>	<b>10</b>
<b>4.1 CONDICIONES GENERALES.....</b>	<b>10</b>
4.1.1 Revisión general.....	10
4.1.2 Estabilización.....	10
4.1.3 Verificación de equipos.....	11
4.1.4 Manejo de la muestra.....	11
4.1.5 Medidas de seguridad.....	12
<b>4.2 INSTRUCCIONES DE ENSAYO.....</b>	<b>12</b>
4.2.1 Patrones y equipos de medición.....	12
4.2.1.1 Equipos de medición.....	12
4.2.1.2 Materiales y consumibles.....	12
4.2.1.3 Reactivos y soluciones.....	13
4.2.2 Curva calibración nivel alto.....	13
4.2.3 Preparación de los tubos Silanizados:.....	14
4.2.4 Saponificación.....	14
4.2.5 Extracción.....	15
4.2.6 Derivatización.....	15
4.2.7 Análisis cromatográfico.....	16
4.2.8 Cálculos.....	17
4.2.9 Control de calidad.....	17
<b>5. RESPONSABILIDADES.....</b>	<b>18</b>
5.1 Director técnico.....	18
5.2 Director de Calidad.....	18
5.3 Líder de Laboratorio.....	18
5.4 Analista.....	19
<b>6. FORMATOS RELACIONADOS.....</b>	<b>19</b>

	<p>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-169</p>
		<p>Revisión: 3</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-10-23</p>

7. ANEXOS ..... 20

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo.

Describir los pasos para realizar el ensayo de determinación de colesterol en alimentos de acuerdo con las directrices establecidas en el método de referencia AOAC 994.10 [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 colesterol en alimentos	AOAC 994.10 [2]	Cromatografía de gases con detector FID

*Tabla 1. Descripción del método analítico*

Este método es aplicable a las siguientes matrices:

- Leche y productos lácteos
- Carnes y productos cárnicos
- Cacao y derivados
- Productos de panadería
- Café y productos derivados
- Huevo
- Salsas y aderezos
- Grasas y aceites

## 2 DEFINICIONES Y NOTACIONES.

### 2.1 Definiciones.


**Documento [3].**

Información y su medio de soporte.

**Ensayo/prueba [3].**

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

**Procedimiento [3].**

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

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

#### **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.

#### **Colesterol [6].**

El colesterol es un lípido (del tipo estero) que se encuentra en la membrana plasmática eucariota, los tejidos corporales de todos los animales y en el plasma sanguíneo de los vertebrados. Pese a que las cifras elevadas de colesterol en la sangre tienen consecuencias perjudiciales para la salud, es una sustancia estructural esencial para la membrana plasmática, ya que regula la entrada y salida de sustancias en la célula. Abundan en las grasas de origen animal.

La fórmula química del colesterol se representa de dos formas: C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O/ C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>OH. Es un lípido esteroide, derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno (o esterano), constituido por cuatro carboxilos condensados o fusionados, denominados A, B, C y D, que presentan varias sustituciones:


- Dos radicales metilos en las posiciones C-10 y C-13.
- Una cadena alifática ramificada de 8 carbonos en la posición C-17.
- Un grupo hidroxilo en la posición C-3.
- Una insaturación entre los carbonos C-5 y C-6.

En la molécula de colesterol se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una cola o porción apolar formada por el carbo-ciclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos. Así, el colesterol es una molécula tan hidrófoba que la solubilidad de colesterol libre en agua es de 10<sup>-8</sup> M y, al igual que los otros lípidos, es bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo (CHCl<sub>3</sub>).

#### **Saponificación [7]**

La heterogeneidad estructural de los lípidos dificulta cualquier clasificación sistemática. El componente lipídico de una muestra biológica puede ser extraído con disolventes orgánicos y ser sometido a un criterio empírico: la reacción de saponificación.

La saponificación consiste en una hidrólisis alcalina de la preparación lipídica (con KOH o NaOH). Los lípidos derivados de ácidos grasos (ácidos monocarboxílicos de cadena larga) dan lugar a sales alcalinas (jabones) y alcohol, que son fácilmente extraíbles en medio acuoso. No todos los lípidos presentes en una muestra biológica dan lugar a este tipo de reacción. Se distinguen por tanto dos tipos de lípidos:

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

Lípidos Saponificables: los lípidos saponificables agrupan a los derivados por esterificación u otras modificaciones de ácidos grasos, y se sintetizan en los organismos a partir de la aposición sucesiva de unidades de dos átomos de carbono. En este grupo se incluyen:

- Ácidos grasos y sus derivados
- Eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos)
- Lípidos neutros (acilgliceroles y ceras)
- Lípidos anfipáticos (glicerolípidos y esfingolípidos).

Lípidos no saponificables: Los lípidos insaponificables son derivados por aposición varias unidades isoprénicas, y se sintetizan a partir de una unidad básica de 5 átomos de carbono: el isopreno. En este grupo de lípidos se incluyen:

- Terpenos: retinoides, carotenoides, tocoferoles, naftoquinonas, dolicoles
- Esteroides: esteroles, sales y ácidos biliares, hormonas esteroideas

Existen otros lípidos insaponificables que no están relacionados estructuralmente con el isopreno:

- Hidrocarburos
- Lípidos pirrólicos

## 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 994.10 Cholesterol in Foods Direct Saponification-Gas Chromatographic method.

[3] ISO 9000:2015 Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary/ Sistemas de gestión de la calidad- Fundamentos y vocabulario.


	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

[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.

[6] Chevreul (1816) "Recherches chimiques sur les corps gras, et particulièrement sur leurs combinaisons avec les alcalis. Sixième mémoire. Examen des graisses d'homme, de mouton, de boeuf, de jaguar et d'oie" (Chemical researches on fatty substances, and particularly on their combinations o filippos ine kapios with alkalis. Sixth memoir. Study of human, sheep, beef, jaguar, and goose fat), Annales de Chimie et de Physique, 2: 339-372. From page 346 : "Je nommerai cholesterine, de χολη, bile, et στερεος, solide, la substance cristallisée des calculs biliars humains, ... " (I will name cholesterine — from χολη (bile) and στερεος (solid) — the crystalized substance from human gallstones...)

[7] A comprehensive classification system for lipids<sup>1</sup>

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

## 4 DESARROLLO

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos clave:

Equipos
Balanza analítica con resolución de 0,1 mg
Micropipeta de 100 µL - 1000 µL
Micropipeta de 20 µL – 200 µL
Micropipeta de 1 µL – 10 µL
Pipeta de 25 mL
Vortex
Destilador de agua
Baño maría
Plancha de calentamiento
Cromatógrafo de gases FID

*Tabla 2. Equipos para utilizar*

### 4.1 CONDICIONES GENERALES

#### 4.1.1 Revisión general.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, ésta es inspeccionada con el fin de verificar que las condiciones de cantidad, empaque y preservación se mantienen, 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 se cuenta con mínimo 50 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.

#### 4.1.2 Estabilización.

Los ítems de ensayo, patrones y controles de calidad deben atemperarse con suficiente antelación de tal manera que se encuentren en equilibrio térmico con el ambiente en el cual se ejecutarán los ensayos.

La balanza analítica y otros equipos electrónicos que realicen mediciones de alguna magnitud correspondiente a condiciones de influencia en la ejecución del ensayo deben encenderse por lo menos media hora antes de su uso. Así mismo, el cromatógrafo líquido de alta resolución debe encenderse, adecuarse y ajustarse a los parámetros de medida, acondicionando el sistema al menos 30 minutos antes de iniciar la corrida cromatográfica. a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

#### 4.1.3 Verificación de equipos.

Antes de iniciar el ensayo, debe verificarse que el estado de funcionamiento de los equipos sea adecuado. Esto puede llevarse a cabo revisando que cuenten con la etiqueta de mantenimiento vigente y que estos no tengan alguna etiqueta que lo identifique como "Fuera de servicio". Además, en el caso en el cual se lleve el control de uso, deben registrarse los últimos registros consignados en el formato FOR-TC-017, con el propósito de verificar que no se han registrado fallas en el funcionamiento. Si algún equipo es utilizado para la medición de alguna magnitud de influencia en el ensayo, este debe estar calibrado. Por tanto, se debe verificar la etiqueta de calibración adherida a este, y comprobar que se encuentre vigente.

Así mismo, debe verificarse que se haya realizado y registrado la verificación diaria de la balanza analítica en el formato FOR-TC-005.

Además de lo anterior, debe verificarse la fecha de expiración de los patrones, materiales de referencia y controles de calidad empleados en el ensayo con el fin de evitar el uso de materiales vencidos. 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, avisar a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.


#### 4.1.4 Manejo de la muestra.

Durante el almacenamiento y ensayo de la muestra, esta debe permanecer herméticamente cerrada, con el fin de no alterar la humedad original que contiene la muestra durante estas actividades. La identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, deben realizarse de acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

Sí la muestra 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).

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

- 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.

**NOTA:** es importante evitar la exposición de la muestra a la luz y alta temperatura.

#### 4.1.5 Medidas de seguridad.

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

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

## 4.2 INSTRUCCIONES DE ENSAYO.


### 4.2.1 Patrones y equipos de medición

#### 4.2.1.1 Equipos de medición

- Cromatógrafo de gases FID
- Phenomenex ZB-1 (30m x 0.25mm, 0.25µm)
- Balanza analítica con resolución de 0.1 mg
- Transferpipetas de 1000 µL y 10 mL

#### 4.2.1.2 Materiales y consumibles

- Vaso de precipitado de 1000 mL
- Balón volumétrico de 10mL
- Balón volumétrico de 1000mL
- Erlenmeyer de 250 mL con acople 29/32
- Erlenmeyer de 100 mL
- Probeta de 250mL
- Probeta de 100mL
- Embudos de separación de 500mL
- Tubos falcón de 15mL
- Viales de vidrio ámbar con tapa rosca
- Puntas para micropipeta de 200uL
- Puntas para micropipeta de 1mL

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

- Puntas para micropipeta de 10mL
- Pipetas Pasteur de 3mL

#### 4.2.1.3 Reactivos y soluciones

- Estándar de Colesterol: con pureza  $\geq 98\%$
- Estándar de Colestano (5- $\alpha$ -Colestano) Estándar interno: con pureza  $\geq 97\%$
- Dimetildiclorosilano  $\geq 99\%$
- Dimetilformamida (DMF).  $\geq 99\%$
- n-Heptano grado GC.  $\geq 99\%$
- Hexametildisilano (HMDS)  $\geq 99\%$
- Tolueno  $\geq 99\%$
- Trimetilclorosilano (TMCS)  $\geq 99\%$
- Sulfato de Sodio anhidro  $\geq 99\%$
- Dimetilformamida  $\geq 99\%$
- Acetona

#### 4.2.1.4 Solución hidróxido de potasio al 50%

Disolver 500 g de KOH en 500 mL de agua tipo I.

#### 4.2.1.5 Solución hidróxido de potasio 1 M

Disolver 50 g de KOH en 800 mL de agua tipo I, agitar con ayuda de un agitador magnético y dejar enfriar, cuando la solución se encuentre atemperada, aforar a 1 L con agua tipo I.

#### 4.2.1.6 Solución Hidróxido de potasio 0.5 M

Disolver 25 g de KOH en 800 mL de agua tipo I, agitar con ayuda de un agitador magnético y dejar enfriar, cuando la solución se encuentre atemperada, aforar a 1 L con agua tipo I.


#### 4.2.1.7 Solución estándar de colesterol 1 mg/mL

Pesar 25.0 mg de estándar de colesterol en un balón volumétrico de 25 mL y diluir con DMF y prepare una curva de calibración como se muestra a continuación.

#### 4.2.2 Curva calibración nivel alto

**Estándar 0,2 mg/mL:** En un tubo de vidrio, adicionar una alícuota de 200  $\mu$ L de la solución stock, adicionar 800  $\mu$ L de dimetilformamida.

**Estándar 0,1 mg/mL:** En un tubo de vidrio, adicionar una alícuota de 100  $\mu$ L de la solución stock, adicionar 900  $\mu$ L de dimetilformamida.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

**Estándar 0,05 mg/mL:** En un tubo de vidrio, adicionar una alícuota de 50 µL de la solución stock, adicionar 950 µL de dimetilformamida.

**Estándar 0,01 mg/mL:** En un tubo de vidrio, adicionar una alícuota de 10 µL de la solución stock, adicionar 990 µL de dimetilformamida.

#### **Curva calibración nivel bajo**

**Estándar 0,05 mg/mL:** En un tubo de vidrio, adicionar una alícuota de 50 µL de la solución stock, adicionar 950 µL de dimetilformamida.

**Estándar 0,01 mg/mL:** En un tubo de vidrio, adicionar una alícuota de 10 µL de la solución stock, adicionar 990 µL de dimetilformamida.

**Estándar 0,005 mg/mL:** En un tubo de vidrio, adicionar una alícuota de 5 µL de la solución stock, adicionar 995 µL de dimetilformamida.

**Estándar 0,0025 mg/mL:** En un tubo de vidrio, adicionar una alícuota de 2.5 µL de la solución stock, adicionar 997.5 µL de dimetilformamida.

#### **4.2.2.1 Solución estándar interno 5- $\alpha$ -Colestano 0,1 mg/mL:**


Pesar 10.0 mg de estándar de 5- $\alpha$ -colestano en un balón volumétrico de 100 mL y diluir con heptano.

#### **4.2.3 Preparación de los tubos Silanizados:**

- Limpiar los tubos con metanol anhidro y secar por 30 min a 110°C
- Transferir los tubos a un desecador para que se enfríen
- Saque los tubos del desecador y llénelos con una solución al 10% de dimetildiclorosilano (DMCS) en tolueno, tapar los tubos, dejar los tubos con la solución por 1 hora.
- Drenar los tubos y recuperar la solución, lavar los tubos con metanol anhidro y secar a 100°C antes de su uso.
- Después de usar los tubos, lávelos con metanol, agua, metanol, en ese orden y séquelos a 100°C para un uso posterior.
- Los tubos pueden ser reutilizados sin silabizar, si el lavado de estos no se realiza con un jabón alcalino.

#### **4.2.4 Saponificación**

- En un Erlenmeyer pesar una porción de muestra de:
- 1 gramo para matrices de grasas, aceites, salsas y huevos.
- Menos de 5 gramos para matrices con alto contenido de humedad (Frutas, Bebidas).
- 2 gramos para el resto de las matrices.
- Adicionar una barra de agitación magnética, 40 mL de etanol al 95% y 8 mL de hidróxido de potasio al 50%.
- Colocar el Erlenmeyer en una plancha de calentamiento y agitación, conectar el condensador y colocar el sistema en reflujo durante  $70 \pm 10$  minutos.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

- Para asegurar una saponificación completa, verificar que no queden grumos adheridos a las paredes, de ser así, utilizar una vara de vidrio o adicionar solución de KOH para incorporar los grumos.
- Apagar el calentamiento y adicionar 60 mL de etanol al 95% a través del condensador, adicionarlo desde la parte superior. La agitación debe de continuar.
- Pasados 15 minutos remover el condensador y dejar atemperar la solución, esta solución es estable por 24 horas.


#### 4.2.5 Extracción

- Colocar la muestra en agitación y adicionar 100 mL de tolueno (V1). Tapar la solución y agitar por más de 30 segundos.
- Adicionar la muestra a un embudo de separación de 500 mL. Adicionar 110 mL de una solución de KOH 1 M. Agitar fuertemente el embudo por 10 segundos. Dejar reposar para que las fases se separen y descartar la fase acuosa.
- Adicionar 40 mL de una solución de KOH 0.5 M y agitar vigorosamente por 10 segundos. Descartar la fase acuosa.
- Adicionar 40 mL de agua tipo I y agitar vigorosamente, separar las fases y descartar la fase acuosa. Repetir este lavado 3 veces, agitando vigorosamente. Si se presentan emulsiones, adicionar una pequeña cantidad de etanol al 95%. Luego de realizar el ultimo lavado la solución debe de tener una apariencia traslucida.
- Pasar la fase organica a través de un filtro que contenga 20 g de sulfato de sodio, recolectar la muestra en un Erlenmeyer de 125 mL el cual debe de contener 2 gramos de sulfato de sodio. Agitar y dejar reposar 15 minutos. La solución se puede almacenar bien tapada por menos de 24 h.
- Tomar con ayuda de una pipeta un volumen V2 (según tabla 3), introducirlos en un recipiente apropiado para la evaporación y evaporar el extracto hasta sequedad con ayuda de nitrógeno y un baño maría a una temperatura de  $40 \pm 3$  °C.
- Reconstituir la muestra con 3 mL de acetona y secar nuevamente.
- Reconstituir con un volumen de DMF V3 (según tabla 3).

**Nota:** Si la concentración de la muestra luego de ser leída en el cromatógrafo de gases se sale del rango de calibración, tomar una cantidad menor del extracto de tolueno utilizado para llevar a sequedad (V2) o cambie el volumen de DMF utilizado para reconstituir el residuo final (V3), o cambiar ambos volúmenes, para que la concentración final del extracto quede dentro de la curva de calibración.

#### 4.2.6 Derivatización

- Pipetear 1 mL de las soluciones preparadas para la curva y la muestra dentro de un tubo de 15 mL aproximadamente.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

- Adicionar 0.2 mL de HMDS y 0.1 mL de TMCS. Tapar los tubos y agitar vigorosamente con la mano por 30 segundos.
- Dejar reposar la muestra por 15 minutos.
- Pasado este tiempo, adicionar 1 mL del estándar interno de 5 $\alpha$ -colestano, adicionar 10 mL de agua tipo I. Tapar el tubo y agitar vigorosamente 30 segundos y centrifugar por 2 minutos a 2500 rpm en caso de ser necesario.
- Transferir suficiente fase acuosa a un vial para la inyección en el GC. Asegurarse de no transferir fase acuosa. Analizar los estándares y el extracto de muestra antes de 24 horas.

#### 4.2.7 Análisis cromatográfico


- Inyectar 2  $\mu$ L
- Determinar el área de cada pico utilizando el integrador digital. Dividir el área del pico del colesterol con el área del estándar interno para obtener el cociente de la respuesta. Graficar ratio de respuesta vs. Concentración de los estándares.
- Determinar la concentración de colesterol utilizando la ecuación de la recta obtenida con la gráfica.

##### 4.2.7.1 Extracción

- Modo de inyección: Split
- Temperatura de Inyector: 270.0 °C
- Temperatura del detector: 300.0 °C
- Gas de arrastre: Helio
- Modo de control de flujo: velocidad lineal
- Flujo de columna: 2,0 mL/min
- Velocidad lineal: 47.8 cm/sec
- Flujo de purga: 3,0
- Ratio Split: 20
- Flujo de hidrogeno: aprox. 35 mL/min
- Flujo de aire: aprox. 280 mL/min
- Columna: ZB1 30 m x 0.25 (mm) x 0.25( $\mu$ m)
- Tiempo de equilibrio :0,5 min

Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)
----	190	0.00
30	230	2.00
40	280	10.00

Tabla 3. Rampas de temperatura para la corrida cromatográfica

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

#### 4.2.8 Cálculos

Calcule los g de porción de muestra/ mL derivatizados de la siguiente manera:

$$\frac{g \text{ de porción de muestra}}{mL \text{ derivatizados}} = \left(\frac{W}{V1}\right) * \left(\frac{V2}{V3}\right)$$

Donde:

W: Peso de la muestra utilizados para la Derivatización (g)

V1: Volumen de tolueno usados en la extracción.

V2: Alícuota del extracto usado para evaporar

V3: Volumen de DMF usado para disolver el residuo.


Calcule el contenido de colesterol en la muestra de la siguiente manera:

$$\frac{mg \text{ de colesterol}}{100 g \text{ de muestra}} = \frac{mg/mL \text{ Colesterol en la muestra}}{g/mL \text{ en la solución usada para derivatizar}} \times 100$$

#### 4.2.9 Control de calidad

El tipo, periodicidad y criterios de aceptación para los resultados obtenidos de los ensayos para el control de calidad se resumen en la tabla siguiente:

CONTROL	PERIODICIDAD	CRITERIO
Verificación de la contaminación de los reactivos (Blanco de reactivos)	En cada lote de ensayo	No deben aparecer picos cuantificables en los tiempos de retención de colesterol
Duplicado por matriz	Cada que se realiza el ensayo	El coeficiente de variación obtenido debe ser menor o igual al 10%
Material de referencia o muestra retenida.	Cada que se realiza el ensayo.	Observar que el valor no se salga de los límites establecidos en el certificado o en la carta control.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

CONTROL	PERIODICIDAD	CRITERIO
Estándar de colesterol	Cada que se realiza el ensayo	Se realiza para confirmación de la curva de calibración.
Participación en Interlaboratorio (Rotación de matriz)	Semestral (según disponibilidad comercial)	Debe obtenerse una calificación satisfactoria en la participación

*Tabla 4. Control de calidad analítico para el ensayo*

El seguimiento de los resultados obtenidos del control de calidad listado en la tabla control debe realizarse y analizarse mediante el uso de cartas control, de acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-077.

## 5. RESPONSABILIDADES.

### 5.1. 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.

### 5.2. Director 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.

### 5.3. 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 (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-169</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-10-23</b>

salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.


- 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.

#### 5.4. 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 el análisis de los resultados de control de calidad de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-077.
- 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.

SOFT-TC-001 "Cuadro de mando para el ensayo de Colesterol".

	Procedimiento de ensayo Determinación de colesterol en alimentos <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-169</b>
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: <b>2023-10-23</b>

FOR-TC-135 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de Colesterol".

## 7. ANEXOS

No Aplica