

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Química

**“Validación de la metodología analítica y cuantificación del contenido
de sodio, potasio, fósforo, magnesio y calcio
en alimentos prioritarios de la dieta del costarricense”**

Trabajo Final de Graduación presentado como requisito parcial
para optar por el grado de Licenciatura en Química

Ericka Valverde Montero

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San Pedro de Montes de Oca

2009

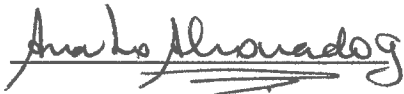
Este proyecto de graduación, ha sido aceptado por la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química.



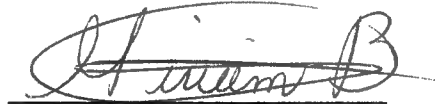
Dra. Virginia Solís Alvarado
Decana de Ciencias
Presidenta del Tribunal



MAE Paulina Silva Trejos
Directora del Proyecto



M.Sc. Ana Lorena Alvarado Gámez
Integrante del Comité Asesor



M.Sc. Mirriam Barquero Quirós
Integrante del Comité Asesor



M.Sc. Carlos Herrera Ramírez
Director de la Escuela de Química
Miembro del Tribunal



Ericka Valverde Montero
Postulante

Agradecimientos

Un agradecimiento especial a la Lícda. Paulina Silva, directora de tesis, por su apoyo y confianza en mi trabajo, por todas sus enseñanzas y las horas de dedicación invertidas. Este trabajo es el resultado de nuestro esfuerzo conjunto.

De igual forma deseo expresar mi agradecimiento a la MSc. Ana Lorena Alvarado y MSc. Miriam Barquero, miembros del comité asesor por su ayuda con las revisiones del trabajo de investigación, y por haber contribuido considerablemente en mi formación académica.

Al tribunal evaluador de esta tesis, por sus correcciones al manuscrito final y por otorgamiento de mención honorífica a este trabajo de investigación.

A la Vicerrectoría de Investigación por el apoyo económico brindado al proyecto y a la Escuela de Química por haber proporcionado el espectrómetro de absorción atómica Varian 220 Fast Sequential y el espectrómetro uv-visible Shimadzu UV-1700, para la cuantificación de los elementos, además de facilitar el laboratorio de investigación para la preparación, digestión y determinación de humedades de las muestras.

A la Licda. Marielos Torres y al Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos por su colaboración en la determinación de humedad de ciertas muestras y suministrar el equipo liofilizador.

Al Lic. Gilberto Araya por el préstamo de algunos libros y a la Facultad de Farmacia por su contribución con el equipo liofilizador. A Oldemar Vargas del Centro de Investigaciones Agronómicas por su colaboración y a Eduardo Valerio por asistencia con el espectrómetro de absorción atómica y con el agua desionizada.

Y a todas las personas que me han brindado su amistad y su apoyo constante durante estos años, gracias a las cuales este trabajo pudo llegar a su fin.

Índice general

Tribunal examinador	i
Reconocimientos.....	i
Índice general.....	i
Índice de Cuadros.....	v
Índice de Figuras	vi
Índice de Abreviaturas	ix
Resumen.....	x
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	
Introducción	2
1.1 Macrominerales	3
1.1.1 Calcio	4
1.1.2 Fósforo	8
1.1.3 Magnesio.....	12
1.1.4 Potasio.....	15
1.1.5 Sodio.....	18
1.2 Reseña epidemiológica y consumo de macrominerales en Costa Rica	22
1.3 Análisis de minerales en alimentos.....	31
1.3.1 Análisis de fósforo.....	32
1.3.2 Análisis de calcio	33
1.3.3 Análisis de potasio.....	34
1.3.4 Análisis de sodio.....	35
1.3.5 Análisis de magnesio.....	36
1.3.6 Digestión en horno de microondas.....	36
1.3.7 Justificación del método empleado para la cuantificación de Na, K, P, Mg y Ca.....	37
1.3.8 Investigaciones sobre metales en alimentos para Costa Rica.	39
1.4. Validación de métodos analíticos.	42
1.4.1 Trazabilidad	43
1.4.2 Normalización.	43

1.4.3 Precisión.....	43
1.4.4 Veracidad	44
1.4.5 Estabilidad.....	45
1.4.6 Robustez.....	45
1.4.7 Límite de detección y límite de cuantificación.....	45
1.4.8 Recuperaciones.....	45
1.4.9 Efectos de matriz.....	46
1.4.10 Linealidad e intervalo de trabajo	46
1.4.11 Sensibilidad.....	46
1.4.12 Incertidumbre	46
 CAPITULO 2: SECCIÓN EXPERIMENTAL	
2.1 Muestreo de alimentos y preparación de muestras.....	48
2.2 Determinación de humedad	50
2.3 Liofilización de muestras.....	51
2.4 Digestión de muestras	51
2.5 Procedimientos de medición de absorbancia.....	52
2.6 Validación de la cuantificación de los macrominerales	54
2.7 Evaluación de la estabilidad.....	56
2.8 Control de calidad	56
2.9 Compilación de datos.....	57
 CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Validación de la metodología analítica	59
3.2 Análisis del contenido de macrominerales en alimentos	104
 CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES.....	
	114
 REFERENCIAS.....	
	115
 ANEXOS	
	127

Índice de Cuadros

Cuadro I.	Requerimiento Diario Recomendado de calcio según la edad	8
Cuadro II.	Requerimiento Diario Recomendado de fósforo según la edad	12
Cuadro III.	Condiciones experimentales de lectura en EAA para Ca, Mg, K y Na	54
Cuadro IV.	Fuentes de variación implicadas en el ANOVA de la regresión lineal simple	60
Cuadro V.	Pruebas de linealidad en calcio por EAA (llama N_2O/C_2H_2) a 422,7 nm	61
Cuadro VI.	Pruebas de linealidad en magnesio por EAA (llama aire/ C_2H_2) a 285,2 nm	61
Cuadro VII.	Pruebas de linealidad en potasio por EAA (llama aire/ C_2H_2) a 766,5 nm	61
Cuadro VIII.	Pruebas de linealidad en sodio por EAA (llama aire/ C_2H_2) a 589 nm	61
Cuadro IX.	Pruebas de linealidad para fósforo por espectrometría UV-vis mediante el complejo ácido vanadomolibdofosfórico a 400 nm	61
Cuadro X.	Ámbitos de trabajo seleccionados para cada elemento	62
Cuadro XI.	Pruebas de homogeneidad para las curvas de calibración	64
Cuadro XII.	Límites de detección y límites de cuantificación según Meier and Zund	64
Cuadro XIII.	Sensibilidad de calibración y sensibilidad analítica	70
Cuadro XIV.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el magnesio en una muestra de MRC 1846 a tres niveles de concentración	72
Cuadro XV.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el magnesio en una muestra de MRC 8414 a tres niveles de concentración	73
Cuadro XVI.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el magnesio en una muestra de MRC 8415 a tres niveles de concentración	74
Cuadro XVII.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el sodio en una muestra de MRC 1846 a tres niveles de concentración	75
Cuadro XVIII.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el sodio en una muestra de MRC 8414 a tres niveles de concentración	76
Cuadro XIX.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el sodio en una muestra de MRC 8415 a tres niveles de concentración	77
Cuadro XX.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el potasio en una muestra de MRC 1846 a tres niveles de concentración	78
Cuadro XXI.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el potasio en una muestra de MRC 8414 a tres niveles de concentración	79
Cuadro XXII.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el potasio en una muestra de MRC 8415 a tres niveles de concentración	80

Cuadro XXIII.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el calcio en una muestra de MRC 1846 a tres niveles de concentración	81
Cuadro XXIV.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el calcio en una muestra de MRC 8414 a tres niveles de concentración	82
Cuadro XXV.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el calcio en una muestra de MRC 8415 a tres niveles de concentración	83
Cuadro XXVI.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el fósforo en una muestra de MRC 1846 a tres niveles de concentración	84
Cuadro XXVII.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el fósforo en una muestra de MRC 8414 a tres niveles de concentración	85
Cuadro XXVIII.	Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el fósforo en una muestra de MRC 8415 a tres niveles de concentración	86
Cuadro XIX.	Resultados de los RSD_r en tres niveles de concentración obtenida para MRC 8414, MRC 8415 y MRC 1846.....	87
Cuadro XXX.	Resultados de la prueba de precisión intermedia y veracidad en el tiempo para el MRC 8414	88
Cuadro XXXI.	Límites de control y límites de acción empleados para monitorear el desempeño del equipo.....	102

Índice de Figuras

Figura 1.	Esquema del proceso de preparación de la porción de prueba para el análisis de los macrominerales y determinación de humedad.	50
Figura 2.	Curva de calibración para magnesio mediante el método de mínimos cuadrados no ponderados y límites de confianza al 95 %	65
Figura 3.	Límite de detección y límite de cuantificación para el magnesio	65
Figura 4.	Curva de calibración para potasio mediante el método de mínimos cuadrados no ponderados y límites de confianza al 95 %	66
Figura 5.	Límite de detección y límite de cuantificación para el potasio	66
Figura 6.	Curva de calibración para sodio mediante el método de mínimos cuadrados no ponderados y límites de confianza al 95 %	67
Figura 7.	Límite de detección y límite de cuantificación para el sodio	67
Figura 8.	Curva de calibración para fósforo mediante el método de mínimos cuadrados no ponderados y límites de confianza al 95 %	68
Figura 9.	Límite de detección y límite de cuantificación para el fósforo	68
Figura 10.	Curva de calibración para calcio mediante el método de mínimos cuadrados ponderados y límites de confianza al 95 %	69
Figura 11.	Límite de detección y límite de cuantificación para el calcio	69
Figura 12.	Curva de calibración para el complejo azul de molibdeno a 823 nm	71
Figura 13.	Estudio de repetibilidad para magnesio en MRC 1846	73
Figura 14.	Estudio de repetibilidad para magnesio en MRC 8414	74
Figura 15.	Estudio de repetibilidad para magnesio en MRC 8415	75
Figura 16.	Estudio de repetibilidad para sodio en MRC 1846	76
Figura 17.	Estudio de repetibilidad para sodio en MRC 8414	77
Figura 18.	Estudio de repetibilidad para sodio en MRC 8415	78
Figura 19.	Estudio de repetibilidad para potasio en MRC 1846	79
Figura 20.	Estudio de repetibilidad para sodio en MRC 8414	80
Figura 21.	Estudio de repetibilidad para potasio en MRC 8415	81
Figura 22.	Estudio de repetibilidad para calcio en MRC 1846.....	82
Figura 23.	Estudio de repetibilidad para calcio en MRC 8414.....	83
Figura 24.	Estudio de repetibilidad para calcio en MRC 8415.....	84
Figura 25.	Estudio de repetibilidad para fósforo en MRC1846.....	85
Figura 26.	Estudio de repetibilidad para fósforo en MRC 8414.....	86
Figura 27.	Estudio de repetibilidad para fósforo en MRC 8415.....	87

Figura 28.	Estudio de veracidad para magnesio en MRC 1846	91
Figura 29.	Estudio de veracidad para magnesio en MRC 8414	91
Figura 30.	Estudio de veracidad para magnesio en MRC 8415	92
Figura 31.	Estudio de veracidad para sodio en MRC 1846	92
Figura 32.	Estudio de veracidad para sodio en MRC 8414	93
Figura 33.	Estudio de veracidad para sodio en MRC 8415	93
Figura 34.	Estudio de veracidad para potasio en MRC 1846	94
Figura 35.	Estudio de veracidad para potasio en MRC 8414	94
Figura 36.	Estudio de veracidad para potasio en MRC 8415	95
Figura 37.	Estudio de veracidad para calcio en MRC 1846	95
Figura 38.	Estudio de veracidad para calcio en MRC 8414	96
Figura 39.	Estudio de veracidad para calcio en MRC 8415	96
Figura 40.	Estudio de veracidad para fósforo en MRC 1846	97
Figura 41.	Estudio de veracidad para fósforo en MRC 8414.....	97
Figura 42.	Estudio de veracidad para fósforo en MRC 8415	98
Figura 43:	Estudio de la estabilidad para sodio en MRC 8414 medido por espectrometría de absorción atómica de llama a 589 nm.	99
Figura 44:	Estudio de estabilidad para fósforo en MRC 8414 medido por espectrometría UV-visible a 400 nm.	99
Figura 45:	Estudio de estabilidad para calcio en MRC 8414 medido por espectrometría absorción atómica de llama a 422,7 nm.	100
Figura 46:	Estudio de estabilidad para potasio en MRC 8414 medido por espectrometría absorción atómica de llama a 766,5 nm	100
Figura 47:	Estudio de estabilidad para magnesio en MRC 8414 medido por espectrometría absorción atómica de llama a 285,2 nm.	101
Figura 48:	Contenido de calcio en base húmeda por 100 g de porción comestible	108
Figura 49:	Contenido de sodio en base húmeda por 100 g de porción comestible	109
Figura 50:	Contenido de potasio en base húmeda por 100 g de porción comestible	110
Figura 51:	Contenido de fósforo en base húmeda por 100 g de porción comestible	111
Figura 52:	Contenido de magnesio en base húmeda por 100 g de porción comestible.....	112

Índice de Abreviaturas

NIST: National Institute of Standards and Technology
INFOODS: Red Internacional de Sistemas de Datos de Alimentos
LATINFOODS: Red Latinoamericana de Sistemas de Datos de Alimentos
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
OMS: Organización Mundial de la Salud
LEC: Líquido extracelular
LIC: Líquido intracelular
PTH: Hormona paratiroidea
ATP: Trifosfato de adenosina
ATP-asa: Trifosfatasa de adenosina
TCC: Tubo colector cortical
ADH: Hormona antidiurética
IA: Ingesta adecuada
RDR: Requerimiento diario recomendado
HTA: Hipertensión arterial
IRC: Insuficiencia renal crónica
AOAC: Association of Official Analytical Chemists
ICP: Plasma acoplado inductivamente
EAA: Espectrometría de absorción atómica
EEA: Espectrometría de emisión atómica
MRC: Material de Referencia Certificado

Resumen

Se validó la metodología analítica y se determinó el contenido de los macrominerales: Na, K, P, Mg y Ca en 46 alimentos prioritarios de la dieta del costarricense. El sodio, el potasio, el magnesio y el calcio se cuantificaron por espectrometría de absorción atómica de llama, y el fósforo por espectrometría UV-Vis del complejo ácido vanadomolibdofosfórico.

Los alimentos se prepararon cocidos, sin aditivos o frescos, según el consumo habitual. La digestión de las muestras se realizó con ácido nítrico en horno de microondas. La cantidad de ácido nítrico requerida según la clase de alimento se determinó a partir de los porcentajes de recuperación obtenidos para masas iguales de alimento y diferentes cantidades de ácido.

Los parámetros analíticos evaluados fueron: linealidad y ámbito de trabajo, límites de detección y de cuantificación, sensibilidad de calibración, sensibilidad analítica, precisión y veracidad.

Los ámbitos lineales de trabajo determinados para cada elemento fueron: Na (0,043 - 0,70) mg/L, K (0,056-0,87) mg/L, P (0,22 -3,5) mg/L, Mg (0,037 -0,65) mg/L y Ca (0,057 -0,87) mg/L. Los límites de detección y de cuantificación fueron de: 0,024 mg/L y 0,043 mg/L para el sodio, 0,031 mg/L y 0,056 mg/L para el potasio, 0,031 mg/L y 0,056 mg/L para el fósforo, 0,120 mg/L y 0,215 mg/L para el magnesio y 0,029 mg/L y 0,057 mg/L para el calcio. La sensibilidad de calibración obtenida para cada elemento fue la siguiente: Na (0,805 A·L/mg), K (0,314 A·L/mg), P (0,0869 A·L/mg), Mg (0,688 A·L/mg), y Ca (0,267 A·L/mg). La sensibilidad analítica evaluada en el punto de equilibrio de la curva fue: Na (45 L/mg), K (68 L/mg), P (121 L/mg), Mg (208·L/mg), y Ca (81 L/mg). La veracidad se evaluó con tres materiales de referencia certificados del NIST®, para un nivel intermedio de concentración en el ámbito lineal de trabajo, se obtuvieron valores promedio de sesgo para Na, K, P, Mg, y Ca de: 0,0023 mg/L, 0,0047 mg/L, -0,0007 mg/L, -0,0021 mg/L y 0,0023 mg/L respectivamente. La precisión

se evaluó en términos de repetibilidad en tres materiales de referencia certificados del NIST®. Los valores promedio de RSD, % para un nivel intermedio de concentración fueron de: 2,9 % en sodio, 2,3 % en potasio, 0,35 % en fósforo, 1,1 % en magnesio y 1,7 % en calcio.

Una vez validada la metodología se ensayaron las muestras de alimentos. Se encontró que la leche entera en polvo, el pan blanco de trigo, el queso fresco y el queso mozzarella presentan el contenido más elevado en sodio con concentraciones que oscilan entre (452 a 106) mg Na/100 g. Los alimentos más ricos en potasio fueron: el aguacate, el banano, el camote, la zanahoria, el plátano, la pechuga de pollo, y la leche entera en polvo. El contenido de potasio en estos alimentos se encuentra entre (440-330) mg K/ 100 g. Se encontró el mayor contenido de calcio en la leche entera en polvo, el queso fresco, el queso mozzarella, la leche fluida, el yogurt y el pan blanco de trigo, con concentraciones que oscilan entre (735 a 98) mg Ca/100 g. Los alimentos más ricos en fósforo fueron de origen proteico como: el hígado de res, el hígado de pollo, el lomo de res, la pechuga de pollo, el queso fresco, el queso mozzarella y la leche entera en polvo, en los cuales el contenido de fósforo varió entre los (835-177) mg P/100 g. La tortilla, las leguminosas, el filete de tilapia y la leche entera en polvo son los alimentos que presentaron mayor contenido de magnesio con concentraciones que oscilan entre (47 a 38) mg Mg/100 g.

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

Introducción

Los datos sobre composición de alimentos forman parte importante del conocimiento requerido para entender el desempeño de la nutrición en la salud humana. La calidad, cantidad y accesibilidad de estos datos constituye un medio esencial para los científicos de alimentos, profesionales de la salud, nutrición y otros sectores interesados en el suministro de estos y sus implicaciones en el bienestar de las personas.¹

Las tablas de composición de alimentos son el instrumento que permite conocer la composición de la energía porcentual de los alimentos y sus nutrientes. Tienen relevancia en diversas aplicaciones, como: ^{2,3,4}

- Valoración de la ingesta y de la necesidad de nutrientes para la población
- Planificación de políticas de alimentación y nutrición
- Investigación epidemiológica y agroindustrial
- Formulación de programas de fortificación
- Elaboración de regímenes alimenticios institucionales y terapéuticos
- Diseño y desarrollo de nuevos productos alimenticios
- Etiquetado nutricional, regulación y comercio internacional

La información proporcionada en las tablas de composición de alimentos, tiene un carácter relativo, ya que puede verse afectada por diversos factores, entre los que destacan: las técnicas utilizadas para la cuantificación de sus componentes, el origen de los alimentos, variabilidad del contenido nutricional dependiendo de la región, el clima, diferencias de cultivos, suelos, el tipo de alimento, la forma de preparación, entre otros.³

La Red Internacional de Sistemas de Datos de Alimentos (INFOODS), se instauró en 1984, mediante la participación de la Universidad de las Naciones Unidas y la FAO, con el fin de promover la cooperación internacional para la obtención e intercambio de datos adecuados y confiables sobre composición de alimentos. Posteriormente, se crearon varias ramas regionales, entre ellas LATINFOODS para América Latina y el Caribe, la cual está formada por 19 capítulos nacionales. ^{5,6}

En 1992, se realizó en Roma, la Conferencia Internacional sobre Nutrición, asistida por la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS), en ésta se enfatizó en la necesidad de contar con información fiable sobre composición de alimentos, que pudiera ser utilizada para cumplir los requisitos de mercadeo, etiquetado, reglamentación sanitaria comercial y oficial, que exige el mercado actual y que han sido retomados en tratados internacionales.¹

Los macrominerales: sodio, potasio, fósforo, magnesio y calcio son nutrientes esenciales para los seres vivos, y por lo tanto, se requiere conocer su contenido en los alimentos. En este Trabajo de Investigación se validó la metodología analítica de digestión y medición cuantitativa para determinar el contenido de estos elementos en diferentes grupos de alimentos de importante consumo a nivel nacional. Los resultados generados, serán incorporados en la base de datos regional sobre composición de alimentos de Costa Rica, desarrollada por el capítulo COSTARICAFOODS, y que forma parte de la Tabla de Composición de Alimentos de América Latina.

1.1 Macrominerales

Según Williams (2007),⁷ el término mineral se usa en nutrición para clasificar a los elementos químicos que son esenciales para los procesos vitales. Estos se encuentran en la naturaleza y se ingieren diariamente en forma de sales disueltas en los alimentos y en el agua. Los minerales tienen funciones básicas en la nutrición, por ejemplo, son utilizados para la elaboración de tejidos, la activación de enzimas y hormonas, intervienen en el equilibrio ácido base de la sangre, la contracción muscular y la regulación del metabolismo del agua, entre otras.

Los macrominerales ó minerales mayores, son aquellos elementos a los cuales se les ha asignado un requerimiento diario recomendado, ingesta adecuada, ó índice metabólico de ejercicio mayor a 100 mg/día. Se incluyen en este grupo: el calcio, el fósforo, el magnesio, el potasio, el sodio, el azufre y el cloro.⁷

1.1.1 Calcio

El calcio es el catión divalente más abundante en el organismo humano, y representa entre (1,5-2,0) % de la masa corporal. Más del 99 % del calcio se encuentra en forma de cristales de hidroxapatita como componente estructural del esqueleto y el restante 1 % se distribuye en los fluidos intra y extra celulares.⁸

La concentración normal de calcio total en el plasma varía entre (2,1 - 2,5) mmol/L. Se presenta en tres formas: en fracción ionizada (50 %), unido a proteínas, principalmente a la albúmina (40 %) y en menor proporción, formando complejos con aniones como citrato, bicarbonato y fosfato (10 %). La forma ionizada (Ca^{2+}) es la única que posee actividad biológica, esta se conserva en una concentración entre (1,1-1,3) mmol/L en casi todos los mamíferos. Aún si se produjeran grandes cambios en la dieta, la concentración sérica de calcio se mantiene debido a la homeostasis adoptada por el sistema endocrino para mantener regulado este mineral.^{9,10}

Absorción y Homeostasis

La concentración de Ca^{+2} en el plasma se mantiene regulada, a través de un complejo sistema de control homeostático en el que intervienen las hormonas calcitropicas: la hormona paratiroidea (PTH), el 1,25-dihidroxicolecalciferol [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] y la calcitonina, que junto con tejidos diana específicos (riñón, hueso, intestino) aumentan o disminuyen la entrada de calcio en el líquido extracelular (LEC).^{11,12}

Un adulto sano absorbe en promedio solamente un 30 % del calcio ingerido en condiciones normales a través de la mucosa intestinal. Este proceso se lleva a cabo por dos mecanismos de transporte: el transcelular y el paracelular. El primero ocurre en el duodeno y el yeyuno proximal. Es saturable, y comprende el transporte activo mediante el enlace de calcio a la proteína calbindina. Este proceso está regulado por el calcitriol [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] el cual es liberado en respuesta a un incremento de la PTH causada por una reducción del Ca^{2+} en el plasma. El segundo proceso es pasivo, se lleva a cabo en el yeyuno y el ileum, es no saturable e implica el transporte de Ca^{2+} por

difusión simple entre las células de la mucosa intestinal. La absorción de calcio por esta vía depende de la cantidad biodisponible en el intestino.^{8,11}

Algunos componentes de los alimentos interfieren en la absorción del calcio: el ácido fítico que se encuentra en cereales, el oxalato de ciertos vegetales verdes, tales como las espinacas y el ácido urónico contenido en la fibra dietética. También existe evidencia de que una alta ingesta de sodio, ácidos grasos y proteínas aumentan las pérdidas de calcio por excreción urinaria y fecal.¹³

La excreción urinaria de calcio está regulada por la PHT, calcitonina y el calcitriol. Aproximadamente se desecha el 1 % del calcio filtrado en los riñones y el 99 % se reabsorbe por la nefrona.¹¹

La carencia de vitamina D y la falta de respuesta intestinal a la misma (exceso de glucocorticoides o de hormona tiroidea, síndromes de mala absorción) son las causas más frecuentes del déficit de absorción del calcio. Además el calcio está vinculado a la presencia de fósforo. La deficiencia o exceso de cualquiera de estos dos macrominerales, puede afectar la absorción del otro.¹⁴

Funciones Fisiológicas

El calcio desempeña diversos roles estructurales y funcionales en el organismo. Este elemento participa en la formación y mantenimiento del esqueleto, interviene en la regulación temporal y espacial de la función neuronal y en la inhibición de la proliferación de células cancerosas.

El calcio intracelular actúa como mensajero secundario y como cofactor para proteínas y enzimas que regulan diversos procesos como: la neurotransmisión, movilidad, secreción hormonal y proliferación celular. El calcio extracelular, forma parte integral de la fase mineral de los huesos, opera como cofactor en la adhesión molecular, la permeabilidad de las membranas y regula la excitabilidad neural.¹⁵

El calcio ionizado es también un regulador importante del acoplamiento de la excitación-contracción del corazón y de la tensión del músculo liso del sistema vascular periférico. Es un mediador en los procesos de vasoconstricción y vasodilatación. En general, una dieta adecuada en calcio ha demostrado reducir los riesgos de hipertensión y la formación de varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de pecho y de colon.^{9, 15, 16}

Deficiencias

Los trastornos hipocalcémicos se pueden dividir en: deficiencia primaria de PTH o de calcitriol e hipovitaminosis D. El mecanismo de acción de la PTH en sus órganos blanco depende del calcitriol; por lo tanto, la hipocalcemia que ocurre en ausencia de calcitriol se presenta a pesar de que los niveles de PTH sean normales o altos. En el hipoparatiroidismo, la ausencia de PTH reduce la síntesis de la $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ y empeora la hipocalcemia asociada.

Una inadecuada ingesta de calcio por absorción o pérdida excesiva conduce a la desmineralización del hueso. Bajos niveles de Ca^{+2} en la sangre (hipocalcemia), aumentan la excitabilidad de las células nerviosas y musculares y pueden producir tetania y fenómenos relacionados tales como: parestesias, incremento de la excitabilidad neuromuscular, calambres y espasmos musculares. En el hipoparatiroidismo crónico, se producen cambios ectodérmicos, entre ellos, la pérdida capilar, defectos en el esmalte dental y cataratas. También se presentan síntomas psiquiátricos tales como ansiedad y depresión.¹⁸

En el adulto puede darse la pérdida de masa ósea (osteoporosis) en mujeres postmenopáusicas con edades entre los 51 y 65 años, afectando principalmente las vertebras y el radio distal. En hombres y mujeres mayores de 65 años se producen lesiones en vertebras, cadera, húmero y tibia.^{17, 18, 19}

Además las deficiencias en la ingesta de calcio también se asocian al desarrollo de hipertensión y cáncer de colon.⁸

Toxicidad

El aumento del calcio sérico se asocia a gran morbilidad y es causa de mortalidad, si no se diagnostica y se trata adecuadamente. En general del (70 – 80) % de todos los casos de hipercalcemia son debidos a enfermedades malignas y a hipoparatiroidismo primario, el cual es producido por una hipersecreción de PHT por una ó más glándulas paratiroides.

La hipercalcemia se presenta cuando la entrada de calcio a la sangre es mayor que su velocidad de salida. La absorción de calcio del intestino y más frecuentemente, la movilización de calcio del hueso hacia la sangre, son tan grandes, que exceden la capacidad del riñón para eliminarlo o del esqueleto para depositarlo en la fase mineral ósea. En otras ocasiones, la entrada normal de calcio a la sangre conduce a hipercalcemia, debido a que está limitada a la capacidad de mineralización del hueso, la excreción renal de calcio o ambas.

La hipercalcemia también aumenta las resistencias periféricas y por ende la presión arterial. La calciuria favorece la formación de cálculos renales y nefrocalcinosis. La deshidratación y el efecto del calcio sobre el músculo liso intestinal y la conducción nerviosa, afectan la motilidad gastrointestinal y conducen a la constipación, náuseas y vómitos.^{18, 19, 20}

Necesidades y recomendaciones

A diferencia de otros nutrientes el requerimiento diario de calcio, no está relacionado con el mantenimiento de las funciones metabólicas, sino más bien con el mantenimiento de la integridad ósea, ya que el tejido óseo contiene la reserva principal de este nutriente. Por esta razón las necesidades de calcio son superiores en los periodos de crecimiento, el embarazo y la lactancia.²¹

En el cuadro I se indica el Requerimiento Diario Recomendado (RDR) para el calcio según el panel de National Institutes of Health.

Cuadro I. Requerimiento Diario Recomendado de calcio según la edad ⁸

Edad (años)	RDR de calcio (mg)
1 < 4	800
4 < 9	800 – 1 200
9 < 11	800 – 1 200
11 < 24	1 200- 1 500
25 < 51	1 000
25 < 51	1 000
51+	1 000 ^a
embarazo	1 200-1 500
lactancia	1 200-1 500

^a Para mujeres con reemplazo de estrógeno se recomienda consumir 1 000 mg y en mujeres sin reemplazo de estrógeno se recomienda 1 500 mg. Los hombres mayores de 65 años deberían incrementar la ingesta a 1 500 mg.

Fuentes

Los alimentos con mayor contenido de calcio son los productos lácteos: leche entera, leche descremada, queso, yogurt, y otras leches fermentadas. Las frutas secas grasas (avellanas, nueces) y las legumbres son una fuente importante de calcio aunque su nivel de absorción es menor que en los lácteos. Las carnes y pescados contienen cantidades discretas, destacándose el salmón, las sardinas y las anchoas. También se encuentra en menor proporción en frutas y vegetales verdes oscuros (espinacas y brócoli).²¹

1.1.2 Fósforo

El fósforo representa entre (0,65-1,1) % de la masa corporal de un adulto promedio. Aproximadamente el 85 % del fósforo contenido en el cuerpo se encuentra en el esqueleto como constituyente de la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10} [\text{PO}_4]_6 [\text{OH}]_2$), y de otros fosfatos de calcio. Cerca del 1 % se encuentra en la sangre y resto se mantiene distribuido en tejidos blandos, como el músculo.¹¹

El fósforo es uno de los principales componentes intracelulares con una concentración de (1-2) mmol/L; se encuentra en su forma libre como aniones o formando parte de numerosos organofosfatos, proteínas, enzimas, factores de transcripción, lípidos, ácidos nucleicos y enlaces de alta energía (ATP, GTP). En las células y en el LEC el 85 % del fósforo existe principalmente como HPO_4^{2-} ó NaHPO_4^- y cerca de un 15 % como H_2PO_4^- . Las concentraciones de fosfato en la sangre se expresan en términos de fósforo elemental, con límites normales de (0,75-1,45) mmol/L.²²

Absorción y homeostasis

Cerca de un (50-70) % del fósforo de la dieta es absorbido en el intestino, principalmente en el duodeno y el yeyuno. El mecanismo de absorción puede ocurrir por dos vías, una saturable, mediada por un sistema de transporte activo dependiente del sodio, y otra en la cual el fósforo es absorbido por vía pasiva, de forma lineal con la ingesta dietética, mediante procesos de difusión dependientes de la concentración.

La cantidad de fósforo absorbida en el intestino por día es de (1,0 -1,5) g y equivale a la cantidad excretada en la orina en condiciones normales. La eficiencia de absorción es incrementada hasta un 90 % por mecanismos de transporte dependientes de la vitamina D y el calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), especialmente cuando la ingesta de fósforo es deficiente.

La excreción del fósforo se produce en el riñón. El fosfato sérico se filtra en el glomérulo y se reabsorbe en el túbulo proximal. Este proceso está acompañado por cambios en la actividad de un específico co-transportador de $\text{Na}^+/\text{PO}_4^{2-}$. Por otro lado, la PHT estimula la resorción de fosfato en el hueso, igual que con el calcio. Pero en contraste con este, la PHT estimula también la excreción de fósforo en la orina para disminuir su concentración en el LEC.^{8, 23}

Funciones Fisiológicas

El fósforo como fosfato, es un componente esencial en el protoplasma y la membrana celular. Además de su función estructural y de soporte en el tejido óseo, el fosfato participa como sistema amortiguador en la conservación del equilibrio ácido-base en la sangre. En las células forma parte de muchas sustancias como los fosfolípidos, las fosfoproteínas y los ácidos nucleicos, los segundos mensajeros hormonales, el monofosfato cíclico de guanina y los polifosfatos de inositol y el 2,3 difosfoglicerato, este último es regulador de la liberación de oxígeno a partir de la hemoglobina.

El fósforo es también responsable de la reposición de la energía metabólica en forma de enlaces de fosfato de alta energía, actúa como regulador alostérico de muchas enzimas (activa o disminuye la actividad enzimática) y regula la velocidad de producción renal del calcitriol.^{2, 24}

Debido a que el fósforo se recicla en los diferentes procesos fisiológicos en que participa, las funciones de este nutriente se basan en el mantenimiento del crecimiento tisular (en el desarrollo del individuo en el embarazo y la lactancia) y en el reemplazo de las pérdidas por excreción y descamación de la piel y mucosa intestinal. En ambos casos es necesario mantener un nivel adecuado de fosfato inorgánico en el fluido extra celular.¹

La ingesta de antiácidos que contienen aluminio y magnesio, puede reducir la absorción del fósforo debido a la formación de sales de fosfatos que impiden su adecuada absorción. Igualmente el uso de fármacos a base de carbonatos y acetatos de calcio.⁸

Deficiencias

La hipofosfatemia es una reducción del nivel normal de fósforo en el plasma; se presenta por tres mecanismos principales: inadecuada absorción intestinal, excreción renal excesiva de fosfato, rápida redistribución de fosfato desde el LEC en el hueso o en los tejidos blandos.

La hipofosfatemia crónica es causada por persistente pérdida renal de fosfato, por excesiva activación de los receptores de la PHT en el túbulo proximal, ocasionada por un hiperparatiroidismo primario o por síndrome de hipercalcemia. Varias enfermedades genéticas también causan pérdidas renales de fosfato como la hipofosfatemia ligada al cromosoma X y el síndrome de Fanconi.¹⁹

Cuando la concentración de fósforo en el plasma es menor a 0,3 mmol/L, se pueden manifestar diferentes síntomas clínicos que incluyen debilidad muscular, parestesia, convulsiones, cardiomiopatía, fallo respiratorio, susceptibilidad a infecciones, ataxia y confusión mental. Una hipofosfatemia prolongada puede ocasionar raquitismo y osteomalacia.¹⁹

Toxicidad

La hiperfosfatemia es un incremento anormal de las concentraciones séricas de fósforo superior a >1,8 mmol/L, y se asocia con la insuficiencia renal o con la translocación de fósforo, secundaria a una lisis celular, hacia el espacio extracelular, como resultado de infecciones sistémicas, hepatitis fulminante, hipertermia, rabdomiólisis no traumática y terapia citotóxica,. Otras causas incluye: cetoacidosis diabética, disminución de la PHT, excesiva ingesta de vitamina D.

La hipocalcemia y la tetania son los síntomas clínicos más relevantes de aparición aguda. Por el contrario, las manifestaciones crónicas son: las calcificaciones metastásicas y el hiperparatiroidismo secundario que acompaña a la osteodistrofia renal.¹⁹

Necesidades y recomendaciones

El fósforo procedente de la dieta es requerido para el crecimiento y la reposición de las pérdidas por la excreta. Anteriormente, la recomendación de fósforo se establecía para mantener el equilibrio relativo con la ingesta de calcio. Posteriormente se estableció la recomendación con base en estudios de balance y niveles séricos de

fósforo inorgánico. El Requerimiento Diario Recomendado (RDR) de fósforo, se presentan en el cuadro II. ²⁴

Cuadro II. Requerimiento Diario Recomendado de fósforo según la edad ⁸

Edad/(años)	RDR de fósforo (mg)
1 - 3	460
4 - 8	500
9 - 18	1 250
>18	700

Fuentes alimentarias

El fósforo se encuentra de forma abundante en casi todo tipo de alimentos, principalmente en los ricos en proteínas, como carnes, pescado, huevo y productos lácteos. También se encuentra en legumbres, granos, cereales y en el chocolate. Además es un aditivo en varios alimentos procesados en forma de sales de fosfato. Esto dificulta la confección de dietas con restricción de fósforo para pacientes con insuficiencia renal. ²¹

1.1.3 Magnesio

Un adulto promedio contiene en su masa corporal entre (20-28) g de magnesio. Aproximadamente entre (50-60) % del magnesio total se encuentra en el hueso, por ejemplo como $Mg(OH)_2$ o $Mg_3(PO_4)_2$, alrededor de un (20-25) % se localiza en los músculos y el resto se distribuye en los otros tejidos blandos y fluidos extracelulares. Las concentraciones séricas de este elemento oscilan entre (0,70-1,1) mmol/L. El magnesio se puede encontrar en el LEC en forma libre, alrededor de 55 %, formando complejos con citrato, fosfato y otros iones 13 % o unido a las proteínas 32 %. ^{9, 10, 24}

Absorción y homeostasis

La homeostasis del magnesio se mantiene controlando la eficacia de la absorción intestinal y sus pérdidas a través de la orina. La absorción de magnesio es del (30-65) % de la ingesta y ocurre principalmente en el yeyuno y el ileum. Este proceso ocurre por tres mecanismos: la difusión pasiva, arrastre de solutos (siguiendo el movimiento del agua), y transporte activo.

Los fosfatos libres afectan la absorción al formar sales insolubles con el Mg^{+2} . También la presencia de fitatos, fibra y ácidos grasos, disminuyen la absorción. Por otro lado las proteínas y la fructuosa pueden aumentar su absorción.

El riñón es el principal regulador del magnesio, en este órgano se somete a un proceso de filtración y reabsorción. Alrededor de un 70 % del magnesio sérico es ultrafiltrado y el riñón sano reabsorbe alrededor del 95 % de esta cantidad. Cuando la dieta es baja en magnesio, la eliminación renal se reduce.⁸

Funciones Fisiológicas

Además de formar parte estructural del hueso, asociado al calcio y al fósforo, el magnesio cumple importantes funciones, en su estado intracelular se enlaza a los fosfolípidos como parte de la membrana para dar estabilidad. También se encuentra asociado a los ácidos nucleicos, proteínas (enzimas), y se enlaza al ATP, dando soporte a su estructura.

El magnesio interviene en al menos 300 pasos enzimáticos del metabolismo intermedio. En la glucólisis, siete enzimas requieren Mg^{+2} en forma iónica o asociado a ATP o AMP. Participa en la descarboxilación oxidativa en el ciclo de Krebs, en la β -oxidación de los ácidos grasos y en la síntesis de proteínas. Interviene en la agregación de las partículas de ribosomas y en la transferencia de la acil aminoácido a la molécula de ARN. El Mg^{+2} es necesario para la formación de un segundo mensajero, el monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico) por la adenilato ciclasa. Además el magnesio afecta la fisiología cardíaca, con el acoplamiento de

neurotransmisores y enzimas a los receptores, con la activación de proteínas y la modulación de diversos canales iónicos.^{9,12}

Otras posibles funciones del magnesio se relacionan con disminución de la presión sanguínea por dilatación de las arterias, prevención de arritmias cardíacas anormales y la inhibición de coágulos en la sangre.¹⁴

Deficiencias

La hipomagnesemia es una reducción de la concentración normal de magnesio menor a 0,75 mmol/L en el LEC, que se puede manifestar por deficiencia en la ingesta dietética, síndromes de mal absorción, pérdidas excesivas por inadecuada resorción en el riñón o por diarrea crónica.¹⁹

La hipomagnesemia se encuentra asociada a la hipocalcemia y a la hipofosfatemia. Los síntomas clínicos son difíciles de determinar, estos incluyen: anorexia, náusea, debilidad y disfunción neuromuscular. Se cree que puede existir relación entre los bajos niveles de magnesio y la presencia de alteraciones cardiovasculares, como arritmia, taquicardia, fibrilaciones e isquemia; también se asocia con hipertensión, osteoporosis y diabetes mellitus.^{19, 24}

Toxicidad

La hipermagnesemia es un incremento de la concentración de magnesio en el plasma por encima de los niveles normales. Concentraciones elevadas de magnesio conducen a una disminución de la transmisión neuromuscular, electroconducción cardíaca y a depresión de los ganglios simpáticos. Todos estos efectos son secundarios a un bloqueo de la liberación de la acetilcolina y son antagonizados eficazmente por el ión calcio.

El cuadro clínico es generalizado y progresivo, se manifiesta como parálisis muscular incluyendo la vejiga y el intestino. Además manifiesta otros síntomas como: náusea, vómito, letargo, confusión, depresión respiratoria, ausencia de reflejos osteotendinosos, hipotensión y paro cardíaco.^{10, 19}

Necesidades y recomendaciones

Los Requerimientos Diarios Recomendados de magnesio son de 400 mg para hombres adultos y 310 mg para mujeres; ambos con edades entre los 19 y 30 años. Estos se incrementan después de los 31 años a 420 mg para hombres y 320 mg para mujeres. Las mujeres embarazadas deberían aumentar la ingesta a unos 350 mg diarios.⁸

Fuentes alimentarias

Las fuentes principales de magnesio son los vegetales verdes, legumbres, nueces y los cereales de grano entero. Las frutas, carnes y productos lácteos también contienen cantidades relativas de este nutriente. Existen bebidas ricas en magnesio como el café, el té y el chocolate. Los alimentos refinados son los que presentan menor contenido de magnesio.^{8, 11}

1.1.4 Potasio

El potasio es el principal catión intracelular del organismo. El 98 % se encuentra en el fluido intracelular con una concentración promedio de 140 mmol/L; mientras que en el LEC se mantiene con límites estrechos de (3,5-5,0) mmol/L. Un hombre promedio de 70 Kg contiene unos 270 mg de potasio; esta cantidad varía según la masa muscular, que es el tejido que presenta mayor contenido de este mineral.^{9, 10, 11}

Absorción y homeostasis

Aproximadamente el 90 % del potasio ingerido en la dieta es absorbido en el tracto gastrointestinal, en este proceso interviene el colon y el intestino delgado. Se cree que el K⁺ es absorbido a través de la membrana apical de la célula mucosal colónica por un transporte activo en que interviene la bomba ATP-asa Na⁺/K⁺, encargada de intercambiar H⁺ por K⁺. Alternativamente el potasio puede entrar a la célula vía

membrana apical por difusión hacia la membrana basolateral mediante canales abiertos de K^+ .²⁵

La absorción de potasio es poco afectada por la dieta, aunque el aceite de oliva puede incrementarla y la fibra dietética disminuirla.¹¹

El cuerpo tiene dos caminos para reducir las concentraciones séricas de potasio: aumentando la cantidad de potasio intracelular o por eliminación renal. En el riñón, el potasio se filtra libremente en el glomérulo, se reabsorbe en el túbulo proximal y se secreta en el distal, este proceso es regulado por la hormona aldosterona.^{9, 10}

Al tubo colector cortical (TCC) llega sólo el 10 % del K^+ filtrado. La eliminación de potasio dependerá de la presencia de mayor o menor número de cargas negativas en el lumen del TCC, lo cual dependerá de la reabsorción de sodio, de la presencia de mayor o menor cantidad de cloro o bicarbonato y del volumen urinario que llegue al TCC (a mayor volumen de orina, mayor será el potasio que se desplace para lograr el equilibrio electroquímico a ambos lados de la membrana tubular). En la regulación de la excreción de K^+ por el TCC, la aldosterona juega un papel fundamental, al aumentar la secreción de K^+ . Asimismo, la secreción de aldosterona aumenta luego de una carga de potasio, mientras que se reduce con la depleción de este ion. La aldosterona actúa estimulando todos los procesos que secretan K^+ ; incrementa el número de canales abiertos de Na^+/K^+ en la membrana luminal y aumenta la actividad de la bomba $ATPasa Na^+/K^+$ en la membrana basolateral.²⁶

Las anomalías de la homeostasis del potasio están relacionadas con problemas de insulina, aldosterona, balance ácido base y función renal.¹⁰

Funciones Fisiológicas

El potasio cumple varias funciones esenciales en el metabolismo energético, el transporte de membrana y el mantenimiento de la diferencia de potencial a través de las membranas celulares. Esta última función es de especial importancia para todas las células neuromusculares y endocrinas, ya que su función está determinada por la

capacidad para despolarizarse y repolarizarse. El potasio es clave en la excitabilidad eléctrica que interviene en la transferencia de señales a través de los nervios, en la contracción consiguiente de los grupos musculares, la liberación de un producto glandular exocrino y la propagación de una onda de despolarización en el músculo liso o en el miocardio.⁹

Se ha demostrado que el potasio tiende a reducir la tensión arterial, por varios mecanismos, entre ellos se encuentran, la supresión del sistema renina-angiotensina y del sistema nervioso simpático, por efecto directo sobre la resistencia vascular periférica, y por el antagonismo de los efectos de la hormona natriurética, dando como resultado un aumento de la excreción de sodio.^{9, 27}

La administración oral de sales de potasio ha demostrado mejoras en el balance de calcio y fósforo, incrementando el ritmo de formación ósea y disminuyendo la resorción.¹¹

Deficiencias

La hipopotasemia puede presentarse como consecuencia de una excesiva entrada de potasio en las células o de una disminución de potasio corporal. El exceso de insulina, los incrementos de catecolaminas, la enfermedad de Cushing (exceso de esteroides), y los diuréticos aumentan la pérdida de potasio. La enfermedad renal crónica, vómitos prolongados, diarreas y abuso de laxantes también pueden provocar hipopotasemia. No se muestran síntomas clínicos, con las bajas ingestas de potasio, excepto en casos de inanición o anorexia nerviosa. La hipopotasemia perturba la actividad nerviosa y neuromuscular, produciendo alteraciones cardíacas, renales y metabólicas.^{11, 19}

Toxicidad

La hiperpotasemia es un aumento anormal de las concentraciones de potasio en el plasma. Esta puede ocurrir debido a un incremento en la ingesta o disminución en la excreción renal, como consecuencia de una insuficiencia renal, por insuficiencia de adrenocortical o por un flujo excesivo de potasio intracelular al fluido extracelular. La hiperpotasemia puede ser causada por traumatismos o infecciones graves, hemólisis o

rabdomiólisis, acidosis metabólica y enfermedad de Addison (hipoaldosteronismo). Los efectos clínicos principales de hiperpotasemia son la disfunción cardíaca y alteraciones en los músculos del esqueleto. Los síntomas se resumen en arritmias ventriculares, paro cardíaco, disfunción neuromuscular y parálisis.¹⁹

Necesidades y recomendaciones

Los problemas nutricionales del potasio están relacionados principalmente con el consumo insuficiente. Los requerimientos de potasio se estiman aproximadamente en 2 g/día. Sin embargo, debido a efectos opuestos con el sodio se consideran óptimas las ingestas mayores, alrededor de 3,5 g/día.¹¹

Fuentes alimentarias

Las fuentes que contienen mayor contenido de potasio son las frutas secas, las frutas frescas, las legumbres y los vegetales. También son buenas fuentes de potasio los cereales, los productos lácteos, las carnes y el pescado. Entre las bebidas con mayor contenido de potasio se encuentra el café, el té, el chocolate y el jugo de naranja.¹⁴

1.1.5 Sodio

El sodio es el principal catión del fluido extracelular y está regulado por un sistema hormonal que también controla el balance de agua, el pH y la presión osmótica. El contenido de sodio de un adulto promedio es de 120 mg, del cual aproximadamente un 30 % se encuentra en la estructura cristalina del hueso. El resto se encuentra en el LEC con una concentración de (136-145) mmol/L, en los nervios y en tejidos musculares. La concentración sérica de sodio, es mantenida por mecanismos que involucran la sed, la hormona antidiurética (ADH) y la función renal.^{10, 11}

Absorción y homeostasis

El organismo absorbe aproximadamente un 95 % de la ingesta de sodio. Este proceso se lleva a cabo en la mucosa intestinal y el colon por tres mecanismos. El primero consiste en un cotransporte de Na^+ /glucosa, en el cual un transportador de la membrana luminal de las células de la mucosa lleva el sodio junto con algún soluto como la glucosa hacia el interior de la célula. Posteriormente el sodio es bombeado hacia la membrana basolateral por la bomba ATP-asa Na^+/K^+ , mientras la glucosa sale de la membrana por difusión simple. El otro sistema consiste en una absorción electroneutral de Na^+ y Cl^- . Este mecanismo permite la entrada de Na^+ por intercambio con H^+ y la entrada de Cl^- por intercambio con HCO_3^- . El último sistema se conoce como mecanismo electrogénico de absorción de sodio. En este el sodio entra a la membrana luminal de la célula mucosal colónica a través de una serie de conductos llamados “canales de Na^+ ”, por gradiente de concentración, en este caso el sodio entra acompañado por agua y aniones. Igualmente, en estos dos últimos mecanismos, el sodio es bombeado hacia la membrana basolateral por la bomba ATP-asa Na^+/K^+ .^{8,}
26

La glucosa y algunos aniones como el citrato, propionato y bicarbonato aumentan la absorción de sodio.¹¹

El exceso de sodio es excretado por los riñones, y una pequeña cantidad en el sudor. La excreción renal y la retención están controladas por la aldosterona. En el riñón, el glomérulo recibe y filtra cerca de 180 L de agua y 600 g de sodio por día. Menos de 2 L de agua y (0,10 - 40) g de sodio terminan en la orina. La mayor parte del agua y el sodio filtrados son reabsorbidos en los túbulos proximales.¹⁰

Las hormonas angiotensina y aldosterona tienen la función de retener el sodio, incrementando su reabsorción. Cuando las concentraciones séricas disminuyen, la renina estimula la activación de la angiotensina en el plasma, la cual estimula la vasoconstricción, que aumenta la presión arterial, disminuye las pérdidas de agua y estimula la liberación de aldosterona en la corteza suprarrenal. El aumento de la concentración de sodio plasmático estimula la resorción y la reabsorción renal de agua

y disminuye su excreción mediante la secreción de la hormona antidiurética en la hipófisis.¹⁰

Funciones Fisiológicas

La función principal del sodio es la regulación del balance osmótico y electrolítico. Es necesario para mantener un adecuado potencial eléctrico de la membrana celular para la función neuromuscular. También es un componente de la apatita del hueso y está implicado en el transporte celular activo. Su participación activa es ocasionada por la enzima ATP-asa Na^+/K^+ de la membrana plasmática. Esta enzima bombea sodio fuera de la célula y al mismo tiempo introduce potasio al interior celular mientras se hidroliza el ATP. Las transmisiones de las señales a lo largo de las células nerviosas, el transporte activo de nutrientes en el interior del enterocito y la contracción y relajación del músculo dependen de la bomba ATP-asa Na^+/K^+ .²⁶

Deficiencias

La hiponatremia consiste en bajas concentraciones séricas de sodio en el fluido extracelular. Esta situación es causada por traumatismos graves, caquexia y uso excesivo de diuréticos. Una ingesta excesiva de agua también puede producir pérdidas de sodio. La retención de agua puede deberse a la ingesta de medicamentos que generalmente producen un incremento de la hormona antidiurética (HAD), o a la ingesta de agua en personas con insuficiencia renal, o con enfermedades hepáticas, colitis ulcerosa, anorexia nerviosa, insuficiencia cardíaca congestiva con edema, infecciones graves y diarrea.^{11,19}

La hiponatremia, rara vez es causada por baja ingestión de sodio, excepto en infantes que ingieren alimentos hipotónicos. Este padecimiento es fisiológicamente significativo, cuando hay un estado de hipoosmolaridad y una tendencia de movimiento del agua libre del LEC al LIC. Cuando los niveles de sodio caen rápidamente (24 a 48) horas, ocurre edema cerebral, con la consiguiente hipertensión endocraneana, cuya principal complicación es la compresión mecánica de las estructuras cerebrales y la herniación.²⁸

Toxicidad

La hipernatremia, representa un déficit de agua en relación a las concentraciones corporales de sodio y puede originarse por la pérdida de agua o por exceso o ganancia de sodio. Los pacientes con riesgo de presentar hipernatremia son aquellos con alteraciones mentales, edades extremas y pacientes hospitalizados debido a una iatrogenia.

Las depleciones de agua son causadas normalmente por diabetes insípida, tumores, histiocitosis, tuberculosis, sarcoidosis, hipodipsia, post-traumática, pérdidas gastrointestinales (vómitos, diarrea, drenajes gástricos) y deshidratación causada por quemaduras, sudoración excesiva o deficiente ingesta de agua. Las ganancias de sodio se deben a ingestión de alimentos hipertónicos, ingestión de agua de mar, infusión de bicarbonato de sodio, hiperaldosteronismo primario, enemas hipertónicos y síndrome de Cushing.²⁹

La hipernatremia se presenta frecuentemente en los recién nacidos o infantes y en adultos mayores, quienes a menudo tienen hipodipsia, también en trastornos neurológicos en la llamada hipernatremia esencial. Diferentes estudios indican que existe relación entre las altas ingestas de sodio y el incremento de la excreción de calcio y resorción ósea. Los síntomas clínicos de la hipernasemia son edema e hipertensión.^{11,19}

Necesidades y recomendaciones

La cantidad de sodio requerida para un adulto se estima en unos 500 g/día. Sin embargo, la ingesta normal de sodio (principalmente en forma de NaCl) varía de (2-14) g por día.^{11,14}

Fuentes alimentarias

Los alimentos naturales como las frutas y los vegetales son los que contienen bajas cantidades de sodio, con excepción de la leche. La mayor cantidad de sodio proviene de la sal (NaCl) utilizada en cocción y preparación de los alimentos. Las fuentes con mayor contenido de sodio provienen de alimentos preparados y procesados, en los cuales se utiliza una amplia variedad de sales de sodio como aditivos. Entre ellos se encuentra el pan, quesos, sopas deshidratadas, salsa de tomate, salsa de soya, snacks, embutidos, y carnes ahumadas.¹⁴

1.2 Reseña epidemiológica y consumo de macrominerales en Costa Rica

1.2.1 Consumo de macrominerales en Costa Rica

El calcio, el fósforo, el magnesio, el sodio y el potasio son macrominerales esenciales en la nutrición y el metabolismo del organismo humano. En Costa Rica se han reportado pocos datos sobre el consumo de estos macrominerales.

La encuesta nacional de nutrición realizada en Costa Rica en 1966 mostró un consumo promedio de calcio de 717 mg/día. Las fuentes principales fueron los lácteos y los frijoles. Para el año 1982, este consumo disminuyó a 505 mg/día, tanto en habitantes del área rural como del área urbana. En ambas poblaciones se identificaron los productos lácteos como fuente principal.^{30, 31}

Un estudio nutricional en mujeres mayores de 45 años de la Región Brunca, realizado en 1991 demostró un consumo promedio de calcio de 600 mg/día. En este caso las fuentes identificadas fueron: la leche, los frijoles, el huevo, la tortilla, el queso y la natilla. Otro estudio realizado en 1993 en Tibás, para adultos, mostró un consumo promedio de calcio de 532 mg/día. Estos datos muestran una deficiencia de calcio con respecto a los requerimientos diarios recomendados.^{31, 32}

En una encuesta realizada en el Carmen de Cartago, en el 2001, se determinó un consumo de calcio entre (450-753) mg/día. Según este estudio, el 73 % de los hogares presentaron bajo consumo de este nutriente.³³

La ingesta real de sodio de la población costarricense es desconocida. La Encuesta Nacional sobre Consumo de Sal Doméstica en el Hogar realizada en 1984, indicó un consumo promedio de NaCl de (10,6 -13,5) g/día. Equivalente a (4,2- 5,3) g Na/día. Se indicó que los alimentos que aportan cantidades significativas de sodio en la dieta nacional son: el pan “francés”, el arroz, el queso fresco, la margarina y el pan dulce. Se estima que el consumo de alimentos procesados, sopas deshidratadas, consomés, salsas y embutidos, contribuyen a la ingesta elevada de sodio en la población.^{30, 34}

La encuesta realizada en Cartago en el 2001 mostró un consumo per cápita promedio de 3 661 mg Na/día. Se identificaron como fuentes principales: sal doméstica 66%, pan y galletas 12 %, consomé 7 % y embutidos 6 %.³³ En este caso el consumo disminuyó, sin embargo, aún sobrepasa el valor indicado por la OMS de 1 700 mg Na / día, entre sus recomendaciones para reducir la presión arterial.³⁵

Con respecto al consumo de fósforo, la encuesta nacional de nutrición de 1982 indicó un promedio de 797 mg/día para la población rural y urbana. El cual es adecuado, según el requerimiento diario recomendado de 700 mg/día.⁸ Entre las fuentes alimenticias principales, se pueden identificar: los productos lácteos, las carnes, las leguminosas y el arroz.³¹

Actualmente no se dispone de datos oficiales a nivel nacional sobre el consumo de magnesio y potasio. Estos nutrientes se deben inferir a partir de los datos disponibles sobre el consumo de alimentos de la población y tablas de composición de alimentos.

1.2.2 Epidemiología de los macrominerales en Costa Rica

La dieta es un factor importante en todos los procesos fisiológicos del cuerpo, si existen deficiencias o excesos de algún nutriente, por largos periodos de tiempo o

dificultades en la adecuada absorción y excreción, se producen desequilibrios en el desarrollo y mantenimiento del organismo.

Un informe de la FAO sobre dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas, sugiere que la dieta y la actividad física son determinantes de la buena salud y la prevención de las principales enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición, como las cardiopatías coronarias y la hipertensión, el cáncer, la diabetes, la obesidad, las fracturas por osteoporosis y las enfermedades dentales.³⁵

En la población costarricense, los trastornos cardiovasculares, la hipertensión arterial, la insuficiencia renal y la osteoporosis son enfermedades crónicas que están relacionadas de alguna manera con el consumo de los macrominerales analizados en esta investigación.

Enfermedades Cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en Costa Rica desde la década de los setentas. En el trienio 97-99, aproximadamente la mitad de las defunciones se debieron a enfermedades cardiovasculares y tumores. En el año 2000 murieron 8 407 hombres y 6 221 mujeres por esta causa, que corresponde a 35 % y 32 % respectivamente, de la mortalidad total para ese año.³⁶

En el contexto de las enfermedades cardiovasculares, se destacan la diabetes y la hipertensión, porque ambas enfermedades a la vez son factores de riesgo biológicos para el daño vascular coronario, renal, o periférico. Un estudio efectuado en los principales hospitales de San José, entre 1993 y 1994, revela que el 20 % de los pacientes internados con un primer infarto eran diabéticos tipo 2 y el 55,2 % eran hipertensos.³⁷

Hipertensión arterial

Los nutrientes que usualmente están asociados con la presión sanguínea son: el sodio, el cloro, el potasio y el magnesio, además de la glucosa y el alcohol.

El exceso de cloruro de sodio aumenta la cantidad de agua fuera de la célula, lo que provoca retención de líquido (edema) y aumenta la presión de la sangre. Hay evidencias de que una alimentación baja en sodio reduce la presión arterial en muchas personas hipertensas y disminuye la necesidad de medicamentos antihipertensivos.³³

En sociedades con altas ingestas de potasio, los niveles promedio de presión sanguínea y la prevalencia de hipertensión tienden a ser menores comparados con las que tienen ingestas bajas. Varios estudios clínicos han concluido que el uso de suplementos orales de potasio disminuye la presión sistólica y diastólica de la sangre. Este efecto es más evidente en personas hipertensas que en normotensas, y es aún más pronunciado en personas con dietas altas en NaCl.³⁸

En la mayoría de las poblaciones existe una relación inversa entre el consumo de calcio y la presión sanguínea. Las bajas ingestas de calcio están asociadas con un incremento en la prevalencia de hipertensión. El análisis de ensayos clínicos ha demostrado pequeñas reducciones estadísticamente significativas de la presión sistólica con los suplementos de calcio.³⁸

Varias investigaciones demuestran que los individuos con hipertensión suelen tener dietas bajas en calcio, y que la ingesta de productos lácteos y de suplementos con calcio (1 000 mg) reduce la presión arterial en personas jóvenes y en mujeres con eclampsia (presión arterial del embarazo).³⁹

También se ha investigado la relación entre el magnesio y la hipertensión, debido a que este elemento promueve la relajación del músculo liso y por los efectos que produce al interactuar con el calcio. Un incremento en la presión sanguínea está relacionado con la excreción del calcio y del magnesio. En diferentes estudios se ha encontrado una relación inversa entre la ingesta de magnesio y la presión sanguínea.⁸

La hipertensión arterial (HTA) es un problema en salud pública a escala mundial y nacional. Este trastorno es reconocido como un importante factor de riesgo para la enfermedad isquémica coronaria, la enfermedad cerebrovascular, la insuficiencia cardíaca, la insuficiencia renal y de enfermedades vasculares periféricas.

Según datos obtenidos en el periodo de 1999 al 2002 por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades en Estados Unidos, se reportó un incremento de 28,9 % de personas con hipertensión (definida como una presión sistólica > 140 mmHg y una diastólica > 90 mmHg). Actualmente, una de cada cuatro personas de la población estadounidense tiene hipertensión arterial.⁴⁰

En el caso de Costa Rica alrededor del 14 % de la población adulta padece de hipertensión arterial.⁴¹ Además de ser uno de los trastornos crónicos con mayores costos de consulta externa. En el 2006, un trabajo presentado por la Asociación Costarricense de Salud Pública, indicó una prevalencia de HTA en el 59 % de los adultos mayores.⁴²

Muchos investigadores han sugerido que la HTA esencial se puede comenzar a desarrollar durante la infancia, y existe evidencia de que los niños y los adolescentes que presentan presiones arteriales relativamente elevadas para su edad, mantienen esta tendencia cuando son adultos.⁴³

Ulate (1989), realizó una investigación sobre la distribución de valores de presión arterial en 934 niños, con edades entre 6 y 16 años, que residen en el Valle Central de Costa Rica. La prevalencia de hipertensión arterial en la muestra fue de 3,4 %.⁴³

En el año 2005 se realizó un estudio sobre la calidad de atención en hipertensión arterial. En este se demostró que al 29 % de las persona hipertensas estudiadas (1 591) se les diagnosticó con daño a órgano blanco o enfermedad cardiovascular. Se encontró un aumento del número de personas hipertensas conforme aumenta la edad. Además 79 % de la población hipertensa estudiada es mayor de 50 años.⁴⁴

Osteoporosis

En la osteoporosis hay una reducción tanto de la matriz proteica como de la mineral, a la vez que se dan varias alteraciones en la microestructura del hueso, lo que aumenta el riesgo de fractura al irse reduciendo la densidad ósea. Entre los factores determinantes de la osteoporosis se encuentran los relativos a la alimentación y estilos de vida.⁴⁵

Es conveniente diferenciar la osteoporosis de otros procesos, como la osteopenia y la osteomalacia que también se acompañan de un debilitamiento o pérdida de la masa ósea. La osteopenia es un término general descriptivo aplicable a todos los sistemas del esqueleto donde se observa un menor estado de calcificación o densidad del hueso. Y la osteomalacia -conocida como raquitismo en infantes, es una forma de osteopenia cuya característica principal es la presencia de matriz osteoide suficiente, pero que no mineraliza correctamente debido a la falta de calcio.⁴⁶

El calcio y el fósforo son los minerales más estudiados en la prevención y el tratamiento de la osteoporosis. En peso, el calcio representa el 40 % del mineral óseo y el fósforo el 60 %. El proceso de remodelación del esqueleto requiere indispensablemente de concentraciones plasmáticas normales de calcio y fosfato.⁴⁷

El hueso, presenta zonas de reabsorción debido la acción de los osteoclastos: células que segregan sobre la superficie ósea, enzimas que disuelven el mineral y digieren la matriz. A lo largo del ciclo vital el esqueleto mantiene una elevada tasa de renovación, de manera que entre el (10-30) % de masa ósea se renueva cada año.⁴⁸

Varios estudios han demostrado que una ingesta de calcio adecuada, produce una mejor mineralización del hueso durante la adolescencia. Esto es determinante para alcanzar el valor máximo de masa ósea, que se obtiene en promedio entre (25-30) años; a partir de ese momento, se inicia un proceso de pérdida leve con la edad, debido a un desequilibrio en el cual el proceso de resorción del hueso excede al de formación y por tanto, la masa ósea desciende entre un (0,5-1) % en promedio por año.^{49,50}

Los cambios que ocasionan la mayor pérdida de hueso producto del aumento en la actividad osteoclástica, ocurren cuando disminuyen los niveles de estrógeno en las mujeres, o en hombres y mujeres que superan los 60 años de edad. La cantidad de hueso disponible como soporte mecánico disminuye por debajo del umbral de fractura, ocasionando que el paciente sufra de fracturas sin traumatismo o como consecuencia de un traumatismo leve. Esto ocasiona primero pérdidas en el esqueleto axial (costilla, vértebra y pelvis) y posteriormente en los huesos largos. Las secuelas clínicas principales de la osteoporosis son las fracturas de las vértebras, de la muñeca, de la cadera, del húmero y de la tibia^{49,51}

Los pacientes con osteoporosis no complicada pueden permanecer asintomáticos o pueden presentar dolor en huesos y músculos, especialmente en la espalda. Pueden presentar fracturas en vértebras por traumatismos mínimos, o pueden darse fracturas espontáneamente por lo general en las vértebras de carga.⁵⁰

En Costa Rica, en el año 1998, el número de pacientes con diagnóstico de fractura de cuello de fémur fue de 1698, de los cuales el 44 % correspondió a hombres y el 56 % restante a mujeres. De este grupo el 46,3 % de los hombres y el 90 % de las mujeres presentaban edades mayores a los 60 años.⁵²

De acuerdo con Clark (2009), directora del Proyecto Latinoamericano de Osteoporosis Vertebral, de la Universidad de California en Estados Unidos, el 14,7 % de la población de América Latina sufre fracturas de vértebras. Los estudios realizados demuestran que en mujeres latinas entre los 50 y los 59 años la probabilidad de padecer osteoporosis en las vértebras es de un 9% y que entre los 60 y 69 años el riesgo sube al 10,2 %. De los 70 a 79 años las fracturas se dan en un 18 % de los casos. La incidencia es del 27 % en mujeres con más de 80 años. En Costa Rica no existen datos sobre la incidencia de osteoporosis vertebral, solamente se conoce que el 90 % de las fracturas de cadera se deben a la osteoporosis.⁵³

Después de la menopausia las mujeres presentan una intensa aceleración de la pérdida de masa ósea debido a la desaparición de los efectos inhibidores de los estrógenos sobre el recambio óseo. Y como consecuencia, la absorción por transporte activo del calcio se reduce y las pérdidas renales aumentan. Así para conseguir un balance equilibrado se precisan aportes mayores de consumo de calcio en mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas.^{49, 50, 54}

Altas ingestas de fósforo, combinado con bajo consumo de calcio puede conducir a hiperparatiroidismo y pérdida de hueso. Una dieta adecuada en calcio, consumo moderado de proteína y suficiente fósforo permite alta densidad ósea. Por otro lado las deficiencias de fósforo, son poco frecuentes y son producto de una desnutrición muy marcada, que podrían incrementar los riesgos de fractura.⁵⁵

La ingesta exagerada de sal o de proteínas incrementa la pérdida urinaria de calcio por lo que ambos se pueden considerar factores de riesgo para la osteoporosis. Un

incremento de sodio en la dieta produce perdida renal de calcio, incrementa la secreción de PTH y de calcitriol. Un consumo elevado de sodio en la dieta de adultos que tienen una producción menor de calcitriol, o un incremento en la reabsorción tubular de sodio podría aumentar la perdida ósea.⁵¹

Por cada aporte de 500 mg de sodio en la dieta, el riñón elimina unos 10 mg de calcio. Por ello, se ha indicado que las mujeres postmenopáusicas que sigan las recomendaciones de ingerir 1 000 mg de calcio al día no deben superar consumos de 2 000 mg de sodio (lo que equivale a 5 g de sal).⁵⁴

Sin embargo, la ingesta de sodio no es tan problemática cuando el consumo de calcio o de potasio es el recomendado. La importancia del potasio se basa en la influencia sobre la homeostasis del calcio, particularmente en su conservación urinaria y su excreción. Dietas bajas en potasio incrementan la excreción urinaria de calcio. Por lo tanto, es recomendable asegurar una ingesta suficiente de potasio con dietas basadas en frutas y vegetales.⁵⁵

En la actualidad, las deficiencias de magnesio son tratadas eficientemente, y se pueden detectar fácilmente. Varios estudios epidemiológicos han encontrado que altas ingestas de magnesio están asociadas con una mayor densidad de masa ósea en hombres y mujeres de edad avanzada. El déficit de magnesio suele acompañarse de un balance cálcico positivo ya que hay hipocalcemia, hipocalciuria y reducción de la secreción de PTH.^{54,55}

Insuficiencia Renal Crónica (IRC)

Existen múltiples causas de Insuficiencia Renal Crónica (IRC), las enfermedades más comunes asociadas son: glomerulonefritis, pielonefritis crónica, hipertensión arterial, enfermedad policística, cálculos renales y diabetes mellitus. Este padecimiento se caracteriza por la pérdida de la capacidad reguladora del organismo para excretar productos del metabolismo proteico, los cuales se acumulan en la sangre y desarrollan el síndrome urémico; también produce alteraciones electrolíticas: retención de potasio (produciendo hiperpotasemia), elevación del fósforo del plasma sanguíneo, así como

bajo nivel de calcio. La insuficiencia renal produce acidosis, altera el equilibrio del calcio y fósforo en los huesos (osteodistrofia renal).⁵¹

El tratamiento de la IRC requiere de un control dietético ajustado en el consumo de lípidos, proteínas, calcio, sodio y potasio. Ya que este es un factor condicionante de la evolución de la patología.

Watnick y Morrison (2008), indican que alrededor de 20 millones de americanos adultos son afectados por la enfermedad renal crónica, y de estos casos el 70 % es causado por diabetes mellitus o por hipertensión arterial. La mayor complicación de la insuficiencia renal crónica es el alto riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular. El 95 % de pacientes con insuficiencia renal crónica terminal mueren por falla cardíaca. En el progreso de la insuficiencia renal, se desarrolla hipertensión debido a la retención de agua y sal. El aumento de la presión puede ser controlado con la restricción dietética de agua y sal, pérdida de peso y terapia farmacológica.⁵⁶

Existe poca información en el país sobre la prevalencia de la Insuficiencia Renal. En 1991 se diagnosticaron 348 casos de pacientes con IRC entre el Hospital San Juan de Dios y el Hospital Calderón Guardia, los cuales representan un 30,7 % de la población diagnosticada para ese año.⁵⁷

Esquivel (1994), identificó los conocimientos y prácticas alimentarias de 53 pacientes diagnosticados con IRC, en los hospitales San Juan de Dios y Calderón Guardia. Los resultados mostraron deficiencias respecto al consumo de alimentos ricos en proteína, sodio, potasio, calcio, cantidad diaria recomendada de líquidos, así como aspectos relacionados con la importancia y beneficio de la terapia dietética.⁵⁷

La habilidad del riñón para ajustarse a las variaciones de sal y agua se ve limitada en la enfermedad renal. Una elevada ingesta de NaCl favorece la aparición de falla cardíaca, edema e hipertensión; mientras que las bajas ingestas de sal, ocasionan contracción del volumen produciendo hipotensión. El aumento de la presión puede ser controlado con la restricción dietética de agua y sal (se recomienda reducir el consumo de sal a 2 g/día), pérdida de peso y terapia farmacológica.⁵⁸

Los desordenes de calcio y fósforo en el hueso también se pueden referir a la insuficiencia renal crónica, principalmente ocasionados por hiperparatiroidismo secundario. El aumento de la PHT produce calcificaciones metastásicas, donde precipitan calcio y fosfato en arterias, tejido cardiaco y pulmonar. Por lo que la prevención de hiperparatiroidismo implica una dieta baja en fósforo.

La osteomalacia es otra forma de osteodistrofia renal. Cuando empeora la función de los riñones, disminuye la absorción de calcio terminando en una posible hipocalcemia y anormal mineralización del hueso.⁵⁸

1.3 Análisis de minerales en alimentos

Antes de realizar el análisis elemental en los alimentos, primero se debe destruir la materia orgánica, o realizar una extracción y concentración del analito. Los tratamientos convencionales de mineralización se basan generalmente en la incineración vía seca, por calentamiento a elevadas temperaturas, entre los (500-550) °C, o digestión vía húmeda, mediante el calentamiento con oxidantes, generalmente con mezclas de ácidos fuertes.⁵⁹

En la incineración, se requieren periodos muy largos de calentamiento. Además algunos elementos se pierden por volatilización o absorción en los recipientes de sílice o de porcelana, principalmente en el estudio de elementos traza. El calentamiento por encima de los 500 °C puede provocar pérdidas de metales alcalinos. El fósforo se pierde como óxido ácido, principalmente en presencia de sulfato, excepto cuando se ha adicionado un exceso de magnesio. En la digestión húmeda, las temperaturas son más bajas, y se llevan a cabo en menos tiempo, sin embargo se requieren grandes cantidades de reactivos corrosivos, lo que dificulta su utilidad para el análisis de un mayor número de muestras.⁵⁹

El análisis cuantitativo de los elementos se puede realizar por métodos clásicos: gravimétricos y volumétricos, o por métodos instrumentales, espectroscópicos, electroquímicos ó cromatográficos.

Los métodos instrumentales se basan en la medida de una propiedad fisicoquímica del analito, denominada señal analítica, la cual es transformada por el instrumento en un lenguaje entendible, y mediante el proceso de calibración se puede relacionar esta señal con la concentración del analito. Algunas ventajas que ofrecen estos métodos son: mayor rapidez de análisis, posibilidad de automatización, alta sensibilidad y buena precisión.⁶⁰

1.3.1 Análisis de fósforo

En los productos alimenticios los metafosfatos o pirofosfatos deben ser convertidos a ortofosfatos por tratamiento ácido. La determinación de fósforo en alimentos, se realiza principalmente por espectrometría de absorción visible, mediante dos métodos colorimétricos:

a. Método del vandato-molibdato

Este método se basa en la reacción de Mission en la que una disolución ácida de ortofosfato, se trata con un reactivo compuesto por ácido molíbdico y ácido vanádico para formar el ácido vanadomolibdofosfórico $[H_3PO_4 \cdot VO_3 \cdot 11MoO_3 \cdot nH_2O]$; un complejo muy estable de color amarillo, que tiene una absorptividad molar de 1 800 a 400 nm.⁶²
⁶³

Este método se utiliza ampliamente en la determinación de fósforo en queso (Método oficial 991.25), en vinos (Método oficial 962.11), en alimentos para animales (Método oficial 965.17), en frutas (Método oficial 970.39). La mineralización de la muestra se realiza por vía seca en una mufla o por vía húmeda con $HClO_4$ y HNO_3 .⁶¹

b. Método del azul de molibdeno

Consiste en la reacción entre el molibdato de amonio con disolución de ortofosfato, en medio ácido, para formar el ácido fosfomolibdico (reacción de Denigè), que es reducido con cloruro estanoso o con otros agentes reductores como: ácido ascórbico, fenilhidracina, hidroquinona, ó dióxido de azufre, a un compuesto azul que tiene una fórmula aproximada $[(MoO_2 \cdot 4MoO_3)_2 \cdot H_3PO_4]$ y presenta una absorptividad molar

aproximadamente de 25 000 con un pico máximo de absorción a 850 nm, bastante ancho.^{62, 63}

Este método se aplica en las siguientes matrices alimenticias: frutas y derivados (Método oficial 935.45), agua (Método oficial 973.55), quesos y derivados (Método oficial 990.24), carnes y derivados (Método oficial 991.27), alimentos varios (papa, harina, salchicha, jamón, queso, fórmula de infantes y leche descremada, (Método oficial 995.11). La mineralización de la muestra se realiza por vía seca en una mufla o por vía húmeda con mezclas de HNO_3 , H_2SO_4 , HClO_4 , o de H_2SO_4 y H_2O_2 .⁶¹

Existen otros métodos utilizados para la cuantificación de fósforo en alimentos: La espectrometría de emisión con plasma acoplado inductivamente ICP empleada en plantas y alimento para animales (Método oficial 985.01). Los métodos gravimétricos por formación de molibdofosfato de quinolidina, el cual se aplica en plantas (Método oficial 966.01), frutas (Método oficial 970.39) y gelatina (Método oficial 972.21). Los métodos titrimétricos que consisten en la precipitación de los fosfatos como fosfomolibdato de amonio. En este método el precipitado se recoge y se disuelve en un pequeño exceso de álcali y se retitula con ácido. Se aplican en la determinación de fósforo en carne (Método oficial 969.31), alimento para animales (Método oficial 964.06), cerveza (Método oficial 920.55), huevo (Método oficial 931.06) y harina (Método oficial 948.09).⁶¹

1.3.2 Análisis de calcio

Existen diferentes técnicas para la determinación de calcio en alimentos, tales como, gravimetría, volumetrías redox y de formación de complejos, cromatografía iónica y potenciometría directa. Entre los métodos oficiales del AOAC predominan los métodos titrimétricos, espectrometría de emisión con plasma acoplado inductivamente (ICP) y la espectrometría de absorción atómica.⁶¹

Las volumetrías de oxidación/reducción se utilizan para la cuantificación de calcio con KMnO_4 , en plantas (Método oficial 910.01 y 921.01), en alimentos para animales (Método oficial 927.02 y 935.13) y en harina (Método oficial 944.03). Las volumetrías

de formación de complejos emplean EDTA para la determinación de Ca en cerveza (Método oficial 976.09) y en vegetales enlatados (Método oficial 968.31).⁶¹

El calcio se cuantifica gravimétricamente en frutas (Método oficial 929.07), por espectrometría de emisión ICP, en fórmula de infantes (Método oficial 984.27), en plantas y en alimentos para mascotas (Método oficial 984.27).⁶¹

Los métodos oficiales del AOAC basados en el análisis por absorción atómica se destinan para las siguientes matrices: queso (Método oficial 991.25), fórmula de infantes, productos de nutrición enteral y alimentos para mascotas (Método oficial 985.35).⁶¹

1.3.3 Análisis de potasio

Los métodos oficiales del AOAC para la determinación de potasio en alimentos son: la fotometría de llama, la espectrometría de emisión con plasma acoplado inductivamente y la espectrometría de absorción atómica.⁶¹

Por medio de la fotometría de llama se determina el potasio en diferentes matrices como, plantas (Método oficial 956.01), vinos (Método oficial 963.13), frutas (Método oficial 965.30) y alimentos marinos (Método oficial 969.23), este último se emplea por emisión o absorción.⁶¹

La emisión con plasma acoplado inductivamente (I.C.P), se utiliza para la determinación de potasio en fórmula de infantes (Método oficial 984.27), mediante digestión ácida en matraz Kjeldahl con una mezcla de HNO₃ y HClO₄ (1+2). Por esta técnica también se determina el potasio en plantas y alimentos para mascotas (Método oficial 985.01), utilizando una mufla a 500 °C por 3 horas para la mineralización de las muestras, las cuales se tratan con HNO₃ y finalmente, se disuelven con HCl (1+1).⁶¹

La espectrometría de absorción atómica se emplea para la cuantificación de potasio en fórmula de infantes, productos de nutrición enteral y alimentos para mascotas (Método oficial 985.35). La destrucción de la materia orgánica se realiza en mufla a 525 °C durante aproximadamente 8 horas, posteriormente, las cenizas se disuelven

en HNO_3 1 mol/L. La medición de absorbancia se realiza con llama aire-acetileno y se utiliza CsCl al 0,5 % como supresor de ionización.⁶¹

1.3.4 Análisis de sodio

Los métodos oficiales para la determinación de sodio en alimentos son: la fotometría de llama, la espectrometría de emisión de llama, la espectrometría de emisión con plasma acoplado inductivamente y la espectrometría de absorción atómica. También se utilizan algunos métodos titrimétricos y potenciométricos.⁶¹

La espectrometría de llama se utiliza para la determinación de Na en plantas, en el cual se realiza un tratamiento previo de extracción (Método oficial 956.01). También se mide el sodio en alimentos provenientes del mar (Método oficial 969.23), en este método, la mineralización de las muestras se realiza vía seca a 525 °C durante 2 horas y posterior tratamiento de las cenizas con HNO_3 , o mediante digestión ácida con HNO_3 , por calentamiento hasta sequedad y previa eliminación de los cloruros mediante precipitación con AgNO_3 .⁶¹

La determinación de sodio en frutas y derivados se realiza por espectrometría de llama (Método oficial 966.16), en este caso no se realiza la etapa de mineralización. Las muestras se preparan según los lineamientos del AOAC (Método oficial 920.149), luego se diluyen con agua o LiCl, empleado como estándar interno.⁶¹

El método con electrodo selectivo de iones se utiliza para determinación de sodio en alimentos para usos dietéticos especiales, los cuales presentan menos de 100 mg Na/100g. (Método oficial 987.03). El pretratamiento de la muestra consiste solamente en licuar y diluir con agua.⁶¹

La espectrometría de absorción atómica con llama se aplica para la determinación de Na en cerveza (Método oficial 976.25), fórmula de infantes, productos de nutrición enteral y alimentos para mascotas (Método oficial 985.35). En este último, el tratamiento de las muestras es el mismo indicado anteriormente, para el análisis de potasio. Se emplea aire-acetileno y CsCl al 0,5 % como supresor de ionización.⁶¹

1.3.5 Análisis de magnesio

El magnesio se determina gravimétricamente en plantas (Método oficial 920.09) y en agua (Método oficial 920.200), por formación de la especie $Mg_2P_2O_7$.⁶¹

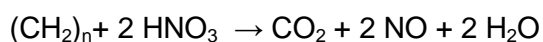
La espectrometría de absorción atómica con llama se aplica para la cuantificación de magnesio en diferentes matrices: agua (Método oficial 974.27), queso (Método oficial 991.25), fórmula de infantes, productos de nutrición enteral y alimentos para mascotas (Método oficial 985.35). En estos métodos se utiliza La 0,1 % como disolvente para minimizar la interferencia de los fosfatos.⁶¹

El magnesio se determina también por espectrometría de emisión con plasma acoplado inductivamente en fórmula de infantes (Método oficial 984.27), planta y alimentos para mascotas (Método oficial 985.01). La mineralización en estos métodos se realiza por digestión ácida o por vía seca, respectivamente, como se indicó anteriormente para el análisis de potasio.⁶¹

1.3.6 Digestión en horno de microondas

Una alternativa empleada actualmente para la destrucción de la materia orgánica de las muestras, es la digestión en un horno de microondas, que se realiza en recipientes cerrados, con temperaturas y presiones elevadas. El calentamiento en este sistema, se da por absorción directa de la energía electromagnética, que causa movimiento de todas las moléculas de forma simultánea, ocasionando que se alcance más rápidamente la temperatura de ebullición en toda la disolución.

Cuando las muestras orgánicas se descomponen en un sistema cerrado de digestión con microondas, se generan productos gaseosos que incrementan la presión del sistema. La reacción exotérmica de la degradación incrementa la temperatura.⁶⁵



Las ventajas principales que ofrece esta técnica son: la disminución significativa de los tiempos de reacción y las pérdidas por evaporación de los componentes volátiles. Además se utiliza menos cantidad de reactivos oxidantes y se disminuye la contaminación y pérdida de muestra.^{66, 67}

Entre los métodos del AOAC, la destrucción de la materia orgánica con microondas se emplea solamente para el análisis elemental de fertilizantes (Método oficial 2006.03) y en la determinación de Pb, Cd, Zn, Cu, Fe en alimentos (Método oficial 999.10), para su posterior cuantificación por espectrometría de absorción atómica con llama y horno de grafito.⁶¹

1.3.7 Justificación de los métodos empleados para la cuantificación de Na, K, P, Mg y Ca

Para la determinación de fósforo es preferible un método colorimétrico, ya que presenta menos interferencias y mayor sensibilidad. El método basado en la formación del complejo azul de molibdeno se utiliza en la determinación de trazas, sin embargo presenta algunos inconvenientes. No es un compuesto estequiométrico y su espectro de absorción depende de la manera en que ha sido preparado. La intensidad del color de sus disoluciones varía con el tiempo, por lo que las lecturas de absorbancia deben realizarse antes de 1 o 2 horas después de prepararse. Además el exceso de molibdato de amonio también se reduce con el tiempo, en disolución fuertemente ácida (≥ 1 mol/L). Entre las interferencias principales se encuentra el Cr^{6+} y el NO_2^- , que producen resultados un 3 % más bajos cuando se encuentran en concentraciones de 1 mg/L y del (10-15) % en concentraciones de 10 mg/L.⁶⁴

El método del ácido vanadomolibdofosfórico, es adecuado para la cuantificación de fósforo total en los alimentos, pues en este tipo de matriz, el fósforo se presenta en concentraciones elevadas. Además el color del complejo es estable durante días y su intensidad no es afectada por las variaciones de la temperatura ambiente. Muchos iones no producen interferencia en altas concentraciones (1 000 mg/L) como el NO_3^- , NO_2^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , ClO_4^- , Li^+ , CN^- , SiO_4^{2-} , MoO_4^{2-} , entre otros.⁶⁴

En espectrometría de emisión atómica y absorción atómica de llama se producen las mismas interferencias, pero con diferente magnitud. Estas pueden ser de dos tipos:

(a) Interferencias espectrales. Estas se producen por efectos de emisión o absorción de otras especies, que imposibilitan la resolución de la señal de analito, por la formación de productos de combustión con bandas anchas de absorción o por partículas que dispersan la radiación.

(b) Interferencias químicas. Son más comunes y están relacionadas con diferentes procesos que ocurren durante la atomización de la muestra, como la formación de compuestos de baja volatilidad, equilibrios de disociación y de ionización.⁶²

La técnica de absorción atómica ofrece algunas ventajas con respecto a la emisión de llama, generalmente es más sensible y presenta menor dependencia de la temperatura. En la emisión se requiere una temperatura óptima de excitación, que va a determinar la relación entre átomos excitados y no excitados en la llama, en el caso de la absorción, los átomos se encuentran en su estado fundamental, además se utiliza como fuente de radiación una lámpara compuesta por el elemento que se analiza, y con esto se disminuyen las interferencias espectrales.^{60,64}

En la espectrometría de emisión la radiación generada por los átomos situados en la parte central de la llama es absorbida por otros átomos que se encuentran en su estado fundamental, ocasionando que el aumento de la emisión disminuya con la concentración. Para el sodio y potasio, el gráfico de intensidad de emisión con respecto a la concentración puede presentar una relación lineal poco satisfactoria. Por tanto, generalmente se requiere del uso de patrón interno.^{64, 68}

Por otro lado, la espectrometría de absorción atómica (EAA) proporciona mejores resultados en cuanto a exactitud, conveniencia y límites de detección para mayoría de los elementos. En la espectrometría de emisión atómica, las fuentes de plasma (ICP) son las más utilizadas actualmente, con esta técnica es posible analizar de manera simultánea una serie de elementos, además de que los intervalos lineales de concentración abarcan varios órdenes de magnitud. Sin embargo con esta técnica se

requiere un volumen mayor de muestra, mayor gasto de capital inicial y requiere un mantenimiento periódico. Los métodos de absorción atómica tienen la ventaja de requerir equipos más simples y menos costosos, de fácil operación y de alta precisión. Mediante esta técnica es posible analizar la mayoría de los cationes de importancia a nivel nutricional. Sin embargo tiene algunas limitaciones, pues no se pueden realizar análisis multielementales rápidos.⁶⁰

En EAA las interferencias químicas son las más comunes, pero se pueden minimizar con el empleo de condiciones de trabajo adecuadas.

La cuantificación de calcio se ve afectada por la formación de compuestos de baja volatilidad con fosfatos y sulfatos, que producen errores negativos. Esta interferencia se logra eliminar aplicando temperaturas elevadas de llama o mediante el uso de un agente liberador como estroncio o lantano, los cuales reaccionan preferiblemente con esos aniones. El estroncio y el lantano también se emplean en la determinación de magnesio para eliminar la interferencia del aluminio, el cual forma compuestos termoestables con este elemento.

La cuantificación de elementos alcalinos como sodio y potasio se ve afectada por la formación de equilibrios de ionización los cuales disminuyen la concentración de átomos en la llama y por tanto la intensidad de absorción o emisión. Esto se puede eliminar mediante la adición de un supresor de ionización en exceso. Los supresores más comunes son el cesio y el litio para la determinación de potasio y el cesio y potasio para las determinaciones de sodio.⁶⁰

1.3.8 investigaciones sobre metales en alimentos para Costa Rica.

A continuación se describen algunas de las investigaciones realizadas en Costa Rica para la determinación de minerales en alimentos.

Aiello (1983)⁶⁹ determinó el contenido de Cu, Sn, Fe, Mn y Zn por espectrometría de absorción atómica en conservas vegetales de arveja, palmito y piña. Las muestras fueron liofilizadas y mineralizadas por digestión húmeda con HCl y HNO₃ concentrados. Se estudió el efecto que producen la temperatura y el tiempo de

almacenamiento sobre el contenido de estos metales. Los resultados indicaron un incremento en el contenido de Fe y Sn con el aumento de la temperatura. Mientras que el tiempo de almacenamiento provocó cambios en las concentraciones de Fe, Sn y Zn. El contenido de zinc en conservas de piña y jugo de piña sobrepasó la norma de 5 mg/L en 30 días de almacenamiento a 37 °C. En el caso del hierro la norma de 15 mg/L se superó entre el tercero y cuarto mes de almacenamiento a 37 °C. El almacenamiento en conservas de piña durante 21 días en refrigeración produjo un incremento en las concentraciones de Fe y Sn. Para el hierro solamente en 5 días se superó la norma de 15 mg/L. El contenido de Pb en conservas almacenadas por un periodo de 6 meses a 37 °C, no superó la norma de (0,3-0,5) mg/L en jugos y de (1-2) mg/L en conservas vegetales.

Arce (1986)⁷⁰ evaluó el contenido de Pb, Cd y Sn en harina de pescado, sardina, atún fresco y en conservas que se producen en Costa Rica, mediante la técnica de absorción atómica con horno de grafito. La mineralización de las muestras se realizó con HNO₃ y H₂SO₄ concentrados para la determinación de Pb y Cd y con HCl concentrado para la determinación de Sn. La concentración de estos metales en los productos enlatados fue superior a la de los productos frescos. Los resultados obtenidos para las muestras de sardina fresca y sardina enlatada fueron los siguientes: para el Pb (0,10-0,23) mg/L y (0,13-0,21) mg/L, para el Cd (0,072-0,098) mg/L y (0,066-0,16) mg/L y para el Sn (1,88-3,02) mg/L y (2,92-3,75) mg/L respectivamente. En el caso del atún fresco y el atún enlatado los valores hallados fueron los siguientes: para el Pb (0,13-0,66) mg/L y (0,29-0,72) mg/L, para el Cd (0,042-0,096) mg/L y (0,14-0,29) mg/L y para el Sn (1,46-6,19) mg/L y (2,30-10,9) mg/L respectivamente. Los resultados sobre el contenido de estos metales en harina de pescado son superiores al resto de los productos con valores para plomo, cadmio y estaño de (0,74-1,75) mg/L, (0,54-1,85) mg/L y (7,5-13,9) mg/L respectivamente. Además se estudió el efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento sobre el contenido de Pb y Sn, donde se encontró un incremento en sus concentraciones, sin superar los límites máximos permitidos.

Montero (1994)⁷¹ determinó el contenido de Na y K en diferentes tipos de galletas, pastas, panes, avena, tortillas y arroz mediante espectrometría de absorción atómica. En este estudio se empleó la técnica de cenizas para la mineralización de las

muestras. El pan y las galletas integrales presentaron el mayor contenido de sodio, con 497 mg/100 g y 354 mg /100 g respectivamente. Las pastas, tortillas, avena y arroz se consideraron muy bajos en este mineral (<8 mg/100g). Con respecto al contenido de potasio, el pan de bollo salado y la galleta de soda integral obtuvieron los valores más altos con 78 mg/100 g y 120 mg/100 g respectivamente. Las pastas, tortillas, avena y arroz obtuvieron valores de (1 a 15) mg/100 g.

En esta investigación se utilizó como referencia la doceava edición del AOAC, para la determinación de humedad y para la cuantificación de sodio y potasio. (AOAC, 1975, Métodos oficiales N° 7077-7080 y 14006, 14008, 14086, 14098) Entre las recomendaciones finales, se indicó continuar con el análisis de Na y K en otros grupos de alimentos y la necesidad de hacer disponible los datos del contenido de estos macrominerales al servicio de nutrición hospitalaria.

En las investigaciones realizadas por Aiello, Arce y Montero no se indica haber realizado la validación de la metodología analítica.

Es importante reconocer el aporte de Pineda (1998),⁷² en el proyecto de mejoramiento de la calidad analítica del laboratorio de control de calidad del Ministerio de Agricultura y Ganadería, al realizar la validación del método espectrométrico por absorción atómica para el análisis de K, Mn y Zn, y del método espectrométrico UV-visible para el análisis de P en muestras de fertilizantes sólidos y foliares. (Método oficial 958.01, AOAC). El tratamiento de las muestras se hizo mediante digestión húmeda. En el caso del análisis de fósforo se recomendó el empleo de una mezcla digestiva compuesta por HNO₃ y HClO₄ cuando las muestras posean material orgánico. En esta investigación se indica la importancia de implementar un programa de aseguramiento de la calidad para los laboratorios y del uso de los materiales de referencia certificados (MRC) en el proceso de validación de un método analítico. Para este estudio se emplearon cinco muestras certificadas sólidas del programa interlaboratorial MAGRUDER. La validación consistió en determinar los parámetros operacionales de metodología: precisión, veracidad, recuperaciones, límites de detección, límite de cuantificación, sensibilidad y ámbito de trabajo.

González (2004),⁷³ determinó el contenido de cadmio en diferentes tejidos de bovino (músculo, hígado y riñón), mediante el método recomendado por Food Safety and Inspection Service (FSIS). Este método se basa en una calcinación para la mineralización de las muestras y el análisis por espectrometría de absorción atómica. La metodología de cuantificación se validó mediante la determinación de los parámetros de desempeño analítico: linealidad (0,02-1,00) mg/L, límite de detección (4,9 µg/Kg), límite de cuantificación (16 µg/Kg), sensibilidad de calibración (0,243 A·L/mg), sensibilidad analítica (105 mg/L), repetibilidad instrumental (< 4,3%), repetibilidad de patrones (<3,5%), reproducibilidad de metodología (CV: 13,5%), veracidad (86,5%), selectividad y especificidad (las interferencias de matriz, químicas o de ionización no fueron significativas). Para un total de 20 animales el contenido promedio de cadmio en tejido bovino fue de 93,7 µg/Kg en hígado, 37,5 µg/Kg en músculo y 253,4 µg/Kg en riñón.

1.4 Validación de métodos analíticos

La validación se define como la confirmación, mediante el examen y la provisión de evidencia objetiva de que los requerimientos particulares para un uso específico se cumplen. (ISO8402:1994)⁷⁴

La validación se aplica cuando se desarrolla un método nuevo o bien se modifica un método ya validado, en este caso, se conoce como validación de diseño. También, se emplea cuando un método de medición ya validado ha sido implementado por primera vez en el laboratorio siguiendo las características establecidas en la validación, en este caso, se conoce como validación de comprobación. Además, existe la validación de control de calidad, la cual consiste en la realización de pruebas rutinarias en el laboratorio para demostrar que los parámetros establecidos en la validación de diseño, se siguen cumpliendo. (ISO 17025:2005)⁷⁴

Una validación de diseño está compuesta por varias etapas: trazabilidad, normalización, precisión, veracidad, estabilidad, robustez, límites de detección y de cuantificación, pruebas de recuperación, intervalo de trabajo y efectos de matriz.⁷⁵

1.4.1 Trazabilidad

La trazabilidad se define como la propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón, por el cual puede relacionarse a referencias establecidas, usualmente a estándares nacionales e internacionales, mediante una cadena ininterrumpida de comparaciones, y teniendo asignadas todas las incertidumbres. (EURACHEM/CTAC Guide: 2003) ⁷⁶

Es decir, la trazabilidad consiste en definir una referencia que pueda ser aceptada convencionalmente como valor verdadero, incluyendo la magnitud de referencia, la cadena de trazabilidad e incertidumbre asignada.

1.4.2 Normalización

La normalización consiste en establecer un procedimiento que permita realizar la medición siempre de la misma manera, independientemente del analista y otras variables de medición.

Un proceso de medición está normalizado cuando no hay evidencia suficiente de la presencia de errores sistemáticos, ni errores aleatorios de causas especiales. Se requiere que exista un procedimiento de medición adecuado, personal capacitado, medio ambiente controlado, trazabilidad y control en los instrumentos de medición. ⁷⁵

1.4.3 Precisión

La precisión expresa la cercanía de concordancia entre resultados de prueba independientes obtenidos bajo condiciones establecidas. Esta se expresa en términos de imprecisión, calculada como la desviación estándar de los resultados de prueba. Se puede determinar bajo condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad. (ISO 3534-1) ⁷⁷

La repetibilidad es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones en resultados independientes obtenidos con el mismo método, en iguales ítems de prueba, en el mismo laboratorio, por un mismo operador, usando el mismo equipo en intervalos cortos de tiempo. (ISO 3534-1)⁷⁷

La reproducibilidad es la precisión obtenida con el mismo método en iguales ítems de prueba por diferentes laboratorios con operadores diferentes y equipos distintos. (ISO 3534-1)⁷⁷

El límite de repetibilidad “r” y el límite de reproducibilidad “R” son los valores menores o iguales a los que se espera encontrar la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba obtenidos bajo condiciones de repetibilidad o de reproducibilidad, respectivamente con una probabilidad del 95 %. El límite de repetibilidad se define matemáticamente como:

$$r = t_{\infty} \sqrt{2} \sigma_r$$

Al 95% de confianza t_{∞} tiene valor de 1,96 y σ_r es la desviación estándar medida bajo condiciones de repetibilidad. (ISO 3534-1)⁷⁷

También es posible determinar una precisión intermedia la cual permite medir la variación dentro de un mismo laboratorio durante un periodo largo de tiempo (diferentes días), con diferentes analistas, diferente equipo y otras condiciones que produzcan variaciones. (VIM, 2008)⁷⁸

1.4.4 Veracidad

La veracidad es el grado de concordancia entre la media obtenido de una serie de resultados de prueba y un valor de referencia aceptado. Se expresa generalmente en términos del sesgo. (ISO 3534-1)⁷⁷

1.4.5 Estabilidad

La estabilidad del método se determina midiendo sucesivamente conforme pasa el tiempo una muestra estable y homogénea con el objeto de establecer la estabilidad del resultado en condiciones normalizadas de repetibilidad o reproducibilidad.⁷⁵

1.4.6 Robustez

La robustez es la capacidad de un proceso de medición de no ser afectado por pequeñas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales. (EURACHEM/ Guide: 1998)⁷⁹

1.4.7 Límite de detección y Límite de cuantificación

El límite de detección (LD) se define como la menor concentración de analito que puede ser detectada pero no cuantificada, bajo condiciones de prueba establecidas, por debajo de este valor no se tiene la certeza de la presencia del analito. (ICH)⁸⁰

El límite de cuantificación (LC) se refiere a la menor concentración de analito que puede ser cuantificada con veracidad y precisión aceptables bajo las condiciones analíticas específicas. (ICH)⁸⁰

1.4.8 Recuperaciones

Las pruebas de recuperación se refieren a la pérdida o ganancia aparente de analito por defectos del proceso de medición. La evaluación de la recuperación permite corregir los errores sistemáticos que tienen los procesos de medición por imperfecciones de diseño.⁷⁵

Para determinar la recuperación se debe adicionar una fracción de analito a una muestra de prueba, previo al análisis de muestra fortificada y sin fortificar y se determina el porcentaje recuperado. (EURACHEM/ Guide:1998)⁷⁹

1.4.9 Efecto de matriz

Se define como el efecto combinado de todos los componentes de la muestra sobre la cuantificación del analito. (IUPAC, gold book) ⁸¹

1.4.10 Linealidad e intervalo de trabajo

La linealidad se define como la habilidad de un método para obtener resultados de prueba proporcionales a la concentración de analito. (AOAC-PVMC) ⁸²

El intervalo de trabajo de un método analítico comprende el ámbito de concentraciones de la curva de calibración lineal dentro de los cuales se pueden obtener resultados analíticos cuantificables con la exactitud y la precisión adecuadas. (ICH) ⁸⁰

1.4.11 Sensibilidad

Otro parámetro de desempeño determinado frecuentemente es la sensibilidad de calibración que representa el cambio en la señal de respuesta por el cambio unitario en la concentración de analito. Es decir, la pendiente de la curva de calibración, la cual permanece constante e independiente de la concentración en el intervalo lineal de trabajo. (IUPAC, gold book) ⁸¹

Se define la sensibilidad analítica (γ) como el equivalente a la relación entre la pendiente (m) de curva de calibrado respecto a la desviación estándar de la señal analítica (s_s), a una determinada concentración de analito. (Skoog, 2005) ⁶⁰

$$(\gamma) = m/s_s$$

1.4.12 Incertidumbre

La incertidumbre de medición es un parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse razonablemente a la magnitud a medir. (ISO, guide 1993) ⁸³

CAPITULO 2
SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.1 Muestreo de alimentos y preparación de muestras

La selección de los alimentos se realizó teniendo en cuenta los datos de la última Encuesta Nacional de Nutrición, la canasta básica alimentaria y la lista de los 50 alimentos prioritarios de Costa Rica elaborada por el comité del capítulo COSTARICAFOODS. El estudio se realizó en 5 grupos de alimentos: leche y derivados, granos y cereales, carnes y derivados, frutas y derivados, verduras y hortalizas.^{84,85, 86}

El muestreo se limitó al tipo de alimento desde el punto de vista de la variabilidad en la composición del alimento. Los sitios de muestreo fueron puntos de venta al por menor, representados por los diferentes supermercados cercanos a la Universidad de Costa Rica teniendo en cuenta que estos sean los de mayor afluencia del público, tales como Mas X Menos, Palí, Automercado y Supermercado Cristal.

En el muestreo de productos industrializados no existe inconveniente en la inferencia estadística de los resultados al total de la población, debido a que se producen bajo un estricto control de calidad, tal es el caso del arroz, leches, quesos, pastas, tortillas, pan entre otros. En el caso de alimentos primarios, como carnes, frutas y hortalizas la inferencia estadística, está limitada al origen de los alimentos distribuidos en los puntos de venta seleccionados. Se debe tener en cuenta la limitante de que una gran cantidad de la población costarricense consume productos distribuidos en las ferias del agricultor, las cuales se llevan a cabo en todo el país y por lo tanto, se espera que la variabilidad en la concentración de los minerales sea mayor debido a que se cultivan en diferentes regiones geográficas.

Para considerar la variabilidad en la concentración de los minerales con respecto a la estación seca o lluviosa, las muestras se recolectaron cada cuatro meses por un periodo de un año.³

La madurez del alimento es otro factor determinante de la concentración de los macrominerales por lo que se especifica en la descripción del alimento el estado de maduración, la variedad, así como también la parte del alimento que se analizó.

El método de muestreo para los alimentos industrializados, que se venden empacados (leguminosas, arroz, avena, pan en tajadas, tortillas, pastas, leche fluida y en polvo, quesos y yogures) fue aleatorio. Se tomó una unidad de cada producto de la misma marca, en cada visita de muestreo realizada durante el año. Para los alimentos de origen agrícola que se venden en unidades sueltas o en empacados, como por ejemplo, papas, cebollas, brócoli, chile dulce, frutas, entre otros, el número de unidades seleccionadas dependió del tamaño de las unidades individuales del alimento para que en total la muestra primaria tuviera una masa de (0,1 - 0,5) kg. En cada muestreo se tomaron 3 muestras primarias, y a partir de estas, se obtuvo una muestra compuesta de (0,1-0,2) kg con la parte comestible del alimento. En el caso de las carnes (pechuga de pollo deshuesada, bistec de lomo, hígado de pollo y de res, filete de pescado) se compraron 3 porciones individuales entre (0,1-0,5) kg, para extraer una muestra compuesta con una masa de (0,1-0,2) kg.

La preparación de los alimentos se realizó según el consumo más habitual (frescos o cocidos), basándose en los métodos de preparación de muestra indicados por Greenfield y Southgate.³

Los alimentos que generalmente se consumen cocidos se prepararon de la siguiente manera: Se cocinó el total del paquete o la muestra compuesta, con agua desionizada (18 MΩ) en horno de microondas, sin ningún aditivo. A partir de la muestra cocida y homogenizada se tomaron 2 porciones para la determinación de humedad y el resto se liofilizó, para su posterior digestión y cuantificación de minerales por triplicado. En el caso de los alimentos que se consumen frescos, se homogenizó la muestra compuesta o el contenido total del paquete según el caso, y se tomaron las 2 porciones para la determinación de humedad y el resto se liofilizó, para su posterior digestión y cuantificación de minerales por triplicado. Las carnes se cocinaron a la plancha en sartén de teflón sin aditivos, o con agua desionizada (18 MΩ), en horno de microondas, según el caso. Una vez cocidas, se reducen a trozos pequeños con cuchillos plásticos. Posteriormente se toman 2 réplicas para la determinación de humedad, y el resto se liofiliza para tomar las 3 réplicas para la digestión y la cuantificación de los minerales.

Las muestras mineralizadas se diluyeron con agua desionizada (18 MΩ) en balones aforados de 50 mL. De estas diluciones madres se tomaron las alícuotas adecuadas para el análisis de cada elemento como se resume en la figura 1.

Las muestras mineralizadas se diluyeron con agua desionizada (18 MΩ) en balones aforados de 50 mL. De estas diluciones madres se tomaron las alícuotas adecuadas para el análisis de cada elemento como se resume en la figura 1.

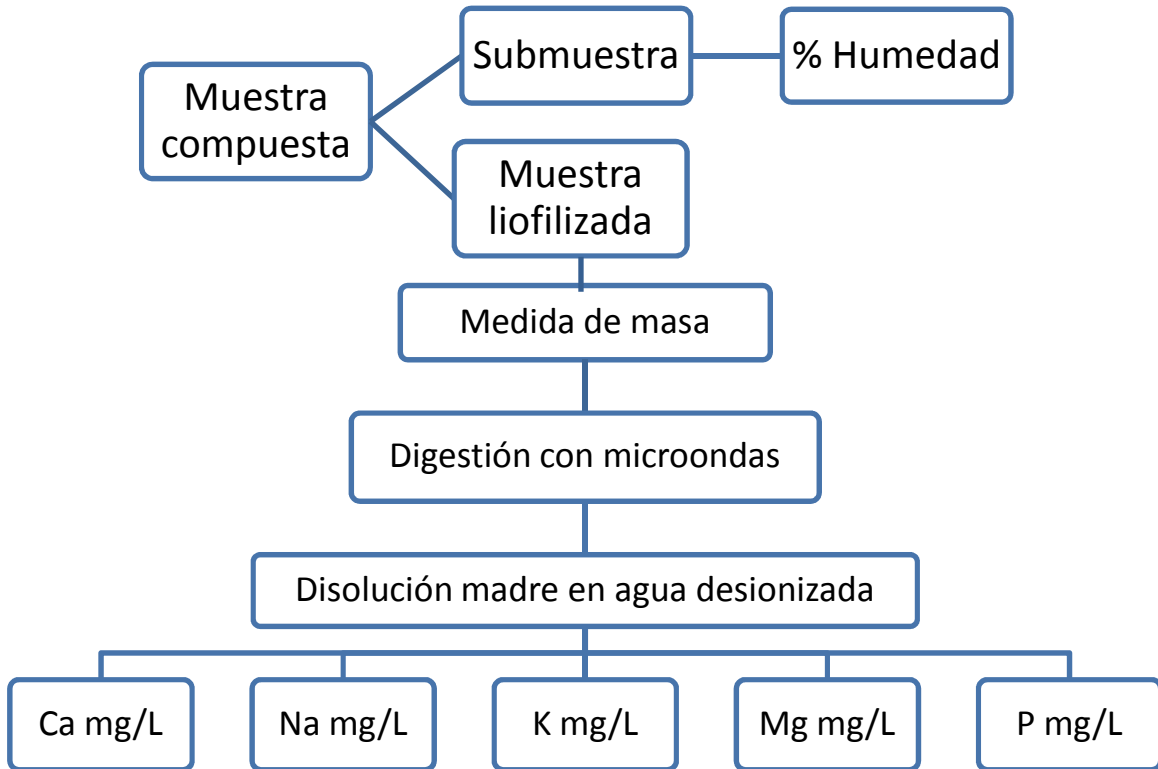


Figura 1. Esquema del proceso de preparación de la porción de prueba para el análisis de los macrominerales y determinación de humedad.

2.2 Determinación de humedad

La determinación de humedad se realizó gravimétricamente por determinación de la de masa perdida, al someter la muestra a una temperatura adecuada, por un tiempo establecido. Se utilizaron dos técnicas: la pérdida de peso con estufa de convección y la pérdida de peso con estufa de vacío (frutas y lácteos), en este último los ensayos se realizaron en el Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos CITA. En ambos casos se utilizaron los métodos oficiales del AOAC. ⁸⁷⁻⁹⁴

Los datos sobre el contenido de humedad se emplearon para expresar los resultados de las determinaciones analíticas realizadas en base seca, a base húmeda, con el fin de hacer referencia a la composición de macrominerales en el alimento en su estado original.

2.3 Liofilización de muestras

Las muestras se liofilizaron en equipos de acuerdo con el manual del liofilizador:⁹⁵

Se utilizó un Liofilizador modelo FreeZone® 4.5 L marca Labconco de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica y un Liofilizador modelo FreeZone® 6 L marca Labconco del Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos, CITA de la Universidad de Costa Rica.

2.4 Digestión de muestras

La medida de masa de las muestras se realizó con exactitud y seguidamente se digirieron en un horno de microondas Speedwave MWS-2 de Berghof, provisto con un sistema de digestión a presión. El agente oxidante empleado fue HNO₃ 65 % en masa, de calidad A.C.S. El programa de digestión se aplicó en tres etapas, con tiempo y potencia establecidos de acuerdo con la matriz y el manual del equipo.⁹⁶

2.4.1 Validación del procedimiento de digestión

Para validar el procedimiento de digestión ácida de las muestras en horno de microondas se determinaron los porcentajes de recuperación de masas establecidas de muestras para cada matriz con diferentes volúmenes de HNO₃ al 65 %, manteniendo el programa de digestión de variación de temperatura en función del tiempo a una potencia constante.

Además, en la evaluación de la veracidad con tres materiales de referencia certificados (MRC) de diferentes matrices alimenticias, se validó en conjunto todas las etapas del procedimiento, medición de masa de muestra, digestión y cuantificación.

2.5 Procedimientos de medición de absorbancia

2.5.1 Determinación de fósforo por espectrometría uv-vis

El fósforo total se determinó mediante el método espectrofotométrico del ácido vanadomolibdofosfórico, reportado por el AOAC (método oficial 991.25)⁹⁸, el cual fue modificado y ampliado a las diferentes matrices en estudio. Las modificaciones realizadas a este método consisten en la destrucción de la materia orgánica con horno de microondas, en lugar de incinerar a 525 °C por 16 horas y la reducción del tamaño de muestra a 0,5 g. Se utilizó HCl en lugar de HNO₃ en la preparación del reactivo vanadomolibdato. Se redujo el ámbito de lectura de (1,2-8,4) mg/L a (0,22-3,5) mg/L y se variaron las cantidades de los reactivos de molibdato de amonio y metavanadato de amonio.

Las lecturas de absorbancia se realizaron en un Espectrómetro uv-visible marca Shimadzu UV-1700, con celdas de cuarzo con 1 cm de longitud de paso óptico, a una longitud de onda de 400 nm.

Las disoluciones estándares de fósforo se prepararon con fosfato de potasio dihidrogenado KH₂PO₄ 99,1 %, grado ACS, de la casa J.T Baker, N° 3246-01, Lote B51C09, desecado por 2 horas a 105 °C, de calibración trazable al NIST®.

A partir de la muestra digerida se realizaron diluciones adecuadas, de tal forma que el valor de concentración de cada elemento esperada se encontrara cercano al centro de la curva de calibración.

2.5.2 Determinación de Ca, Mg, K y Na por espectrometría de absorción atómica de llama (EAA)

El calcio, el magnesio, el sodio y el potasio se determinaron por espectrometría de absorción atómica con llama. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrómetro de absorción atómica Varian 220 Fast Sequential, equipado con lámparas de cátodo hueco específicas para cada elemento.

El magnesio, el sodio y el potasio se determinaron con llama aire-acetileno y el calcio se determinó con llama óxido nitroso/acetileno. Se utilizó como base un método oficial (AOAC, 985.35)⁹⁸, el cual fue modificado y ampliado a las diferentes matrices.

Las modificaciones realizadas a este método consisten en la destrucción de la materia orgánica con horno de microondas, en lugar de una alícuota de la muestra en horno de microondas a 100 °C por 30 minutos y luego, incinerar a 525 °C por (5 a 8) horas. Se sustituyó el CsCl 0,5 %, por KCl de 2 000 mg K /L y LiCl de 1 000 mg Li /L, como disolventes para las lecturas del sodio y el potasio respectivamente. Al igual que el cesio, también es adecuado el uso del potasio y el litio como supresores de ionización.

Para el magnesio se empleó una disolución de LaCl₃ de 10 000 mg La /L para aforar las muestras y los patrones, pero con una concentración mayor que la indicada en el método, de acuerdo con las especificaciones del manual del equipo de absorción atómica.⁹⁹ El lantano actúa como liberador de las interferencias ocasionadas por la formación de compuestos termoestables de magnesio, los cuales disminuyen la absorción.

En el caso del calcio se utilizó una disolución de KCl de 4 000 mg K /L para aforar las muestras y los patrones. Además se sustituyó la llama aire/acetileno por la llama óxido nitroso/acetileno. De esta manera se logró mejorar la sensibilidad de la curva de calibración. El potasio actúa como supresor de ionización, ya que al incrementar la temperatura de la llama por el uso de N₂O, se elimina el problema de la formación de compuestos de calcio poco volátiles pero se pueden producir interferencias por reacciones de ionización de este analito.

La curva de calibración para cada elemento se preparó a partir de los siguientes materiales de referencia: estándar de Ca de 1000 µg/mL N° 6448-04 Lote A49648, estándar de Mg de 1000 µg/mL N° 6457-04 Lote A4760 3, estándar de K de 1000 µg/mL N° 6464-04 Lot A40582, estándar de Na de 1000 µg/mL N° 6468-04 Lote A30604. Todos de la casa J.T Baker trazables al S.I por el NIST®. En el cuadro III se indican las principales condiciones experimentales de lectura en EAA para estos elementos. A partir de la muestra digerida se realizaron diluciones adecuadas, de tal forma que el valor de concentración de cada elemento esperada se encontrara cercano al centro de la curva de calibración.

Cuadro III. Condiciones experimentales de lectura en EAA para Ca, Mg, K y Na

Elemento	λ nm	LLama	Disolvente
calcio	422,7	N ₂ O/C ₂ H ₂	KCl (K = 4 000 mg / L)
magnesio	285,2	aire/ C ₂ H ₂	LaCl ₃ (La = 10 000 mg / L)
potasio	766,5	aire/ C ₂ H ₂	LiCl (Li = 1 000 mg / L)
sodio	589,0	aire/ C ₂ H ₂	KCl (K = 2 000 mg / L)

2.6 Validación de la cuantificación de los macrominerales

2.6.1 Evaluación de la linealidad

Para los elementos Na, K, Mg y Ca, se estudiaron entre 3 y 4 intervalos de concentración, teniendo en cuenta las concentraciones esperadas en los alimentos, el ámbito de linealidad aplicable al equipo y la cantidad de muestra mineralizada, necesaria para la medición de todos los elementos en una misma réplica de digestión.

Se prepararon curvas con 7 patrones igualmente espaciados, en cada intervalo incluyendo un blanco, y se realizaron siete lecturas al azar. Para cada patrón se graficó la absorbancia promedio en función de la concentración de cada elemento y se determinó la línea de mejor ajuste por el método de mínimos cuadrados ordinarios.

En el caso del fósforo se estudiaron tres intervalos de concentración en diferente longitud de onda, de acuerdo con las recomendaciones de la literatura, para la cantidad de fósforo esperada.⁶⁴ Se prepararon curvas compuestas entre 6 y 7 patrones

igualmente espaciados, incluyendo un blanco y se realizaron cuatro lecturas al azar para cada patrón.

En el capítulo 3 se incluyen los resultados de linealidad y las pruebas de homogeneidad para cada mineral.

2.6.2 Determinación de los límites de detección y límites de cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación se determinaron mediante el método gráfico descrito por Meier and Zünd^{100,101}, el cual utiliza la curva de calibración y los límites de confianza al 95 %. Estos valores fueron calculados mediante el método de regresión no ponderada para: sodio, potasio, magnesio y fósforo. En el caso del calcio se empleó la regresión ponderada, debido al comportamiento heterocedástico de la curva de calibración para el intervalo lineal de trabajo seleccionado.

2.6.3 Determinación de la sensibilidad

La sensibilidad instrumental se obtuvo a partir del promedio de las pendientes de varias curvas de calibración (entre 8 y 12), para cada elemento. La sensibilidad analítica se determinó mediante el cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar promedio de la respuesta del equipo en unidades de absorbancia. Los resultados se indican en el cuadro XIII.

2.6.4 Evaluación de la precisión

Para determinar la repetibilidad se analizaron 3 muestras de diferente matriz alimenticia a varios niveles de concentración (alta, media y baja) dentro del alcance del intervalo lineal de trabajo. A partir de las desviaciones estándar de repetibilidad (s_r), se calcularon los límites de repetibilidad (r) al 95 % de confianza. Los resultados se encuentran en los cuadros XIV al XXVIII.

2.6.5 Evaluación de la veracidad

Para la determinación de la veracidad se analizaron tres MRC de diferente matriz alimenticia en varios niveles de concentración (alta, media y baja) dentro del alcance

del intervalo lineal de trabajo. Las matrices estudiadas fueron: Formula de infantes (MRC 1846), Músculo de bovino en polvo (MRC 8414) y Huevo en polvo (MRC 8415), todos obtenidos del NIST® (National Institute of Standards and Technology, Agriculture Canada, Gaithersburg, MD). Los certificados correspondientes se incluyen en el anexo 3. Los resultados se encuentran en los cuadros XIV al XXVIII.

2.7 Evaluación de la estabilidad

Se construyeron diagramas de estabilidad para determinar la variabilidad del método durante un periodo determinado. Las mediciones se realizaron en diferentes días por un periodo de 6 meses, para lo cual se empleó un MRC (Músculo de bovino MRC 8414). A partir de la desviación estándar de un total de 30 mediciones, se calcularon los límites de aviso y los límites de acción.

Las condiciones del procedimiento de medida que se emplearon para determinar si el procedimiento está fuera de control son las siguientes: ¹⁰³

- Uno o más puntos estén sobre 3s del punto central.
- Dos o más puntos consecutivos por encima de 2s.
- Una serie de 7 o más puntos consecutivos del mismo lado de la línea central.
- Una tendencia de incremento o disminución de 7 puntos.

2.8 Control de calidad

2.7.1 Evaluación del desempeño del equipo de lectura

Se elaboraron cartas de control de lectura con una disolución intermedia de la curva de calibración preparada a partir de disoluciones trazables al NIST®, para los elementos en estudio: Na, K, P, Mg y Ca.

Cada 10 lecturas de absorbancia durante una corrida de muestras se mide el estándar de control, por duplicado, si dos resultados se encuentran sobre el límite de aviso se

repite las lecturas anteriores hasta el último dato aceptable del estándar de control. Si el sistema no se logra restablecer se realiza una nueva calibración.

2.7.2 Uso de blancos de muestra

Se preparó un blanco en cada corrida de digestión y el valor obtenido se utilizó para corregir las mediciones de las muestras.

2.7.3 Control mediante un MRC

Se analizó un Material de Referencia Certificado al menos una vez por semana para determinar el sesgo del método. Los resultados se encuentran en el cuadro XXX. Con estos datos se elaboraron gráficos de control. (Figuras 43-47)

2.7.4 Evaluación de la precisión

Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados entre dos réplicas fueron comparados con el límite de repetibilidad obtenido en la validación, en caso de obtener una diferencia mayor se procede a repetir el análisis con 2 nuevas réplicas.

2.9 Compilación de datos

Se elaboraron registros de muestreo, que incluyen información de la identidad y tamaño del alimento, el código de entrada, la fecha y lugar de muestreo, el origen del alimento cuando se conoce y otros detalles relevantes de interés.

Se elaboraron registros con la descripción del alimento, los cuales incluyen: código, nombre común del alimento, nombre científico, nombre en inglés, tipo (grupo), grado de preparación, grado de madurez, datos de la etiqueta o lista de ingredientes, preparación de la muestra y fecha del muestreo.

Para la compilación de los datos se empleó el formulario elaborado por COSTARICAFOODS, en este se completaron las plantillas sobre información general del alimento, identificación, contenido de minerales Ca, Na, K, Mg y P en mg/ 100 g de alimento y la plantilla para la evaluación de la calidad de los datos por alimento.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

3.1 Validación de la metodología analítica

Para la determinación de los elementos de interés en las diferentes matrices se validaron tanto los métodos de digestión como los métodos de cuantificación, mediante la determinación de los parámetros de desempeño que debe cumplir una validación de diseño.

3.1.1 Linealidad y ámbito de trabajo

El análisis de la regresión demostró para las curvas de todos los elementos evaluados, paso del intercepto por cero y una desviación no significativa respecto a la regresión lineal. Se aplicó el contraste t de dos colas, para $(n-2)$ grados de libertad, bajo el supuesto de que los datos siguen una distribución normal. La hipótesis nula de esta prueba es la no correlación entre las variables x e y . El resultado se obtiene a partir del coeficiente de correlación r , según la siguiente ecuación:¹⁰²

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Los resultados de esta prueba se encuentran en los cuadros V al XI. El valor de t experimental en cada caso, fue mucho mayor que el valor crítico al nivel de significancia del 95%, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe correlación significativa entre la absorbancia y la concentración.

Se aplicó además el análisis de varianzas ANOVA para el estudio de la linealidad. Esta prueba descompone las fuentes de variación sobre la señal analítica de acuerdo con la igualdad del cuadro IV, donde la variabilidad total está compuesta por la sumatoria de los cuadrados de la contribución debida a la regresión SC_{reg} y la sumatoria de los cuadrados debido al error experimental aleatorio de la respuesta analítica SC_{res} .

Cuadro IV. Fuentes de variación implicadas en el ANOVA de la regresión lineal simple

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Varianzas
Regresión	$SC_{reg} = \sum_i^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$S_e^2 = \frac{SC_{reg}}{1}$
Residual	$SC_{res} = \sum_i^n (\bar{x}_i - \hat{y}_i)^2$	$S_r^2 = \frac{SC_{res}}{n-2}$
Total	$SC_{total} = \sum_i^n (\bar{x}_i - \bar{y})^2$	$S_y^2 = \frac{SC_{total}}{n-1}$

El estadístico F se calcula mediante la razón entre la varianza debida a la regresión y la varianza residual, los cuales se obtienen al dividir la sumatoria de los cuadrados entre los grados de libertad correspondientes.

$$F_{ANOVA} = \frac{S_e^2}{S_r^2}$$

Puesto que el valor experimental de F es mayor que el valor crítico se concluye que existe una relación lineal entre las variables. Los valores elevados del F experimental indican que la varianza de la regresión es mucho más grande que la varianza residual. Entre mayor sea el valor de F mayor es la relación entre las variables x e y. Los resultados obtenidos para el ámbito de linealidad de cada elemento, se presentan en los cuadros del V al IX.

Cuadro V. Pruebas de linealidad en calcio por EAA (llama N₂O/C₂H₂) a 422,7 nm

Ámbito (mg/L)	r ²	pendiente	intercepto	F _{ANOVA}	t _{exp}	t _c
0,25-1,5	0,9992	0,263	0,0041	55714	260	2,00
0,10-1,0	0,9990	0,266	0,0027	78382	232	2,00
0,12-0,87	0,9990	0,269	0,0050	83513	232	2,00

Cuadro VI. Pruebas de linealidad en magnesio por EAA (llama aire/ C₂H₂) a 285,2 nm

Ámbito (mg/L)	r ²	pendiente	intercepto	F _{ANOVA}	t _{exp}	t _c
0,25-1,5	0,988	0,2576	0,0185	3302	67	2,00
0,20-1,0	0,990	0,2896	0,0066	3578	73	2,00
0,050-0,75	0,992	0,3057	0,0026	3628	82	2,00
0,05-0,65	0,992	0,6770	0,019	4240	82	2,00

Cuadro VII. Pruebas de linealidad en potasio por EAA (llama aire/ C₂H₂) a 766,5 nm

Ámbito (mg/L)	r ²	pendiente	intercepto	F _{ANOVA}	t _{exp}	t _c
0,25-1,5	0,990	0,2576	0,0185	3832	73	2,00
0,20-1,0	0,996	0,2896	0,0062	4578	86	2,00
0,12-0,87	0,998	0,2545	0,005	4697	150	2,00
0,050-0,75	0,996	0,3057	0,0026	2913	86	2,00

Cuadro VIII. Pruebas de linealidad en sodio por EAA (llama aire/ C₂H₂) a 589 nm

Ámbito (mg/L)	r ²	pendiente	intercepto	F _{ANOVA}	t _{exp}	t _c
0,25-1,5	0,993	0,7781	0,034	11081	113	2,00
0,20-1,0	0,993	0,8359	0,012	13303	116	2,00
0,10-0,70	0,998	0,8542	0,016	15929	164	2,00

Cuadro IX. Pruebas de linealidad en fósforo por espectrometría UV-vis mediante el complejo ácido vanadomolibdofosfórico a 400 nm

Rango (mg/L)	r ²	pendiente	intercepto	F _{ANOVA}	t _{exp}	t _c
4,0-16	0,999	0,018	0,001	18664	232	2,06
2,0-8,0	0,999	0,053	-0,001	24370	232	2,06
0,50-3,5	0,999	0,086	0,00002	69936	232	2,06

Para seleccionar el ámbito de trabajo se consideraron los siguientes criterios: las pruebas estadísticas F y t, comprobación visual de la recta de calibración y el gráfico de los residuales. En el caso del fósforo el ámbito más adecuado, es el que presenta mayor sensibilidad, además es el más recomendado si se considera la menor cantidad de muestra digerida necesaria para el análisis.

En el cuadro X se encuentran los ámbitos de trabajo lineales seleccionados para cada elemento, que incluye, además, el límite de cuantificación. En el anexo 2 se encuentran los gráficos de residuales de los ámbitos de trabajo seleccionados para cada elemento.

Cuadro X. Ámbitos de trabajo seleccionados para cada elemento

Elemento	Ámbito (mg/L)
Calcio	0,057-0,87
Magnesio	0,037-0,65
Sodio	0,043-0,70
Potasio	0,056-0,87
Fósforo	0,22-3,50

3.1.2 Pruebas de Homogeneidad de varianzas

Se realizaron dos pruebas estadísticas de homogeneidad: La prueba de Cochran y la prueba de Bartlett, ambas para una probabilidad de 0,05. Los resultados se indican en el cuadro XI.

La prueba de homogeneidad de varianzas por Cochran permite verificar la hipótesis nula ($h_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots \sigma_k^2$) a partir de las varianzas observadas ($s_1^2 = s_2^2 = \dots s_k^2$) en k muestras del mismo tamaño n ($n_1 = n_2 = \dots n_k$), con un riesgo α , mediante el estadístico:

$$C = \frac{s_{m\acute{a}x}^2}{\sum s_i^2}$$

Si el $C_{\text{experimental}}$ es menor que el $C_{\text{crítico}}$ se acepta la hipótesis nula y se concluye que las varianzas del conjunto de datos no son significativamente diferentes.

La prueba de Bartlett es una de las más utilizadas para comprobar la homogeneidad de varianzas. Se define como:

$$G = \frac{1}{C} \left[(N - k) \ln (s^2) - \sum_{i=1}^k (n_i - 1) \ln s_i^2 \right]$$

$$\text{donde, } C = 1 + \frac{1}{3(k-1)} \left(\sum_{i=1}^k \frac{1}{n-1} - \frac{1}{N-k} \right)$$

Cuando la hipótesis nula ($h_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots \sigma_k^2$) es cierta el estadístico tiene una distribución aproximadamente de χ^2 con $k-1$ grados de libertad. ¹⁰²

Solamente para el calcio el valor experimental obtenido en la prueba de Cochran y la prueba de Bartlett fue mayor que su correspondiente valor crítico, por lo que se concluye que este elemento presenta una distribución heterogénea de las varianzas en el intervalo de trabajo de (0,057 a 0,87) mg/L. Este comportamiento se observa en el gráfico de residuales, los cuales muestran una tendencia creciente al aumentar la concentración de calcio.

En el caso de los otros elementos (Na, K, Mg y P) se acepta la hipótesis nula y se concluye el comportamiento homocedástico de las varianzas de los puntos de la curva de calibración. Esto indica que el factor concentración no influye en la variabilidad de las mediciones.

Cuadro XI. Pruebas de homogeneidad para las curvas de calibración

Prueba de Bartlett			Prueba de Cochran		
Elemento / Ámbito (mg/L)	G exp	G crítico χ^2	Elemento / Ámbito (mg/L)	C exp	C crítico
P (0,22-3,50)	2,810	12,59	P (0,22-3,50)	0,189	0,3362
Na (0,043-0,70)	11,17	12,59	Na (0,043-0,70)	0,299	0,3362
K (0,056-0,87)	5,820	12,59	K (0,056-0,87)	0,277	0,3362
Mg (0,037-0,65)	4,830	12,59	Mg (0,037-0,65)	0,203	0,3362
Ca (0,057-0,87)	13,35	12,59	Ca (0,057-0,87)	0,381	0,3362

3.1.3 Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Las curvas de calibración con sus límites de confianza al 95 % y los límites de detección y de cuantificación se indican en las figuras 2 a 11. Los resultados se determinaron según el método gráfico y se resumen en el cuadro XII.¹⁰²

Según Miller,¹⁰³ cuando se tiene un comportamiento heterocedástico en los errores de la curva de calibrado, como en el caso del calcio, lo adecuado es utilizar regresión ponderada para el cálculo de los límites de detección y cuantificación, ya que proporciona resultados más reales.

Cuadro XII. Límites de detección y límites de cuantificación según Meier and Zünd¹⁰²

Elemento	Límite de Detección (mg/L)	Límite de cuantificación (mg/L)
Mg	0,021	0,037
K	0,031	0,056
Na	0,025	0,043
P	0,12	0,22
Ca	0,030	0,057

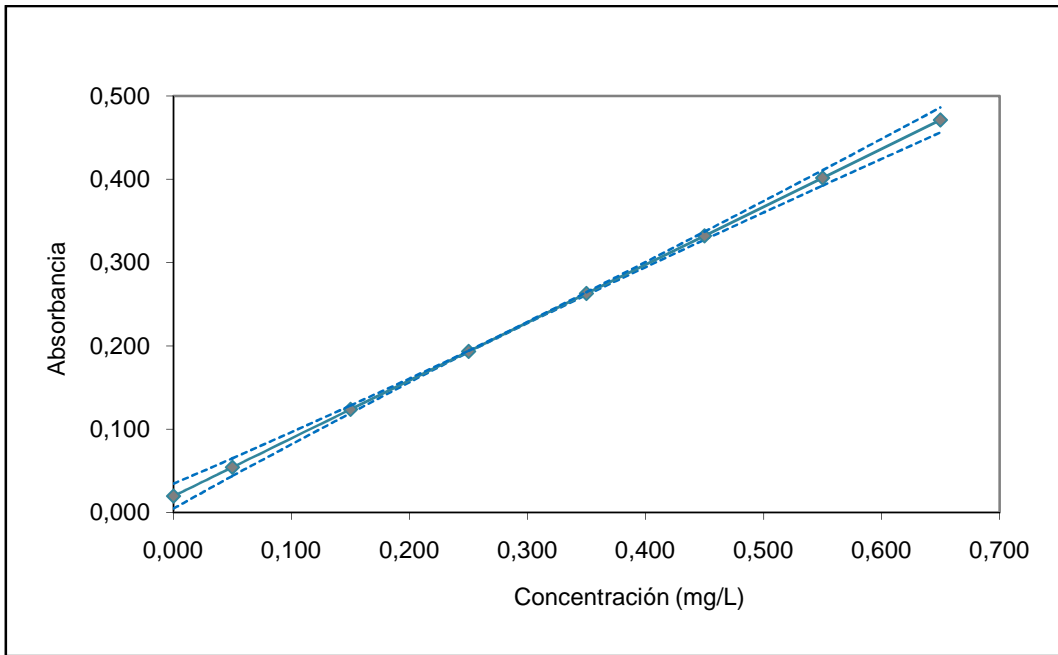


Figura 2. Curva de calibración para magnesio mediante el método de mínimos cuadrados no ponderados y límites de confianza al 95 %

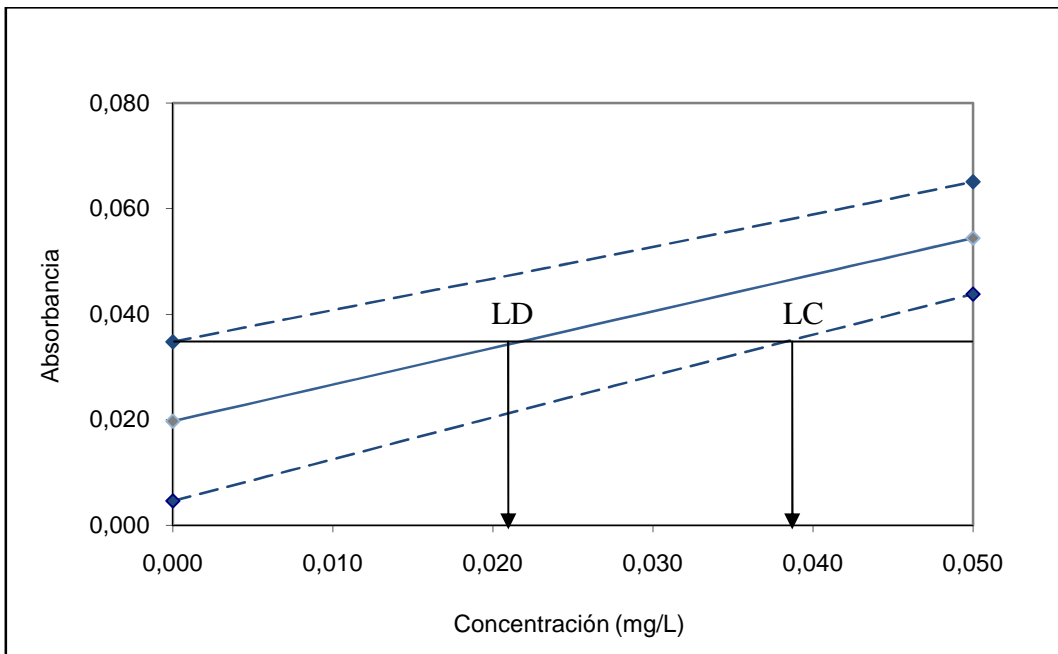


Figura 3. Límite de detección y límite de cuantificación para el magnesio

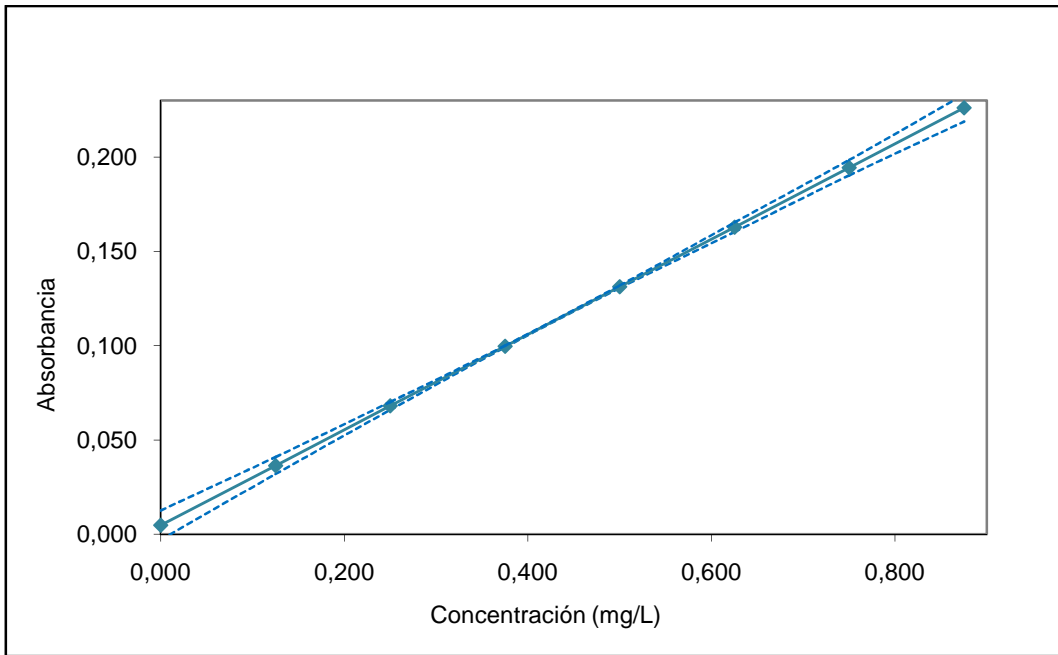


Figura 4. Curva de calibración para potasio mediante el método de mínimos cuadrados no ponderados y límites de confianza al 95 %

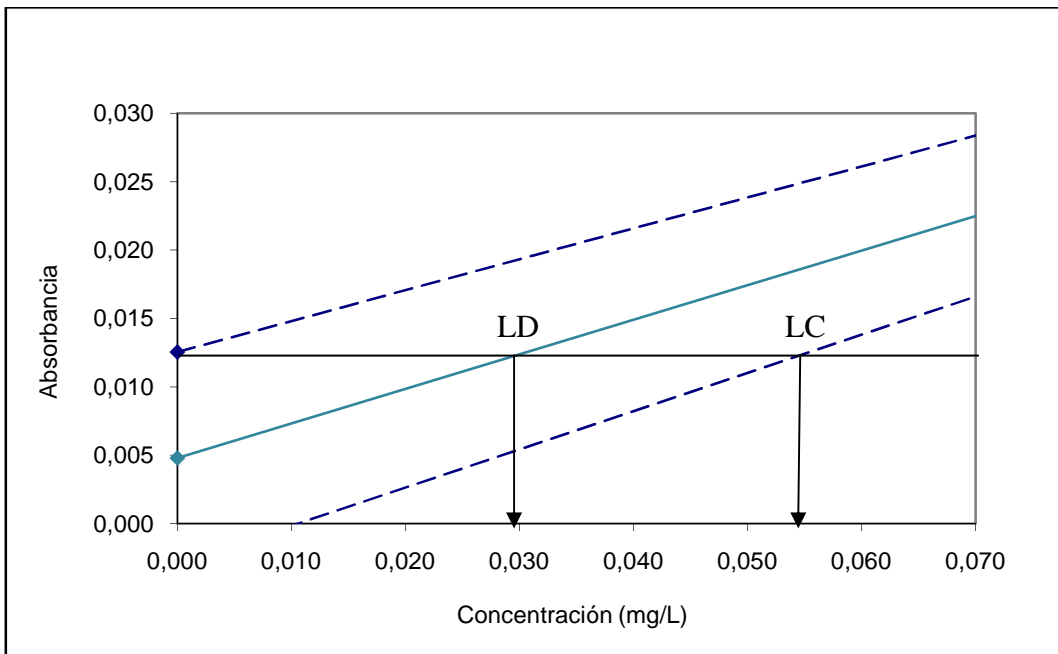


Figura 5. Límite de detección y límite de cuantificación para el potasio

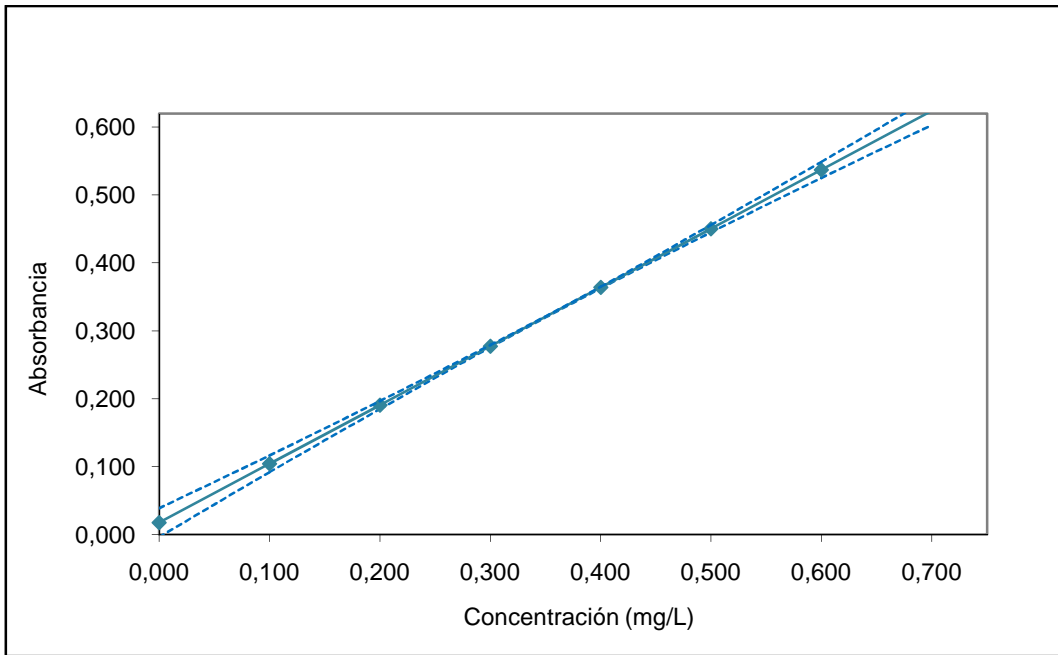


Figura 6. Curva de calibración para sodio mediante el método de mínimos cuadrados no ponderados y límites de confianza al 95 %

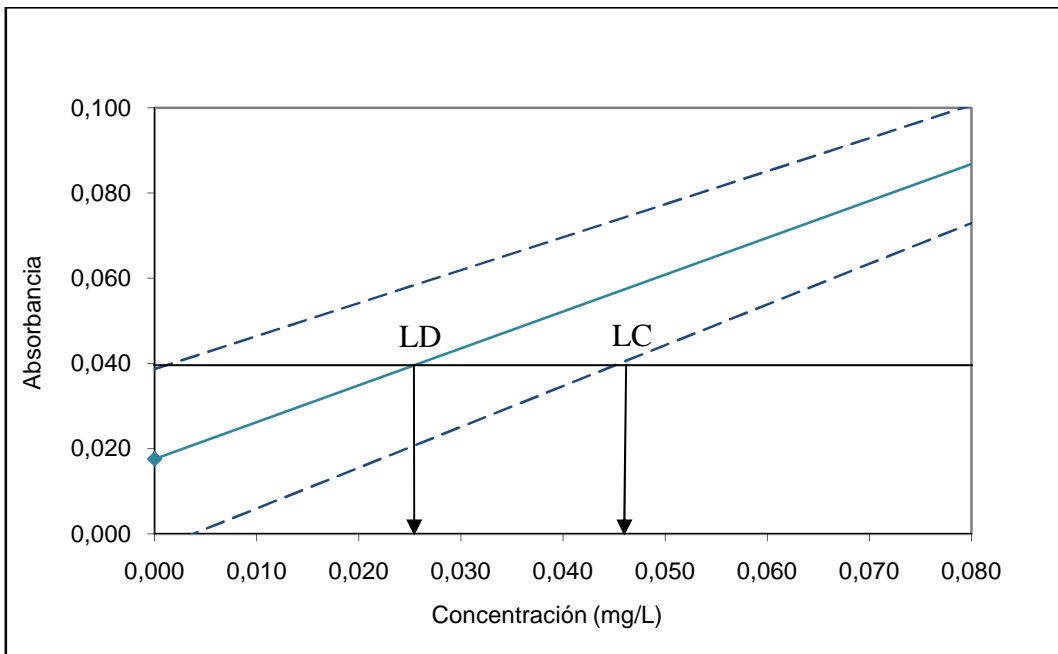


Figura 7. Límite de detección y límite de cuantificación para el sodio

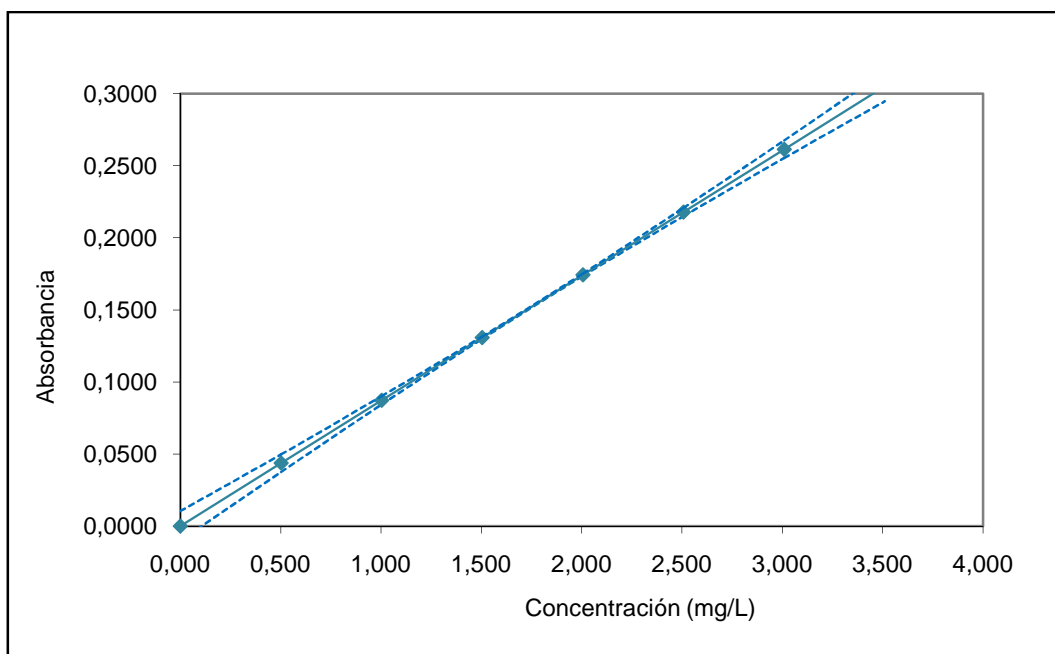


Figura 8. Curva de calibración para fósforo mediante el método de mínimos cuadrados no ponderados y límites de confianza al 95 %

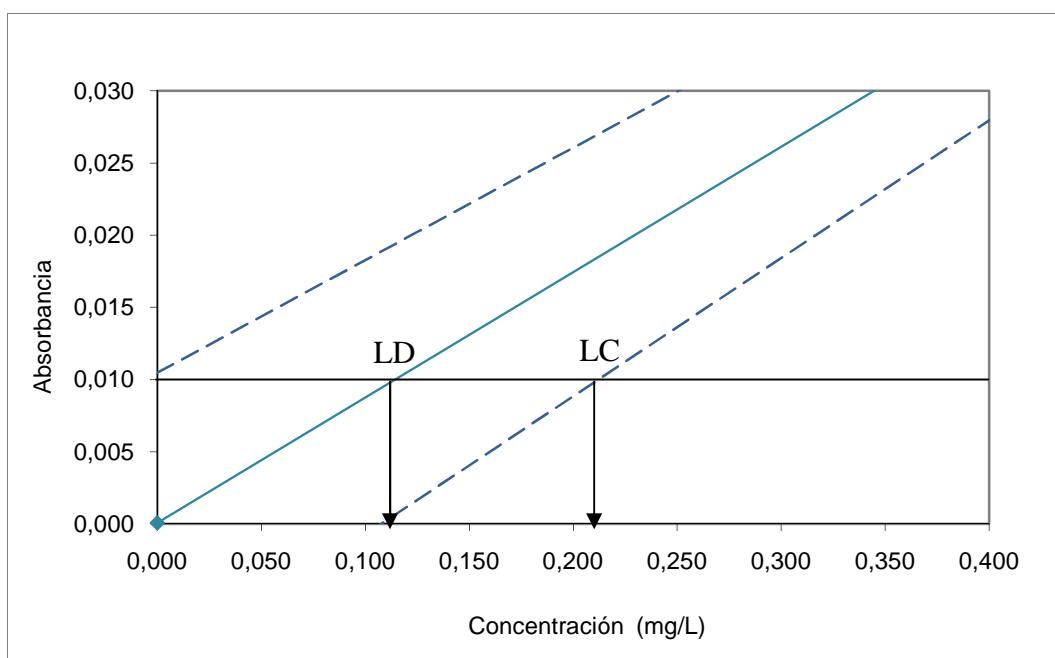


Figura 9. Límite de detección y límite de cuantificación para el fósforo

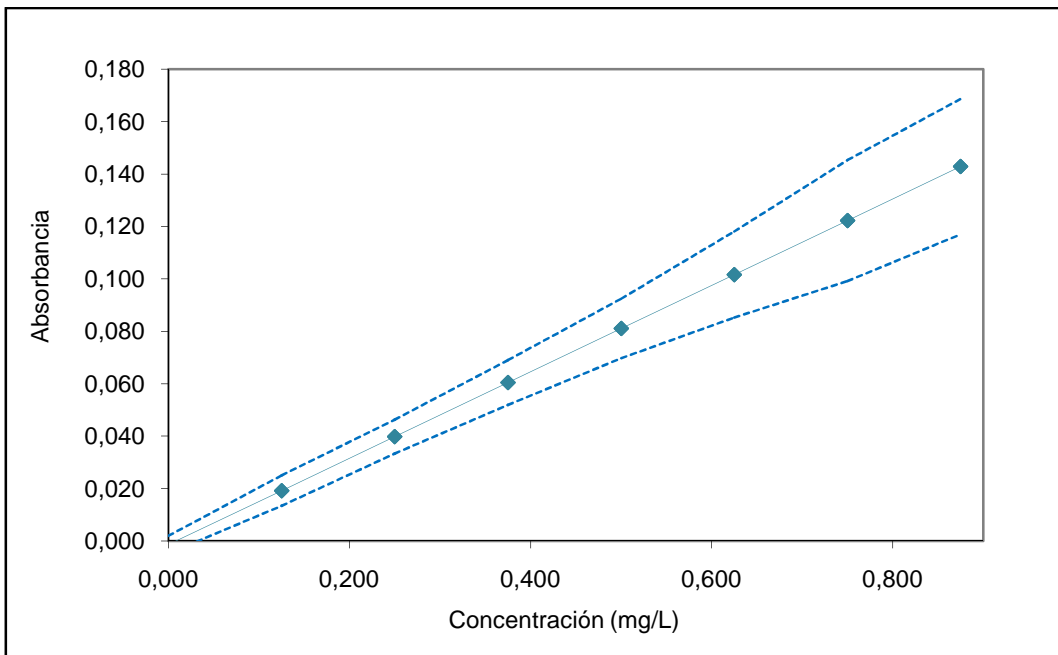


Figura 10. Curva de calibración para calcio mediante el método de mínimos cuadrados ponderados y límites de confianza al 95 %

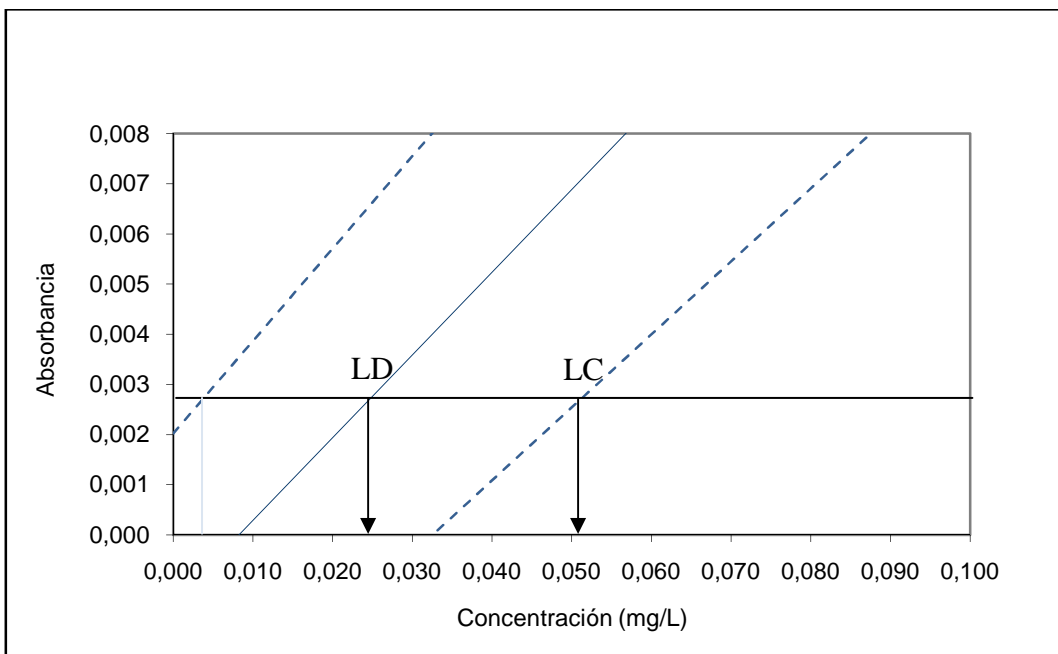


Figura 11. Límite de detección y límite de cuantificación para el calcio

3.1.4 Sensibilidad

La sensibilidad de calibración mide la capacidad del método para discernir pequeñas variaciones en la concentración. Por cada mg/L de analito se produce un incremento en unidades de absorbancia equivalente a la pendiente de la curva de calibración.

La sensibilidad analítica, obtenida como el cociente entre la pendiente y la desviación estándar de la señal analítica, es útil cuando se requiere comparar métodos que presentan igual pendiente de calibración para la determinación de un mismo analito. El método más sensible será el que presente menor dispersión, y por tanto mayor sensibilidad analítica. De igual manera, entre métodos que presenten igual precisión el más sensible será el que presente mayor sensibilidad de calibración.

En el cuadro XIII se observa que las mayores sensibilidades de calibración las presentan el sodio y el magnesio con valores de 0,805 A*L/mg y 0,688 A*L/mg respectivamente. La sensibilidad analítica fue mayor para el magnesio con un valor de 208 L/mg esto indica una menor dispersión instrumental en comparación con el sodio que tiene una sensibilidad analítica de 44 L/mg.

Cuadro XIII. Sensibilidad de calibración y sensibilidad analítica

Elemento	Sensibilidad de calibración (A* L/mg)	Sensibilidad analítica (L/mg)
Mg	0,688	215
K	0,314	68
Na	0,805	45
Ca	0,267	149, 81, 37*
P	0,0869	157

*comportamiento heterocedástico

La sensibilidad analítica del calcio no se mantiene constante a lo largo del intervalo de calibración, debido a que este elemento presenta un comportamiento heterocedástico en el intervalo de concentración empleado. La variabilidad de las medidas instrumentales aumenta con la concentración y por lo tanto la sensibilidad analítica

disminuye. En este caso se determinó la sensibilidad analítica para tres niveles de concentración con un valor de 149 L/mg en el nivel bajo, 81 L/mg a un nivel intermedio y de 37 L/mg en el nivel más alto. Para los demás elementos en estudio, que siguen un comportamiento homocedástico, la sensibilidad analítica se calculó para el patrón intermedio de la curva de calibración, ya que la desviación estándar no cambia significativamente con la concentración.

La sensibilidad de calibración obtenida para la cuantificación de fósforo, por formación del complejo del ácido vanadomolibdofosfórico es de 0,0867 A*L/mg. Este valor es bajo en comparación con otras técnicas más sensibles, por ejemplo, la pendiente de calibración para la cuantificación de fósforo mediante el complejo azul de molibdeno obtenida experimentalmente es (0,844 A*L/mg), 10 veces mayor que para el complejo vanadomolibdofosfórico.

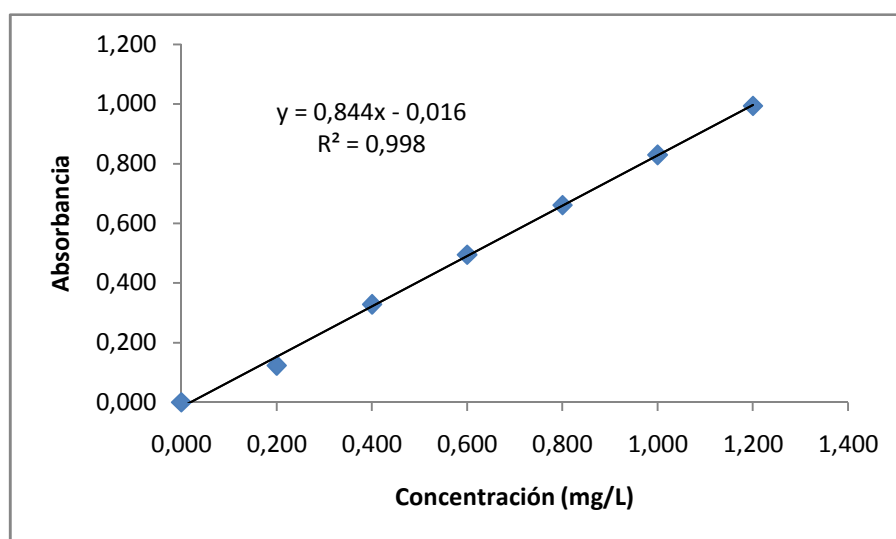


Figura 12. Curva de calibración para el complejo azul de molibdeno a 823 nm.

Si bien, la baja sensibilidad de calibración imposibilita la utilidad de este complejo para detectar fósforo en concentraciones trazas, el hecho de presentar una sensibilidad analítica grande, le permite obtener buenos resultados con alta precisión, cuando se trabaja con las concentraciones adecuadas de fósforo.

La sensibilidad analítica del fósforo es de 157 L/mg, casi tres veces mayor que la sensibilidad analítica del sodio, del potasio y del calcio, en un nivel intermedio de

concentración. Esto se debe a que los métodos espectrométricos de absorción uv-vis tienen una desviación estándar menor en las lecturas de absorbancia, en comparación con la técnica de absorción atómica, lo cual le confiere mayor precisión analítica.

3.1.5 Estudio de la precisión bajo condiciones de repetibilidad

En los cuadros XIV al XXVIII se muestran los resultados del estudio de repetibilidad obtenidos para cada elemento en los tres materiales de referencia certificados. Las figuras 12 a 25 muestran la relación entre el límite de repetibilidad r y la concentración. La tendencia observada indica que existe un ligero incremento de los errores aleatorios al aumentar la concentración de analito. Sin embargo, esta correlación no es muy marcada ya que los valores de las pendientes son muy pequeños.

Cuadro XIV. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el magnesio en una muestra de MRC 1846 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,1082	0,3009	0,4924
2	0,1074	0,3014	0,5003
3	0,1054	0,2884	0,4937
4	0,1066	0,2910	0,4952
5	0,1034	0,2978	0,4994
6	0,1029	0,3030	0,4858
7	0,1029	0,2985	0,4864
8	0,1023	0,2963	0,4889
9	0,1021	0,2985	0,4833
10	0,1044	0,3035	0,4845
valor teórico	0,107	0,301	0,494
media	0,105	0,298	0,491
sesgo	-0,002	-0,003	-0,003
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,0022	0,0050	0,0061
r	0,006	0,014	0,017
CV	2,1	1,7	1,2

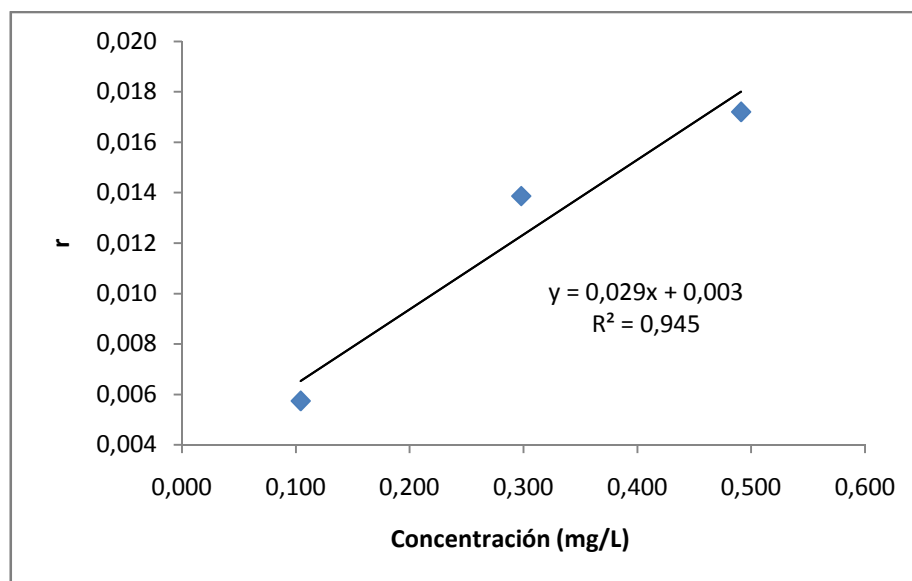


Figura 13. Estudio de repetibilidad para el magnesio en MRC 1846

Cuadro XV. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el magnesio en una muestra de MRC 8414 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,1089	0,3080	0,4976
2	0,1096	0,3034	0,4991
3	0,1107	0,3062	0,5009
4	0,1078	0,3047	0,4981
5	0,1093	0,3036	0,5019
6	0,1063	0,3062	0,4979
7	0,1069	0,3044	0,4984
8	0,1062	0,3049	0,4958
9	0,1087	0,3003	0,4966
10	0,1076	0,3025	0,4899
valor teórico	0,110	0,307	0,499
media	0,108	0,304	0,498
sesgo	-0,002	-0,001	-0,001
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,0015	0,0022	0,0030
r	0,004	0,006	0,009
CV	1,4	0,72	0,60

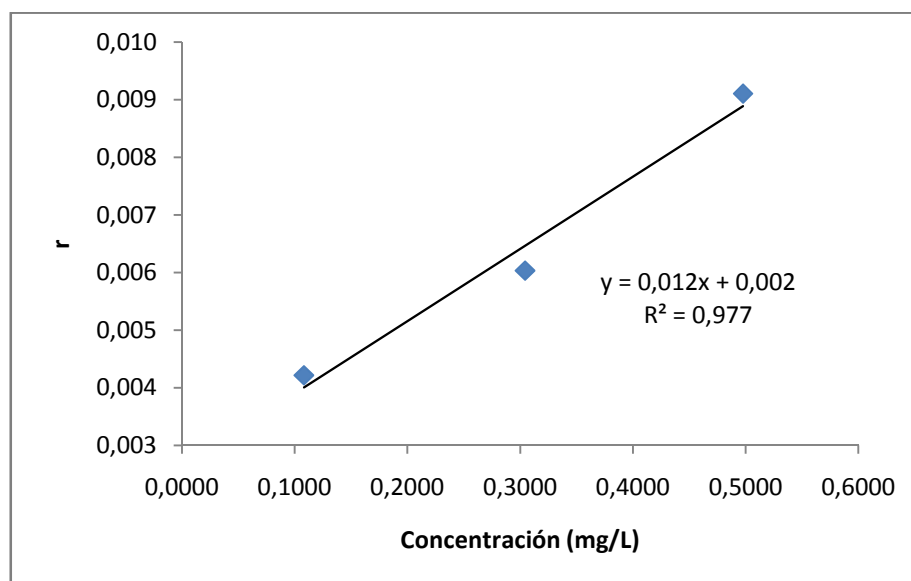


Figura 14. Estudio de repetibilidad para magnesio en MRC 8414

Cuadro XVI. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el magnesio en una muestra de MRC 8415 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,1216	0,3027	0,4810
2	0,1220	0,3053	0,4903
3	0,1220	0,3060	0,4849
4	0,1213	0,3017	0,4814
5	0,1212	0,3020	0,4845
6	0,1225	0,3084	0,4883
7	0,1247	0,3083	0,4837
8	0,1240	0,3092	0,4915
9	0,1247	0,3012	0,4814
10	0,1231	0,3028	0,4821
valor teórico	0,122	0,305	0,488
media	0,123	0,305	0,485
sesgo	0,001	-0,0003	-0,003
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,0014	0,0031	0,0039
r	0,004	0,009	0,011
CV	1,1	1,0	0,8

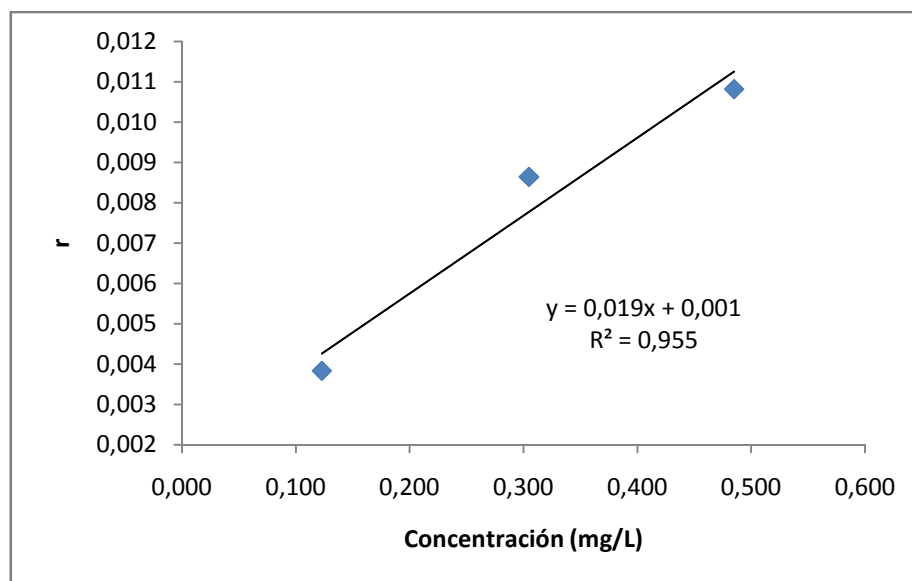


Figura 15. Estudio de repetibilidad para magnesio en MRC 8415

Cuadro XVII. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el sodio en una muestra de MRC 1846 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,1881	0,3890	0,6289
2	0,1793	0,4170	0,6030
3	0,1840	0,4270	0,6178
4	0,1872	0,4285	0,5998
5	0,1866	0,4209	0,6134
6	0,1915	0,4256	0,5752
7	0,1964	0,4128	0,5878
8	0,1939	0,4177	0,5870
9	0,2000	0,4194	0,6011
10	0,1991	0,4288	0,6047
valor teórico	0,185	0,416	0,601
media	0,191	0,419	0,602
sesgo	0,006	0,003	0,001
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,007	0,012	0,016
r	0,019	0,033	0,043
CV	3,6	2,8	2,6

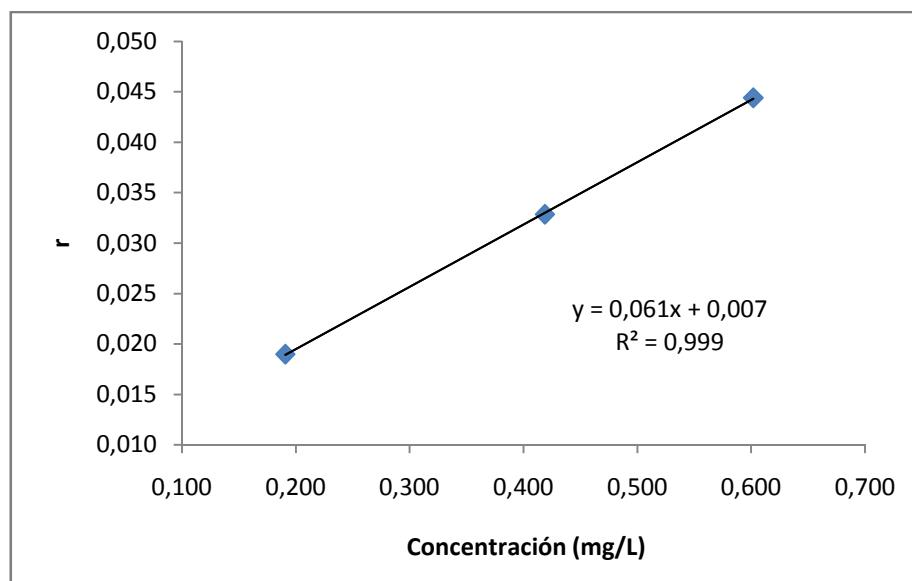


Figura 16. Estudio de repetibilidad para sodio en MRC 1846

Cuadro XVIII. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el sodio en una muestra de MRC 8414 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,2007	0,4193	0,5911
2	0,2060	0,4245	0,5773
3	0,2044	0,4164	0,5821
4	0,2009	0,4216	0,5868
5	0,2052	0,4379	0,5892
6	0,1989	0,3915	0,5744
7	0,1924	0,4099	0,5696
8	0,1963	0,4091	0,5501
9	0,1986	0,4076	0,5731
10	0,1990	0,4222	0,5901
11	0,2145	0,4055	0,5566
12	0,2198	0,4114	0,5987
valor teórico	0,210	0,420	0,588
media	0,203	0,415	0,578
sesgo	-0,007	-0,005	-0,010
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,008	0,012	0,015
r	0,022	0,033	0,041
CV	3,8	2,8	2,5

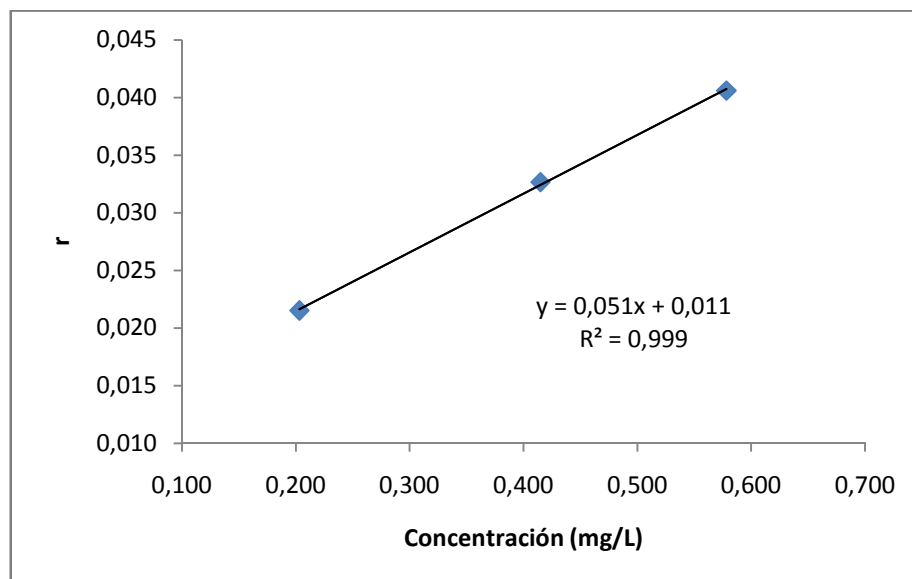


Figura 17. Estudio de repetibilidad para sodio en MRC 8414

Cuadro XIX. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el sodio en una muestra de MRC 8415 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,1492	0,4544	0,6214
2	0,1521	0,4469	0,5958
3	0,1496	0,4543	0,6216
4	0,1535	0,4728	0,6018
5	0,1405	0,4651	0,5983
6	0,1538	0,4676	0,5722
7	0,1588	0,4696	0,5754
8	0,1526	0,4369	0,5782
9	0,1579	0,4593	0,5868
10	0,1510	0,4516	0,5939
11	0,1553	0,4384	0,6207
valor teórico	0,150	0,451	0,602
media	0,152	0,461	0,597
sesgo	0,002	0,009	-0,004
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,005	0,014	0,018
r	0,014	0,039	0,051
CV	3,3	3,0	3,0

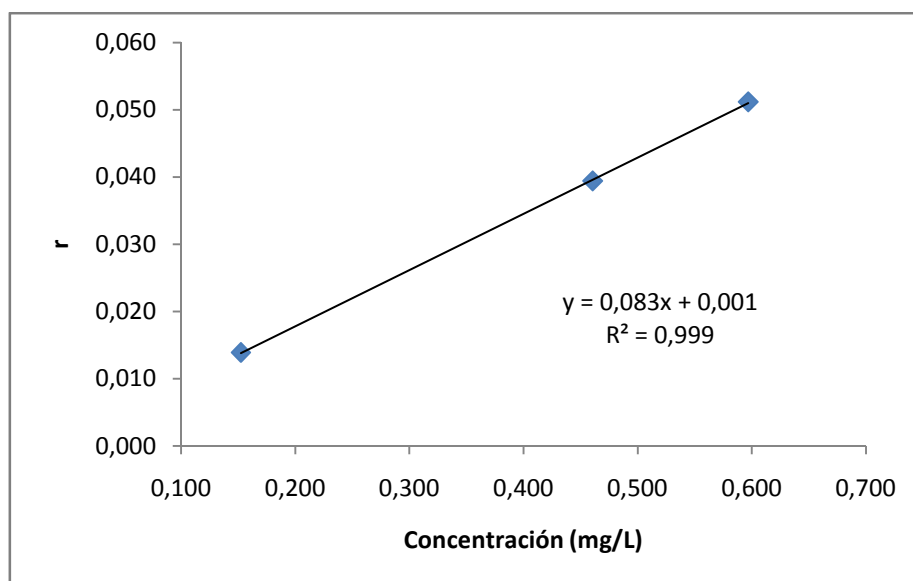


Figura 18. Estudio de repetibilidad para sodio en MRC 8415

Cuadro XX. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el potasio en una muestra de MRC 1846 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,3117	0,4767	0,7800
2	0,3112	0,4687	0,7789
3	0,3114	0,4705	0,7458
4	0,3016	0,4729	0,7529
5	0,3253	0,4542	0,7500
6	0,3217	0,4654	0,7498
7	0,3123	0,4577	0,7458
8	0,3043	0,4594	0,7473
9	0,3026	0,4668	0,7505
10	0,3033	0,4450	0,7539
valor teórico	0,304	0,457	0,761
media	0,311	0,464	0,755
sesgo	0,007	0,010	-0,005
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,008	0,010	0,013
r	0,023	0,027	0,036
CV	2,6	2,1	1,7

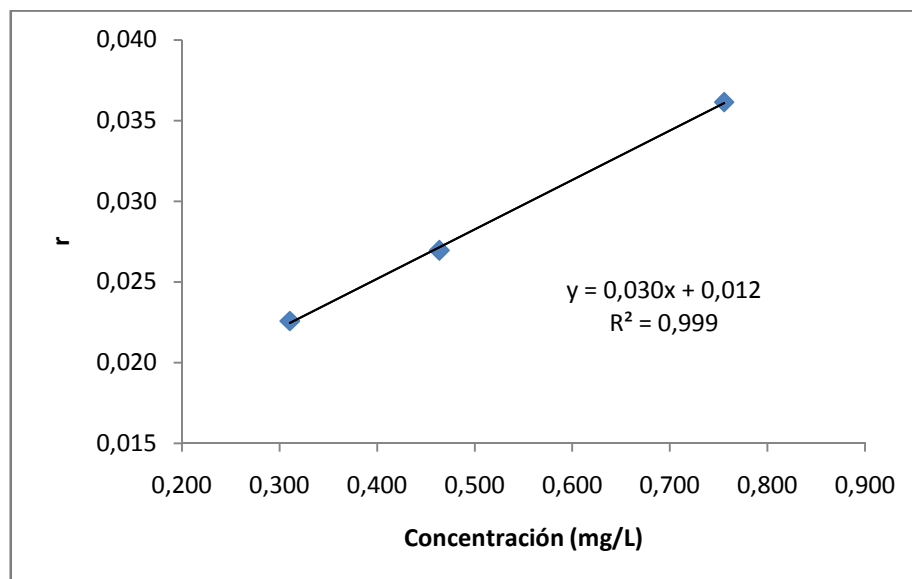


Figura 19. Estudio de repetibilidad para potasio en MRC 1846

Cuadro XXI. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el potasio en una muestra de MRC 8414 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,2556	0,4961	0,7089
2	0,2522	0,4867	0,7306
3	0,2415	0,4927	0,7226
4	0,2427	0,5093	0,7085
5	0,2512	0,4771	0,7416
6	0,2471	0,4802	0,7053
7	0,2425	0,4754	0,7092
8	0,2361	0,4907	0,7331
9	0,2373	0,4946	0,7226
10	0,2498	0,4915	0,7245
valor teórico	0,243	0,485	0,727
media	0,246	0,489	0,721
sesgo	0,003	0,005	-0,007
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,007	0,010	0,012
r	0,018	0,028	0,035
CV	2,8	2,0	1,7

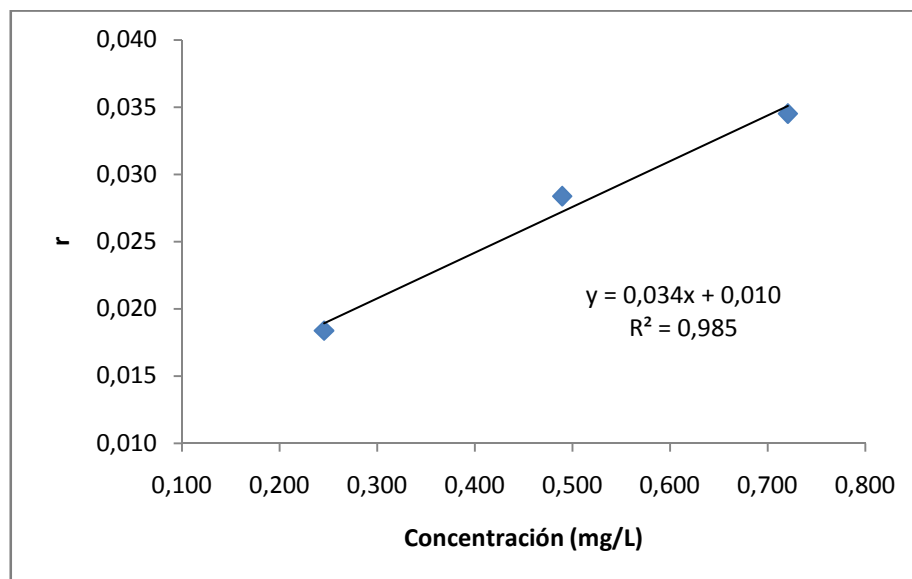


Figura 20. Estudio de repetibilidad para sodio en MRC 8414

Cuadro XXII. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el potasio en una muestra de MRC 8415 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,2625	0,4535	0,7536
2	0,2561	0,4691	0,7346
3	0,2585	0,4585	0,7537
4	0,2515	0,4686	0,7625
5	0,2583	0,4548	0,7605
6	0,2504	0,4442	0,7703
7	0,2540	0,4688	0,7593
8	0,2599	0,4562	0,7423
9	0,2665	0,4590	0,7671
10	0,2538	0,4538	0,7695
valor teórico	0,255	0,456	0,766
media	0,257	0,457	0,759
sesgo	0,002	0,002	-0,008
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,005	0,008	0,012
r	0,014	0,023	0,033
CV	1,9	1,7	1,6

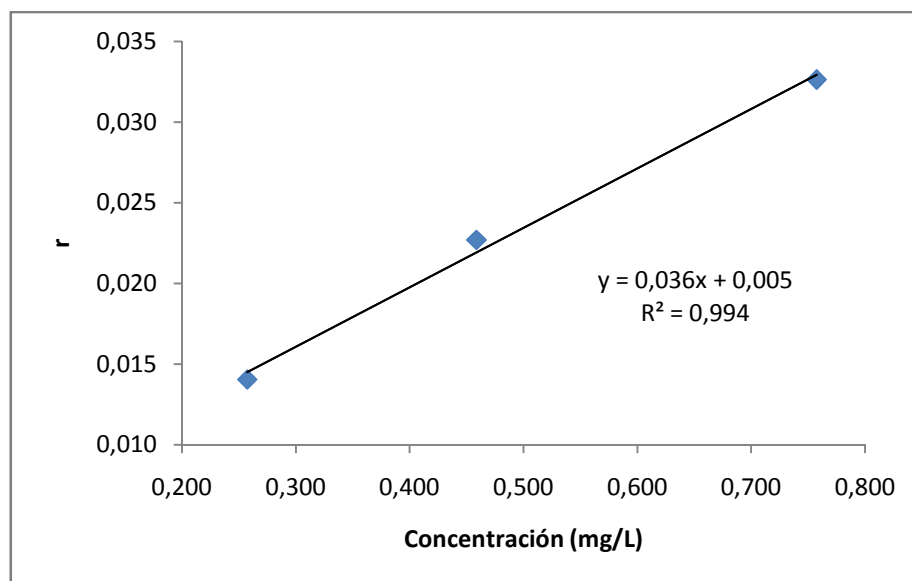


Figura 21. Estudio de repetibilidad para potasio en MRC 8415

Cuadro XXIII. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el calcio en una muestra de MRC 1846 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,2194	0,3690	0,7522
2	0,2164	0,3716	0,7513
3	0,2204	0,3653	0,7260
4	0,2226	0,3627	0,7338
5	0,2170	0,3661	0,7312
6	0,2144	0,3579	0,7097
7	0,2135	0,3532	0,7157
8	0,2097	0,3523	0,7200
9	0,2132	0,3576	0,7313
10	0,2179	0,3632	0,7266
11	0,2197	0,3636	0,7153
12	0,2158	0,3632	0,7266
13	0,2209	0,3632	0,7533
valor teórico	0,220	0,367	0,734
media	0,217	0,362	0,730
sesgo	-0,003	-0,005	-0,003
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,0037	0,0056	0,014
r	0,010	0,016	0,040
CV	1,7	1,5	1,9

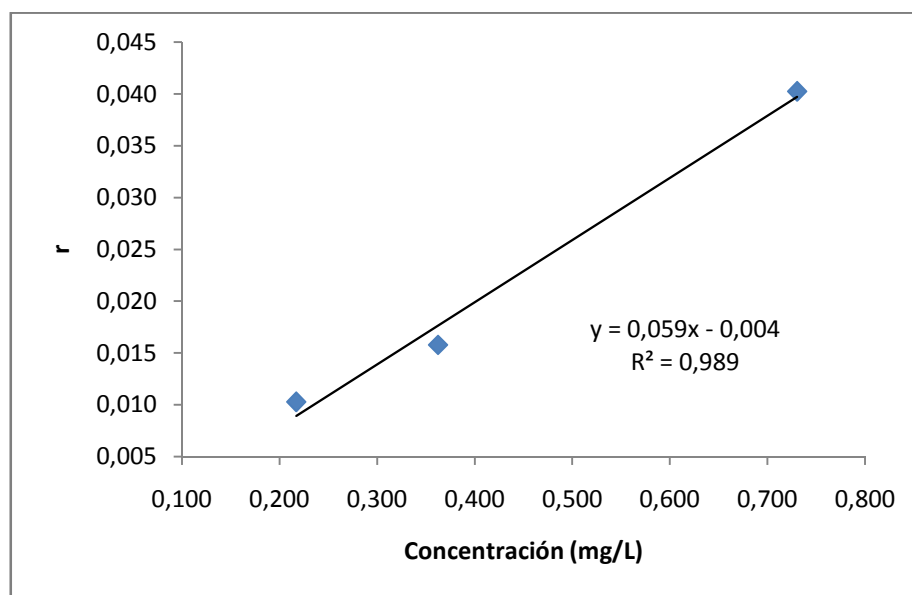


Figura 22. Estudio de repetibilidad para calcio en MRC 1846

Cuadro XXIV. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el calcio en una muestra de MRC 8414 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,2401	0,4690	0,7677
2	0,2446	0,4716	0,7489
3	0,2341	0,4653	0,7553
4	0,2404	0,4627	0,7568
5	0,2363	0,4661	0,7485
6	0,2401	0,4579	0,7662
7	0,2412	0,4532	0,7652
8	0,2456	0,4523	0,7432
9	0,2379	0,4576	0,7524
10	0,2365	0,4632	0,7586
11	0,2398	0,4636	0,7651
12	0,2457	0,4632	0,7785
13	0,2348	0,4632	0,7542
valor teórico	0,232	0,467	0,754
media	0,240	0,462	0,759
sesgo	0,008	-0,005	0,0053
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,0039	0,0056	0,010
r	0,011	0,016	0,027
CV	1,6	2,0	1,3

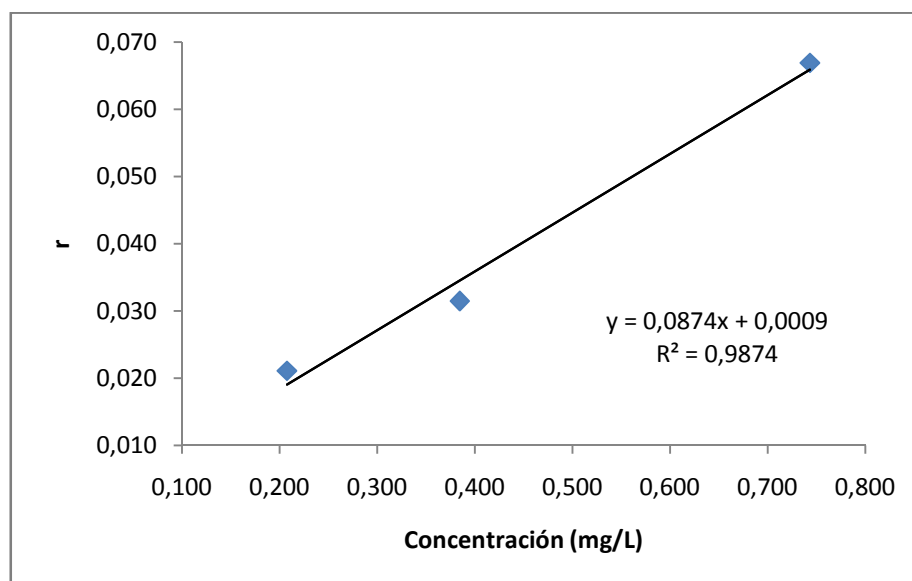


Figura 23. Estudio de repetibilidad para calcio en MRC 8414

Cuadro XXV. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el calcio en una muestra de MRC 8415 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,2559	0,4970	0,7582
2	0,2515	0,4909	0,7552
3	0,2534	0,4825	0,7446
4	0,2556	0,4878	0,7381
5	0,2487	0,4834	0,7334
6	0,2448	0,4982	0,7226
7	0,2435	0,4942	0,7312
8	0,2478	0,4941	0,7325
9	0,2466	0,4986	0,7480
10	0,2458	0,4865	0,7455
11	0,2435	0,4843	0,7528
12	0,2524	0,4948	0,7498
13	0,2586	0,4954	0,7425
valor teórico	0,248	0,496	0,743
media	0,250	0,491	0,743
sesgo	0,002	-0,005	-0,0002
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,0050	0,0058	0,011
r	0,014	0,016	0,030
CV	2,0	1,5	1,5

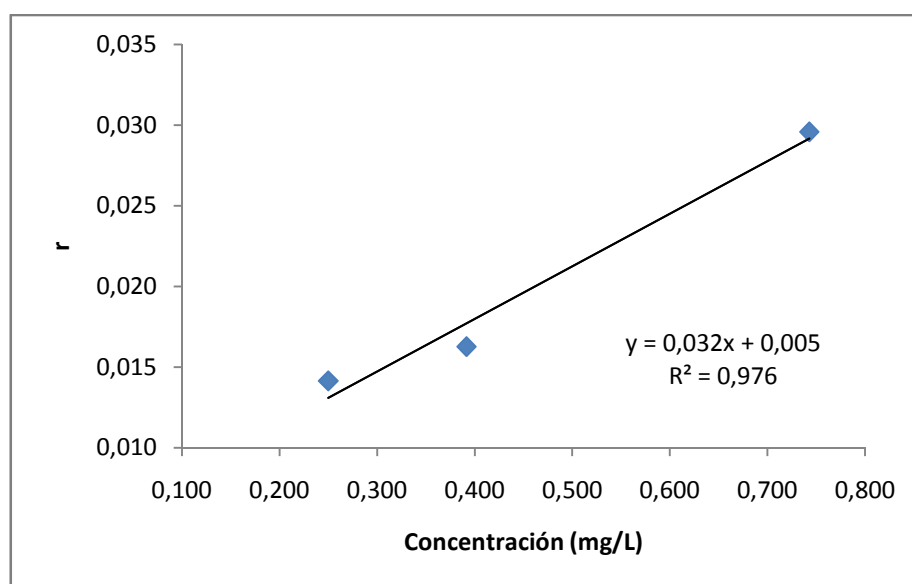


Figura 24. Estudio de repetibilidad para calcio en MRC 8415

Cuadro XXVI. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el fósforo en una muestra de MRC 1846 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	1,040	2,091	3,111
2	1,040	2,092	3,117
3	1,0441	2,077	3,133
4	1,044	2,078	3,132
5	1,045	2,078	3,132
valor teórico	1,043	2,086	3,130
media	1,042	2,083	3,125
sesgo	-0,001	-0,003	-0,005
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,0025	0,0076	0,0103
r	0,0071	0,0212	0,0287
CV	0,24	0,36	0,33

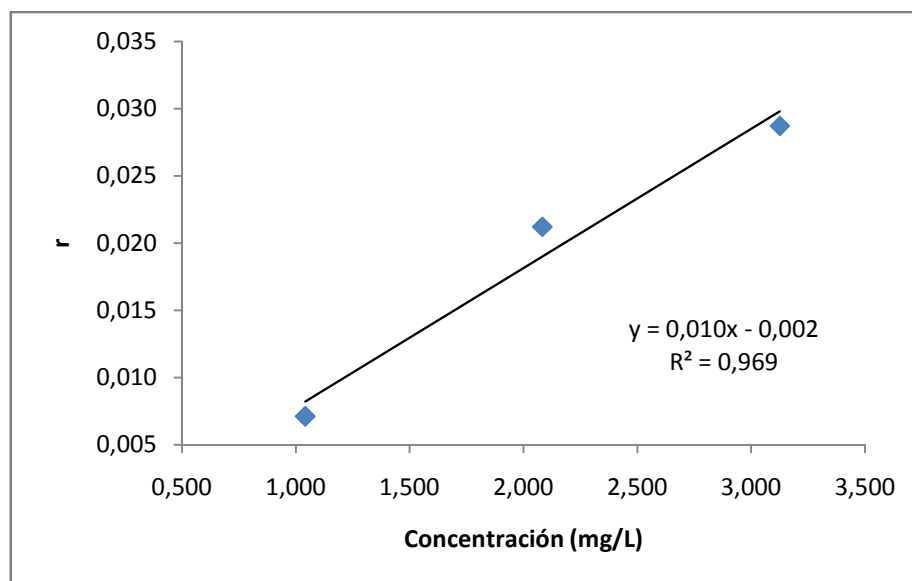


Figura 25. Estudio de repetibilidad para fósforo en MRC1846

Cuadro XXVII. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el fósforo en una muestra de MRC 8414 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,999	2,011	3,001
2	0,999	2,011	3,001
3	1,001	1,999	3,011
4	1,004	1,999	3,021
5	1,004	1,999	3,021
valor teórico	1,003	2,006	3,009
media	1,001	2,004	3,011
sesgo	-0,002	-0,002	0,002
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,0025	0,0063	0,0101
r	0,0071	0,0178	0,0283
CV	0,25	0,31	0,33

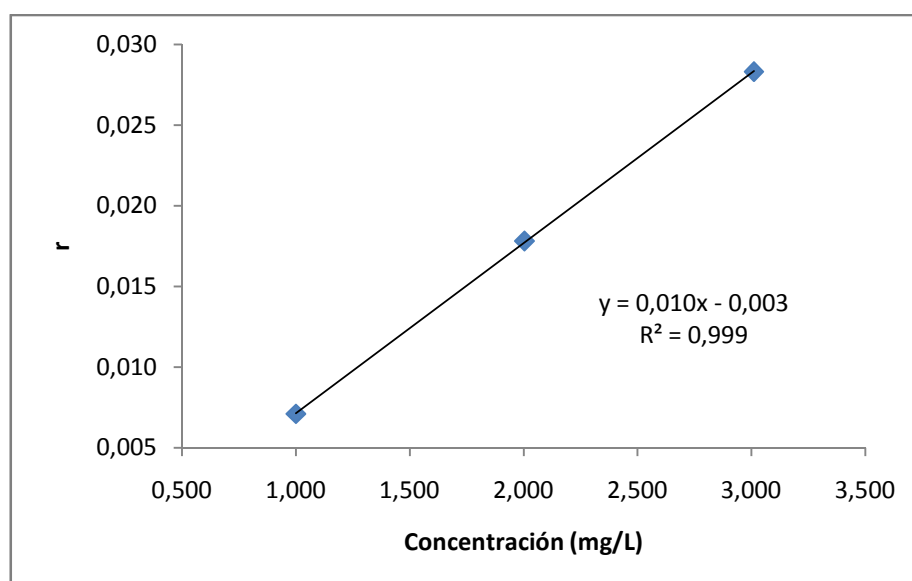


Figura 26. Estudio de repetibilidad para fósforo en MRC 8414

Cuadro XXVIII. Datos del estudio de repetibilidad y veracidad para el fósforo en una muestra de MRC 8415 a tres niveles de concentración

Réplicas	Nivel 1 C (mg/L)	Nivel 2 C (mg/L)	Nivel 3 C (mg/L)
1	0,997	1,993	2,996
2	0,997	1,993	2,986
3	0,999	2,006	3,006
4	1,002	2,006	3,006
5	1,002	2,010	3,011
valor teórico	1,000	1,999	2,999
media	0,999	2,002	3,001
sesgo	-0,001	0,003	0,002
k	2,8	2,8	2,8
s_r	0,0030	0,0079	0,0100
r	0,0083	0,0222	0,0281
CV	0,24	0,39	0,33

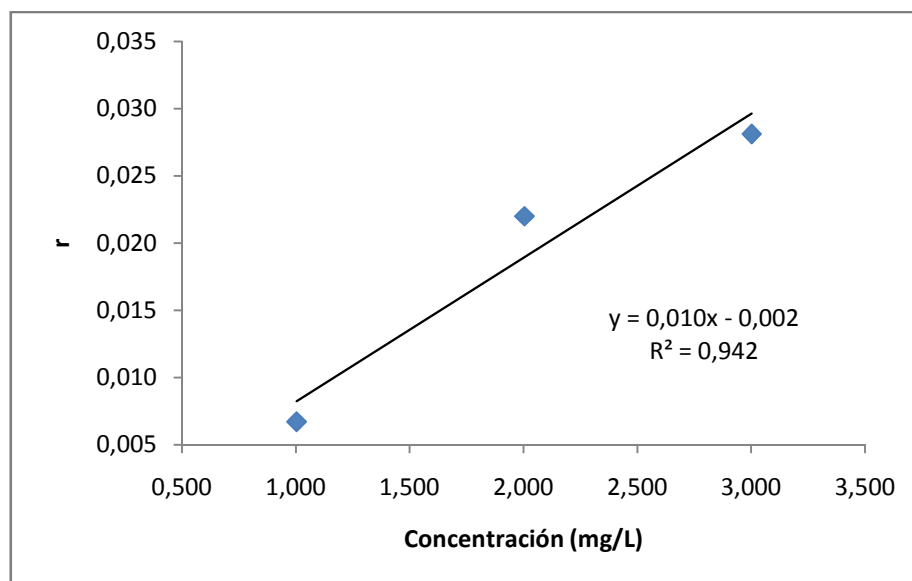


Figura 27. Estudio de repetibilidad para fósforo en MRC 8415

Cuadro XXIX. Resultados de los RSD_r en tres niveles de concentración obtenidos para diferentes materiales de referencia certificados.

Fósforo	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
MRC1846	0,24	0,36	0,33
MRC 8414	0,25	0,31	0,33
MRC 8415	0,24	0,39	0,33
$RSD_{r \text{ promedio}}$	0,24	0,35	0,33
Calcio			
MRC1846	1,7	1,5	1,9
MRC 8414	1,6	2,0	1,3
MRC 8415	2,0	1,5	1,5
$RSD_{r \text{ promedio}}$	1,8	1,7	1,6
Potasio			
MRC1846	2,6	2,1	1,7
MRC 8414	2,8	2,0	1,7
MRC 8415	1,9	1,7	1,6
$RSD_{r \text{ promedio}}$	2,5	2,3	2,3
Sodio			
MRC1846	3,6	2,8	2,6
MRC 8414	3,8	2,8	2,5
MRC 8415	3,3	3,0	3,0
$RSD_{r \text{ promedio}}$	3,6	2,9	2,6
Magnesio			
MRC1846	2,12	1,7	1,2
MRC 8414	1,4	0,72	0,60
MRC 8415	1,1	1,0	0,8
$RSD_{r \text{ promedio}}$	2,0	1,1	0,9

En el cuadro XXIX se resumen los resultados de repetibilidad obtenidos como desviación estándar relativa RSD_r , para los tres materiales de referencia certificados (cuadros XIV a XXVIII). Al comparar estos datos con los valores reportados en la literatura se puede comprobar que la precisión es adecuada para la determinación de todos los elementos en estudio. El AOAC reporta (RSD_r) para el fósforo de (2,4-3) % en fórmula de infantes (Método Oficial 985.35) y de (1,2-1,6) % en queso (Método Oficial 991.25). Los resultados experimentales obtenidos presentan un $RSD_{r \text{ promedio}}$ para el fósforo de (0,24-0,35) %. Esto indica que el método empleado muestra una variabilidad mínima a la esperada bajo condiciones de repetibilidad en el intervalo de concentración estudiado. Además el RSD_r obtenido para el nivel de concentración medio y alto son muy similares a un nivel de confianza del 95 % y significativamente mayores al RSD_r experimental del nivel de baja concentración.

El calcio presentó poca variabilidad entre las diferentes matrices. Además los RSD_r en los tres niveles de concentración son similares a un nivel de confianza del 95%. Esto concuerda con lo esperado en teoría debido al comportamiento ascendente en los errores con la concentración, y por lo tanto la desviación estándar relativa debería ser la misma en toda la curva de calibración. Los RSD_r promedio obtenidos experimentalmente se encuentran entre (1,6-1,8) %. Estos resultados son comparables con los valores reportados por el AOAC para queso (RSD_r 1,5 %, método 991.25), y menores a los reportados en fórmula de infantes (RSD_r (5,4-6,1) %, método 985.35).

En el caso del magnesio, el sodio y el potasio se observa un RSD_r más grande en el nivel de concentración más bajo, para las tres matrices, lo cual indica que existe una mayor variabilidad de los valores con respecto a la media en el nivel de concentración más bajo. Esto se debe posiblemente a que este nivel de concentración se encuentra más cercano al límite de cuantificación, en comparación con el nivel más bajo estudiado para el calcio y el fósforo, los cuales se encuentran por encima del primer patrón de la curva de calibración.

Para el magnesio en queso el AOAC reporta un RSD_r de 0,9 % (método 991.25) y en fórmula de infantes (RSD_r (3,5-4,4) %, método 985.35). El RSD_r promedio obtenido experimentalmente se encuentra entre (0,9-2,0) % con lo que se confirma que la precisión obtenida es adecuada.

El AOAC reporta para el potasio en fórmula de infantes un RSD_r de 2,0 % y los resultados obtenidos experimentalmente se encuentran entre (2,3-2,5) %. En este caso la variabilidad se considera aceptable para los propósitos del método.

El sodio presentó la mayor desviación estándar relativa con un RSD_r promedio de (2,6-3,6) %. Sin embargo este resultado concuerda con el valor reportado por el AOAC para el RSD_r en fórmula de infantes de (3,5-5,8) %.

3.1.6 Verificación de la veracidad

Para la determinación de la veracidad se analizaron tres MRC de diferente matriz alimenticia en tres niveles de concentración (alta, media y baja) dentro del alcance del intervalo lineal de trabajo. Las matrices estudiadas fueron: Fórmula de infantes (MRC 1846), Músculo de bovino en polvo (MRC 8414) y Huevo en polvo (MRC 8415).

Se realizaron entre 5 y 13 repeticiones del ensayo, para cada nivel de concentración y se estableció una comparación entre el promedio de los valores obtenidos (\bar{X}) con el valor de referencia certificado (\bar{X}_{MRC}), mediante el sesgo:

$$\text{sesgo} = \bar{X} - \bar{X}_{MRC}$$

Los resultados de esta prueba se encuentran en los cuadros XIV al XXVIII. En todos los casos se puede demostrar que el valor del sesgo fue menor o igual que la desviación estándar de los resultados de prueba. La ausencia de errores sistemáticos para los tres materiales de referencia, se demuestra mediante la comparación gráfica entre los valores experimentales y los valores teóricos. Para todos los elementos en estudio el análisis de la recta de regresión al 95% de confianza demostró un coeficiente de correlación no significativamente diferente de uno, pendiente no significativamente diferente de uno y ordenada en el origen no significativamente diferente de cero. Estos resultados se pueden observar claramente en las figuras 28 a 42.

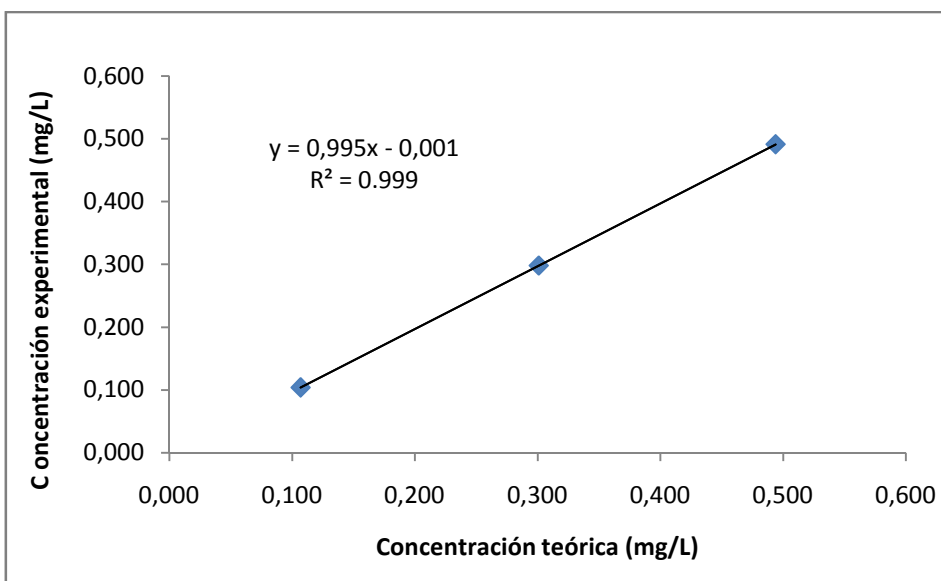


Figura 28. Estudio de veracidad para magnesio en MRC 1846

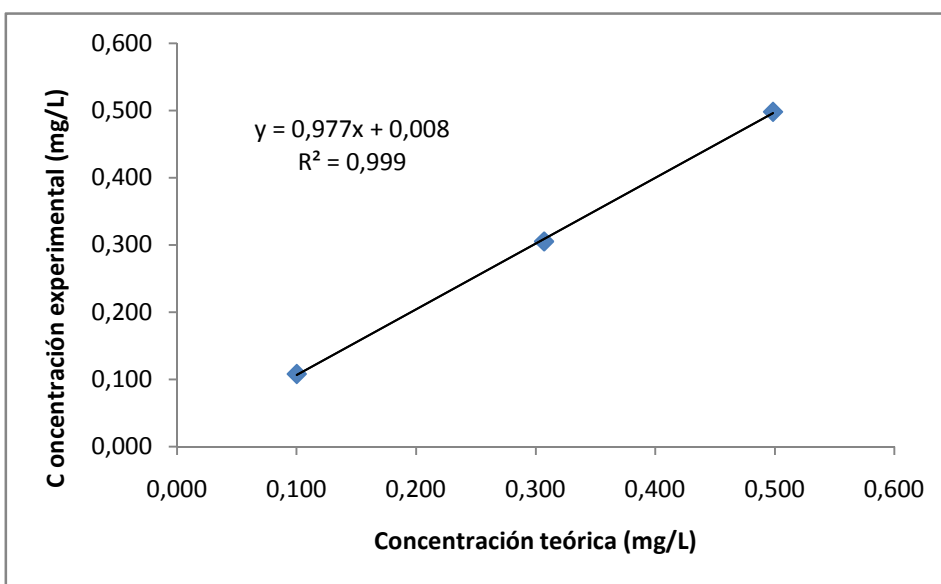


Figura 29. Estudio de veracidad para magnesio en MRC 8414

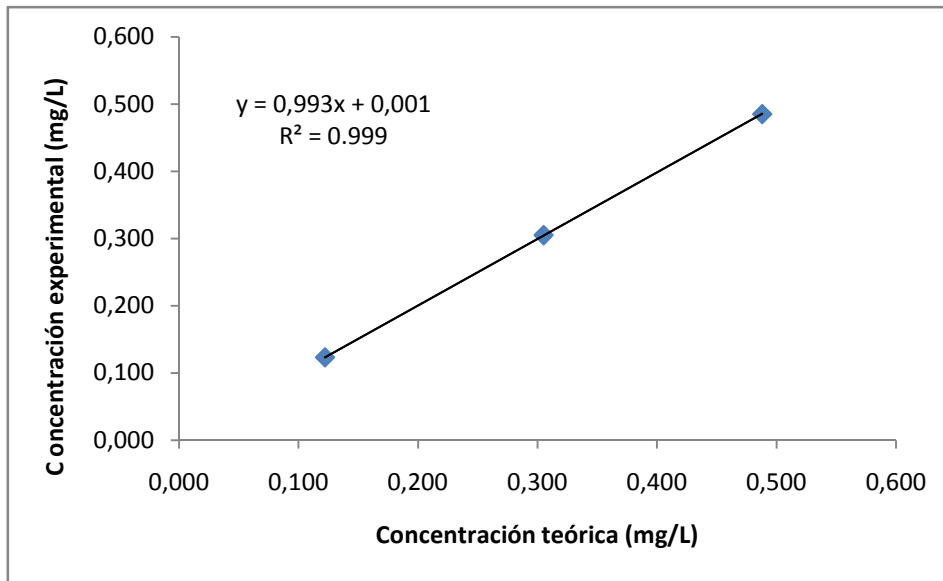


Figura 30. Estudio de veracidad para magnesio en MRC 8415

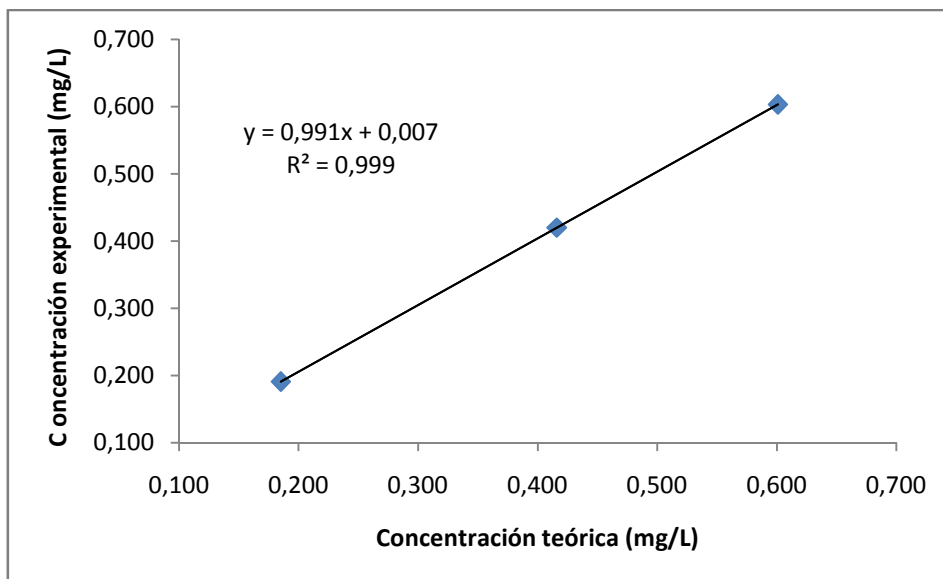


Figura 31. Estudio de veracidad para sodio en MRC 1846

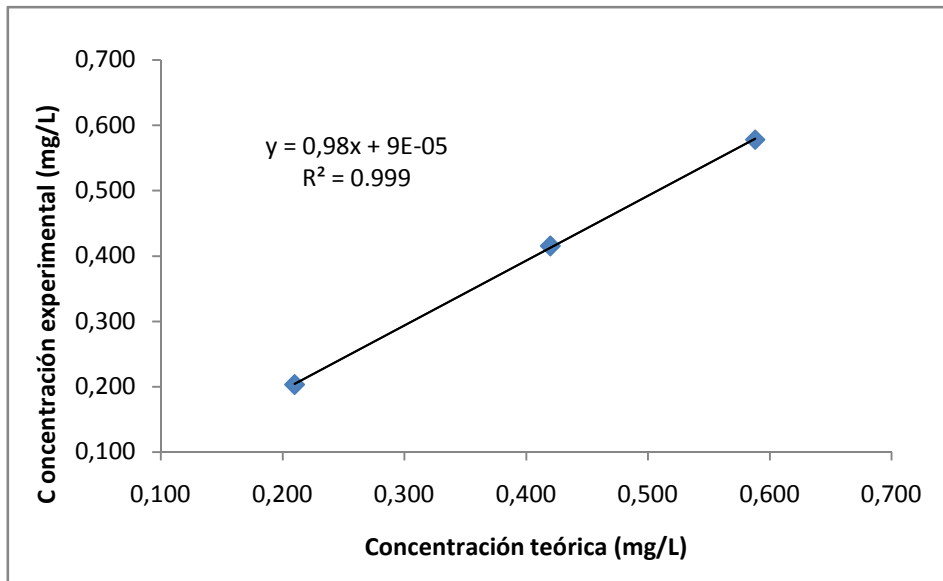


Figura 32. Estudio de veracidad para sodio en MRC 8414

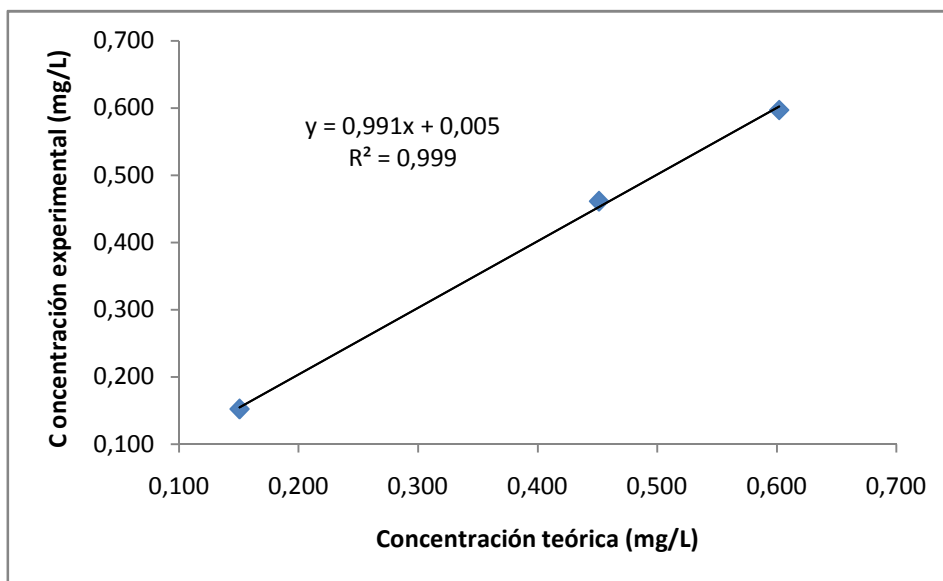


Figura 33. Estudio de veracidad para sodio en MRC 8415

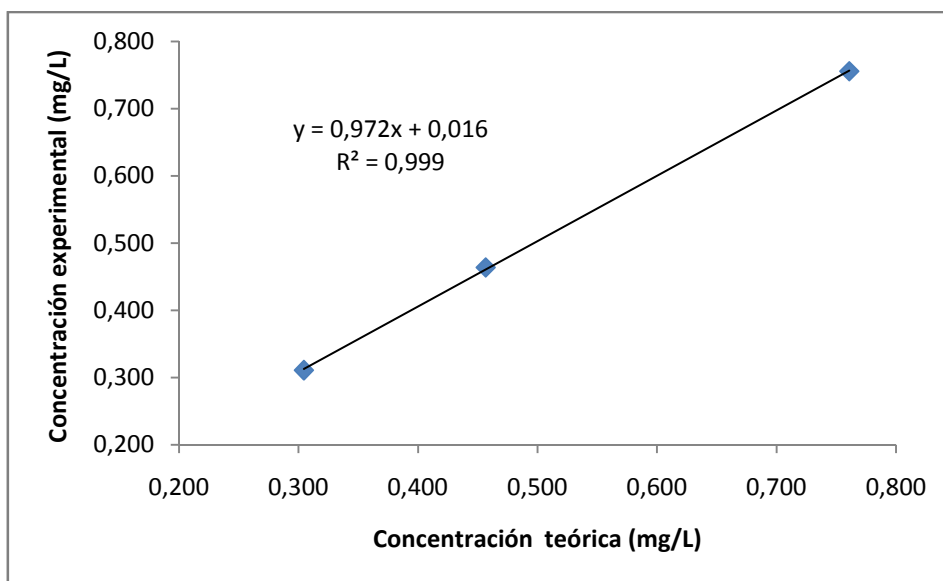


Figura 34. Estudio de veracidad para potasio en MRC 1846

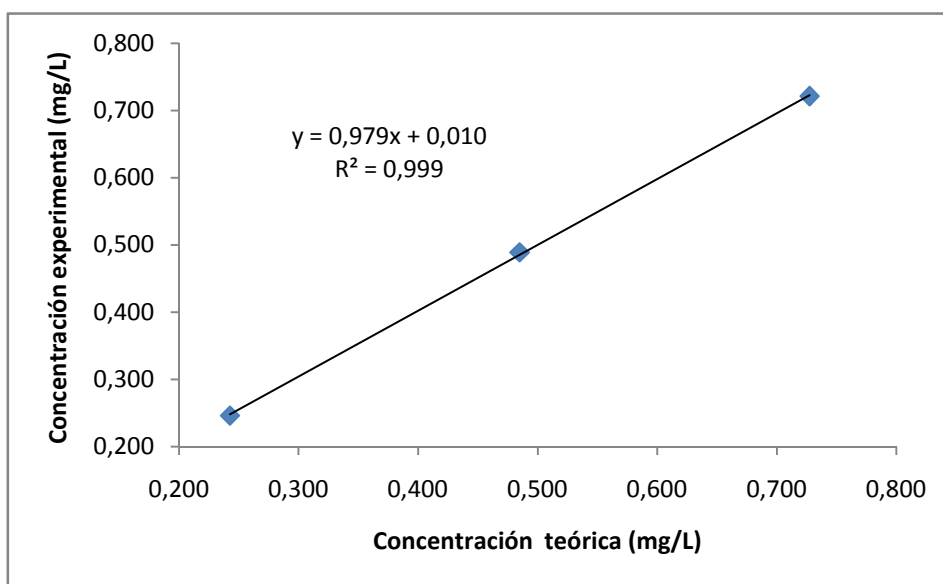


Figura 35. Estudio de veracidad para potasio en MRC 8414

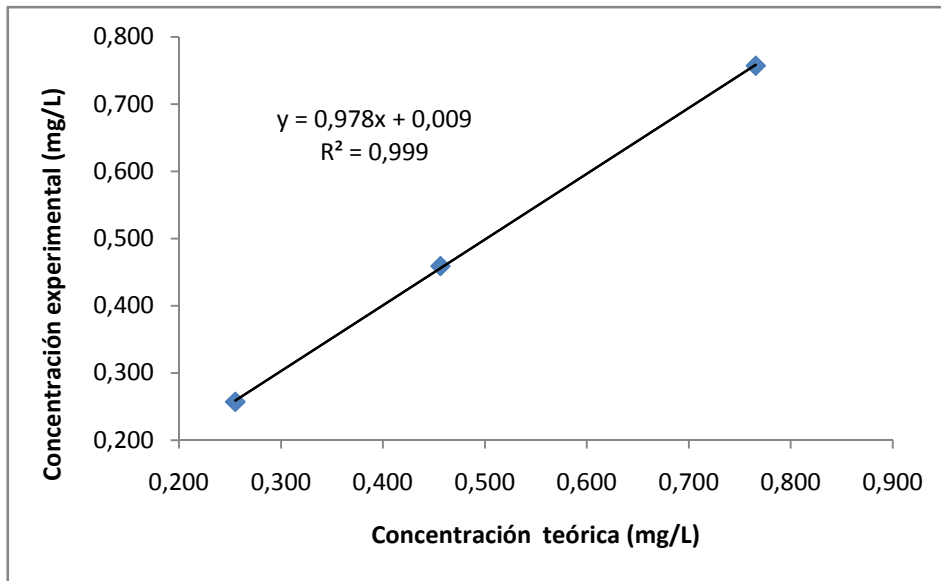


Figura 36. Estudio de veracidad para potasio en MRC 8415

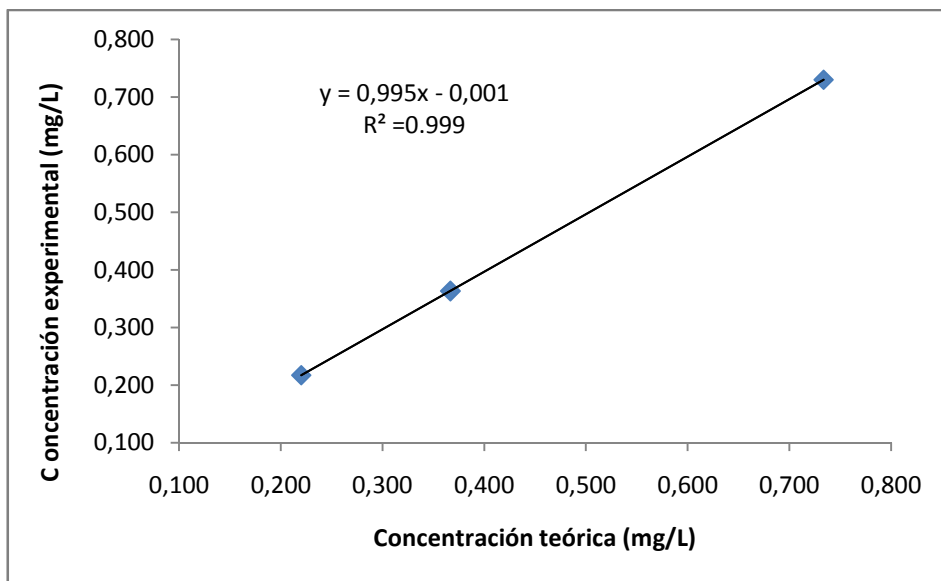


Figura 37. Estudio de veracidad para calcio en MRC 1846

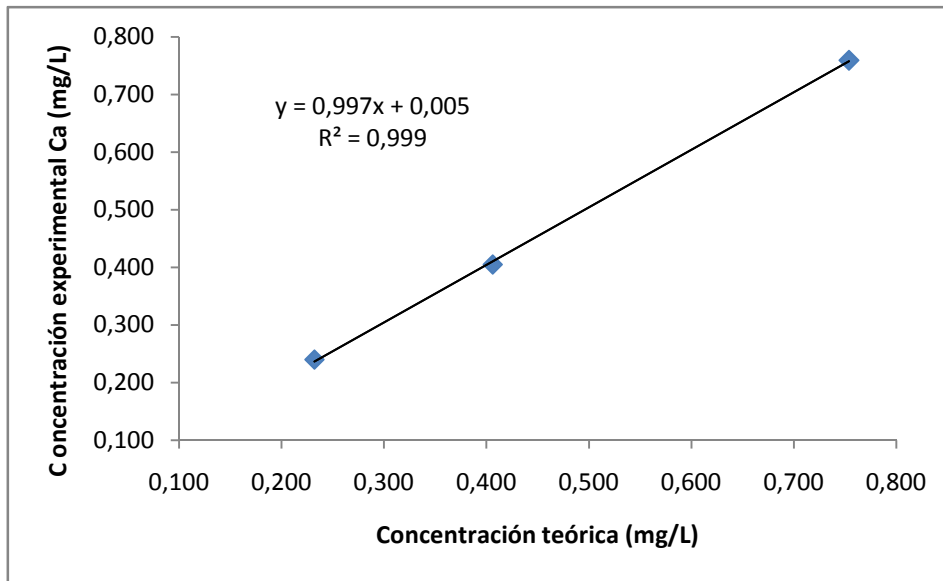


Figura 38. Estudio de veracidad para calcio en MRC 8414

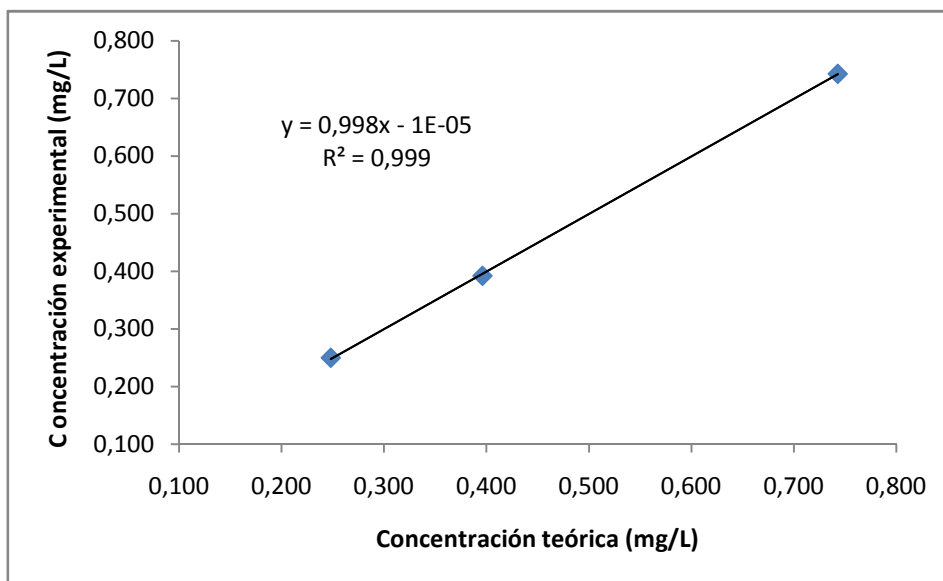


Figura 39. Estudio de veracidad para calcio en MRC 8415

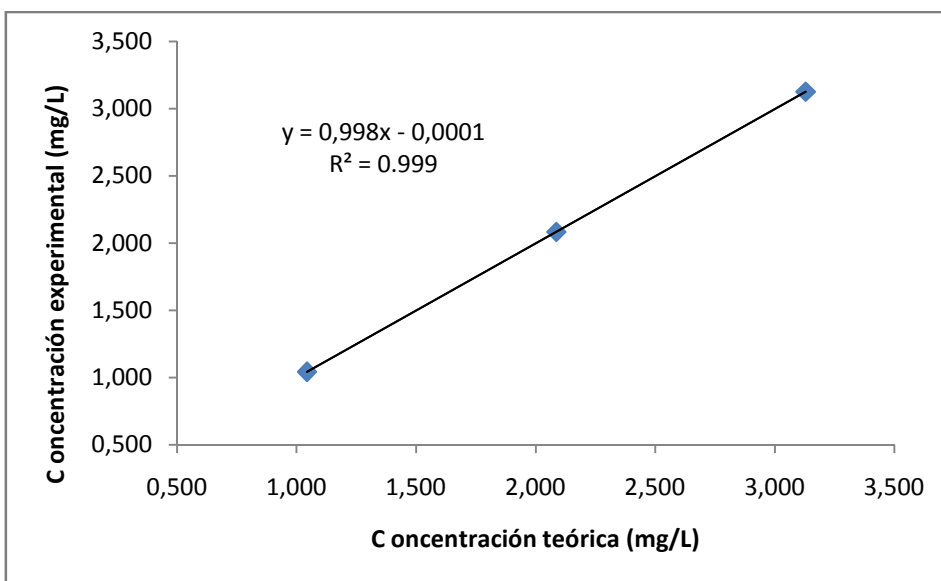


Figura 40. Estudio de veracidad para fósforo en MRC 1846

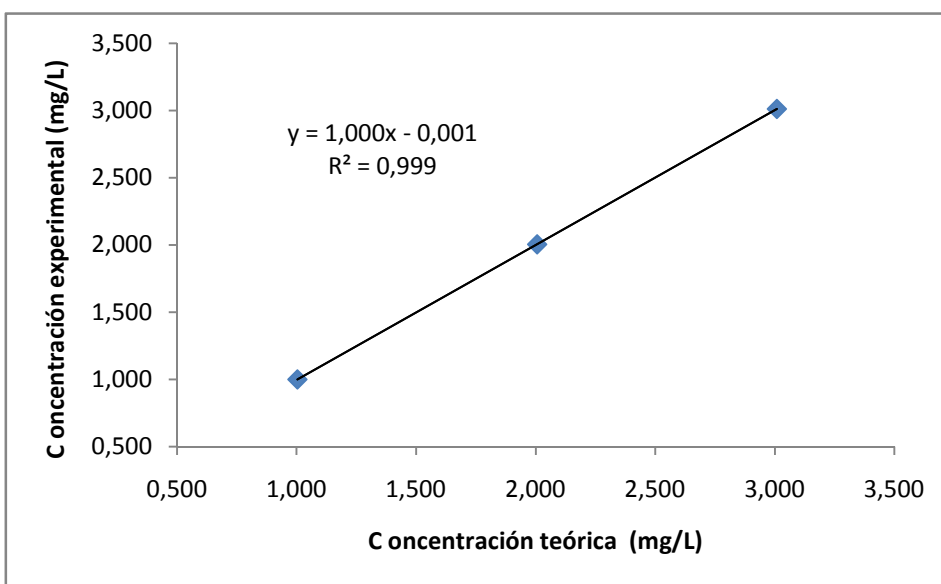


Figura 41. Estudio de veracidad para fósforo en MRC 8414

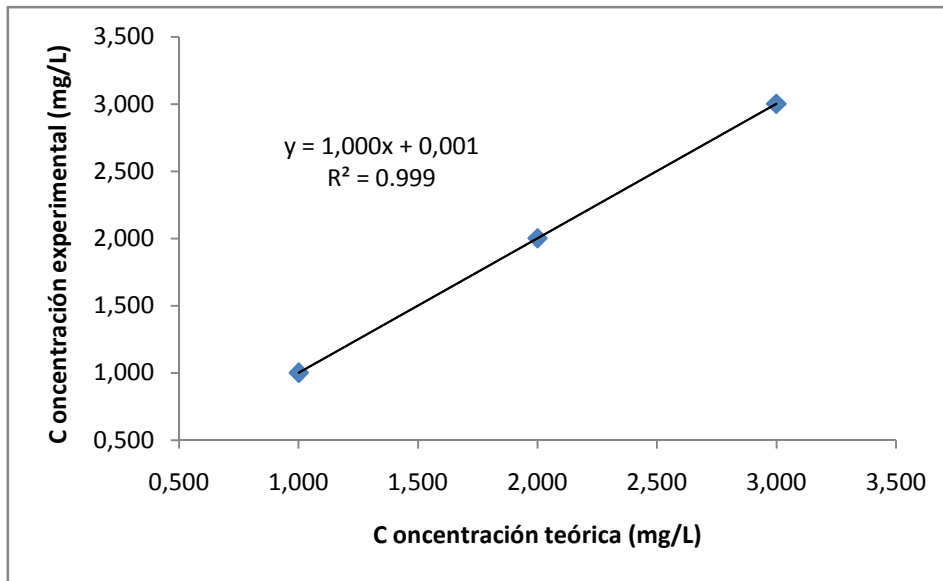


Figura 42. Estudio de veracidad para fósforo en MRC 8415

3. 1. 7 Evaluación de la Estabilidad

Los estudios de estabilidad se muestran en las figuras 43 a 47. En estos diagramas se observan los resultados promedio de lecturas realizadas cada semana para un material de referencia certificado (MRC 8414). Cuando las oscilaciones aleatorias de los datos se distribuyen normalmente en el tiempo alrededor de un valor central fijo, es indicativo de que el sistema se encuentra bajo control estadístico, por lo tanto se esperaría que el 67 % de los datos estén distribuidos dentro del intervalo fijado por la desviación estándar s . El 95 % de los datos debería encontrarse dentro de $2s$ y el 99 % no debería sobrepasar $3s$. En este caso se puede decir que la variabilidad de las medidas se debe solamente a errores aleatorios. Como se puede observar en los gráficos del estudio de la estabilidad, todos los sistemas mostrados siguen una distribución aleatoria que se encuentra bajo control estadístico de acuerdo con los criterios mencionados en la sección experimental.

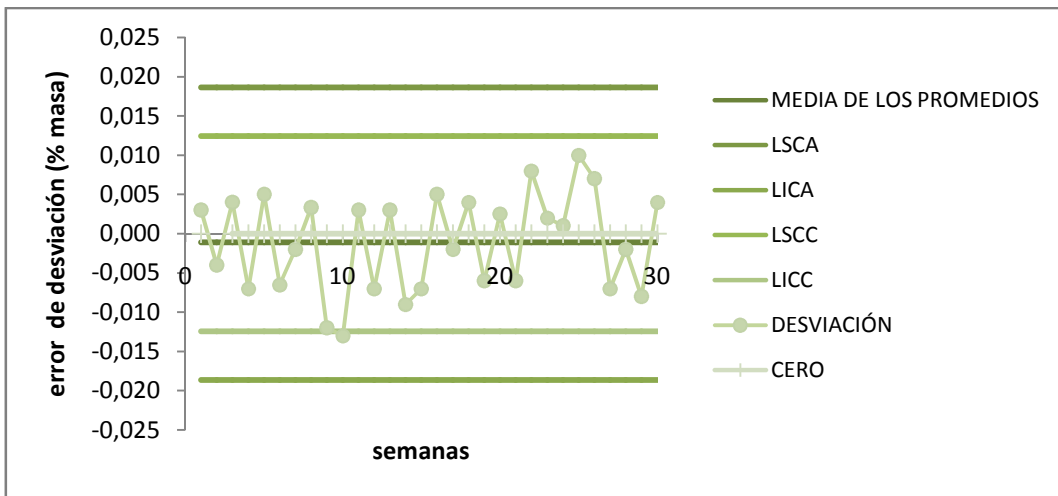


Figura 43. Estudio de la estabilidad para sodio en MRC 8414 medido por absorción atómica de llama a 589 nm.

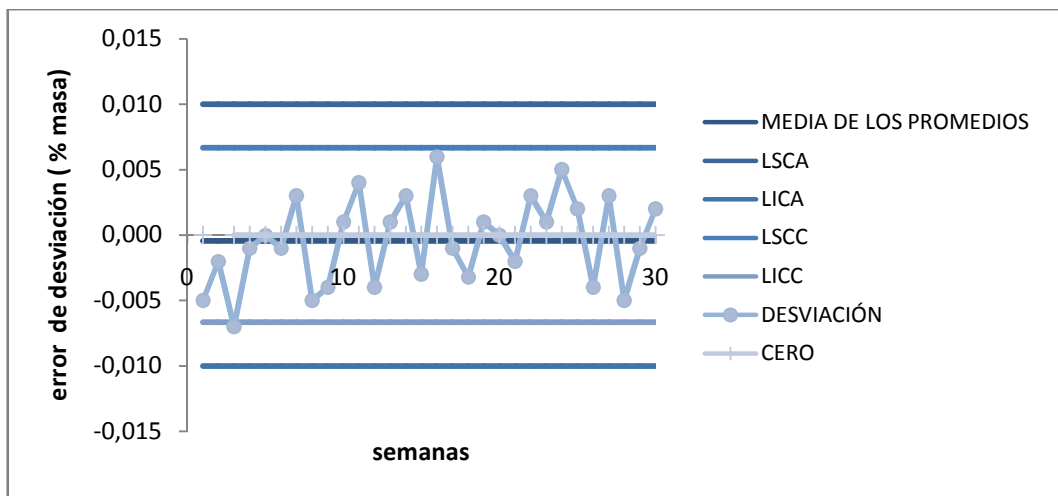


Figura 44. Estudio de la estabilidad para fósforo en MRC 8414 medido por absorción UV-visible a 400 nm.

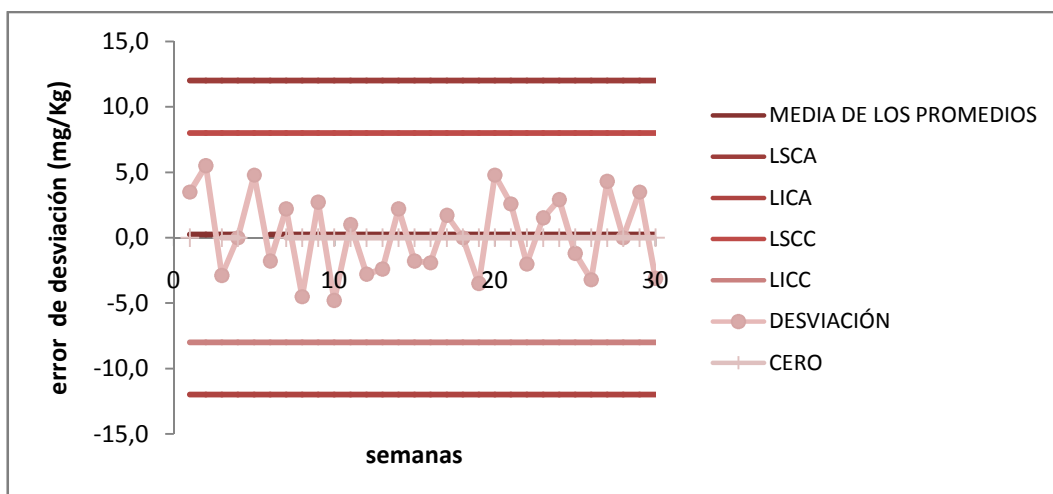


Figura 45. Estudio de la estabilidad para calcio en MRC 8414 medido por absorción atómica de llama a 422,7 nm.

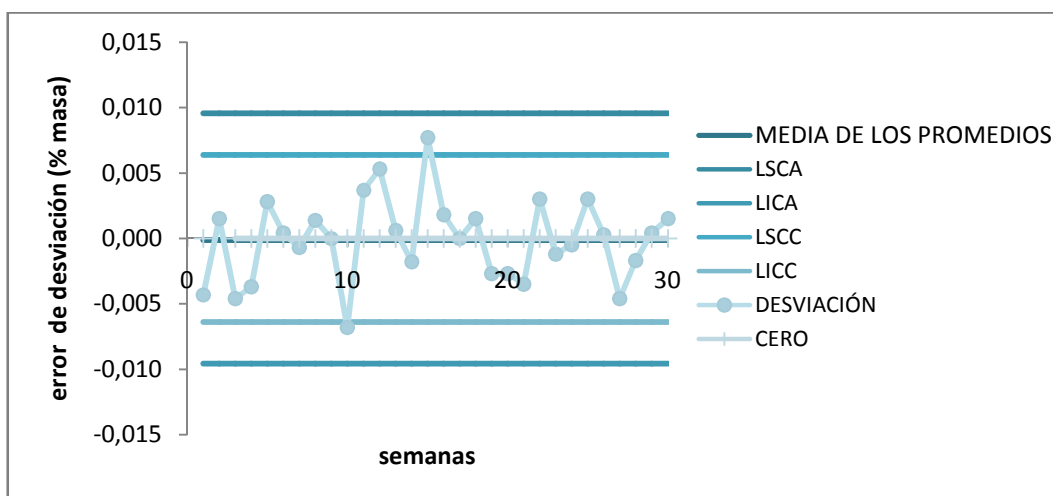


Figura 46. Estudio de la estabilidad para potasio en MRC 8414 medido por absorción atómica de llama a 766,5 nm.

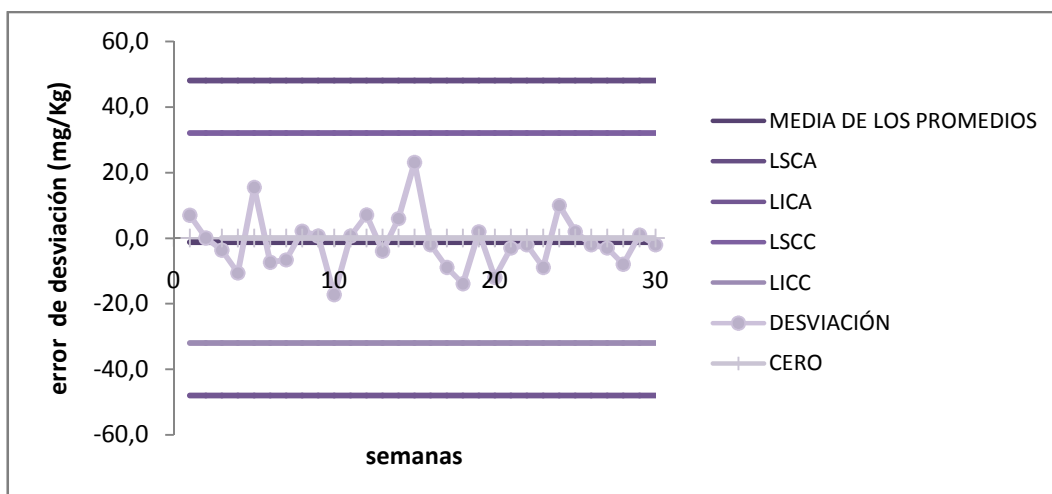


Figura 47. Estudio de la estabilidad para magnesio en MRC 8414 por absorción atómica de llama a 285,2 nm.

Los diagramas de estabilidad de las mediciones para el MRC 8414 se emplearon para realizar el análisis periódico de la veracidad y la precisión. Los resultados se encuentran en el cuadro XXX. La prueba de significancia aplicada mediante el estadístico t a un nivel de confianza del 95 %, demostró que valor de t_{exp} calculado para todos los elementos fue menor que el valor crítico dado en la tabla. Por lo tanto se puede concluir que no existe diferencia significativa entre el valor obtenido y el valor de referencia. Se concluye que el sistema se encuentra libre de errores sistemáticos.

La desviación estándar relativa en este caso fue ligeramente mayor que el RSD_r % obtenido para las mediciones de precisión calculadas en términos de repetibilidad. Esto es consistente, ya que se espera que exista mayor variación de las condiciones de medición para intervalos mayores de tiempo.

Cuadro XXX: Resultados de la prueba de precisión y veracidad en el tiempo

	Ca (mg/Kg)	Mg (mg/Kg)	Na (%)	K (%)	P (%)
Media	146	959	0,209	1,516	0,836
DEST	3,21	8,5	0,0062	0,034	0,0033
RSD%	2,20	0,9	2,97	2,24	0,40
sesgo	1,0	-1,3	-0,0011	-0,001	-0,0004
%E	0,69	-0,1	0,53	-0,07	-0,05
t _{exp}	1,7	-0,80	-0,99	-0,16	-0,72
t _{tabla} (95%)	2,04	2,04	2,04	2,04	2,04

Como se puede observar los RSD% más bajos se obtuvieron para el fósforo y el magnesio, esto es consistente ya que estos elementos presentaron los valores más altos de sensibilidad analítica.

3.1.8 Control de calidad

Después de haber determinado los parámetros de desempeño durante la validación de los métodos de cuantificación, es necesario establecer mecanismos de control de calidad que permitan obtener datos confiables en la etapa de generación de los datos de composición de los macrominerales en alimentos.

Los sistemas de control de calidad que se aplicaron durante esta investigación se describen a continuación.

Blancos de muestras

El uso de blancos de muestra es imprescindible para diferenciar las señales atribuibles al analito de las debidas a los reactivos empleados en el tratamiento de las muestras, así como otras variaciones atribuibles al instrumento de medida. En la etapa de validación se establecieron límites de control y límites de acción para las lecturas de los blancos de muestra para cada elemento mediante el promedio de una serie de 20 resultados. En caso de no conformidad con los resultados se procede a recalibrar o repetir la corrida de digestión si existe sospecha de contaminación.

Desempeño del equipo

Se llevaron cartas de control, para una disolución estándar preparada en un punto intermedio de la curva de calibración. Se fijó el valor central mediante el promedio de una serie de mediciones, entre (20-25) para cada uno de los elementos investigados, y se establecieron límites de control y límites de acción para monitorear y corregir el sesgo en las posteriores mediciones de las muestras durante cada corrida de lectura. La disolución control se analiza después de la calibración y cada 10 lecturas de muestras. Los límites establecidos se encuentran en el cuadro XXXI. Se utilizaron los mismos criterios indicados en la sección anterior para determinar si el comportamiento de los sistemas se encuentra bajo control estadístico.

Cuadro XXXI. Límites de control y límites de acción empleados para monitorear el desempeño del equipo.

Estándar control	Fósforo	Calcio	Magnesio	Sodio	Potasio
Concentración (mg/L)	2,10	0,503	0,508	0,472	0,489
Desviación estándar (s)	0,050	0,021	0,018	0,022	0,025
Límite de Control ($\pm 2s$)	0,10	0,042	0,035	0,045	0,050
Límite de Acción ($\pm 3s$)	0,15	0,062	0,053	0,067	0,075

Replicados de muestra

En la etapa de validación, se determinó el límite de repetibilidad para cada analito. Se adoptó el criterio de realizar 2 réplicas por muestra de alimento, en este caso el criterio para aceptar los resultados de muestra es que la diferencia entre dos réplicas no supere el límite de repetibilidad.

3.2 Resultados del contenido de macrominerales en alimentos

En esta parte se presenta un resumen de los resultados obtenidos del contenido de sodio, potasio, magnesio, calcio y fósforo en los alimentos analizados. Los valores se expresan en base húmeda, por 100 gramos de porción comestible, fresca o cocida, según el consumo más habitual del alimento.

3.2.1 Resultados del contenido de calcio

En la figura 48 se presentan los resultados de los alimentos en los cuales se encontró mayor contenido de calcio. En este estudio se confirma al grupo de los lácteos como las fuentes principales de este mineral. El valor más alto se reporta para la leche entera en polvo con un contenido de 735 mg Ca/100 g, que en su forma reconstituida equivale a unos 235 mg Ca/100 mL. El queso blanco fresco y el queso mozzarella también presentan altos valores con 503 mg Ca/100 g y 461 mg Ca/100 g respectivamente. En el caso de los yogures (entero, semidescremado y líquido) los valores son altos y comparables entre ellos para un promedio de 99 mg Ca/100 g. La leche líquida descremada presentó un contenido de calcio (98 mg Ca/100 g) muy similar al yogurt y al queso crema con 102 mg Ca /100 g.

En el grupo de los cereales y derivados se destacan el pan de trigo (263 mg Ca/100 g) y la tortilla con menor cantidad (25 mg Ca/100 g). Estos últimos a diferencia de los otros cereales, presentan mayor contenido de calcio, ya que contienen aditivos que incrementan el contenido de este mineral. Otros alimentos que presentaron cantidades moderadas son las leguminosas que en promedio contienen unos 37 mg Ca/100 g.

En el grupo de las verduras y hortalizas sobresale el brócoli (38 mg Ca/100 g), la zanahoria (73 mg Ca/100 g), el camote (44 mg Ca/100 g) e incluso la cebolla con 26 mg Ca/100 g. Las frutas y las carnes prácticamente no contienen cantidades significativas de calcio (< 10 mg Ca / 100 g), solamente en el pescado, el contenido es un poco mayor que en resto de las carnes con 17 mg Ca /100 g.

3.2.2 Resultados del contenido de sodio

Los alimentos estudiados que presentan mayor contenido en sodio son los procesados como el caso de la leche en polvo (452 mg Na/100 g), el pan de trigo (430 mg Na/100 g), la tortilla (90 mg Na/100 g), el queso crema (425 mg Na/100 g), el queso mozzarella (250 mg Na/100 g) y el queso fresco (106 mg Na/100 g). El contenido de sodio es muy variable entre los quesos, esto se debe a las diferencias de humedad y al proceso de elaboración de los mismos, en el cual se agrega NaCl para diversos propósitos.

Las carnes presentaron menor cantidad entre (44-70) mg Na/100 g, al igual que el yogurt (53-80) mg Na/100 g y la leche fluida descremada con 46 mg Na/100 g. Los alimentos con menor contenido son las verduras (2-24) mg Na/100 g y las frutas con menos de 2 mg Na/100 g.

3.2.3 Resultados del contenido de potasio

De los alimentos estudiados, los más ricos en potasio son: las frutas, las verduras, las carnes y los lácteos.

El aguacate es la fruta con mayor contenido de potasio (440 mg K/ 100 g). Le siguen el banano (332 mg K /100 g) y el tomate (221 mg K/ 100 g). El resto de las frutas mantiene un promedio entre los (100-200 mg k/100 g). En el grupo de las verdura se destacan: el plátano (412 mg K/ 100 g), la zanahoria (423 mg K/ 100 g), el camote (490 mg K/ 100 g) y la papa (255 mg K/ 100 g).

Las carnes también presentaron cantidades significativas en potasio (236-330) mg K/ 100 g y en los lácteos el contenido varía entre (119-247) mg K/ 100 g.. Los cereales y las leguminosas también contienen potasio pero en menor cantidad < 160 mg/100 g.

3.2.4 Resultados del contenido de fósforo

El fósforo se encuentra principalmente en los alimentos proteicos. En los lácteos el valor más alto se encuentra en la leche en polvo (835 mg P/ 100 g) y en los quesos en cantidades variables según el tipo (69-417) mg P /100 g. El contenido de fósforo en la leche líquida es similar al contenido en el yogurt, con valores de 107 mg P /100 g y (96-117) mg P /100 g, respectivamente.

La relación Ca/P es semejante (2-15) %, entre las leches y los yogures, pero en los quesos, el contenido de fósforo es aproximadamente 23 % menor que el contenido de calcio.

En el caso del grupo de carnes investigado: la cantidad de fósforo es cercana a la cantidad de fósforo en los lácteos (177-361) mg P/100 g. Los valores más altos los presentan el hígado de res (361mg P/ 100 g) y el hígado de pollo (331mg P/ 100 g). Sin embargo en este grupo, la relación Ca/P se hace muy grande. La cantidad de calcio es apenas de un (2-6) % de la cantidad de fósforo.

El fósforo también está presente en los granos y cereales en cantidades intermedias. Las leguminosas contienen entre (103-139) mg P/100 g. Mientras que en el arroz precocido el contenido de fósforo es de 87 mg/ 100 g, en el arroz blanco pulido este disminuye casi el doble (49 mg P/100 g). En el caso de los cereales derivados que han recibido un mayor procesado, el contenido de fósforo es más alto como la tortilla (163 mg P/100 g) y el pan blanco de trigo (126 mg P/100 g). En las pastas el contenido disminuye (65-77) mg P/ 100 g.

En las verduras el fosforo se encuentra en menor cantidad (12-39) mg/ 100 g. Con excepción del ajo que presenta un contenido mayor (153 mg P/100 g). En las frutas el contenido es similar a las verduras (8-32) mg P/100 g.

3.2.5 Resultados del contenido de magnesio

El contenido de magnesio en los alimentos analizados se mantuvo en cantidades intermedias y bajas, y distribuido de forma similar en todos los grupos estudiados. En el grupo de las verduras, el contenido de magnesio varió entre (7-26) mg/100 g. Los alimentos que presenta mayor contenido de este mineral son el plátano (24 mg/100 g), el camote (27 mg/100 g) y el ajo (26 mg/100 g).

En las frutas el contenido de magnesio es bajo entre (4-10) mg/100 g con excepción del aguacate (28 mg/100g) y el banano (30 mg/100 g). El contenido más alto de Mg para los lácteos se presenta en la leche entera en polvo (43 mg/100 g), equivalente en su forma reconstituida a (14 mg/100 g), el queso fresco (27 mg/100g) y el mozzarella (19 mg/100 g). En la leche fluida y el yogurt el contenido de magnesio es comparable con un promedio entre ellos de (13 mg/100 g). En las carnes el contenido de Mg es muy similar entre (18- 28) mg/100 g. El pescado presentó un contenido un poco más elevado con (38 mg/100 g).

El grupo de los cereales y derivados presentó el mayor contenido de magnesio en la tortilla de maíz (47 mg/100 g). El resto se mantuvo con muy poca variación entre los (20-30) mg/100 g. El contenido de magnesio en los cereales y derivados es comparable entre ellos con una variación entre (20-27) mg/100 g. Las leguminosas son las que presentan en general los valores más altos en magnesio: garbanzos (47 mg/100 g), frijol rojo (44 mg/100 g) y lentejas (38 mg/100 g).

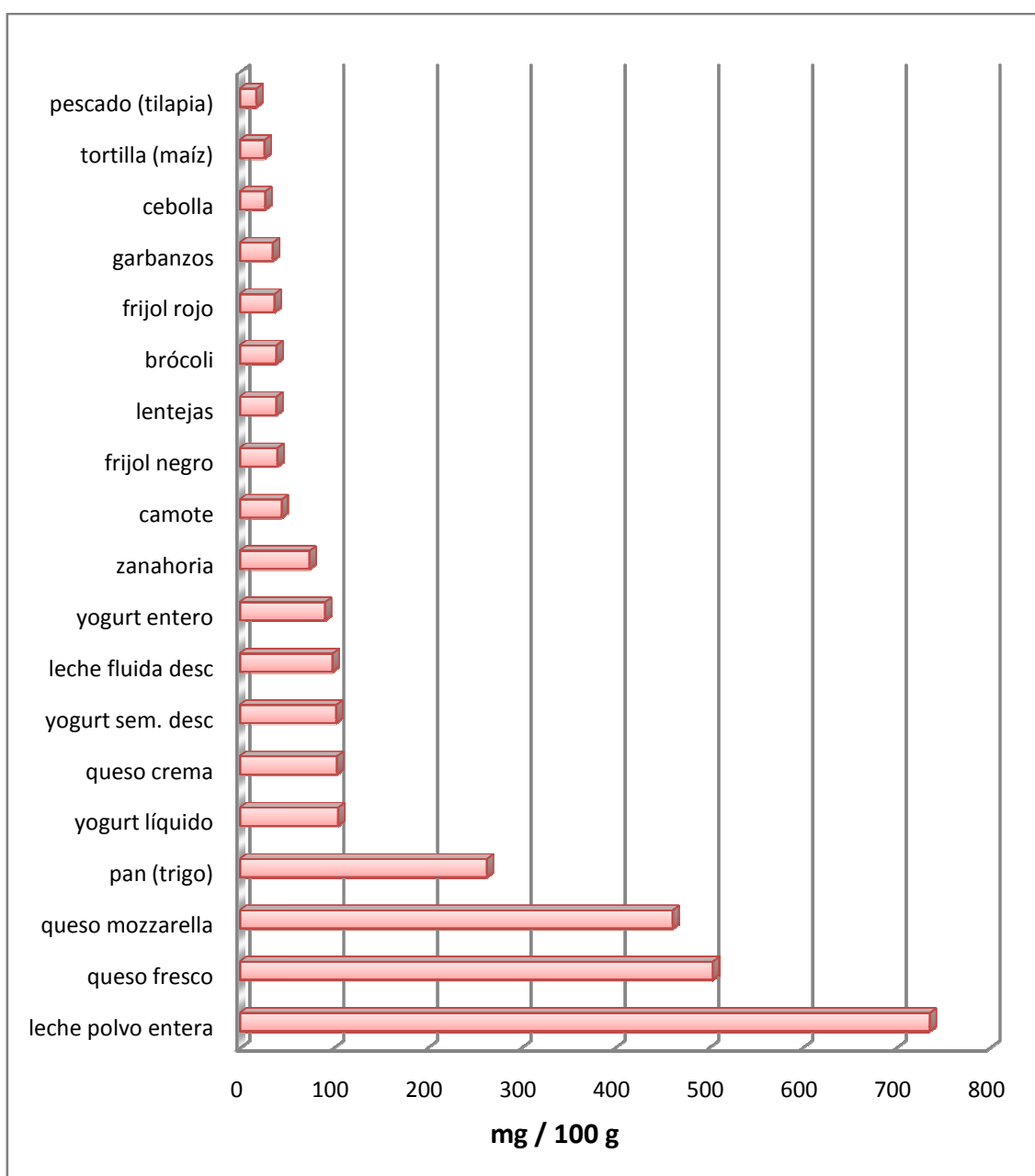


Figura 48. Contenido de calcio en base húmeda por 100 gramos de porción comestible

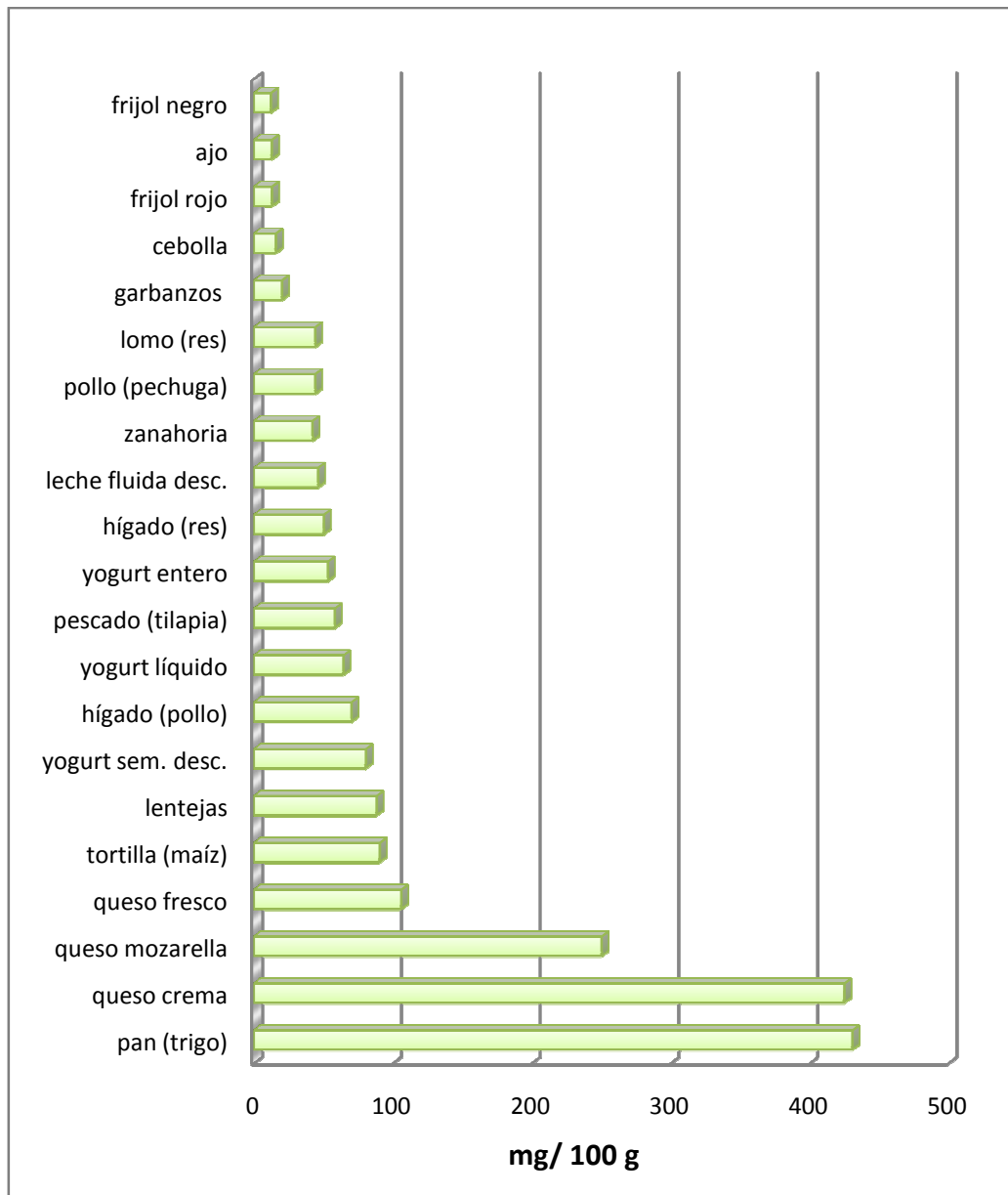


Figura 49. Contenido de sodio en base húmeda por 100 gramos de porción comestible.

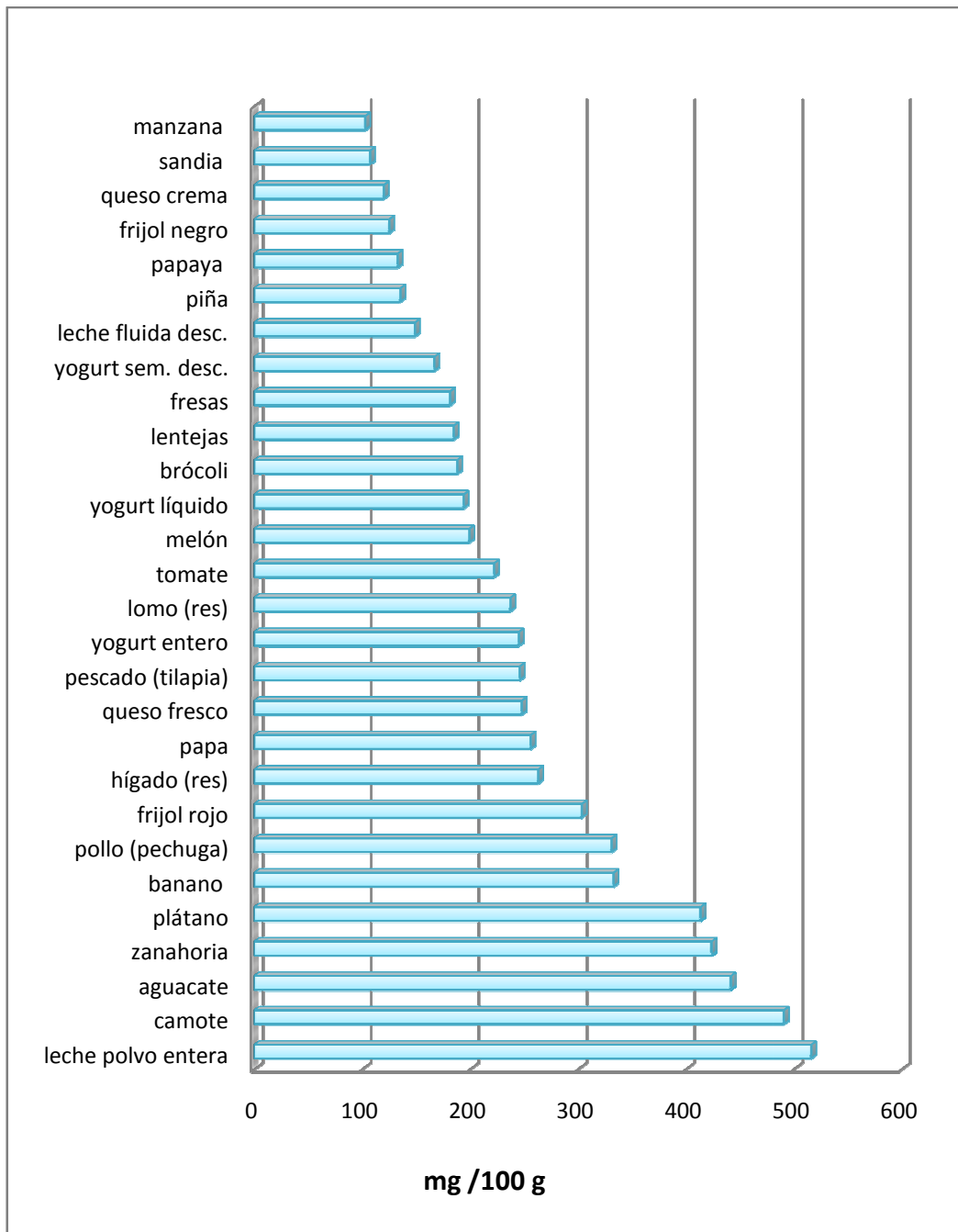


Figura 50. Contenido de potasio en base húmeda por 100 gramos de porción comestible.

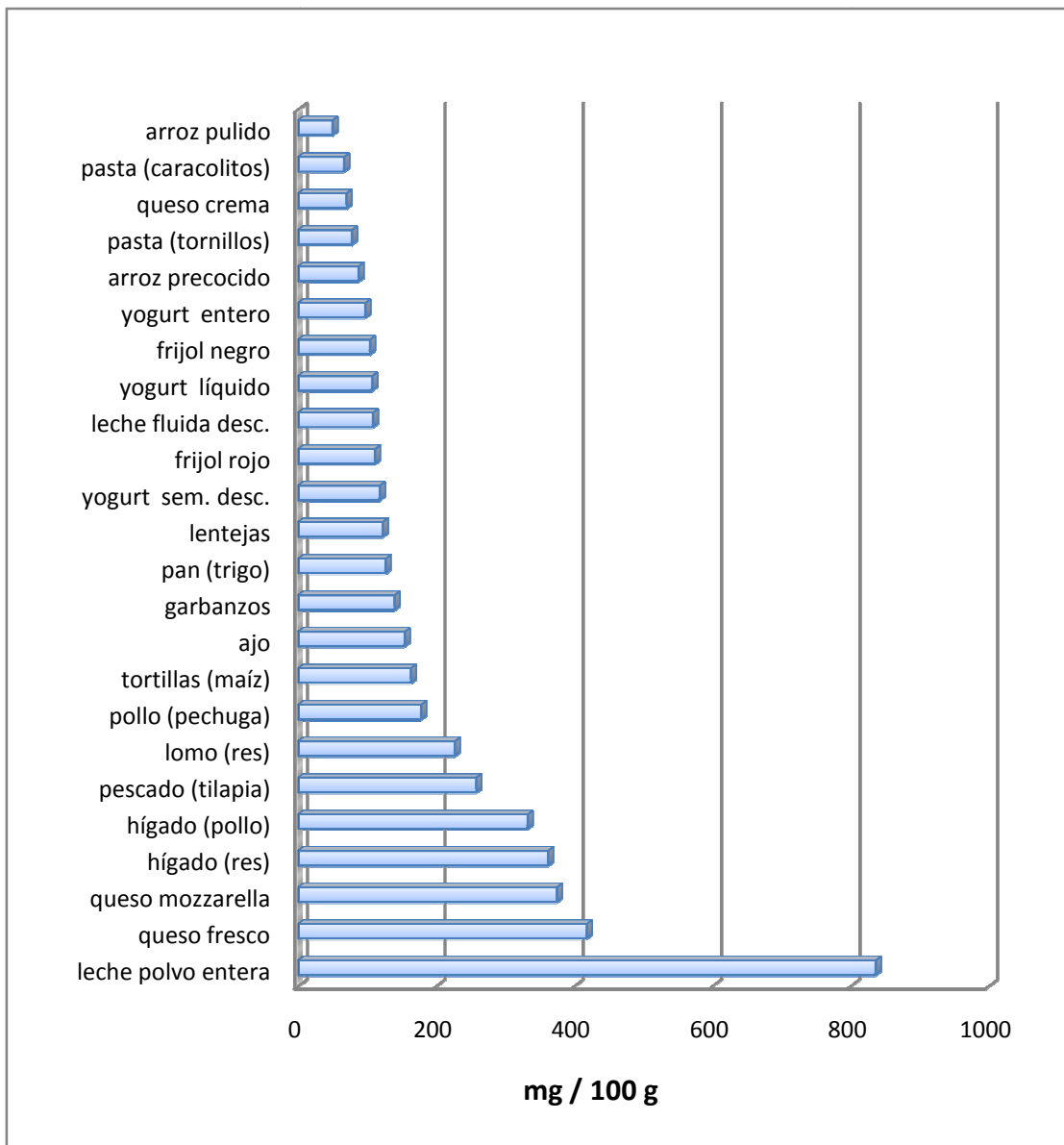


Figura 51. Contenido de fósforo en base húmeda por 100 gramos de porción comestible.

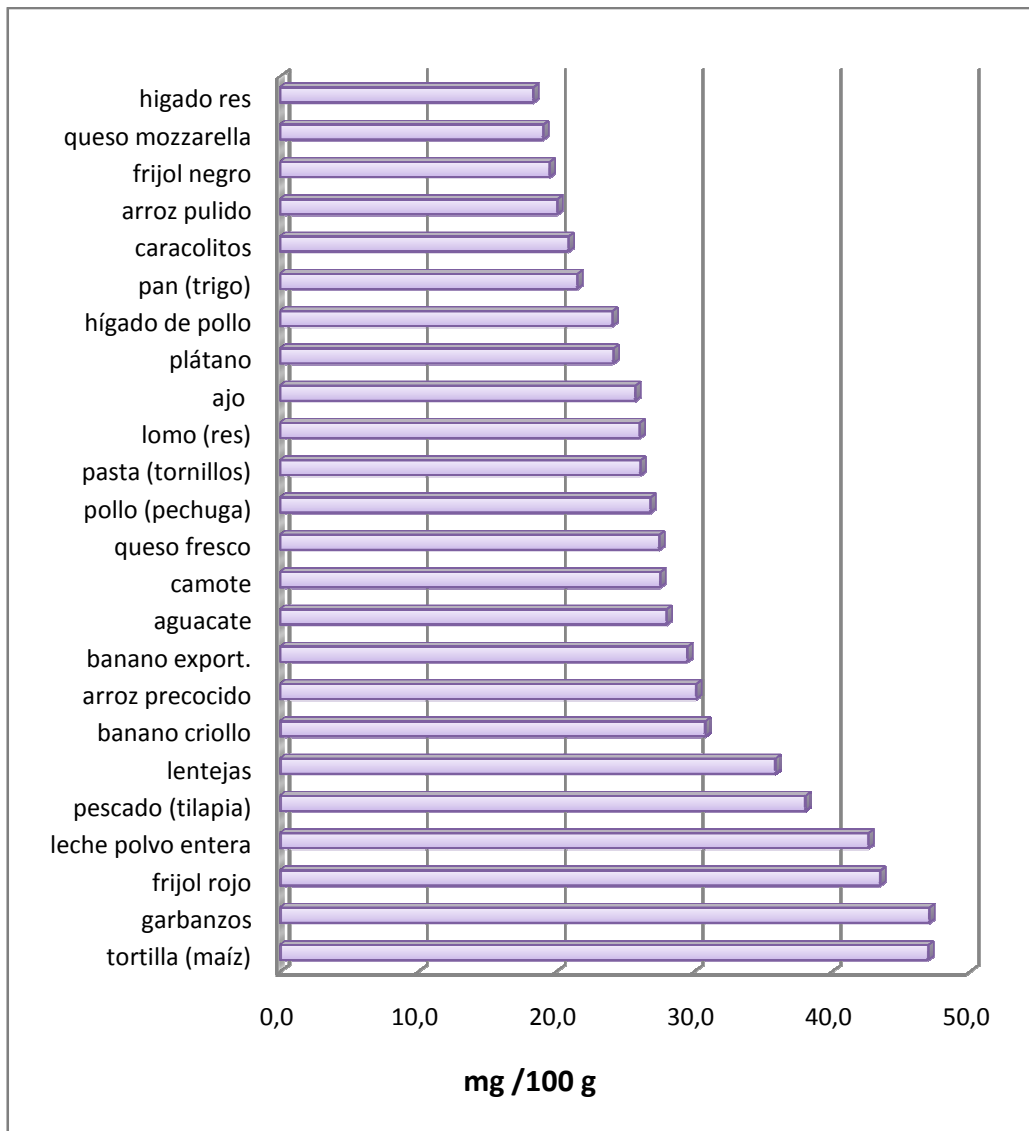


Figura 52. Contenido de magnesio en base húmeda por 100 gramos de porción comestible.

CAPÍTULO 4
CONCLUSIONES

Conclusiones

En esta investigación se logró validar la metodología analítica de digestión y cuantificación de sodio, potasio, magnesio y calcio por espectrometría de absorción atómica de llama y la metodología de cuantificación de fósforo por espectrometría UV-visible en alimentos de importante consumo a nivel nacional.

Los parámetros de desempeño analítico determinados: linealidad y ámbito de trabajo, sensibilidad de calibración y sensibilidad analítica, límites de detección y límites de cuantificación, veracidad y precisión cumplen con los requerimientos necesarios para la aplicación de los métodos validados para la cuantificación de cada elemento.

Los resultados obtenidos en la evaluación de veracidad y precisión con tres MRC de diferente matriz alimenticia, demuestran que los métodos utilizados fueron adecuados para el propósito establecido. El sesgo fue menor que la desviación estándar determinada bajo condiciones de repetibilidad y el RSD_r es menor o comparable con los valores reportados en el método oficial 985,35 del AOAC empleado como referencia en esta investigación.

El estudio de la estabilidad demostró que el sistema analítico se mantuvo bajo control estadístico y los resultados de veracidad medida a lo largo del tiempo demostraron la ausencia de errores sistemáticos.

Después de la validación de la metodología se realizaron ensayos en diferentes grupos de alimentos, los resultados exactos serán publicados posteriormente en revistas científicas.

REFERENCIAS

1. Morón, C.; Zacarías, I.; De Paulo, S. (1997) *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*. Santiago, Chile: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, pp 1-21.
2. Salas, J.; Bonada, A.; Trallero, R; Saló, M.E.; Burgos R. (2008) *Nutrición y dietética clínica*. 2 ed. Ámsterdam: Elsevier, pp 83-96.
3. Greenfield, H.; Southgate, D.A.T. (2006) *Datos de Composición de alimentos: obtención, gestión y utilización*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, pp 8-22, 69-89, 235-246.
4. Ortiz, L; Blanco, A. (2005) Sistema de Información en Composición de Alimentos (SICA) de Costa Rica. Boletín. INCIENSA. 17(3) 2-5.
5. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (2008, noviembre 19) *Compilación de datos para bases de datos y tabla de Composición Química de Alimentos*. Extraído el 02 de enero de 2009 desde <http://www.rlc.fao.org/foro/latfoods/>
6. FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (1997). *Informe sobre el simposio FAO/SLAN/LATINFOODS sobre composición química de alimentos*. Santiago, Chile: Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe, pp 2-4.
7. Williams, M.H. (2006) *Nutrición para la salud, condición física y deporte*. 7 ed. México D.F: Mc Graw Hill Interamericana, capítulo 8.
8. Groff, J.L.; Gropper, S.S. (1999) *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 3 ed. Belmont. USA: Thomson Learning Wadsworth, pp 371-399.

9. Bowman, B.A; Russell, R.M. (2003) *Conocimientos actuales sobre nutrición*. Whashington, D.C: Organización Panamericana de la Salud. (Serie Publicación Científica y Técnica N°592), pp 260-293.
10. Traub, S. (Ed.) (1992) *Basic Skills in interpreting laboratory data: illustrated with case studies*. 2 ed. Aspen, U.S.A: American Society of Health System Pharmacists, pp 94-115.
11. Gibney, M.J; Vorster H.H; Kok, F.J. (2005) *Introducción a la nutrición humana*. Zaragoza, España: Acribia, pp 193-210.
12. Granner, D.K; Murria, R.K; Mayes P.A; Rodwell, V.W. (1994) *Bioquímica de Harper*. 13 ed. México D.F: El Manual Moderno, pp 609-610.
13. Henry, C.; Chapman, C. (2002) *The nutrition handbook for food processors*. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited, p 103.
14. Wardlaw, G.M. (1993) *Perspectives in Nutrition*. 4 ed. New York, USA: Mc Graw Hill International, pp 472-492.
15. Ramesh, C.; Khanal, R.C.; Nemere, I. (2008) Regulation of Intestinal Calcium Transport. *Annu. Rev. Nutr.* 28,179–196.
16. Ganong, W.F. (1977) *Review of medical physiology*. 8 ed. California, U.S.A: Lange Medical Publications, p 427.
17. Sowers, M. (1993) Epidemology of calcium and vitamin D in bones loss. *J. Nutr.* 123, 413-407.
18. Friedman, P.A. (2008) *Goodman & Gilman's Pharmacology: The Agents Affecting Mineral Ion Homeostasis and Bone Turnover*. Mc Graw Hill's Access Medicine, capítulo 61. Extraído el 12 de noviembre de 2008 desde http://www.sibdi.bldt.ucr.ac.cr/bases_datos.htm

19. Parfitt, K. (1999) *Martindale: The complete Drug Reference*. 32 ed. London, USA: Pharmaceutical Press, pp 1147-1149.
20. Suzuki, Y.; Landowski, C.P.; Hediger, M.A. (2008) Mechanisms and Regulation of Epithelial Ca²⁺ Absorption in Health and Disease. *Annu. Rev. Physiol*, 70, 257-271.
21. Cervera, P; Clapes, J; Rigolfal R. (1993) *Alimentación y dietoterapia: Nutrición aplicada a la salud y la enfermedad*. 2 ed. Madrid, España: Mc Graw Hill, pp 38-40.
22. Bringhurts, F.R.; Demay, M.B. Krame, S.M. Kronenberg, H.M. (2008) *Harrison`s Online: Bone and mineral metabolism in health and diseases*.17 ed. Mc Graw Hill's Access Medicine, capítulo 346. Extraído el 12 de noviembre de 2008 desde http://www.sibdi.bldt.ucr.ac.cr/bases_datos.htm
23. Berndt, T.; Kumar, R. (2006) Phosphatonins and the Regulation of Phosphate Homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.*, 69, 341-359
24. Muñoz, M.; Ledesma, J.A. (1996) *Tabla de valor nutritivo de los alimentos de Mayor Consumo en México*. México, D.F: Edición Internacional, pp 33.
25. Hayslett, J.P.; Binder, H.J. (1982) Mechanism of potassium adaptation. *Am J Physiol*. 243,103-112.
26. Rose, B.D; Post, T.W. (2001) *Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders*. 5 ed. New York, USA: McGraw-Hill, pp 372-396.
27. Hajjar, I.; Morley, J.; Kotchen, T.A. (2006) Hypertension: Trends in Prevalence, Incidence, and Control. *Annu. Rev. of Public Health*, 27, 465-490.
28. Adrógue, H; Madias, N. (2000) Hyponatremia. *N Eng J Med*, 342, 1581-1589.
29. Adrógue, H; Madias N. (2000) Hypernatremia. *N Eng J Med*, 342, 1493-1499.

30. Ministerio de Salud. (1997) *Guías alimentarias para la educación nutricional en Costa Rica*. San José, Costa Rica.
31. Ministerio de Salud. (1986) *Encuesta Nacional de Nutrición. Evaluación dietética 1982*. San José, Costa Rica, pp 10-16.
32. Lopez, A.L. (1992) *Determinación del riesgo de sufrir osteoporosis en mujeres mayores de 45 años laborantes en los hospitales de la región Brunca*. Tesis de Licenciatura, Escuela de Nutrición, Universidad de Costa Rica.
33. Ministerio de Salud. (2003) *Encuesta basal de factores de riesgo para enfermedades no transmisibles Cartago 2001: Factores alimentario nutricionales*. San José, Costa Rica, pp 12-13.
34. INCIENSA. (1986) *Encuesta Nacional sobre consumo de sal doméstica en el hogar, Costa Rica 1984*. San José, Costa Rica.
35. WHO (World Health Organization). (2003) *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Informe de una consulta mixta de expertos WHO/FAO. Serie de informes técnicos, No. 916. Ginebra, Suiza.
36. Ronderos, M. (2002) *Enfermedades Cardiovasculares en Costa Rica*. Programa de Prevención y Control de Enfermedades No-Transmisibles de la OPS/OMS. Representación en Costa Rica. Extraído el 14 de diciembre de 2008 desde <http://www.cor.ops-oms.org/>
37. Esquivel M.L, Bolaños M., Romero L. (1997) *Tratamiento trombolítico en el manejo del infarto agudo del miocardio*. San José, Costa Rica: AMC, 39, 28-32.
38. Hajjar, I.; Kotchen, J.M.; Kotchen, T.A. Hypertension: Trends in Prevalence, Incidence, and Control. *Annu. Rev. of Public Health*, 27, 465-490

39. Zanchetta, J.R. (2001) *Osteoporosis: Fisiopatología, diagnóstico, prevención y tratamiento*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, pp 107-108 y 121-131.
40. Pickering, T.G.; Ogedegbe, G. *Hurst's The Heart: Epidemiology of Hypertension*. Mc Graw Hill's Access Medicine. capítulo 68. Extraído el 27 de octubre de 2008 desde http://www.sibdi.bldt.ucr.ac.cr/bases_datos.htm
41. CCSS (Caja Costarricense del Seguro Social). (2002) *Manual para Detección, Diagnóstico y Tratamiento de la Hipertensión Arterial*. San José, Costa Rica: CCSS. Dirección técnica de servicios de salud: Departamento de Medicina Preventiva.
42. Méndez, E.; Rosero, L. (2007) *Prevalencia de hipertensión en adultos mayores de Costa Rica*. Población y Salud en Mesoamérica. Centro Centroamericano de Población, Universidad de Costa Rica, 5 (1).
43. Ulate, G.A. (1989) Valores de presión arterial en una muestra de niños y adolescentes del valle central de Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 33 (2).
44. Ministerio de Salud. (2006) *Informe de resultados de la evaluación de la calidad de atención en hipertensión arterial en la red de servicios de salud para el año 2005*. San José, Costa Rica: Ministerio de Salud, Organización Panamericana de la Salud.
45. Oria, E. (2003) Sección de Dietética y Nutrición Clínica: Factores preventivos y nutricionales de la osteoporosis. Pamplona, España: *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 26, (3).
46. Campo, M.M. (1999) *El babel terminológico: osteopenia y osteoporosis*. Boletín. Asociación Española de Paleopatología, no. 24, 1999.
47. Berne, R; Levy, M.(1998) *Fisiología*. 2 ed. Madrid, España: Harcourt Brace, pp 455-461.

48. Mateos, C. (2006) *El conocimiento de las poblaciones pasadas a través de los restos óseos: aproximación a la osteoporosis en paleopatología*. Proyecto Fin de Carrera. Biología Evolutiva y Biodiversidad. España: Universidad Autónoma de Madrid.
49. Meza, Norma. (2001) *Factores dietéticos predisponentes de enfermedad cardiovascular, cáncer y osteoporosis en la población costarricense*. Tesis de grado Magister Scientiae en Nutrición Humana. San Pedro, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
50. Beers, M. H.; Berknow, R. (1999) *El Manual Merck de Diagnóstico y Tratamiento*. 10 ed. Madrid, España: Harcourt.
51. Braunwald, E.; Isselbacher, K.; Fauci, A.S.; Kasper, D.L.; Hauser, S.L.; Longo, D.L. Jameson, J.L. (2002) *Principios de Medicina Interna: Compendio Harrison*. 15 ed., Madrid, España: Mac Graw Hill, pp 2606-2610.
52. CCSS (Caja Costarricense del Seguro Social) (2000). *Egresos por diagnóstico principal*. San José, Costa Rica: CCSS, Dirección Técnica de Servicios de Salud, Sección de Información Biomédica.
53. Vargas, A. (2009, enero 5) *Vértabras son las que más ceden ante osteoporosis*. *Periódico La Nación*. Extraído el 05 de noviembre de 2009 desde http://www.lanacion.com/Aldea_gloval.
54. Tierney, L. M.; MacPhee, S. (1999) *Diagnóstico clínico y tratamiento*. 34 ed. México D.F: El Manual Moderno, pp 876-889.
55. Nieves, J. W. (2005) Osteoporosis: the role of micronutrients. *Am. J. Clinical Nutrition*. 81, 1232S-1239S.
56. Watnick, S.; Morrison, G. (2008) *Medical Dx & Tx: Kidney Disease*. Mc Graw Hill's Access Medicine. Capítulo 22. Extraído el 22 de noviembre de 2008 desde http://www.sibdi.bldt.ucr.ac.cr/bases_datos.htm.

57. Esquivel, V. (1994) *Conocimientos y prácticas Alimentarias del paciente con Insuficiencia Renal Crónica. Tesis de grado Licenciatura en Nutrición*. Facultad de Medicina, Escuela de Nutrición, San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
58. Bargman, J.M, Karl Skorecki, K. (2008) *Harrisson's Online: Chronic Kidney Disease*. Mc Graw Hill's Access Medicine. Capítulo 274. Extraído el 22 de noviembre de 2008 desde http://www.sibdi.bldt.ucr.ac.cr/bases_datos.htm.
59. Pomeranz, Y.; Meloan, C.E. (2000) *Food analysis: Theory and practice*. 3 ed. Gaithersburg, Maryland, United States of America: An Aspen Publication, pp 606-614.
60. Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. (2005) *Principios de análisis instrumental*. 5 ed. Madrid, España: Mc Graw-Hill Interamericana, pp 13, 230-239.
61. Official Methods of Analysis (2005). 18 ed., Revisión no. 1, Gaithersburg M.D, U.S.A: AOAC INTERNATIONAL (OMA).
62. Kirk, R.S; Sawyer, R; Egan, H. (2004) *Composición y análisis de alimentos de Person*. 2 ed. México D.F: Compañía editorial continental, pp 41-42.
63. Walton, H.F; Reyes, J. (1983) *Análisis químico e instrumental moderno*. Barcelona, España: Reverté, pp 187, 250-253
64. APHA, AWWA, WPCF. *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. 17 ed. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos, pp 3-14, 4-195 – 4-199.
65. Kingston, H.M.; Jassie L.B. (1986) Microwave Energy for Acid Decomposition at Elevated Temperatures and Pressures Using Biological and Botanical Samples. *Anal. Chem.*, 58, 2534-2541.
66. Skoog, D. A.; West, D.; Holler, F.J. (2005) *Fundamentos de química analítica*. 8 ed., Australia: Thomson, pp 1058-1061.

67. Moraes, E. M.; Smanioto, J.; Gottfried, J.N; Medeiros, J.A; Knapp G. (2004) Microwave-Assisted Sample Combustion: A Technique for Sample Preparation in Trace Element Determination. *Anal. Chem.*, 76, 3525-3529.
68. Walton, H.F; Reyes J. *Análisis químico e instrumental moderno*. Barcelona, España: Reverté. Capítulo 8.
69. Aiello Ramírez, J. (1983) *Estudio del contenido de metales en conservas vegetales producidas en el país*. Proyecto de graduación de Licenciatura en Tecnología de Alimentos, San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
70. Arce Urbina, M. E. (1986) *Contenido de metales en harina de pescado, sardina y atún frescos y en conserva producidos en Costa Rica*. Proyecto de graduación de Licenciatura en Química, San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
71. Montero C., M. (1994) *Contenido de sodio y potasio en cereales procesados y derivados consumidos en Costa Rica*. Proyecto de Graduación de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
72. Pineda C., L. (1998) *Validación de métodos de absorción atómica con llama para el análisis de potasio, zinc y manganeso, y un método espectrofotométrico para el análisis de fósforo en muestras de fertilizantes*. Proyecto de Graduación de Licenciatura en Química, San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
73. González, M. (2004) *Determinación de Cadmio en tejido bovino por espectrofotometría de absorción atómica*. Tesis de Licenciatura en Química. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
74. NMX-EC-17025-IMNC-2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración
75. Martínez, R.R. (2008) *Validación de métodos de medición*. México, D.F: Entidad Mexicana de Acreditación, pp 18-36

76. EURACHEM/CTAC Guide (2003) Traceability in Chemical Measurement. Capítulo 4
77. International Organization for Standardization, ISO 3534-1:1993. Statistics-Vocabulary and symbols-part 1: Probability and general statistical terms
78. International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM), Joint Committee for Guides in Metrology, JCGM 200, 2008.
79. EURACHEM, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, First Internet Edition, 1998.
80. ICH. Harmonised Tripartite Guideline Q2A Text on Validation of Analytical Procedures. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1994
81. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2 ed. (the "Gold Book"). Compilado por A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML versión corregida en línea Extraído el 20 de marzo de 2009 desde <http://goldbook.iupac.org> (2006)
82. AOAC Peer Verified Methods Program - Manual on policies and procedures, AOAC International, Arlington VA, 1994
83. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, International Standardization Organization. Ginebra, Suiza, 1995
84. Encuesta Nacional de Nutrición. Fascículo 3: Consumo aparente. Ministerio de Salud. Costa Rica, 1996.
85. Blanco, A.; Padilla, G.; Monestel, Y. Los 50 alimentos prioritarios de Costa Rica. Boletín. INCIENSA. 15, 1, 2003.
86. INEC, Costo de la canasta básica de los alimentos. Unidad de estadísticas económicas. Boletín mensual. 12, 6, 2002.

87. Official Methods of Analysis (2005). 18 ed., Revisión no. 1, Gaithersburg M.D, U.S.A: AOAC INTERNATIONAL (OMA), Official Method 927.05
88. Official Methods of Analysis (2005). 18 ed., Revisión no. 1, Gaithersburg M.D, U.S.A: AOAC INTERNATIONAL (OMA), Official Method 930.15
89. Official Methods of Analysis (2005). 18 ed., Revisión no. 1, Gaithersburg M.D, U.S.A: AOAC INTERNATIONAL (OMA), Official Method 920.151
90. Official Methods of Analysis (2005). 18 ed., Revisión no. 1, Gaithersburg M.D, U.S.A: AOAC INTERNATIONAL (OMA), Official Method 925.10
91. Official Methods of Analysis (2005). 18 ed., Revisión no. 1, Gaithersburg M.D, U.S.A: AOAC INTERNATIONAL (OMA), Official Method 950.46
92. Official Methods of Analysis (2005). 18 ed., Revisión no. 1, Gaithersburg M.D, U.S.A: AOAC INTERNATIONAL (OMA), Official Method 926.08
93. Official Methods of Analysis (2005). 18 ed., Revisión no. 1, Gaithersburg M.D, U.S.A: AOAC INTERNATIONAL (OMA), Official Method 955.35
94. Official Methods of Analysis (2005). 18 ed., Revisión no. 1, Gaithersburg M.D, U.S.A: AOAC INTERNATIONAL (OMA), Official Method 930.15
95. Manual de operaciones. LIOFILIZADOR FreeZone ® 4.5 L Labconco Corporation, Printed U.S.A, 2002
96. Microwave Digestion System with Built in Non-Contact Temperature Measurement. V5.1, User Manual. BERGHOF Products and Instruments GmbH. Germany, 2004.
97. Official Methods of Analysis (2005). 18 ed., Revisión no. 1, Gaithersburg M.D, U.S.A: AOAC INTERNATIONAL (OMA), Official Method 921.25
98. Official Methods of Analysis (2005). 18 ed., Revisión no. 1, Gaithersburg M.D, U.S.A: AOAC INTERNATIONAL (OMA), Official Method 985.35
99. Varian. (1989) Flame Atomic Absorption Spectrometry Varian. Analytical Methods. Mulgrave Victoria, Australia: Puplicacion N° 85-100009-00
100. Oppenheimer, L.; Capizzi, T.P.; Weppelman, R.M.; Mehta, H. Determining the lowest limit of assay measurement. Anal. Chem, 55, 4, 1983.
101. Meier, P.C.; Zünd, R.E. Statistical methods in analytical chemistry. 2 ed. (Chemical analysis; v.153) "A Wiley-Interscience publication", John Wiley & Sons, Inc. New York, U.S.A, 2000
102. Miller, J.C.; Miller, J.N. Estadística para química analítica, Adison-Wesley Iberoamericana, USA, 1993.

103. Hibbert, D.B. (2007) *Quality assurance in the analytical chemistry laboratory*. New York, USA: Oxford University Press, p 118

ANEXOS

ANEXO 1: Cartas de Control para la evaluación del desempeño del equipo

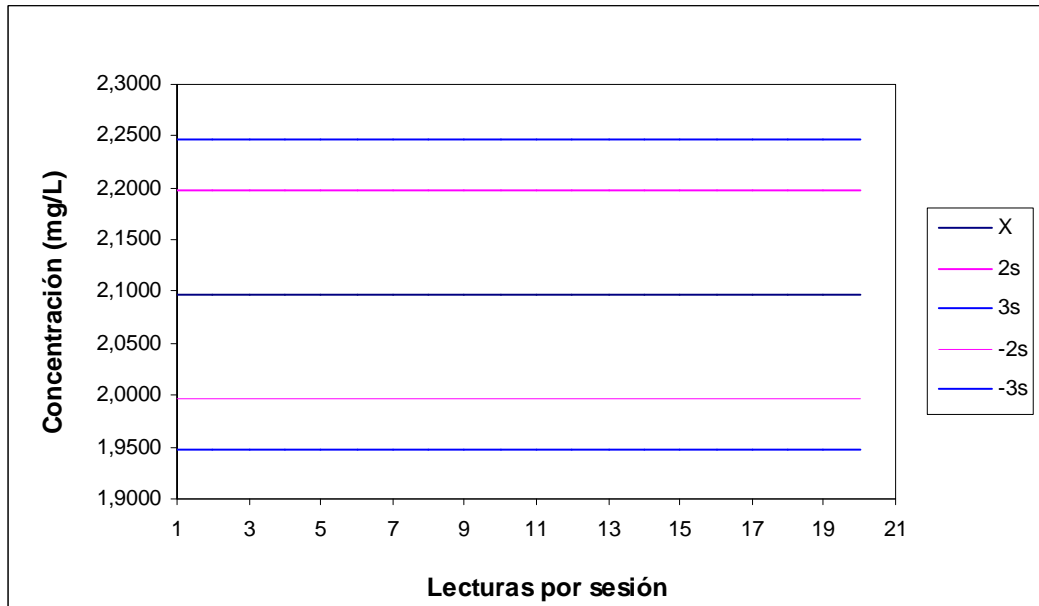


Figura 53: Carta de control del desempeño del equipo UV-vis para el fósforo

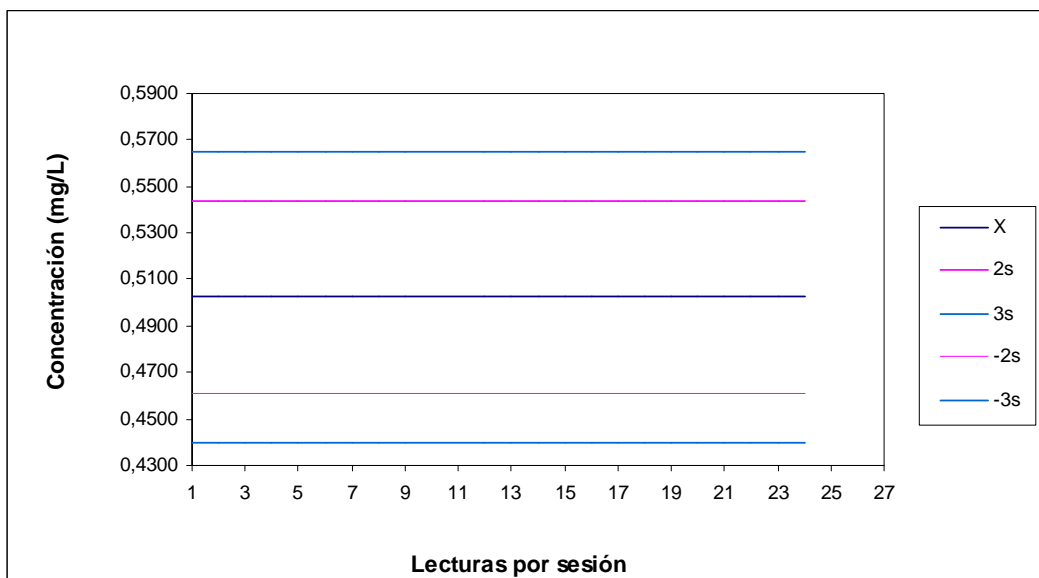


Figura 54: Carta de control del desempeño del equipo AA para el calcio



Figura 55: Carta de control del desempeño del equipo AA para el potasio

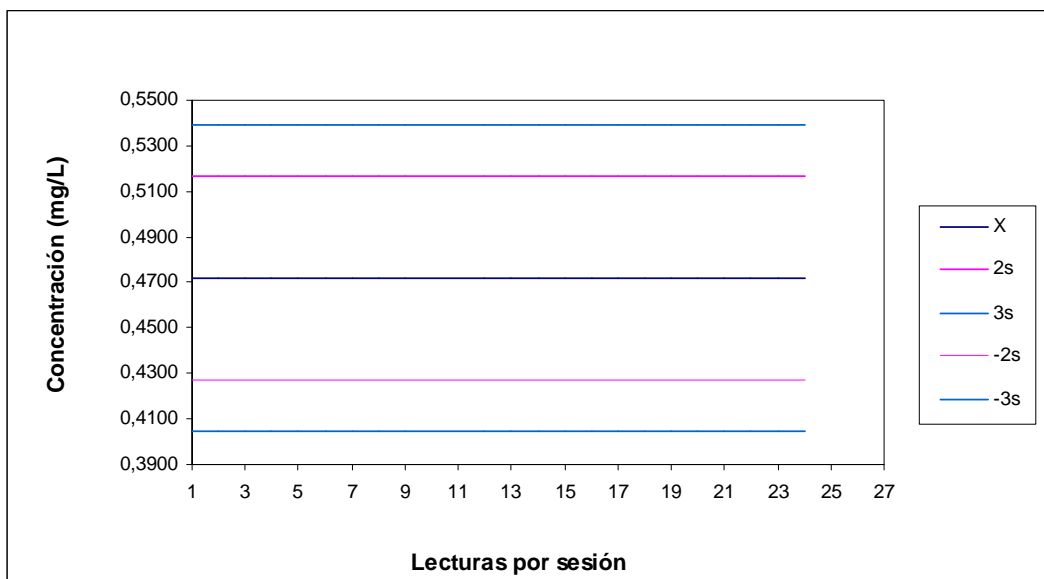


Figura 56: Carta de control del desempeño del equipo AA para el sodio

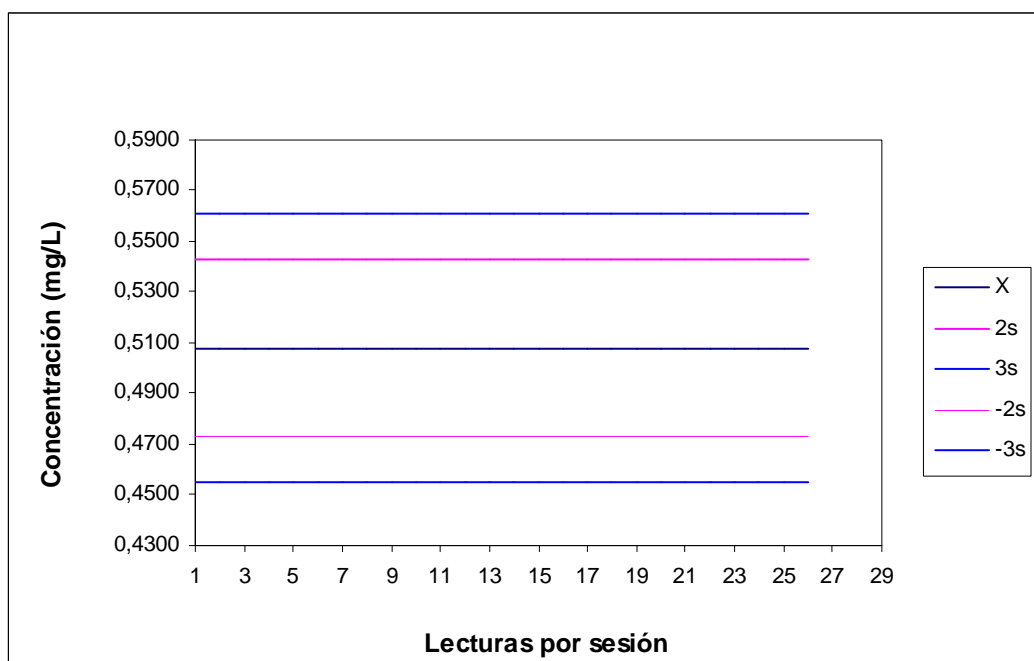
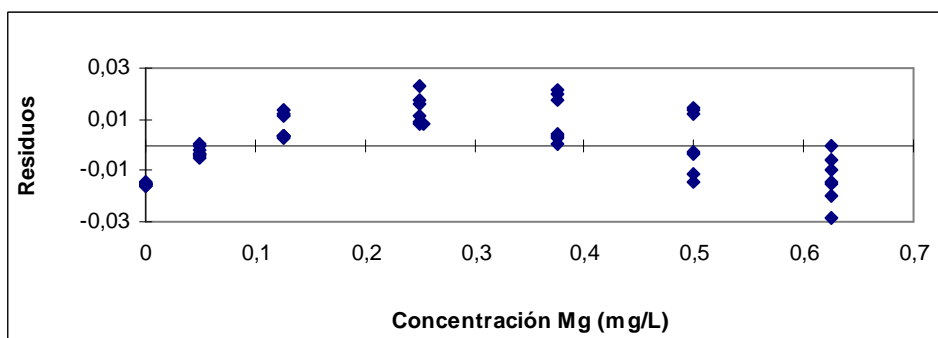
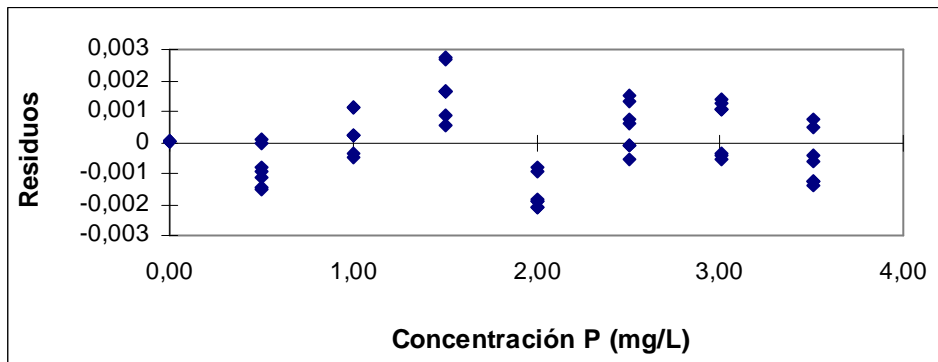
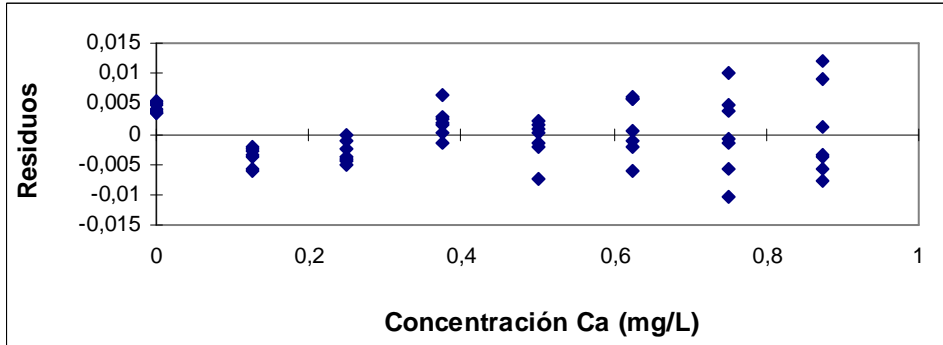
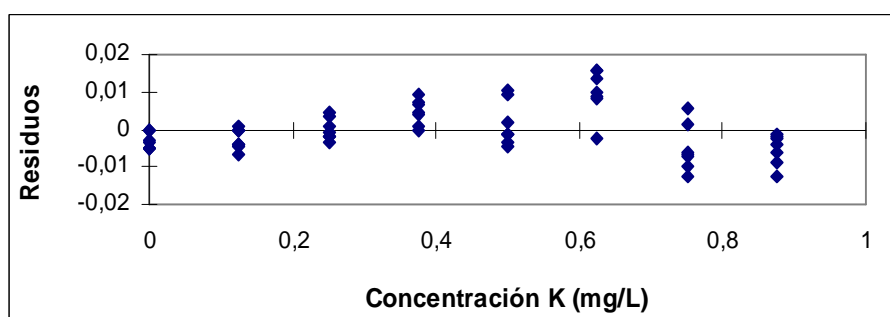
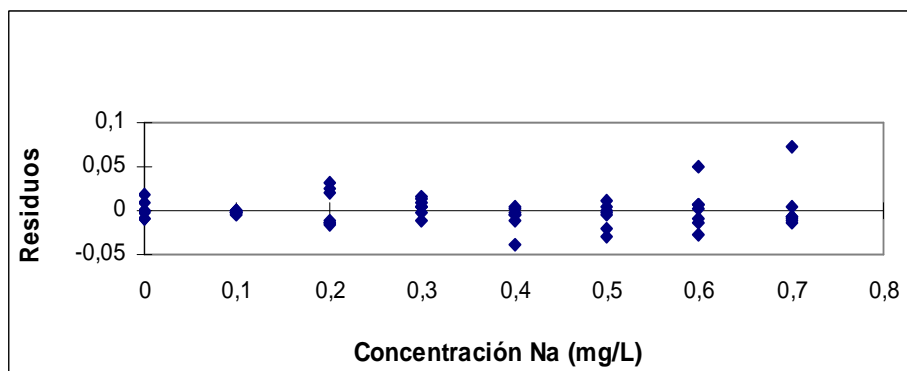


Figura 57: Carta de control del desempeño del equipo AA para el magnesio

ANEXO 2: Gráficos de residuales de las curvas de calibración







National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material[®] 1846

Infant Formula

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in validating methods for determining proximates, calories, vitamins, minerals, and trace elements in infant formula and similar matrices. This SRM can also be used for quality assurance when assigning values to in-house control materials. A unit of SRM 1846 consists of 10 single-use packets of spray-dried, milk-based infant formula, each containing approximately 30 g of material.

Certified Concentration Values: The certified concentration values of selected vitamins and iodine in SRM 1846 are provided in Table 1. Values were derived from the combination of results provided by NIST and collaborating laboratories. All assigned values are the equally weighted means of the measurements made by laboratories reporting results for a given analyte; the associated uncertainties are expanded uncertainties at the 95 % level of confidence [1]. Values are reported on an as-received (not dry-mass) basis in both mass fraction units [2] and in the units specified by the Infant Formula Act of 1980 [3].

Reference Concentration Values: Reference concentration values for proximates, calories, additional vitamins, minerals, trace elements, and fatty acids are provided in Tables 2 through 5. Most of the reference values were derived from results reported by collaborating laboratories. Those for δ -tocopherol and γ - (plus β -) tocopherol were derived from measurements made by NIST using two analytical techniques over a six-year period. The reference values are noncertified values that do not meet NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may reflect only measurement precision, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple methods. Explanations in support of each reference value are given as a note in each table.

Information Values: Information values for additional trace elements and fatty acids are provided in Tables 6 and 7. These concentrations are also derived from analyses performed by the collaborating laboratories. These are noncertified values with no uncertainties reported as there is insufficient information to make an assessment of the uncertainties.

Expiration of Value Assignment: The value assignment of this SRM is valid until **30 September 2009**, within the measurement uncertainties specified, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this report. Value assignment is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or modified.

Maintenance of SRM Value Assignment: NIST will monitor this SRM over the period of its value assignment. If substantive technical changes occur that affect the value assignment before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

Coordination of the technical measurements leading to the certification of this SRM was performed by K.E. Sharpless and S.A. Wise of the NIST Analytical Chemistry Division, E.R. Elkins of the National Food Processors Association (NFPA; Washington, DC), D.C. Woollard (AgriQuality New Zealand Ltd.; Auckland, New Zealand), H.E. Indyk (Anchor Products; Waitoa, New Zealand), M.K. Mountford of the Infant Formula Council (Atlanta, GA), J.T. Tanner of the U.S. Food and Drug Administration (FDA; Washington, DC), and W.R. Wolf of the U.S. Department of Agriculture (USDA; Beltsville, MD).

Stephen A. Wise, Chief
Analytical Chemistry Division

Robert L. Watters, Jr., Chief
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 20 September 2007
See Certificate Revision History on Page 7

Analytical measurements at NIST were performed by J.B. Thomas, S.A. Margolis, B.R. Norman, and K.E. Sharpless of the NIST Analytical Chemistry Division. Analyses for value assignment were also performed by Abbott Laboratories/Ross Products Division, Analytical Systems Research Corporation, Bristol Meyers Squibb/Mead Johnson Nutritionals, FDA, Covance Laboratories, Lancaster Laboratories, Medallion Laboratories, Nestlé USA, Southern Testing and Research Laboratories, University of Ljubljana Laboratory for Radiochemistry, University of Massachusetts Department of Chemistry, USDA Metabolism and Nutrient Interactions Laboratory, Wyeth-Ayerst Laboratories, members of the NFPA Food Industry Analytical Chemists Subcommittee (FIACS), and participants in an AOAC International collaborative study for vitamin K analysis.

Statistical analysis was provided by S.B. Schiller, L.M. Gill, and J.H. Yen of the NIST Statistical Engineering Division.

The support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

NOTICE AND WARNING TO USERS

Storage: Until required for use, the infant formula should be stored at temperatures between approximately 20 °C and 25 °C in the original, sealed packets. **DO NOT** use the contents of previously opened packets as their stability has not been investigated. If reconstituted, the sample should be used immediately.

Warning: For laboratory use only. **NOT** for human consumption.

INSTRUCTIONS FOR USE

Before use, the contents of a packet should be mixed by gentle shaking. Test portions for analysis of fat-soluble vitamins should be reconstituted in hot water (greater than 90 °C but less than 100 °C) and homogenized (using a tissue homogenizer or blender) for 30 seconds to aid in breaking down the encapsulation around the vitamins. A minimum test portion of 5 g should be used for any analytical determination of vitamins in this material; a test portion of at least 250 mg should be used for proximate, minerals, and trace element measurements. (Users may prefer to reconstitute the contents of an entire packet in hot water, and subsequently remove a measured test portion for preparation and analysis.)

PREPARATION AND ANALYSIS

Preparation: SRM 1846 is a milk-based infant formula powder prepared by Analytical Systems Research Corporation, Indianapolis, IN. The SRM was manufactured by preparing a spray-dried formula base containing fat, protein, carbohydrate, and minerals, and then combining that formula base with a dry-blend vitamin premix that supplied all of the vitamins. Fat-soluble vitamins were incorporated in the premix in 200- μ m particle diameter, cold-water-soluble powders; individual powders contained individual fat-soluble vitamins, i.e., one powder contained only vitamin A (as retinyl palmitate), one contained vitamin E (as RRR- α -tocopheryl acetate), etc. (The final product is composed of 95 % formula base and 5 % vitamin premix.) The finished blend was then passed through an agglomerator, which produces larger, faster-dissolving particles. The powdered infant formula was sealed under nitrogen in single-use foil packets, each containing approximately 30 g of material.

NIST Analyses for Fat-Soluble Vitamins: In the original value-assignment analyses, δ -tocopherol, γ - (plus β -) tocopherol, α -tocopherol, and α -tocopheryl acetate were measured in two packets from each of 12 randomly selected boxes over a four-day period. (The infant formula may contain β -tocopherol, but the chromatographic systems described below are incapable of resolving β - and γ -tocopherol; the instrument was calibrated using only γ -tocopherol.) Test portions of approximately 6 g were saponified in a 9 % (mass/volume) potassium hydroxide solution. The samples were saponified for 45 minutes at 37 °C to 40 °C. Analytes were extracted into diethyl ether/hexane, which was subsequently evaporated, and the analytes were redissolved in ethanol. Samples were injected onto a monomeric C₁₈ column [4] and analytes were eluted using a gradient of methanol and ethyl acetate. (Additional methodological detail is provided in reference 5.) Both a programmable UV/visible absorbance detector set to 292 nm for measurement of the tocopherols and 422 nm for measurement of *trans*- β -apo-10'-carotenal oxime (the internal standard) and a fluorescence detector (excitation wavelength of 295 nm, emission wavelength of 335 nm) were used for quantitation of the tocopherols.

In the years following the original value-assignment analyses, the tocopherols were also measured using a different C₁₈ column, and a gradient of acetonitrile, methanol, and ethyl acetate, and this revised Certificate of Analysis reflects the inclusion of tocopherol data obtained using this chromatographic method. In these analyses, 6-g test portions were reconstituted in 6 mL sub-boiling (approximately 90 °C water), and were homogenized for 30 s. Test portions were saponified in a 1.7 % (mass/volume) methanolic potassium hydroxide solution at 55 °C for 60 min. Analytes were extracted into diethyl ether/petroleum ether, which was subsequently evaporated, and analytes were dissolved in ethanol/ethyl acetate.

In the original certification analyses, single packets from each of the same 12 randomly selected boxes in which the tocopherols were analyzed were also analyzed for vitamin A (*trans*-retinol and *trans*-retinyl palmitate) over a six-day period. Extraction and chromatography were performed as described above, with the exception that test portions were saponified overnight. Measurement of retinol and retinyl palmitate was at 325 nm using a programmable UV/visible absorbance detector; measurement of *trans*-β-apo-10'-carotenal oxime (the internal standard) was at 422 nm.

NIST Analyses for Water-Soluble Vitamins: Vitamin C was measured in duplicate packets from each of 12 randomly selected boxes over a three-day period. Test portions of approximately 5 g were combined with dithiothreitol to reduce dehydroascorbic acid to ascorbic acid. Proteins were coagulated, and the clear solutions were analyzed by anion exchange chromatography using a cross-linked polyamine column [6]. A chromatographic solvent consisting of a phosphate buffer in acetonitrile and water eluted the ascorbic acid to an electrochemical detector set at 700 mV [6].

Riboflavin (vitamin B₂) and pyridoxine (vitamin B₆) were measured in duplicate test portions from one packet from each of 10 randomly selected boxes over a four-day period. Nicotinamide (niacinamide) was measured in each of these packets over a two-day period. Test portions of 3.5 g to 5 g were dissolved in water, and the proteins were coagulated overnight; the clear solution was removed for analysis. A monomeric C₁₈ column [4] separated the analytes using a gradient of aqueous potassium acetate and acetonitrile. A fluorescence detector was used to measure pyridoxine (excitation wavelength of 295 nm, emission wavelength of 405 nm) and riboflavin (excitation wavelength of 269 nm, emission wavelength of 520 nm); an absorbance detector was used for measurement of nicotinamide at 260 nm.

NIST Analysis for Iodine: Iodine was measured by neutron activation analysis in single packets from each of five randomly selected boxes. In a class-100 clean bench, test portions of approximately 3.5 g were combusted in a quartz combustion tube under flowing oxygen, and iodine was removed from the gas stream onto activated charcoal traps. The sealed charcoal traps and iodine standards were then irradiated for 60 s in the NBSR pneumatic facility RT-4 at 20 MW reactor power. Both the standards and test portions were counted for 20 min at a distance of 20 cm after a 10-min decay period.

Analyses by Collaborating Laboratories: Data from eight additional sources were used for certification of this material: nine laboratories selected to assist in the certification (Appendix A); an interlaboratory comparison exercise organized by the NFPA FIACS (20 participating laboratories); the manufacturer of the material; the University of Ljubljana Laboratory for Radiochemistry (Ljubljana, Slovenia); the University of Massachusetts Department of Chemistry (Amherst, MA); the USDA Metabolism and Nutrient Interactions Laboratory (Beltsville, MD); four additional collaborating laboratories (Appendix B); and 34 laboratories participating in an AOAC collaborative study for the analysis of vitamin K. Not every laboratory measured every analyte. The nine laboratories listed in Appendix A were asked to use AOAC methods or their equivalent, to make duplicate measurements from each of six packets, and to report detailed methodological information with their results. A summary of the methodological information and the number of laboratories using a particular analytical technique is provided in Appendix C. The methods used by the laboratories listed in Appendices A and B, NIST, USDA, the University of Massachusetts, the University of Ljubljana, the manufacturer, and the AOAC collaborative study are included in this listing; NFPA FIACS methods are not included.

Homogeneity Assessment: The homogeneity of ascorbic acid (vitamin C), riboflavin (vitamin B₂), pyridoxine (vitamin B₆), and vitamin E was assessed at NIST using the methods described above. While no statistically significant heterogeneity was found for vitamins B₂ (3.5 g to 5 g test portions) and E (6 g test portions), a 2 % relative standard deviation of the material was observed for vitamins C (5 g test portions) and B₆ (3.5 g to 5 g test portions). Similarly, in an assessment of the homogeneity of zinc and selenium by the USDA, 1 % and 2 % relative standard deviations, respectively, were observed for 0.25 g test portions. Therefore, a 2 % heterogeneity contribution has been included in all vitamin, mineral, and trace element uncertainties. Proximate and fatty acid data have been treated as homogeneous.

Value Assignment: The nine laboratories listed in Appendix A reported six mean values for their six duplicate analyses. The mean for each laboratory was determined from these six values. For the calculation of assigned values, for analytes other than the individual fatty acids and vitamin K, each of these laboratory means was weighted equally with the mean of the NFPA interlaboratory comparison exercise, the mean from a NIST analysis (when available), and the means from analyses by the manufacturer, the University of Ljubljana, and the University of Massachusetts (also when available).

The four laboratories listed in Appendix B reported results for the analysis of fatty acids in four packets of infant formula, and assigned values are calculated from the equally weighted means of these results.

Two of the nine laboratories listed in Appendix A reported six mean values for their six duplicate analyses of vitamin K. The FDA laboratories reported values for 10, 10, and 31 analyses, respectively; two sets of data were received from the FDA laboratory in Atlanta. The 34 AOAC collaborative study laboratories reported results for duplicate analyses. The reference value is calculated from the equally weighted means of these results.

Table 1. Certified Concentration Values for Selected Vitamins and Iodine^(a,b)

	Mass Fraction (mg/kg)	Units Specified by Infant Formula Act [3]
Vitamin C	1146 ± 66	(22.2 ± 1.3) mg/100 kcal
Vitamin B ₂	17.4 ± 1.0	(337 ± 21) µg/100 kcal
Vitamin B ₆ (pyridoxine hydrochloride)	8.4 ± 1.0	(162 ± 20) µg/100 kcal
Niacin	63.3 ± 7.6	(1230 ± 150) µg/100 kcal
Iodine	1.11 ± 0.17	(21.4 ± 3.3) µg/100 kcal

^(a) Each certified concentration value, expressed as a mass fraction of the material (as received) for selected vitamins and iodine, is the equally weighted mean of results from analyses by NIST, the NFPA FIACS interlaboratory comparison exercise, the Universities of Ljubljana and Massachusetts (for iodine), and laboratories listed in Appendix A. The expanded uncertainty, computed according to the CIPM method [1], is at the 95 % level of confidence, and includes within- and between-laboratory uncertainties as well as material variability. Each certified value and expanded uncertainty defines a range of values within which the true concentration is expected to lie with 95 % confidence. The certified concentration values have been converted to the units specified by the Infant Formula Act; the uncertainties on values expressed relative to 100 kcal have been expanded to include the uncertainty in the kcal measurements. Analytical methodology information is provided in Appendix C.

^(b) **NOTE:** NIST has removed the certified value for vitamin E as α -tocopherol due to the increasing difficulty in extracting this analyte from the material.

Table 2. Reference Concentration Values for Proximates and Calories^(a)

	Mass Fraction (%)	g/100 kcal
Solids	98.02 ± 0.27	19.01 ± 0.16
Ash	2.913 ± 0.048	0.565 ± 0.010
Fat	27.1 ± 0.6	5.25 ± 0.12
Nitrogen	1.739 ± 0.058	0.337 ± 0.012
Protein	11.10 ± 0.37	2.153 ± 0.073
Carbohydrate (by difference)	57.2 ± 1.0	11.10 ± 0.21
Calories ^(b)	(515.5 ± 4.2) kcal/100 g	

^(a) Each reference concentration value, expressed as a mass fraction of the material (as received) for proximates and calories, is an equally weighted mean of method-specific results from the NFPA FIACS interlaboratory comparison exercise and the laboratories listed in Appendix A. The expanded uncertainty, computed according to the CIPM method [1], is at the 95 % level of confidence, and includes within- and between-laboratory uncertainties. Each reference value and expanded uncertainty defines a range of values within which the concentration is expected to lie with 95 % confidence when analyzed using AOAC Official Methods of Analysis. The reference values have been converted to express concentrations relative to 100 kcal, and the uncertainties on these values have been expanded to include the uncertainty in the kcal measurements. Analytical methodology information is provided in Appendix C. **NOTE:** NIST has replaced the previously used term “noncertified” with “reference value.”

^(b) The value for calories is the mean of individual caloric calculations from the laboratories listed in Appendix A and the NFPA FIACS interlaboratory comparison exercise. If the mean proximate values above are used for calculation, with caloric equivalents of 9, 4, and 4 for fat, protein, and carbohydrate, respectively, the mean caloric content is 517 kcal/100 g.

Table 3. Reference Concentration Values for Selected Vitamins^(a,b)

	Mass Fraction (mg/kg)	Units Specified by Infant Formula Act [3]
Vitamin D ^(c)	0.117 ± 0.011	(90.5 ± 8.7) IU ^d /100 kcal
δ-Tocopherol ^(e)	20.19 ± 1.69	not required by Infant Formula Act
γ-Tocopherol ^(e,f)	75.01 ± 5.07	not required by Infant Formula Act
Vitamin K ^(g)	0.944 ± 0.041	(18.32 ± 0.81) µg/100 kcal
Vitamin B ₁ hydrochloride	10.9 ± 1.5	(212 ± 28) µg/100 kcal
Vitamin B ₁₂	0.039 ± 0.003	(0.746 ± 0.051) µg/100 kcal
Folic Acid ^(h)	1.29 ± 0.28	(25.1 ± 5.5) µg/100 kcal
Pantothenic acid ^(h)	48.7 ± 7.3	(940 ± 140) µg/100 kcal
Biotin ^(h)	0.411 ± 0.066	(8.0 ± 1.3) µg/100 kcal
Choline (ion)	1250 ± 120	(24.2 ± 2.6) mg/100 kcal
Inositol ^(h)	940 ± 190	(18.2 ± 3.7) mg/100 kcal

^(a) Each reference concentration value, expressed as a mass fraction for selected vitamins, is an equally weighted mean of results from the NFPA FIACS interlaboratory comparison exercise and laboratories listed in Appendix A. The value for vitamin K is the equally weighted mean of results reported by laboratories listed in Appendix A and the AOAC International collaborative study laboratories. The expanded uncertainty, computed according to the CIPM method [1], is at the 95 % level of confidence and includes within- and between-laboratory uncertainties as well as material variability. Each reference value and expanded uncertainty defines a range of values within which the concentration is expected to lie with 95 % confidence. The reference values have been converted to the units specified by the Infant Formula Act; the uncertainties on values expressed relative to 100 kcal have been expanded to include the uncertainty in the kcal measurements. Analytical methodology information is provided in Appendix C. **NOTE:** NIST has replaced the previously used term “noncertified value” with “reference value.”

^(b) **NOTE:** NIST has removed the reference value for vitamin A as *trans*-retinol due to the increasing difficulty in extracting this analyte from the material.

^(c) Includes pre-vitamin D

^(d) IU = International Units

^(e) Reference values, expressed as mass fractions for δ-tocopherol and γ-tocopherol, are the means of results obtained by NIST using two analytical techniques. The uncertainty in the reference values is expressed as an expanded uncertainty, U , at the 95 % level of confidence, and is calculated according to the method described in the ISO Guide [1]. The expanded uncertainty is calculated as $U = ku_c$, where u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the effect of within-laboratory components of uncertainty as well as material variability. The coverage factor, k , is determined from the Student's

t -distribution corresponding to the appropriate associated degrees of freedom and 95 % confidence for each analyte. **NOTE:** Concentration values have been revised due to the inclusion of additional data.

^(f) Includes β-tocopherol

^(g) Contains both *cis* and *trans* vitamin K. One and two laboratories, respectively, reported values for *cis* and *trans* vitamin K; mean values were 0.098 mg/kg *cis* and 0.93 mg/kg *trans* vitamin K.

^(h) Collaborating laboratories reported measuring either total or free analyte; results were indistinguishable and have been combined for value assignment.

Table 4. Reference Concentration Values for Minerals and Trace Elements^(a)

	Mass Fraction (mg/kg)	Units Specified by Infant Formula Act [3]
Calcium	3670 ± 200	(71.1 ± 4.0) mg/100 kcal
Phosphorus	2610 ± 150	(50.7 ± 2.9) mg/100 kcal
Magnesium	538 ± 29	(10.43 ± 0.56) mg/100 kcal
Iron	63.1 ± 4.0	(1.225 ± 0.079) mg/100 kcal
Zinc	60.0 ± 3.2	(1.164 ± 0.063) mg/100 kcal
Copper	5.04 ± 0.27	(97.7 ± 5.2) µg/100 kcal
Sodium	2310 ± 130	(44.8 ± 2.6) mg/100 kcal
Potassium	7160 ± 380	(138.9 ± 7.5) mg/100 kcal
Chloride	4920 ± 300	(95.5 ± 5.9) mg/100 kcal

^(a) Each reference concentration value, expressed as a mass fraction for minerals and trace elements, is an equally weighted mean of results from the NFPA FIACS interlaboratory comparison exercise, the USDA, the manufacturer, and laboratories listed in Appendix A. The expanded uncertainty, computed according to the CIPM method [1], is at the 95 % level of confidence and includes within- and between-laboratory uncertainties as well as material variability. Each reference value and expanded uncertainty defines a range of values within which the concentration is expected to lie with 95 % confidence. The reference values have been converted to the units specified by the Infant Formula Act; the uncertainties on values expressed relative to 100 kcal have been expanded to include the uncertainty in the kcal measurements. Analytical methodology information is provided in Appendix C. **NOTE:** NIST has replaced the previously used term “noncertified value” with “reference value.”

Table 5. Reference Concentration Values for Fatty Acids (as Triglycerides)^(a)

	Mass Fraction (%)
Dodecanoic acid (C12:0) (Lauric acid)	3.65 ± 0.56
Tetradecanoic acid (C14:0) (Myristic acid)	1.54 ± 0.13
Hexadecanoic acid (C16:0) (Palmitic acid)	2.90 ± 0.15
(Z)-9-Hexadecenoic acid (C16:1) (Palmitoleic acid)	0.0208 ± 0.0025
Octadecanoic acid (C18:0) (Stearic acid)	2.84 ± 0.14
(Z)-9-Octadecenoic acid (C18:1) (Oleic acid)	6.01 ± 0.15
9-Octadecenoic acid (C18:1) (Elaidic acid)	4.00 ± 0.54
(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid (C18:2) (Linoleic acid)	3.48 ± 0.40
(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid (C18:3) (Linolenic acid)	0.0982 ± 0.0048
Eicosanoic acid (C20:0) (Arachidic acid)	0.088 ± 0.011
Docosanoic acid (C22:0) (Behenic acid)	0.0566 ± 0.0075

^(a) Each reference concentration value, expressed as a mass fraction on an as-received basis, is an equally weighted mean of results provided by the laboratories listed in Appendix B. The uncertainty in the reference values is expressed as an expanded uncertainty, U , at the 95 % level of confidence, and is calculated according to the method described in the ISO and NIST Guides [1]. The expanded uncertainty is calculated as $U = k u_c$, where u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of between-laboratory and within-laboratory components of uncertainty. The coverage factor, k , is determined from the Student's t -distribution corresponding to the appropriate associated degrees of freedom and 95 % confidence for each analyte. Analytical methodology information is provided in Appendix C.

Table 6. Information Concentration Values for Manganese and Selenium^(a)

	Mass Fraction (mg/kg)	µg/100 kcal
Manganese	0.4	7
Selenium	0.08	1

^(a) Information values for manganese and selenium are the equally weighted means of results from the analysis by the USDA, the NFPA FIACS interlaboratory comparison exercise, and laboratories listed in Appendix A. The information values have also been converted to express concentrations relative to 100 kcal. Analytical methodology information is provided in Appendix C.

Table 7. Information Concentration Values for Fatty Acids (as Triglycerides)^(a)

	Mass Fraction (%)
Hexanoic acid (C6:0) (Caproic acid)	0.063
Octanoic acid (C8:0) (Caprylic acid)	0.60
Decanoic acid (C10:0) (Capric acid)	0.47
Pentadecanoic acid (C15:0)	0.011
Heptadecanoic acid (C17:0) (Margaric acid)	0.023
9-Eicosenoic acid (C20:1) (Gadoleic acid)	0.031
Tetracosanoic acid (C24:0) (Lignoceric acid)	0.039

^(a) Each information concentration value, expressed as a mass fraction on an as-received basis, is an equally weighted mean of results provided by the laboratories listed in Appendix B. Analytical methodology information is provided in Appendix C.

REFERENCES

- [1] ISO; *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*; ISBN 92-67-10188-9, 1st ed., International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.
- [2] Taylor, B.N.; *Guide for the Use of the International System of Units (SI)*; NIST Special Publication 811, U.S. Government Printing Office: Washington, DC 1995 Ed. (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.
- [3] Infant Formula Act of 1980, Public Law 96-359 [H.R. 6940] (1980).
- [4] Sander, L.C.; Wise, S.A.; *Evaluation of Shape Selectivity in Liquid Chromatography*; LC-GC 5, pp. 378-390 (1990).
- [5] Sharpless, K.E.; Schiller, S.B.; Margolis, S.A.; Brown Thomas, J.; Iyengar, G.V.; Colbert, J.C.; Gills, T.E.; Wise, S.A.; Tanner, J.T.; Wolf, W.R.; *Certification of Nutrients in Standard Reference Material 1846: Infant Formula*; J. AOAC Vol. 80, pp. 661-621 (1997).
- [6] Margolis, S.A.; Schapira, R.M.; *The Measurement of L-Ascorbic Acid and D-Ascorbic Acid in Biological Samples*; J. Chromatogr. B; Vol. 690, pp. 25-33 (1997).

Certificate Revision History: 20 September 2007 (Update of expiration date and editorial changes); 22 March 2006 (Editorial changes to clarify the form of vitamins B₁ and B₆ and extension of the certification period); 24 January 2006 (This revision reports a change in vitamin B₁ in Table 3 and Appendix C to vitamin B₁ hydrochloride, and editorial changes); 25 August 2004 (This technical revision reports the removal of the certified value for vitamin E (α -tocopherol) and the reference value for vitamin A (retinol) because of increasing difficulty in extracting these analytes from the material. The expiration date for the material has been extended); 14 January 2004 (The expiration date for the material has been extended); 17 October 2003 (This revision reports an extension in the value assignment date); 25 September 2001 (This technical revision reports a change from certified to reference value for vitamin A (because of increasing difficulty in extracting this analyte from the material) and a change in the concentration values for δ - and γ -tocopherol (because of the inclusion of more data); 04 October 1999 (This technical revision reports the addition of reference and information values for fatty acids and a change from information to reference value for vitamin K); 02 June 1998 (This technical revision reports a change from information to certified value for iodine; reports a reference value for choline (ion) instead of choline; and reports a revision in the "Instructions for Use" to aid in breaking down the encapsulation around the fat-soluble vitamins); 08 May 1996 (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the certificate in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-6776; fax (301) 926-4751; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.

APPENDIX A

The laboratories listed below performed measurements that contributed to the certification of SRM 1846 Infant Formula.

Abbott Laboratories, Ross Products Division; Columbus, OH, USA.
Bristol Meyers Squibb, Mead Johnson Nutritionals; Zeeland, MI, USA.
Covance Laboratories; Madison, WI, USA.
Food and Drug Administration, Atlanta Center for Nutritional Analysis; Atlanta, GA, USA.
Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition; Washington, DC, USA.
Lancaster Laboratories; Lancaster, PA, USA.
Nestlé USA; Dublin, OH, USA.
Southern Testing and Research; Wilson, NC, USA.
Wyeth-Ayerst Laboratories; Radnor, PA, USA.

APPENDIX B

The laboratories listed below performed measurements of individual fatty acids in SRM 1846.

Covance Laboratories; Madison, WI, USA.
Lancaster Laboratories; Lancaster, PA, USA.
Medallion Laboratories; Minneapolis, MN, USA.
Southern Testing and Research Laboratories; Wilson, NC, USA.

APPENDIX C

The methodological information reported by collaborating laboratories whose results were used for value assignment is summarized below. The number of laboratories using a particular method is provided in parentheses. The methods used by the laboratories listed in Appendices A and B, USDA, the manufacturer, the University of Ljubljana, the University of Massachusetts, the AOAC collaborative study laboratories, and NIST are included in this appendix; NFPA FIACS methods are **NOT** included.

Proximates, Fatty Acids, and Calories

Solids	Moisture determined by mass loss after oven-drying: Forced-air oven (2) Vacuum oven (6) Thermogravimetric analysis (1)
Ash	Mass loss after ignition in muffle furnace (8) Thermogravimetric analysis (1)
Fat	Alkali pretreatment to break fat emulsion, extract with ether: Roese-Gottlieb - petroleum ether (5) Mojonnier - diethyl ether/petroleum ether (3) Acid digestion, ether extraction (1)
Fatty Acids	Hydrolysis followed by gas chromatography (4)
Nitrogen	Kjeldahl (6) Thermal conductivity (2) Pyrolysis, gas chromatography (1)
Protein	Calculated; a factor of 6.38 was used to calculate protein from nitrogen results
Carbohydrate	Calculated; solids - (protein + fat + ash)
Calories	Calculated; 9(fat) + 4(protein) + 4(carbohydrate)

Fat-Soluble Vitamins

Vitamin D	Saponification - NPLC - absorbance detection (3) Saponification - RPLC - absorbance detection (3)
δ-Tocopherol, γ-Tocopherol	Saponification - RPLC - fluorescence detection (NIST) Saponification - RPLC - absorbance and fluorescence detection (NIST)
Vitamin K	Enzymatic digestion - RPLC - absorbance detection (2) Enzymatic digestion - solid-phase extraction - RPLC - post-column reduction - fluorescence detection (1) Matrix solid-phase dispersion - RPLC - post-column reduction - fluorescence detection (1) Enzymatic digestion - RPLC - post-column reduction - fluorescence detection (35)

Water-Soluble Vitamins

Vitamin C	Fluorescence detection (6) Electrochemical titration (1) Colorimetric titration (1) Ion exchange chromatography - electrochemical detection (NIST)
Vitamin B ₁ hydrochloride	Microbiological (1) Digestion - fluorescence detection (3) Extraction - RPLC - fluorescence detection (2) Extraction - ion pairing chromatography - fluorescence detection (1)
Vitamin B ₂	Microbiological (1) Digestion - fluorescence detection (4) Extraction - RPLC - fluorescence detection (2 + NIST)
Vitamin B ₆ (pyridoxine hydrochloride)	Microbiological (6) Extraction - RPLC - fluorescence detection (NIST)
Vitamin B ₁₂	Microbiological (6)
Niacin	Microbiological (6) Acid digestion - absorption spectrophotometry (1) Extraction - RPLC - fluorescence detection (NIST)
Folic acid	Microbiological (6)
Pantothenic acid	Microbiological (6)
Biotin	Microbiological (6)
Choline	Acid digestion - absorption spectrophotometry (4) Acid digestion - electrochemical detection (2)
Inositol	Microbiological (3) Ion exchange chromatography - electrochemical detection (1)

Minerals and Trace Elements

Calcium	Flame atomic absorption spectrometry (2) Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (7)
Chloride	Electrochemical titration (5) Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (1) Absorption spectrophotometry (1)
Copper	Flame atomic absorption spectrometry (2)

	Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (7)
Iodine	Colorimetric titration (1) Absorption spectrophotometry (1) Gas chromatography - electron capture detection (1) Ion-selective electrode (1) Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (2) Radiochemical neutron activation analysis (1 + NIST) Inductively coupled plasma - mass spectrometry (1)
Iron	Flame atomic absorption spectrometry (2) Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (7)
Magnesium	Flame atomic absorption spectrometry (2) Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (7)
Manganese	Flame atomic absorption spectrometry (1) Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (6)
Phosphorus	Absorption spectrophotometry (3) Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (6)
Potassium	Flame atomic absorption spectrometry (1) Flame atomic emission spectrometry (1) Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (7)
Selenium	Graphite furnace atomic absorption spectrometry (2) Hydride generation atomic absorption spectrometry (1) Gas chromatography - isotope dilution mass spectrometry (1)
Sodium	Flame atomic absorption spectrometry (1) Flame atomic emission spectrometry (1) Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (7)
Zinc	Flame atomic absorption spectrometry (2) Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (7) Inductively coupled plasma - isotope dilution mass spectrometry (1)



National Institute of Standards & Technology

Report of Investigation

Reference Material 8414

Bovine Muscle Powder

Agriculture Canada

Distributed by the National Institute of Standards and Technology

This Reference Material (RM) is intended for use in evaluating analytical methods and instruments used for the determination of major, minor, and trace constituent elements in meat, meat products, and other similar food, agricultural, and biological materials. RM 8414 was prepared and characterized by the Centre for Land and Biological Resources Research (CLBRR), Agriculture Canada, who is the sole authority for the information provided in this report including best estimate and other technical information. RM 8414 consists of 50 g of dry powdered beef muscle packaged in two glass bottles of 25 g each that are sealed in an aluminum-nylon pouch.

Expiration of Report: The Report of Investigation of RM 8414 is valid, within the measurement uncertainty specified, until **31 August 2011**, provided the RM is handled in accordance with instructions given in this report (see "Instructions for Use"). This report is nullified if the RM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Maintenance of RM Value Assignment: NIST will monitor this RM over the period of its value assignment. If substantive technical changes occur that affect the value assignment before the expiration of this report, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

Material Application: This material, together with other food-type RMs issued by NIST, covers a wide range of natural matrix compositions and elemental concentrations. By providing concentration values for a wide range of constituent elements of nutritional, toxicological, and environmental significance, RM 8414 is expected to be useful in assessing the role of nutrients in health and disease, establishing dietary requirements for nutrients, accumulating accurate baseline concentration data for nutrients and contaminants, and monitoring foods for nutrients and contaminants.

It is conceivable that some elemental contamination may have been picked up during preparation, processing, and handling, and also that alterations of original chemical composition of the bulk starting material may have resulted from differential sieving of component tissues with differing compositions. Hence, this material cannot be taken as strictly containing solely natural, physiological concentrations of inorganic constituent elements. It can, however, be considered to reflect a food product taken through preparation/processing, not unlike food materials processed commercially or in the analytical laboratory. This RM can thus be used for data quality control (DQC) in the analysis of such processed materials and can additionally be considered for DQC of methods measuring total concentrations of elements in food products with natural, uncontaminated, physiological element levels.

The material was prepared at Agriculture Canada under the direction of Milan Ilnat, Centre for Land and Biological Resources Research (CLBRR), who also coordinated the interlaboratory analytical campaign to characterize the material and performed evaluations/calculations of analytical data to arrive at best estimate and informational elemental concentration values. The former Food Research Centre and the Engineering and Statistical Research Centre, Agriculture Canada, kindly provided some facilities, experimental assistance, and construction of the blender.

Stephen A. Wise, Chief
Analytical Chemistry Division

Robert L. Watters, Jr., Chief
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899
Report Issue Date: 20 February 2008
See Report Revision History on Page 7

Statistical support, design, and consultation with computations for homogeneity estimates as well as best estimate and informational concentration values were provided by M.S. Wolynetz, Statistical Research Section, Research Program Service, Agriculture Canada.

Support aspects involved in the issuance of this RM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

Recommended Procedures for Use: RM 8414 should be kept at room temperature in its original bottle, tightly-capped and not exposed to intense direct light or ultraviolet radiation. Prior to each use, contents of the bottle should be well mixed by gentle shaking and rolling of the container. A recommended minimum subsample weight of 0.5 g should be taken for analysis. Moisture content should be determined on a separate subsample for conversion of analytical results to a dry weight basis. The recommended method of drying to relate analytical results to the best estimate values listed in Table 1 is drying for 4 h in an air oven at 85 °C. Analyses reported in Table 1 represent total concentrations of elements in this RM. Dissolution procedures should be capable of rendering a completely dissolved sample appropriate to the method and should be designed to avoid losses of elements by volatilization or by retention on decomposition and processing containers and measuring equipment. Analytical methods should be capable of measuring total levels of analytes for comparison with best estimate values.

PREPARATION AND ANALYSIS¹

Preparation: The source of material for RM 8414 was boneless hip, commonly denoted Canada grade A round steak (consisting of the major muscles: semimembranosus, semi-tendinosus, biceps femoris and adductor) from market weight beef cattle (*Bos Taurus*). All preparatory work was performed in-house at the facilities of Agriculture Canada, Ottawa. [1,2]. The meat was trimmed of all visible fat and connective tissues and the resulting lean muscle tissue was ground frozen in a stainless steel comminuting machine with a 1 mm stainless steel screen. The finely milled product was freeze-dried and the dry bulk powder was sterilized with cobalt-60 gamma radiation to 2.0 megarads by Atomic Energy of Canada Ltd. All subsequent processing was performed in a moderately clean room using plastic equipment. Additional reduction of particle size was effected by ball milling with Teflon-TFE balls in a 1 L Teflon-PFA screw cap jar. Material sieving was through nylon monofilament sieve cloths supported in high density white polyethylene holders. Pairs of sieves with openings of approximately 250 µm/50 µm or 250 µm/90 µm were used to yield suitable narrow middle cuts constituting the RM. This fraction was blended in a polymethylmethacrylate V-configuration blender and packaged into clean 150 mL brim capacity, clear glass bottles with pulp/Saran-lined black polypropylene screw caps. A total of 288 randomly selected units was segregated for physical and chemical characterization. Units were individually hermetically sealed in aluminum-nylon pouches to enhance long term stability.

Assessment of Homogeneity: Homogeneity testing was performed on randomly selected units for 12 elements by application of high precision analytical methods in three laboratories. [3] Subsamples of 0.5 g were taken from each of four units and analyzed by M. Ihnat, Agriculture Canada for calcium, iron, potassium, magnesium, sodium and zinc using a precise and reliable application of acid digestion flame atomic absorption spectrometry. [4,5] Subsamples of 0.3-1.5 g each, taken from a total of six units, were analyzed by R.W. Dabeka, Health and Welfare Canada for cadmium, cobalt, nickel, and lead by precise and reliable graphite furnace atomic absorption spectrometric methods following acid digestion and separation/preconcentration of the analytes using coprecipitation with ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (all four elements) and additionally with palladium/ascorbic acid for lead. [6,8] Fluoride was determined by the same analyst in 0.1 g subsamples from six units by an acid-facilitated microdiffusion-ion specific electrode method. [9] Sensitive solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometric determinations were performed by M. Stoeppler and U. Bagschik, Nuclear Research Center, Julich, Federal Republic of Germany, on 0.0005 g (0.5 mg) subsamples for copper (50 subsamples from 5 units) and lead (280 subsamples from 8 units). [3] In addition, the extensive set of analytical results obtained from a large number of analysts participating in the interlaboratory characterization campaign was assessed to provide homogeneity estimates for other elements. [3] This material generally exhibits excellent homogeneity. Uncertainties associated with best estimate values reported in Table 1 include effects of material inhomogeneity.

¹Certain commercial materials and equipment are identified in order to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply a recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment are the best available for the purpose.

Best Estimate Values for Constituent Elements: The population of analytical information from cooperating analysts using a wide variety of analytical methods was assessed using technical and statistical criteria as well as judgment to arrive at best estimate values and associated uncertainties listed in Table 1. These values, not certified by NIST, are based on results obtained by at least two, but typically several independent, reliable analytical methods. Concentration estimates for five other elements are provided in Table 2 as information values only, as they are based on results of limited determinations or only one analytical method.

Chemical Characterization: Chemical analyses to establish best estimate concentrations were conducted in an interlaboratory cooperative characterization campaign involving the initiating laboratory and a large number of selected expert analysts in other laboratories. A wide range of independent analytical methods listed in Table 3 were applied to provide analytical results for a large number of nutritionally, toxicologically, and environmentally pertinent elements. Typically, analyses were performed by each participant on duplicate subsamples from randomly selected (usually four) units of material using sample weights and methods left to the discretion of the analyst. Subsample sizes ranged from 0.002 to 5 g, typically 0.4 g. Elemental determinations were performed on "as received" material, with conversion of results to a dry matter basis using moisture values determined on separate 2 g samples by the procedure specified in this report. Analytical results obtained by Agriculture Canada and Health and Welfare Canada laboratories during homogeneity testing and analysis served a dual role of providing information for homogeneity assessment and quantitation.

This Report of Investigation, prepared by Milan Ihnat, is contribution No. 92-46 from CLBRR, Research Branch, Agriculture, Canada.

Table 1. Best Estimate Concentrations of Constituent Elements

Major Constituents

Element	Content and uncertainty weight (%) ^(a)	Methods ^(b)
Nitrogen	13.75 ± 0.32	I01, J01, J02
Potassium	1.517 ± 0.037	A01, B02, D01, E01
Phosphorus	0.836 ± 0.045	B02, B03, B04, F01, F02, M01
Sulfur	0.795 ± 0.041	B02, D04, J02, J04, L01, M02
Sodium	0.210 ± 0.008	A01, B02, D01
Chlorine	0.188 ± 0.015	D01, D04, F01, K02, L01

Minor and Trace Constituents

Element	Content and uncertainty mg/kg ^(a)	Methods ^(b)
Magnesium	960 ± 95	A01, A03, B02, B03, B04, D01
Calcium	145 ± 20	A01, A03, B02, B03, D01, E01, E02
Zinc	142 ± 14	A01, A03, B02, B03, B04, D01, D02, D03, E01
Iron	71.2 ± 9.2	A01, A03, B02, B03, D01, D02, D03, E01, E02
Rubidium	28.7 ± 3.5	D01, D02, E02
Copper	2.84 ± 0.45	A01, A05, B02, B03, C03, C06, D01, D03, E01, H01
Aluminum	1.7 ± 1.4	A05, B02, D01
Bromine	1.1 ± 0.5	D01, E01
Boron	0.6 ± 0.4	B02, D04
Lead	0.38 ± 0.24	A05, A06, A16, C03, H01
Manganese	0.37 ± 0.09	A01, A05, A06, B02, D01, D03, E01
Molybdenum	0.08 ± 0.06	C03, C06, C07, D03, F01, H06
Selenium	0.076 ± 0.010	B06, C01, C04, D02, D03, G01
Chromium	0.071 ± 0.038	A06, B02, C05, D03
Strontium	0.052 ± 0.015	B02, B03, C03
Nickel	0.05 ± 0.04	A16, C03, H01
Iodine	0.035 ± 0.012	D03, D05, D06, F02

Cadmium	0.013 ± 0.011	A04, A05, A06, A16, C03, D03, H01
Arsenic	0.009 ± 0.003	A11, D03
Cobalt	0.007 ± 0.003	A16, D01, D02, D03, H01
Mercury	0.005 ± 0.003	A09, A10, D03

^(a) Best estimate values, weight percent or mg/kg (ppm), are based on the dry material, dried according to instructions in this report and are equally-weighted means of results from generally at least two, but typically several, different analytical methods applied by analysts in different laboratories. Uncertainties are imprecision estimates expressed either as a 95% confidence interval or occasionally (B, Ni) as an interval based on the entire range of accepted results for a single future determination, based on a sample weight of at least 0.5 g. These uncertainties, based on between-method and laboratory, between-unit and within-unit estimates of variances, include measures of analytical method and laboratory imprecisions and biases and material inhomogeneity.

^(b) Analytical method codes and descriptions are provided in Table 3.

Table 2. Information Concentrations of Constituent Elements

Element	Estimated content, mg/kg ^(a)	Methods ^(b)
Antimony	0.01	D02, D03
Barium	0.05	C03, D02
Cesium	0.05	D01
Fluorine	0.22	H04
Vanadium	0.005	B02, D03

^(a) These analytical values, on a dry matter basis, are estimates given strictly for information only as they are based on results of limited determinations or only one method; no uncertainties are provided. Use of this RM to quantitatively monitor method performance for elements other than those with best estimate concentration values in Table 1 is not warranted.

^(b) Analytical method codes and descriptions are provided in Table 3.

Table 3. Analytical Methods Used to Determine Best Estimate and Information Concentration Values^(a)

Analytical Method	Code	Elements Determined
Acid digestion flame atomic absorption spectrometry	A01	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn
Dry ashing flame atomic absorption spectrometry	A03	Ca, Fe, Mg, Zn
Acid digestion electrothermal atomic absorption spectrometry	A04	Cd
Closed vessel acid digestion electrothermal atomic absorption spectrometry	A05	Al, Cd, Cu, Mn, Pb
Dry ashing electrothermal atomic absorption spectrometry	A06	Cd, Cr, Mn, Pb
Acid digestion cold vapour atomic absorption spectrometry	A09	Hg
Closed vessel acid digestion cold vapour atomic absorption spectrometry with preconcentration	A10	Hg

Closed vessel acid digestion hydride generation atomic absorption spectrometry with preconcentration	A11	As
Acid digestion coprecipitation electrothermal atomic absorption spectrometry	A16	Cd, Co, Ni, Pb
Acid digestion inductively coupled plasma atomic emission spectrometry	B02	Al, B, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Sr, (V), Zn
Closed vessel acid digestion inductively coupled plasma atomic emission spectrometry	B03	Ca, Cu, Fe, Mg, P, Sr, Zn
Dry ashing inductively coupled plasma atomic emission spectrometry	B04	Mg, P, Zn
Acid digestion hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry	B06	Se
Acid digestion isotope dilution mass spectrometry	C01	Se
Closed vessel acid digestion isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry	C03	As, (Ba), Cd, Cu, Mo, Ni, Pb, Sr
Acid digestion dry ashing hydride generation isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry	C04	Se
Dry ashing acid digestion isotope dilution mass spectrometry	C05	Cr
Acid digestion isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry	C06	Cu, Mo
Dry ashing inductively coupled plasma mass spectrometry	C07	Mo
Instrumental neutron activation analysis	D01	Al, Br, Ca, Cl, Co, (Cs), Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Rb, Zn
Instrumental neutron activation analysis with acid digestion	D02	(Ba), Co, Fe, Rb, (Sb), Se, Zn
Neutron activation analysis with radiochemical separation	D03	Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, I, Mn, Mo, (Sb), Se, (V), Zn
Neutron capture prompt gamma activation analysis	D04	B, Cl, S

Epithermal instrumental neutron activation analysis	D05	I
Preconcentration neutron activation analysis	D06	I
Particle induced X-ray emission spectrometry	E01	Br, Ca, Cu, Fe, K, Mn, Rb, Zn
X-ray fluorescence	E02	Ca, Fe
Acid digestion light absorption spectrometry	F01	Mo, P
Dry ashing light absorption spectrometry	F02	Cl, I, P
Acid digestion fluorometry	G01	Se
Closed vessel acid digestion anodic stripping voltametry	H01	Cd, Co, Cu, Ni, Pb
Extraction ion selective electrode	H04	(F)
Dry ashing catalytic adsorption polarography	H06	Mo
Kjeldahl method for nitrogen -volumetry	I01	N
Combustion elemental analysis -thermal conductivity	J01	N
Combustion elemental analysis with chromatographic separation -thermal conductivity	J02	N, S
Combustion elemental analysis -fluorometry	J04	S
Dry ashing volumetry	K02	Cl
Closed vessel combustion ion chromatography	L01	Cl, S
Acid digestion gravimetry	M01	P
Dry ashing gravimetry	M02	S

^(a) Letter codes refer to classes of similar methods; number codes refer to specific variants. Elements in parentheses have only information values for this RM.

REFERENCES

- [1] Ihnat, M.; Wolf, W.R.; *Maize and Beef Muscle Agricultural Research Materials*; in Wolf, W.R., (ed.), *Biological Reference Materials: Availability, Uses, and Need for Validation of Nutrient Measurement*, J. Wiley and Sons, NY pp. 141–165 (1985).
- [2] Ihnat, M.; Cloutier, R.; Wood, D.; *Reference Materials for Agricultural and Food Analysis: Preparation and Physical Characterization of a Bovine Muscle Powder Candidate Reference Material*; *Fresenius Z. Anal. Chem.* Vol. 326, pp. 627–633 (1987).
- [3] Ihnat, M.; Stoeppler, M.; *Preliminary Assessment of Homogeneity of New Candidate Agricultural/Food Reference Materials*; *Fresenius J. Anal. Chem.* Vol. 338, pp. 455–460 (1990).
- [4] Ihnat, M.; *High Reliability Atomic Absorption Spectrometry of Major and Minor Elements in Biological Materials*; *Fresenius Z. Anal. Chem.* Vol. 326, pp. 739–741 (1987).
- [5] Ihnat, M.; *Reliable Measurement of Major, Minor, and Trace Elemental Nutrients*; *J. Res. Nat'l. Bur. Stand.* Vol. 93, 354–358 (1988).
- [6] Dabeka, R.W.; McKenzie, A.D.; *Graphite-Furnace Atomic Absorption Spectrometric Determination of Lead and Cadmium in Food After Nitric-Perchloric Acid Digestion and Coprecipitation with Ammonium Pyrrolidine Dithiocarbamate*; *Can. J. Spectrosc.* Vol. 31, pp. 44–52 (1986).
- [7] Dabeka, R.W.; *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometric Determination of Lead, Cadmium, Cobalt, and Nickel in Infant Formulas and Evaporated Milk After Nitric-Perchloric Acid Digestion and Coprecipitation with Ammonium Pyrrolidine Dithiocarbamate*; *Sci. Total Environ.* Vol. 89, pp. 271–277 (1989).
- [8] Dabeka, R.W.; *A Novel Coprecipitation Method for the Isolation and Concentration of Lead and Its Application to the GFAAS Determination of Microtrace Lead Levels in Biologicals, in Final Program of the 17th Annual Meeting of the Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies*; p. 102 (1990).
- [9] Dabeka, R.W.; McKenzie, A.D.; Conacher, H.B.S.; *Microdiffusion and Fluoride-Specific Electrode Determination of Fluoride in Foods*; *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* Vol. 62, pp. 1065–1069 (1979).

Report Revision History: 20 February 2008 (Update of expiration date and editorial changes); 1994 February 18 (Editorial revision); 24 September 1993 (Original report date).

Users of this RM should ensure that the report in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-6776; fax (301) 926-4751; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.

APPENDIX A

Cooperating Analysts

- G. Alfthan, National Public Health Institute, Helsinki, Finland.
- P. Allain and Y. Mauras, Laboratoire de Pharmacologie et toxicologie, Centre de Pharmacovigilance, Centre Hospitalier Regional et Universitaire d'Angers, Angers Cedex, France.
- D.L. Anderson, Division of Contaminants Chemistry, Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration, Washington, DC, USA.
- R. Beine, D.E Lichtenberg, E. Denniston, and M. Peralta, Division of Regulatory Services, University of Kentucky, Lexington, KY, USA.
- P.R. Beljaars and Th. Rondags, Governmental Food and Commodities Inspection Service, Maastricht, The Netherlands.
- M. Bouraly, N. Texier, and A. Couty, Centre d'Application de Levallois, Atochem, Levallois-Perret Cedex, France.
- W.T. Buckley, G. Wilson, and D. Godfrey, Agassiz Research Station, Agriculture Canada, Agassiz, BC, Canada.
- A.R Byrne, M. Dermelj, M. Horvat, N. Prosenc, and D. Konda, Nuclear Chemistry Department, J. Stefan Institute, E. Kardelja University, Ljubljana, Slovenia.
- A. Chatt and R.R. Rao, Slowpoke-2 Facility, Trace Analysis Research Centre, Department of Chemistry, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada.
- C.L. Chou, Marine Chemistry Division, Department of Fisheries and Oceans, Halifax, NS, Canada.
- J.G. Crock, Branch of Geochemistry, US Geological Survey, Denver, CO, USA.
- W.C. Cunningham, Division of Contaminants Chemistry, Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration, Washington, DC, USA.
- R.W. Dabeka, Food Research Division, Health Protection Branch, Health and Welfare Canada, Ottawa, ON, Canada.
- J. de Jong and E. Boers, State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT), Wageningen, The Netherlands.
- J.F. Dlouhy, Analytical Services Division, River Road Environmental Technology Centre, Environment Canada, Ottawa, ON, Canada.
- R. Dybczynski and B. Danko, Department of Analytical Chemistry, Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warsaw, Poland.
- A. Farina Mazzeo, R. Piergallini, E.P. Salsano, and F. Abballe, Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Institute Superiore di Sanita, Rome, Italy.
- M. Ferguson, W.R. Musick, S.A. MacIntyre, and W.R. Laing, Analytical Chemistry Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, USA.
- C.T. Figueiredo and W.B. McGill, Department of Soil Science, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
- P.W.F. Fischer and A. Giroux, Bureau of Nutritional Sciences, Food Directorate, Health and Welfare Canada, Ottawa, ON, Canada.
- K. Frank, J. Denning, and L. Hayne, Institute of Agriculture and Natural Resources, Department of Agronomy, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE, USA.
- F.L. Fricke, C. Gaston, and K.A. Wolnik, National Forensic Chemistry Center, US Food and Drug Administration, Cincinnati, OH, USA.
- E.S. Gladney and E.M. Hodge, Health and Environmental Chemistry Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA.
- R.D. Hauck and R.H. Scheib, Office of Agricultural and Chemical Development, Tennessee Valley Authority, Muscle Shoals, AL, USA.
- G.U. Hesselius, Mikro Kemi AB, Uppsala, Sweden.
- K. Heydorn, E. Damsgaard, and N. Lavi, Isotope Division, Riso National Laboratory, Roskilde, Denmark.
- E. L. Hoffman, Activation Laboratories Ltd., Ancaster, ON, Canada.
- M. Ihnat, Centre for Land and Biological Resources Research, Agriculture Canada, Ottawa, ON, Canada.
- J.L. Imbert and M. Olle, Service Centrale d'Analyse, Centre National de la Recherche Scientifique, Vernaison, France.
- D.L. Jeffress and S. Allison, Feed Control Laboratory, Missouri Department of Agriculture, Jefferson City, MO, USA.
- L. Jorhem and E. Ericsson, National Food Administration, Uppsala, Sweden.
- F.J. Kasler, Department of Chemistry, University of Maryland, College Park, MD, USA.
- W.F. Koch, L.A. Holland, and J.R. DeVoe, National Institute of Standards and Technology, Center for Analytical Chemistry, Inorganic Analytical Research Division, Gaithersburg, MD, USA.
- B. Kratochvil and N. Motkosky, Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
- D. Kuik and P. Heida, Governmental Food and Commodities Inspection Service, Leeuwarden, The Netherlands.

J. Kumpulainen, Central Laboratory, Agricultural Research Center of Finland, Jokioinen, Finland.

G.W. Latimer Jr., W. Igler, L. Park, H. Hinojosa, C. Upton, and D. Arvelo, Agricultural Analytical Services, Office of the Texas State Chemist, College Station, TX, USA.

J.W. McLaren, S.N. Willie, V.J. Boyko, and S.S. Berman, Measurement Science, Institute for Environmental Chemistry, National Research Council of Canada, Ottawa, ON, Canada.

W. Maenhaut, and G. Hebbrecht, Laboratory for Analytical Chemistry, Instituut voor Nucleaire Wetenschappen, Rijksuniversiteit Gent, Gent, Belgium.

B. Magyar, B. Aeschlimann, and H.R. Elsener, Institute of Inorganic Chemistry, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.

T.P. Mawhinney, R. Boles, R. Cathey, and P. Eggeman, Experimental Station Laboratories, College of Agriculture, University of Missouri-Columbia, Columbia, MO, USA.

N.J. Miller-Ihli and F.E. Greene, Nutrient Composition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, US Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA.

Nuclear Research Reactor Facility, Department of Nuclear Engineering and Engineering Physics, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA.

I. Olmez, Nuclear Reactor Laboratory, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA.

I.S. Palmer, O.E. Olson Biochemistry Laboratories, Chemistry Department, South Dakota State University, Brookings, SD, USA.

J.B. Reust, H.R. Lang, and A. Janchen, Analytical Research and Development, Project/Product Coordination, Sandoz Pharma Ltd., Basle, Switzerland.

R. Schelenz and E. Zeiller, Chemistry Unit, International Atomic Energy Agency-Seibersdorf, Vienna, Austria.

L.J. Schmidt and U. Soni, Mass Spectrometry and Elemental Analysis Department, Shell Development Company, West Hollow Research Center, Houston, TX, USA.

J. Schoenau, Department of Soil Science, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.

P. Schramel, Institut für Ökologische Chemie, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Neuherberg, Federal Republic of Germany.

T.R. Shuler and F.H. Nielsen, Grand Forks Human Nutrition Research Center, US Department of Agriculture, Grand Forks, ND, USA.

R.J. Stevens and A. Beattie, Food and Agricultural Chemistry Research Division, Department of Agriculture (Northern Ireland), Belfast, Northern Ireland.

M. Stoepler, K. May, P. Ostapczuk, M. Froning, U. Bagschik and V. Arenas, Forschungszentrum Julich GmbH, Institut für Angewandte Physikalische Chemie, Julich, Federal Republic of Germany.

J.T. Tanner and K.K. Cook, Nutrient Surveillance Branch, Division of Nutrition, US Food and Drug Administration, Washington, DC, USA.

C. Veillon, K.Y. Patterson, and N. Hardison, Vitamin and Mineral Nutrition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, US Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA.

J. Versieck, L. Vanballenberghe, and A. Wittoek, Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, University Hospital, Gent, Belgium.

R.F. Walker, K.J. Thurlow, and G. Holcombe, Laboratory of the Government Chemist, Teddington, Great Britain.

H. Watkinson and A.A. Judge, MAFTech Ruakura, Ruakura Agriculture Centre, Ministry of Agriculture and Fisheries, Hamilton, New Zealand.

P.C. William, Grain Research Laboratory, Canadian Grain Commission, Winnipeg, MB, Canada.

J.R.W. Woittiez, M.dC. Tangonan, K. Kroon and A. Lagerwaard, Interfaculty Reactor Institute, Department of Radiochemistry, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.

J.R.W. Woittiez and M. Geusebroek, Netherlands Energy Research Foundation ECN, Petten, The Netherlands.

W. Yuen, Saskatchewan Research Council, Saskatoon, SK, Canada.



National Institute of Standards & Technology

Report of Investigation

Reference Material 8415

Whole Egg Powder

A Joint Material of Agriculture Canada and NIST

(Distributed by the National Institute of Standards and Technology)

Reference Material (RM) 8415 is intended for use in evaluating analytical methods and instruments used for the determination of major, minor, and trace constituent elements, as well as proximates, fatty acids, and calories in egg, egg products and similar food, and agricultural and biological materials. This material can also be used for quality assurance when assigning values to in-house control materials. RM 8415 consists of 35 g of dry whole egg powder packaged in a glass bottle sealed in an aluminum-nylon pouch.

Reference Concentration Values: Reference concentration values for major, minor, and trace constituent elements are provided in Table 1. Reference concentration values for selected proximates are provided in Table 2. The reference values in Tables 1 and 2 were derived from results reported in an interlaboratory comparison exercise and by four additional collaborating laboratories, respectively. Reference values are noncertified values that are the best estimates of the true values; however, the values do not meet NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may reflect only measurement precision, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods.

Information Concentration Values: Information concentration values for additional elements, fatty acids, and water-soluble vitamins are provided in Tables 3, 4, and 5. These are noncertified values with no reported uncertainties as there is insufficient information to assess uncertainties. The information values are given to provide additional characterization of the material. Use of this RM to quantitatively monitor method performance for analytes other than those with reference concentration values in Tables 1 and 2 is not recommended.

Expiration of Certification: The certification of RM 8415 is valid, within the measurement uncertainty specified, until **24 February 2011**, provided the RM is handled in accordance with instructions given in this report (see "Instructions for Use"). This certification is nullified if the RM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Maintenance of RM Value Assignment: NIST will monitor this RM over the period of its value assignment. If substantive technical changes occur that affect the value assignment before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

Statistical support was provided by M.S. Wolynetz, Statistical Research Section, Research Program Service, Agriculture Canada and L.M. Gill and J.H. Yen, Statistical Engineering Division, NIST.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

Stephen A. Wise, Chief
Analytical Chemistry Division

Robert L. Watters, Jr., Chief
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899
Report Issue Date: 25 January 2008
See Report Revision History on Page 9

RM 8415 was prepared at Agriculture Canada under the direction of M. Ihnat, Centre for Land and Biological Resources Research (CLBRR). Coordination of the technical measurements leading to the value assignment of this RM was performed by M. Ihnat of CLBRR, Agriculture Canada and K.E. Sharpless and S.A. Wise of the NIST Analytical Chemistry Division. Following the original analyses for elemental value assignment by the laboratories listed in Appendix A, the material was distributed by NIST to Covance Laboratories (Madison, WI), Lancaster Laboratories (Lancaster, PA), Medallion Laboratories (Minneapolis, MN), and Southern Testing and Research Laboratories (Wilson, NC) for the measurement of proximates, calories, and fatty acids. Selected individual fatty acids were measured in NIST's Analytical Chemistry Division in 2005 by T. Yarita. RM 8415 was also distributed in an interlaboratory comparison exercise in 1995; information values for the concentrations of several water-soluble vitamins have been assigned based on results reported by the laboratories listed in Appendix C.

NOTICE AND WARNING TO USERS

Storage: Until required for use, RM 8415 should be stored under refrigeration in its original bottle, tightly-capped and not exposed to intense direct light or ultraviolet radiation.

WARNING: For laboratory use only. Not for Human Consumption.

INSTRUCTIONS FOR USE

Prior to each use, contents of the bottle should be well mixed by gentle shaking and rolling of the container. A minimum subsample size of 0.5 g should be taken for analysis. Moisture content should be determined on a separate subsample for conversion of analytical results to a dry-mass basis. The recommended method of drying to relate analytical results to the reference values listed in the tables is drying for 4 h in an air oven at 85 °C. Dissolution procedures for elemental analyses should be capable of rendering a completely dissolved sample appropriate to the method and should be designed to avoid losses of elements by volatilization or by retention on decomposition and processing containers and measuring equipment. Analytical methods should be capable of measuring total levels of elements for comparison with reference values.

PREPARATION AND ANALYSIS¹

Preparation: The source of material for RM 8415 was Canada grade A dried whole egg powder, containing added color and a maximum of 2 % Zeolex (sodium silico-aluminate anti-caking ingredient) obtained from Vanderpol's Eggs Ltd. (Surrey, BC, Canada). All preparatory work following acquisition of the commercial product was performed at the facilities of Agriculture Canada (Ottawa, Ontario, Canada) [1,2]. The dry bulk powder was sterilized with cobalt-60 gamma radiation to 2.0 megarads by Atomic Energy of Canada Ltd. Material sieving was through nylon monofilament sieve cloths supported in high-density white polyethylene holders. Pairs of sieves with openings of approximately 250 µm and 50 µm were used to yield a middle-cut fraction for use as the reference material. This fraction was blended in a polymethylmethacrylate V-configuration blender and packaged into clean 150 mL brim capacity, colorless glass bottles with triseal (polyethylene)-lined white polypropylene screw caps. Units were individually hermetically sealed in aluminum-nylon pouches and stored under refrigeration (0 °C to 5 °C) to enhance long-term stability. A total of 144 randomly selected units were used for physical and chemical characterization in the original analyses.

Homogeneity Assessment: Homogeneity testing was performed on randomly selected units for nine elements in three laboratories [3,4]. Subsamples of 0.5 g and 2.0 g were taken from a total of four units and analyzed by M. Ihnat, Agriculture Canada, for aluminum, calcium, iron, magnesium, potassium, strontium, and zinc using acid digestion flame atomic absorption spectrometry [4-7]. Subsamples of 1.0 g to 2.0 g each, taken from a total of six units, were analyzed by R.W. Dabeka, Health and Welfare Canada, for lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry following acid digestion and separation and preconcentration of the analyte using

¹ Certain commercial equipment, instruments or materials are identified in this certificate to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

coprecipitation with palladium and ascorbic acid [8]. Solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometric determinations were performed by M. Stoeppler and U. Bagschik, Nuclear Research Center, Jülich, Germany, on a total of 40 subsamples of 0.5 mg each, from a total of four units for copper [2]. In addition, the analytical results obtained from a large number of analysts (Appendix A) participating in an interlaboratory comparison exercise were assessed to provide homogeneity estimates for other elements [2,4]. No statistically significant heterogeneity was found for aluminum, calcium, iron, lead, magnesium, manganese, mercury, phosphorus, potassium, selenium, sodium, strontium, and zinc in sample sizes required by the analytical technique ranging from 0.1 g to 2 g. Data for all analytes (including the proximates and fatty acids) have been statistically treated as though they are homogeneous, although the homogeneity of other analytes has not been investigated.

Value Assignment: Chemical analyses to establish reference concentrations of elements were conducted in an interlaboratory comparison exercise involving Agriculture Canada and selected analysts in other laboratories (Appendix A) using analytical methods listed in Table 6. Analyses were performed by each participant on duplicate subsamples from randomly selected (typically four) units of material; subsample sizes and methods were left to the discretion of the analyst. Subsample sizes ranged from 0.001 g to 5 g, typically 0.4 g. Elemental determinations were performed on the material “as received”, with conversion of results to a dry-mass basis using moisture values determined on separate 2 g subsamples by the drying procedure specified in the “Instruction for Use” section of this report.

Following the original elemental determinations, NIST distributed RM 8415 to four laboratories (Appendix B) for measurement of proximates, fatty acids, and calories. Each laboratory analyzed one portion from each of three bottles of RM 8415 using their routine methods (Table 7). Determinations were performed on the material “as received”, with conversion of results to a dry-mass basis using moisture values determined on separate subsamples taken from each of the three bottles. Standard Reference Material (SRM) 1846 Infant Formula was analyzed for quality assurance. RM 8415 was also analyzed by several laboratories participating in an interlaboratory comparison exercise in 1995; several of these laboratories (Appendix C) reported values for water-soluble vitamins, and these results are provided as information values in Table 5.

To assess stability, NIST measured selected individual fatty acids in 2005. Determinations were performed on three test portions taken from one jar and six test portions taken from a second jar. Fatty acids were extracted into hexane/acetone using pressurized-fluid extraction, were derivatized to their methyl esters, and were analyzed by gas chromatography (100-m poly-bis-cyanopropylsiloxane column) with flame ionization detection. Mass fractions reported on an as-received basis were converted to a dry-mass basis using the reference value for moisture.

Table 1. Reference Concentrations of Constituent Elements

Major Constituents		
Element	Mass Fraction (%) ^(a)	Methods ^(b)
Nitrogen ^(c)	6.30 ± 0.13	I01, J01, J02
Phosphorus	1.001 ± 0.032	B02, B03, F01, F02, M01
Sulfur	0.512 ± 0.050	B02, D04, J04, M02
Chlorine	0.508 ± 0.032	D01, D04, K02
Sodium	0.377 ± 0.034	A03, B01, B02, B03, D01
Potassium	0.319 ± 0.037	A01, A03, B02, B03, B04, D04
Calcium	0.248 ± 0.019	A01, B02, B04, D01
Minor and Trace Constituents		
Element	Mass Fraction (mg/kg) ^(a)	Methods ^(b)
Aluminum	540 ± 86	A05, B02, B03, B04, D01
Magnesium	305 ± 27	A01, A03, B02, B03, B04, D01
Iron	112 ± 16	A01, A03, B02, B03, B04, D02, D03
Zinc	67.5 ± 7.6	A01, A03, B02, B03, D02, D03, H01
Strontium	5.63 ± 0.46	A01, B02, B03
Copper	2.70 ± 0.35	A05, A06, B02, C06, D03, H01
Iodine	1.97 ± 0.46	D03, D05, F01, H05
Manganese	1.78 ± 0.38	A01, A03, A05, B02, B04, D01, D03
Selenium	1.39 ± 0.17	A08, C01, C04, D01, D02, D03, G01
Vanadium	0.459 ± 0.081	B02, D01, D03
Boron	0.41 ± 0.26	B02, C09, D04
Chromium	0.37 ± 0.18	A05, A06, A12, B02, C05, D02, D03
Molybdenum	0.247 ± 0.023	C06, D03, H06
Lead	0.061 ± 0.012	A16, H01
Cobalt	0.012 ± 0.005	D01, D02, D03, H01
Mercury	0.004 ± 0.003	A09, A10, D03

^(a) Reference values, expressed as mass fractions, are based on the dry material, dried according to instructions in this report, and are equally weighted means of results from at least two, but typically several, different analytical methods applied by analysts in different laboratories. Uncertainties are imprecision estimates expressed either as a 95 % confidence interval or occasionally (B, Co, K, Mn, Mo, Zn) as an interval based on the entire range of accepted results for a single future determination, based on a sample mass of at least 0.5 g. These uncertainties, based on among-method, among-laboratory, among-unit, and within-unit estimates of variances, include measures of analytical method and laboratory imprecisions and biases. (NIST has replaced the previously used term “best estimate” with “reference value”.)

^(b) Analytical method codes and descriptions are provided in Table 6.

^(c) Nitrogen results have been updated to include results from four additional collaborating laboratories (Appendix B). Only the uncertainty has changed from that provided with the original assigned value.

Table 2. Reference Concentrations of Proximates

Analyte	Mass Fraction (as received) (%) ^(a) (b)	Mass Fraction (dry-mass basis) (%) ^(a)
Moisture	3.53 ± 0.54	0 (by definition)
Solids	96.47 ± 0.54	100 (by definition)
Ash	4.78 ± 0.53	4.96 ± 0.55
Protein ^(c)	37.8 ± 1.2	39.2 ± 1.1

^(a) Each reference concentration value, expressed as a mass fraction on an as-received or dry-mass basis, is an equally weighted mean of results from the laboratories shown in Appendix B. The uncertainty in the reference values is expressed as an expanded uncertainty, U , at the 95 % level of confidence, and is calculated according to the method described in the ISO and NIST Guides [9]. The expanded uncertainty is calculated as $U = ku_c$, where u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of between-laboratory and within-laboratory components of uncertainty. The coverage factor, k , is determined from the Student's t -distribution corresponding to the appropriate associated degrees of freedom and 95 % confidence for each analyte. Analytical methodology information is provided in Table 7.

^(b) The “as received” values are based on the moisture content at the time the measurements for value assignment were performed. The amount of moisture in this material may change if moisture is transferred to or absorbed from the atmosphere during storage.

^(c) The protein concentration was calculated from the nitrogen values reported by the laboratories shown in Appendix B using a conversion factor of 6.25. The nitrogen values reported by the laboratories shown in Appendix B were combined with the original data for calculation of the reference value for nitrogen provided in Table 1.

Table 3. Information Concentrations of Constituent Elements

Element	Mass Fraction (mg/kg) ^(a)	Methods ^(b)
Antimony	0.002	D02, D03
Arsenic	0.01	D03
Barium	3	B02, B03, B04
Cadmium	0.005	A06, D03, H01

^(a) These analytical values, on a dry-mass basis, are estimates given strictly for information only, as they are based on results of a limited number of determinations or from only one method; no uncertainties are provided.

^(b) Analytical method codes and descriptions are provided in Table 6.

Table 4. Information Concentrations of Selected Fatty Acids (as Triglycerides)

Analyte	Mass Fraction (as received) (%) ^(a)	Mass Fraction (dry-mass basis) (%) ^(a)
Tetradecanoic Acid (C14:0) (Myristic Acid)	0.16	0.16
Pentadecanoic Acid (C15:0)	0.035	0.036
Hexadecanoic Acid (C16:0) (Palmitic Acid)	8.8	9.1
(Z)-9-Hexadecenoic Acid (C16:1 n-7) (Palmitoleic Acid)	1.8	1.8
Heptadecanoic Acid (C17:0) (Margaric Acid)	0.11	0.11
Octadecanoic Acid (C18:0) (Stearic Acid)	2.6	2.7
(Z)-9-Octadecenoic Acid (C18:1 n-9) (Oleic Acid)	17.0	17.6
(Z)-11-Octadecenoic Acid (C18:1 n-7) (Vaccenic Acid)	1.3	1.4
(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic Acid (C18:2 n-6) (Linoleic Acid)	3.7	3.8
(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoic Acid (C18:3 n-3) (Linolenic Acid)	0.36	0.37
(Z)-11-Eicosenoic Acid (C20:1 n-9) (Gondoic Acid)	0.15	0.15

^(a) These information values, reported on an as-received or dry-mass basis, are the means of results provided by a single method (pressurized fluid extraction followed by gas chromatography with flame ionization detection) run at NIST and are included to provide additional characterization of the material; no uncertainties are provided.

Table 5. Information Concentrations of Selected Vitamins

Analyte	Mass Fraction, (as received) (mg/kg) ^(a)	Mass Fraction, (dry-mass basis) (mg/kg) ^(a)
Vitamin B ₁	2.8	2.9
Vitamin B ₂	12	13
Vitamin B ₆	3.7	3.8
Vitamin B ₁₂	0.068	0.070
Biotin	1.3	1.3
Folic Acid	1.8	1.8
Inositol	860	890
Niacin	2.4	2.5
Pantothenic Acid	91	94

^(a) These information values, reported on an as-received or dry-mass basis, are the equally weighted means of results reported by the laboratories shown in Appendix C. These values are based on results from determinations by one to four laboratories and are included to provide additional characterization of the material; no uncertainties are provided. Analytical methodology information is provided in Table 8.

Table 6. Analytical Methods Used by Collaborating Laboratories (Appendix A) to Determine Reference and Information Concentration Values of Elements^(a)

Analytical Method	Code	Elements Determined
Acid Digestion Flame Atomic Absorption Spectrometry	A01	Ca, Fe, K, Mg, Mn, Sr, Zn
Dry Ashing Flame Atomic Absorption Spectrometry	A03	Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn
Closed Vessel Acid Digestion Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry	A05	Al, Cr, Cu, Mn
Dry Ashing Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry	A06	(Cd), Cr, Cu
Dry Ashing Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry	A08	Se
Acid Digestion Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry	A09	Hg
Closed Vessel Acid Digestion Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry with Preconcentration	A10	Hg
Dry Ashing Digestion Electro-Thermal Atomic Absorption Spectrometry	A12	Cr
Acid Digestion Coprecipitation Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry	A16	Pb
Acid Digestion Atomic Emission Spectrometry	B01	Na
Acid Digestion Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry	B02	Al, B, (Ba), Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Sr, V, Zn
Closed Vessel Acid Digestion Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry	B03	Al, (Ba), Fe, K, Mg, Na, P, Sr, Zn
Dry Ashing Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry	B04	Al, (Ba), Ca, Fe, K, Mg, Mn,
Acid Digestion Isotope Dilution Mass Spectrometry	C01	Se
Acid Digestion Dry Ashing Hydride Generation Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry	C04	Se
Dry Ashing Acid Digestion Isotope Dilution Mass Spectrometry	C05	Cr
Acid Digestion Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry	C06	Cu, Mo
Neutron Activation Mass Spectrometry	C09	B
Instrumental Neutron Activation Analysis	D01	Al, Ca, Cl, Co, Mg, Mn, Na, Se, V

Table 6 (continued)

Analytical Method	Code	Elements Determined
Instrumental Neutron Activation Analysis with Acid Digestion	D02	Co, Cr, Fe, (Sb), Se, Zn
Neutron Activation Analysis with Radiochemical Separation	D03	(As), (Cd), Co, Cr, Cu, Fe, Hg, I, Mn, Mo, (Sb), Se, V, Zn
Neutron Capture Prompt Gamma Activation Analysis	D04	B, Cl, K, S
Epithermal Instrumental Neutron Activation Analysis	D05	I
Acid digestion Light Absorption Spectrometry	F01	I, P
Dry Ashing Light Absorption Spectrometry	F02	P
Acid Digestion Fluorometry	G01	Se
Closed Vessel Acid Digestion Anodic Stripping Voltammetry	H01	(Cd), Co, Cu, Pb, Zn
Acid Digestion Differential Pulse Polarography	H05	I
Dry Ashing Catalytic Adsorption Polarography	H06	Mo
Kjeldahl Method for Nitrogen-Volumetry	I01	N ^(b)
Combustion Elemental Analysis-Thermal Conductivity	J01	N ^(b)
Combustion Elemental Analysis with Chromatographic Separation-Thermal Conductivity	J02	N ^(b)
Combustion Elemental Analysis-Fluorometry	J04	S
Dry Ashing Volumetry	K02	Cl
Acid Digestion Gravimetry	M01	P
Dry Ashing Gravimetry	M02	S

^(a) Letter codes refer to classes of similar methods; number codes refer to specific variants. Elements in parentheses have only information values in this RM. (NIST has replaced the previously used term “best estimate” with “reference value”.)

^(b) See Table 7 for additional information.

Table 7. Methods Used by Collaborating Laboratories (Appendix B) for the Determination of Nitrogen and Selected Proximates

Analyte	Methods
Ash	mass loss after ignition in a muffle furnace
Moisture	mass loss after drying in a vacuum oven (3 laboratories); mass loss after drying in a forced-air oven (1 laboratory)
Nitrogen	Dumas (1 laboratory); modified Dumas (1 laboratory); Kjeldahl (2 laboratories). Note that in the original elemental determinations 12 laboratories provided results (one laboratory provided results using two techniques): Kjeldahl (7); combustion - thermal conductivity (4), and combustion - chromatographic separation - thermal conductivity (2).
Protein	calculated from nitrogen using a factor of 6.25
Solids	calculated; (sample weight – moisture)

Table 8. Methods Used by Collaborating Laboratories (Appendix C) for the Determination of Vitamins

Analyte	Methods
Vitamin B ₁	microbiological (1 laboratory); digestion with fluorescence detection (3 laboratories)
Vitamin B ₂	microbiological (1 laboratory); digestion with fluorescence detection (2 laboratories)
Vitamin B ₆	microbiological (2 laboratories)
Vitamin B ₁₂	microbiological (2 laboratories)
Biotin	microbiological (2 laboratories)
Folic Acid	microbiological (3 laboratories)
Inositol	microbiological (1 laboratory)
Niacin	microbiological (1 laboratory); acid digestion with absorption spectrophotometry (1 laboratory)
Pantothenic Acid	microbiological (2 laboratories)

REFERENCES

- [1] Ihnat M.; *Preparation of Twelve Candidate Agricultural Reference Materials*; Fresenius' J. Anal. Chem., Vol. 332, pp. 539–545 (1988).
- [2] Ihnat, M.; Dabeka, R.W.; Wolynetz, M.S.; *Preparation and Homogeneity Characterization of Ten Agricultural/Food Reference Materials for Elemental Composition*; Fresenius' J. Anal. Chem., Vol. 348, pp. 445–451 (1994).
- [3] Ihnat, M.; Stoepler, M.; *Preliminary Assessment of Homogeneity of New Candidate Agricultural/Food Reference Materials*; Fresenius' J. Anal. Chem., Vol. 338, pp. 455–460 (1990).
- [4] Ihnat, M.; *Characterization (Certification) of Bovine Muscle Powder (NIST RM 8414), Whole Egg Powder (NIST RM 8415) and Whole Milk Powder (NIST RM 8435) Reference Materials for Essential and Toxic Major, Minor, and Trace Element Constituents*; Fresenius' J. Anal. Chem., Vol. 348, pp. 459–467 (1994).
- [5] Ihnat, M.; *High Reliability Atomic Absorption Spectrometry of Major and Minor Elements in Biological Materials*; Fresenius' J. Anal. Chem., Vol. 326, pp. 739–741 (1987).
- [6] Ihnat, M.; *Reliable Measurement of Major, Minor, and Trace Elemental Nutrients*; J. Res. Natl. Bur. Stand., Vol. 93, pp 354–358 (1988).
- [7] Ihnat, M.; *Importance of Acid-Insoluble Residue in Plant Analysis for Total Macro and Micro Elements*; Commun. Soil Sci. Plant Anal., Vol. 13, pp. 969–979 (1982).
- [8] Dabeka, R.W.; *A Novel Coprecipitation Method for the Isolation and Concentration of Lead and Its Application to the GFAAS Determination of Microtrace Lead Levels in Biologicals*; in Final Program of the 17th Annual Meeting of the Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies, p. 102, (1990).
- [9] ISO; *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*; ISBN 92-67-10188-9, 1st ed.; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.

Report Revision History: 25 January 2008 (Update of expiration date and editorial changes); 14 June 05 (This technical revision reports the removal of reference values for fat, carbohydrate, and calories, and the change from reference to information values for selected fatty acids. Storage conditions have also been updated in this version. The material is to be stored under refrigeration by the purchaser, and no longer stored at room temperature as the previous version of this Report stated. This revised Report applies to all RM 8415 units, including those originally stored at room temperature as previously instructed. From the initiation, RM 8415 has been stored under refrigeration at NIST and the "Preparation" section has been updated to reflect this.); 28 April 99 (This technical revision reports the addition of reference values for fat, protein, carbohydrate, calories, ash, moisture, solids, and fatty acids.); 24 September 93 (original report date).

Users of this RM should ensure that the report in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-6776; fax (301) 926-4751; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.

APPENDIX A

Collaborating Analysts for Elemental Determinations

- G. Alfthan, National Public Health Institute, Helsinki, Finland.
- P. Allain and Y. Mauras, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Centre de Pharmacovigilance, Centre Hospitalier Regional et Universitaire d'Angers, Angers Cedex, France.
- D.L. Anderson, Division of Contaminants Chemistry, Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration, Washington, DC, USA.
- R. Beine, D.E. Lichtenberg, E. Denniston, and M. Peralta, Division of Regulatory Services, University of Kentucky, Lexington, KY, USA.
- P.R. Beljaars and Th. Rondags, Governmental Food and Commodities Inspection Service, Maastricht, The Netherlands.
- M. Bouraly, N. Texier, and A. Couty, Centre d'Application de Levallois, Atochem, Levallois-Perret Cedex, France.
- W.T. Buckley, G. Wilson, and D. Godfrey, Agassiz Research Station, Agriculture Canada, Agassiz, BC, Canada.
- A.R. Byrne, M. Dermelj, M. Horvat, N. Prosenc, and D. Konda, Nuclear Chemistry Department, J. Stefan Institute, E. Kardelja University, Ljubljana, Slovenia.
- A. Chatt and R.R. Rao, Slowpoke-2 Facility, Trace Analysis Research Centre, Department of Chemistry, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada.
- W.B. Clarke, Department of Physics, McMaster University, Hamilton, ON, Canada.
- J.G. Crock, Branch of Geochemistry, US Geological Survey, Denver, CO, USA.
- W.C. Cunningham, Division of Contaminants Chemistry, Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration, Washington, DC, USA.
- R.W. Dabeka, Food Research Division, Health Protection Branch, Health and Welfare Canada, Ottawa, ON, Canada.
- J. de Jong and E. Boers, State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT), Wageningen, The Netherlands.
- A. Farina Mazzeo, R. Piergallini, E.P. Salsano, and F. Abballe, Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy.
- C.T. Figueiredo and W.B. McGill, Department of Soil Science, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
- P.W.F. Fischer and A. Giroux, Bureau of Nutritional Sciences, Food Directorate, Health and Welfare Canada, Ottawa, ON, Canada.
- K. Frank, J. Denning, and L. Hayne, Institute of Agriculture and Natural Resources, Department of Agronomy, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE, USA.
- E.S. Gladney and E.M. Hodge, Health and Environmental Chemistry Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA.
- D.C. Gregoire, K. Church, and J.L. Bouvier, Analytical Chemistry Laboratory, Geological Survey of Canada, Energy Mines and Resources Canada, Ottawa, ON, Canada.
- R.D. Hauck and R.H. Scheib, Office of Agricultural and Chemical Development, Tennessee Valley Authority, Muscle Shoals, AL, USA.
- G.U. Hesselius, Mikro Kemi AB, Uppsala, Sweden.
- W. Holak, New York Regional Laboratory, US Food and Drug Administration, Brooklyn, NY, USA.
- M. Ihnat, Centre for Land and Biological Resources Research, Agriculture Canada, Ottawa, ON, Canada.
- J.L. Imbert and M. Olle, Service Central d'Analyse, Centre National de la Recherche Scientifique, Vernaison, France.
- L.L. Jackson, Branch of Geochemistry, US Geological Survey, Denver, CO, USA.
- D.L. Jeffress and S. Allison, Feed Control Laboratory, Missouri Department of Agriculture, Jefferson City, MO, USA.
- L. Jorhem, E. Ericsson, and C.A. Yates, National Food Administration, Uppsala, Sweden.
- F.J. Kasler, Department of Chemistry, University of Maryland, College Park, MD, USA.
- B. Kratochvil and N. Motkosky, Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
- D. Kuik and P. Heida, Governmental Food and Commodities Inspection Service, Leeuwarden, The Netherlands.
- J. Kumpulainen, Central Laboratory, Agricultural Research Center of Finland, Jokioinen, Finland.
- G.W. Latimer Jr., W. Iglar, L. Park, H. Hinojosa, C. Upton, and D. Arvelo, Agricultural Analytical Services, Office of the Texas State Chemist, College Station, TX, USA.
- B. Magyar, B. Aeschlimann, and H.R. Elsener, Institute of Inorganic Chemistry, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
- T.P. Mawhinney, R. Boles, R. Cathey, and P. Eggeman, Experimental Station Laboratories, College of Agriculture, University of Missouri-Columbia, Columbia, MO, USA.
- N.J. Miller-Ihli and F.E. Greene, Nutrient Composition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, US Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA.
- I. Olmez, Nuclear Reactor Laboratory, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA.
- I.S. Palmer, O.E. Olson Biochemistry Laboratories, Chemistry Department, South Dakota State University, Brookings, SD, USA.

Appendix A (continued)

- J.B. Reust, H.R. Lang, and A. Janchen, Analytical Research and Development, Project/Product Coordination, Sandoz Pharma Ltd., Basle, Switzerland.
- R. Schelenz and E. Zeiller, Chemistry Unit, International Atomic Energy Agency-Seibersdorf, Vienna, Austria.
- L.J. Schmidt and U. Soni, Mass Spectrometry and Elemental Analysis Department, Shell Development Company, West Hollow Research Center, Houston, TX, USA.
- J. Schoenau, Department of Soil Science, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.
- P. Schramel, Institut für Okologische Chemie, Gessellschaft für Strahlen-und Umweltforschung GmbH, Neuherberg, Federal Republic of Germany.
- T.R. Shuler and F.H. Nielsen, Grand Forks Human Nutrition Research Center, US Department of Agriculture, Grand Forks, ND, USA.
- R.J. Stevens and A. Beattie, Food and Agricultural Chemistry Research Division, Department of Agriculture (Northern Ireland), Belfast, Northern Ireland.
- M. Stoeppler, K. May, P. Ostapczuk, M. Froning, and U. Bagschik, Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Angewandte Physikalische Chemie, Jülich, Federal Republic of Germany.
- J.T. Tanner and K.K. Cook, Nutrient Surveillance Branch, Division of Nutrition, US Food and Drug Administration, Washington, DC, USA.
- C. Veillon, K.Y. Patterson, and N. Hardison, Vitamin and Mineral Nutrition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, US Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA.
- J. Versieck, L. Vanballenberghe, and A. Wittoek, Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, University Hospital, Gent, Belgium.
- R.F. Walker, K.J. Thurlow, and G. Holcombe, Laboratory of the Government Chemist, Teddington, Great Britain.
- J.H. Watkinson and A.A. Judge, MAFTech Ruakura, Ruakura Agriculture Centre, Ministry of Agriculture and Fisheries, Hamilton, New Zealand.
- G.M. Whitford, School of Dentistry, Department of Oral Biology - Physiology, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA.
- P.C. Williams, Grain Research Laboratory, Canadian Grain Commission, Winnipeg, MB, Canada.
- J.R.W. Woittiez, M.dC. Tangonan, K. Kroon, and A. Lagerwaard, Interfaculty Reactor Institute, Department of Radiochemistry, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.
- J.R.W. Woittiez and M. Geusebroek, Netherlands Energy Research Foundation ECN, Petten, The Netherlands.
- W. Yuen, Saskatchewan Research Council, Saskatoon, SK, Canada.

APPENDIX B

Collaborating Laboratories for Proximate, Fatty Acid, and Caloric Determinations

- Covance Laboratories, Madison, WI, USA.
- Lancaster Laboratories, Lancaster, PA, USA.
- Medallion Laboratories, Minneapolis, MN, USA.
- Southern Testing and Research Laboratories, Wilson, NC, USA.

APPENDIX C

Collaborating Laboratories for Water-Soluble Vitamin Determinations

- Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington, DC, USA.
- Covance Laboratories, Madison, WI, USA.
- Lancaster Laboratories, Lancaster, PA, USA.
- Southern Testing and Research Laboratories, Wilson, NC, USA.