CMQ
CENTRO METROLOGÍA
QUÍMICA DE AGUAS Y ALIMENTOS

FUNDACIONCHILE

INFORME FINAL

PROYECTO 07CN13IZM-95

DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE MATERIALES DE REFERENCIA DE RESIDUOS QUÍMICOS EN PRODUCTOS ALIMENTARIOS DE EXPORTACIÓN: UNA CONTRIBUCIÓN A LA IMPLEMENTACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE CHILE POTENCIA ALIMENTARIA

DIRECTORA DEL PROYECTO

GABRIELA MASSIFF DE LA FUENTE

AGOSTO 2011

CENTRO DE METROLOGIA QUIMICA DE AGUAS Y ALIMENTOS
Av. Del Cóndor 844. Ciudad Empresarial, Huechuraba
Santiago-Chile

INDICE

1.	Introducción	3
2.	Objetivos del Proyecto	4
3.	Aspectos Generales del desarrollo del Proyecto	4
4.	Resultados	4
5.	Resumen de Actividades	7
6.	Conclusiones	11
7.	Anexo	11
7.1	Anexo 1. Publicación "Validation of a Liquid Chromatography -Fluorescence Spectrometric Method for the Quantification of four Quinolones in Pig and Chicken Muscle following the European Union Guideline EC/657/2002" publicada en J. Chil. Chem. Soc.,56, N°1 (2011)	

1 Introducción

La metrología es un pilar fundamental en cualquier sistema que promueva la calidad de los productos y servicios. Tiene gran importancia para los gobiernos, empresas y población en general, facilitando las transacciones comerciales, protegiendo al consumidor, o ayudando a preservar el medioambiente.

Con el acelerado crecimiento del comercio mundial y la apertura de las economías, es necesario establecer un mayor énfasis en la relación que existe entre la metrología química, la calidad de las mediciones analíticas y la evaluación de conformidad.

Por otro lado el comercio internacional de productos alimentarios se rige por los requerimientos exigidos, sobre la calidad e inocuidad de los productos, por los diferentes países importadores de dichos productos. Para ello, se deben cumplir una serie de normativas y reglamentos orientados a asegurar la ausencia de residuos químicos y/o asegurar el cumplimiento de valores límites permitidos para que estos alimentos sean aceptados en los diferentes países de destino.

En un mundo globalizado, la certificación, acreditación de laboratorios y sistemas nacionales de medición se han convertido en una parte importante del desarrollo industrial y el comercio internacional. De esta manera, se busca garantizar que un producto cumple con las características preestablecidas por el productor o por alguna entidad regulatoria, brindando confianza y seguridad al consumidor.

El resultado directo de cumplir con la reglamentación, en el caso de la determinación de residuos químicos en los productos de consumo humano, es trascendental en la medida que afecta la salud de las personas, sin embargo, también significa garantizar futuras exportaciones y captar nuevos importadores.

Para que los resultados de las mediciones sean comparables y no estén sujetos a controversias, es necesario que dichos resultados posean trazabilidad a estándares internacionales reconocidos. Esta trazabilidad se logra mediante el uso de Materiales de Referencia. Sin embargo, Chile no contaba con suficientes Materiales de Referencia que le permitieran asegurar los resultados, derivados del análisis químico de residuos de sus productos pecuarios (músculo de cerdo o de ave) para bajos niveles de concentración.

Considerando los Materiales de Referencia, como herramientas metrológicas, que permiten asegurar la exactitud y comparabilidad de los resultados, su existencia y uso por parte de los Laboratorios que controlan los productos de exportación permitirá evitar las discrepancias entre los diferentes actores involucrados en esta actividad.

El CMQ se encuentra habilitado en el ámbito nacional e internacional para desarrollar materiales de referencia con la confiabilidad requerida para que los laboratorios puedan avalar el resultado de sus mediciones.

Mediante este proyecto se realizó la producción de once materiales de referencia (MR) que brindarán un soporte metrológico al sistema de mediciones nacionales requerido para garantizar la inocuidad en los productos pecuarios que Chile exporta, para los parámetros definidos en este proyecto.

2 Objetivos del proyecto

Objetivo General

Desarrollar y producir Materiales de Referencia de residuos químicos para un área clave del sector exportador alimentario: Industria Agropecuaria

Objetivos específicos

1. Desarrollar y producir nueve materiales de referencia para la industria pecuaria: aves y cerdo.

2. Transferencia de Tecnología y capacitación a las Instituciones participantes del proyecto en el uso de Materiales de Referencia

3. Apoyo a los organismos reguladores y fiscalizadores en los Ensayos de Intercomparación realizados a su red de Laboratorios usando los Materiales de Referencia preparados.

3 Aspectos Generales del Desarrollo del Proyecto

Para alcanzar los objetivos se consideraron diversas actividades en la metodología implementada, cuyo propósito se explicita en la formulación del proyecto, y que se listan a continuación:

1. Revalidación de métodos analíticos
2. Diseño de la preparación de los MR definidos
   a) Quinolonas en músculo de cerdo: Ácido Oxolínico, Enrofloxacino, Ciprofloxacino
   b) Quinolonas en ave: Ácido Oxolínico, Enrofloxacino, Ciprofloxacino
   c) Plomo en ave
   d) Cadmio en ave
   e) Arsénico en ave
3. Obtención de la Materia prima para la producción de los Materiales de Referencia
4. Preparación de los Materiales de Referencia
5. Asignación del valor de referencia al MR
6. Evaluación de la Estabilidad de los MR preparados
7. Generaciones de capacidades en los profesionales del CMQ
8. Pasantías en los laboratorios del CMQ
9. Formación de Capacidades en los Laboratorios Nacionales
10. Organización de Ensayos de Intercomparación por el CMQ para las Laboratorios Nacionales que analizan residuos en Alimentos

4 Resultados

Los resultados obtenidos para las actividades descritas en las diferentes etapas del proyecto muestran la obtención de todos los objetivos planteados. A continuación se resumen los resultados para cada una de las actividades planteadas.

4.1 Revalidación de métodos analíticos

La llegada al Laboratorio de equipos con nuevas tecnologías permitió la revalidación de los métodos para la determinación de quinolonas y metales en matriz carne de cerdo o de ave. Esta actividad permitió, además de la medición cuantitativa de estos compuestos, la confirmación de la presencia de ellos usando estos equipos de última generación. En el caso de las quinolonas se usó Cromatografía líquida de alta resolución con detector masa masa (HPLC/MS-MS) y en el caso de metales la técnica de ICP-Masa

Los métodos revalidados son:

a) 4 Quinolonas en músculo de cerdo: Ácido Oxolínico, Enrofloxacino, Ciprofloxacino y Flumequina. Informado en IAT N°1 Anexo N°1
b) 4 Quinolonas en músculo de ave: Ácido Oxolínico, Enrofloxacino, Ciprofloxacino y Flumequina. Informado en IAT N°1 Anexo N°2
c) Plomo en ave. Informado en IAT N°1 Anexo N°3

4.2 Diseño de la preparación de los MR definidos

Esta actividad contempla establecer un diseño que apunte a minimizar los factores de variabilidad que puedan afectar significativamente las variables que inciden en la asignación del valor de referencia, en la homogeneidad y en la estabilidad de los componentes del material de referencia. El diseño experimental fue desarrollado para cada uno de los 3 grupos de MR.

Grupo 1. 3 Metales pesados en carne de ave. Se informa en el IAT N°2 anexo 1
Grupo 2. 3 Quinolonas en carne de ave. Se informa en el IAT N°2 anexo 2
Grupo 3. 3 Quinolonas en carne de cerdo. Se informa en el IAT N°1 anexo 4

4.3 Obtención de la materia prima para la producción de los Materiales de Referencia

Se realizó un barrido de posibles fuentes de materia prima para la producción de los materiales de referencia. Se concluye usar una fuente comercial a la cual se incorporan los residuos componentes del MR. Informado en IAT N°2

4.4 Preparación de los Materiales de Referencia, Asignación del valor de referencia al MR Y Evaluación de la Estabilidad de los MR preparados

La producción de un material de referencia contempla necesariamente las siguientes etapas:

a) Preparación del RM
b) Asignación del valor de referencia
c) Evaluación de la estabilidad del producto.

Cada una de estas etapas que corresponden a una actividad del proyecto conducen a obtener un material de referencia piloto que tiene sus propiedades muy bien caracterizadas. Los MR son

muestras de músculo de cerdo o de pollo que tendrán valores de referencia para cada uno de los residuos definidos.

En términos generales estas etapas involucran las siguientes tareas:

Preparación de los Materiales de Referencia

- Diseño de la preparación del Material de Referencia y Elaboración del Protocolo de Preparación: definición del material de partida, nivel de concentración, tipo de envase para el almacenamiento, Nº de envases por lote, condiciones de preservación, etc.
- Liofilización de la materia prima
- Preparación del Material de Referencia piloto
- Preparación y Homogenización del MR
- Envasado, sellado, etiquetado
- Selección de los envases para la determinación de la Concentración
- Cálculo del valor por preparación y su incertidumbre

Asignación del valor de referencia al MR

- Preparación gravimétrica de estándares y controles
- Medición analítica de la concentración con el método validado
- Cálculo de la concentración y su incertidumbre
- Evaluación estadística de los resultados
- Evaluación de la homogeneidad del MR
- Asignación del valor certificado de concentración
- Cálculo de incertidumbre del MR
- Evaluación de t=0 de estabilidad del MR

Evaluación de la Estabilidad del MR en el tiempo

- Determinación analítica de la concentración, cálculo y evaluación de resultados en el tiempo

Se realizó la preparación de un lote de cada uno de los 3 grupos de MR

Grupo 1. 3 Metales pesados en carne de ave. Los resultados aparecen el Informe de Avance IAT N°3 anexo 1
Grupo 2. 3 Quinolonas en carne de ave. Se informa en el IAT N°2 anexo 5
Grupo 3. 3 Quinolonas en carne de cerdo. Se informa en el IAT N°2 anexo 4

Para los grupos 2 y 3 se elabora un Informe técnico de Preparación de un material piloto dónde además se describen los resultados para la asignación de valor del MR, se determina la homogeneidad del material y se mide la estabilidad de cada componente del material.
El MR de Quinolonas en cada matriz además contiene Flumequina, es decir, un compuesto adicional por cada matriz.
Para el grupo 1 se elabora un informe técnico para cada etapa de la producción del material de referencia.

4.5 Generaciones de capacidades en los profesionales del CMQ

Visita del profesional del CMQ Sr. Carlos Gómez a INMETRO, que es el Centro de Metrología Nacional de Brazil. Informado en IAT N°2.

Visita de la Directora del Centro de Metrología Química, Sra. Gabriela Massiff, al Centro Nacional de Metrología de Australia. Informado en IAT N°2.

4.6 Pasantías en los Laboratorios del CMQ

Transferencia de la Técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica a través de los métodos de determinación de Cadmio por Horno de Grafito en tejido biológico y de determinación de Arsénico por Generación de Hidruros en tejido orgánico. Esta actividad tiene un componente teórico y uno práctico, realizado en los laboratorios del CMQ. Informado en IAT N°2.

4.7 Formación de Capacidades en los Laboratorios Nacionales

Se dictaron los siguientes Seminarios

a) Estadística aplicada a Química Analítica. Informado en IAT N°2
b) Validación de Métodos Analíticos como herramienta para asegurar la calidad de los resultados en Química Analítica. Informado en el IAT N°2

5 Resumen de Actividades

Finalmente en la tabla se resume el estado de las actividades planificadas para alcanzar los objetivos del proyecto y que han sido informadas en el Sistema de Gestión de Proyectos.

Etapa 1. Diseño de la producción de Materiales de Referencia

Actividad	Comprometido	Informado	% cumplimiento de la Actividad
1. Revalidación de Métodos Analíticos	3 Quinolonas en músculo de cerdo	4 Quinolonas en músculo de cerdo	+ 100%
	3 Quinolonas en pollo	4 Quinolonas en pollo	
	3 metales en carne de ave	3 metales en pollo	
2. Diseño de la Preparación de los MR Definidos	Grupo 1. 3 Metales pesados en carne de ave	Grupo 1. 3 Metales pesados en carne de ave	+ 100%
	Grupo 2. 3 Quinolonas en carne de ave	Grupo 2. 4 Quinolonas en carne de ave	
	Grupo 3. 3 Quinolonas en carne de cerdo	Grupo 3. 4 Quinolonas en carne de cerdo	
3. Reuniones Internas de los Profesionales del CMQ	Reunión semanal de los profesionales del CMQ de análisis y discusión de resultados	Obtenido	100%
4. Obtención de la materia prima para la producción de los Materiales de Referencia.	Materia prima para la preparación de los MR	Obtenido	100%
5. Informe de Avance	Entrega del Informe de avance N°1	Obtenido	100%
6. Generación de Capacidades en los profesionales del CMQ	Visita de un profesional del CMQ a un Centro de Referencia internacional	Obtenido	100%
7. Pasantías en los Laboratorios del CMQ	Una pasantía en el CMQ, de Transferencia tecnológica	Obtenido	100%
8. Formación de Capacidades en los Laboratorios Nacionales	Un seminario orientado a fortalecer las capacidades de medición de los laboratorios nacionales	Obtenido	100%

Etapa 2. Preparación y Certificación de Materiales de Referencia

Actividad	Comprometido	Informado	% cumplimiento de la Actividad
1 Preparación de los Materiales de Referencia descritos en la Etapa 1	3 Quinolonas en músculo de cerdo	4 Quinolonas en músculo de cerdo	+ 100%
	3 Quinolonas en pollo	4 Quinolonas en pollo	
	3 metales en carne de ave (1)	3 metales en músculo de ave	
2. Formación de Capacidades en los Laboratorios Nacionales	Un seminario orientado a fortalecer las capacidades de medición de los laboratorios nacionales	Obtenido	100%
3. Fortalecimiento de las Capacidades en los profesionales del CMQ	Un profesional del CMQ habrá desarrollado nuevas competencias	Obtenido	100%
4. Asignación del valor de referencia al MR	6 MR con valor de referencia asignado	Obtenido	100%
5. Informe de Avance	Informe de Avance N°2- IAT N°2 entregado en Marzo de 2010	Obtenido	100%
6. Pasantía en los laboratorios del CMQ(1)	1 pasantía en el CMQ, de transferencia tecnológica.	Justificado	-

Nota (1): esta actividad se informa en el IAT N°3

Etapa 3. Definición de Estabilidad de los Materiales de Referencia [2]

Actividad	Comprometido	Informado	% cumplimiento de la Actividad
1 Evaluación de la Estabilidad de los MR	Estabilidad definida para los 9 residuos que conforman los Materiales de Referencia comprometidos.	4 Quinolonas en músculo de cerdo 4 Quinolonas en pollo 3 metales en músculo de ave	+ 100%
2. Asignación del valor de referencia al MR	Valor de Referencia asignado a los 3 residuos restantes que conforman los Materiales de Referencia comprometidos	4 Quinolonas en músculo de cerdo 4 Quinolonas en pollo 3 metales en músculo de ave	+ 100%
3. Fortalecimiento de las Capacidades en los profesionales del CMQ	Un profesional del CMQ especializado en aspectos técnicos específicos relacionados con el respaldo metrológico a la producción de MR en otras matrices.	Obtenido	100%
4. Organización de Ensayos de Intercomparación por el CMQ para los Laboratorios Nacionales que analizan residuos en alimentos	Organización y realización por el CMQ de 9 ensayos de Intercomparación a nivel nacional	Obtenido	No corresponde al 100%, se justifica en el IAT N°3
5. Pasantía en los laboratorios del CMQ	Una pasantía en el CMQ de transferencia tecnológica	Obtenido	100%
6. Formación de Capacidades en los Laboratorios Nacionales	Un seminario orientado a fortalecer las capacidades de medición de los Laboratorios Nacionales	Obtenido	100%
7. Informe Técnico Final	Informe Final del proyecto entregado	Obtenido	100%

Nota (2): estas actividades se informan en el IAT N°3

6 Conclusiones

Este proyecto ha permitido desarrollar herramientas metrológicas para un sector exportador clave del país, como es el agropecuario. Los laboratorios nacionales cuentan hoy con Materiales de Referencia de Quinolonas y metales pesados en músculo de ave, y de Quinolonas en músculo de cerdo.

Los Materiales de Referencia son un instrumento internacionalmente válido en el ámbito de las determinaciones analíticas para evaluar desempeño de un laboratorio de ensayo. El proyecto ha permitido que los laboratorios conozcan la calidad de sus resultados en la cuantificación de estos residuos en las matrices de interés. Con esta información pueden iniciar acciones que les permita alcanzar la calidad necesaria para respaldar adecuadamente las certificaciones que realizan.

Es posible concluir por tanto que el proyecto ha cumplido con sus objetivos, como se muestra en este documento. Además permitió incluir una Quinolona adicional que no estaba contemplada en el Proyecto, como es el caso de la Flumequina.

Es muy importante señalar además que este Proyecto permitió realizar una publicación llamada "Validation of a Liquid Chromatography -Fluorescence Spectrometric Method for the Quantification of four Quinolones in Pig and Chicken Muscle following the European Union Guideline EC/657/2002" publicada en J. Chil. Chem. Soc.,56, N°1 (2011), en la cual se destaca que este ha sido financiado por INNOVA, CORFO. En el anexo se adjunta una copia.

7 Anexo

J. Chil. Chem. Soc., 56, N° 1 (2011)

VALIDATION OF A LIQUID CHROMATOGRAPHY-FLUORESCENCE SPECTROMETRIC METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF FOUR QUINOLONES IN PIG AND CHICKEN MUSCLE FOLLOWING THE EUROPEAN UNION GUIDELINE EC/657/2002

Y. VASQUEZ-MARTINEZ, L. VILLEGAS R., A. VILLA AND G. MASSIFF

Centre for Chemical Metrology (CMQ) - Fundación Chile, Santiago; Chile
(Received: July 21, 2010 - Accepted: January 6, 2011)

ABSTRACT

Quinolones are a group of structurally related antibacterial compounds. Over the last years their use in animal production has been greatly increased. This increase can cause the resistance of bacteria. In order to protect human health the European Union (EU), as well as other countries, has established Maximum Residue Limits (MRL) for these antibacterial agents in several foods. Among these foods, pig and chicken muscle have different MRLs in the sub-ppm range.

A liquid chromatography-fluorescence spectrometric method has been developed and validated for the simultaneous assessment of four of the most used quinolones in edible animal matrices production. Simultaneous quantification of enrofloxacin, ciprofloxacin, oxolinic acid and flumequine was achieved by a method involving an initial aqueous extraction step followed by a solid-liquid-phase extraction using reverse-phase columns (C-18) and a final injection of all quinolones in a single chromatographic run using HPLC-Fluorescence detection. Nalidixic acid was used as internal standard.

In addition to the description of the analytical method developed for the quantification of the studied quinolones, the different validation parameters of this method according to Commission Decision EC /657/2002 of the EU are presented and discussed.

Keywords: Quinolones, pig and chicken muscle, HPLC-fluorescence detection

INTRODUCTION

Quinolones are antibacterial compounds with a high activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria including those that are already resistant to β-lactames and sulphonamides antibiotics[1]. This group of structurally related compounds is usually divided into two categories. The first includes the compounds containing a pyridine-carboxylic acid group combined with an aromatic or heteroaromatic ring such as flumequine, oxolinic acid and nalidixic acid. These latter compounds show a moderate activity against Gram-negative bacteria. A second category includes the fluoro-quinolones, which have a fluorine atom attached to the C-6 position and a piperazynil group in the C-7 position. Typical compounds in this second category are ciprofloxacin, enrofloxacin, and levofloxacin, which show a broad spectrum against Gram-negative, Gram-positive bacteria and mycoplasma[2].

These antibacterial properties have made this group of compounds powerful agents in the treatment of animal infections[3]. The administration of quinolones to animals such as pigs and chicken that are produced for human consumption can result in the presence of residues in the animal tissues which, in turn, might result in a hazard for the consumer[4]. Specifically, reports have been published on the strong relationship between the use of quinolones in salmon production and the development of a resistance to *Campylobacter jejune* caused infection in humans[5].

Taking into account the potential hazards that residues of quinolones in edible animal matrices can cause, international institutions such as the Japan regulatory agency (The Japan Research Chemical Foundation, MHLW), and the European Union regulatory agency (Commission of the European communities) have established Maximum Residue Limits (MRL) for these compounds.[6,7]

Table 1 show the MRLs for some quinolones in pig and chicken muscle established in different countries.

Table 1: Maximum allowed concentration (mg/kg) limits for four quinolones in pig and chicken muscle.

Compound	European Union		Japan	
Animal matrix	Chicken (mg/kg)	Pig (mg/kg)	Chicken (mg/kg)	Pig (mg/kg)
Ciprofloxacin + Enrofloxacin	0.1 for the sum of the concentrations of both compounds	Same as for chicken	0.05 for the sum of the concentrations of both compounds	Same as for chicken
Oxolinic acid	0.1	0.1	0.03	0.02
Flumequine	0.4	0.2	0.5	0.5

Several detection methods such as ultraviolet (UV), fluorescence or mass spectrometry (MS) are used in combination with liquid chromatography (LC) for the determination of quinolones. Earlier methods used UV almost exclusively[8,9] but more recently fluorescence detection has been preferred[10,11,12,13]. On the other hand, LC with MS is also used at the international level since this technique has a higher sensitivity and selectivity and is particularly suited for multi-residue determination in complex matrices[14,5,6,7,8].

The present paper reports on the analytical method based on LC with fluorescence (LC-Fl) deetection and its validation according the scheme suggested by European Union guideline EC/657/2002. However, the development of an analytical procedure based in LC-MS and its validation was also successfully carried out in our laboratory. This study will be reported elsewhere.

EXPERIMENTAL

Reagents and chemicals

The quinolone calibration standards were purchased to the Company "Dr Ehrenstorfer Gmbh" (Augsburg, Germany) and the corresponding control standards and internal standard (nalidixic acid) were obtained from Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). All chemicals used were either HPLC grade or analytical grade from Merck (Darmstadt, Germany).

Stock standard and control solutions of 100 mg kg^{-1} were gravimetrically prepared from the high purity solid compounds in a NaOH in methanol (100μL NaOH aqueous solution 1M / 100 mL) solution. Intermediate multi-standard and control solutions (2.5 mg kg^{-1}) were gravimetrically prepared from the stock solutions in phosphate buffer pH 7.4. Internal standard (nalidixic acid) solutions were prepared in a similar way.

Standard samples of the pig and chicken muscle matrices were used for the preparation of calibration curves in a concentration range 0.025-0.200 mg kg^{-1}. These calibration standards were prepared from pig and chicken samples purchased at a local market in Santiago (blank tissue). After the manual elimination of fat and connective tissue with the aid of a knife, a homogeneous paste (homogenate) of the edible matrices was obtained using a food processor. These samples were stored at - 20°C until the validation study was started. The homogenate was spiked to yield five different concentrations (0.025-0.2 mg kg^{-1}) adding five different aliquots of the multi-standard solution. Six control samples were prepared spiking the pig and chicken homogenates with the multi-standard control solution in order to obtain a concentration value near the European Union MRL (0.1 mg kg^{-1}) and another six control samples were similarly prepared at half the European MRL (0.05 mg kg^{-1}). The fortified samples were allowed to stand in the dark for 30 min at room temperature before starting the extraction procedure.

Extraction and clean-up

The extraction procedure that is described below for the pig and chicken matrices was carried out on the blank samples and the fortified samples as well.

Pig. To an amount of 4± 0.01 g of previously spiked homogenate, 9ml of

e-mail: yvasquez@fundacionchile.cl

a 5% trichloroacetic acid (TCA) aqueous solution were added[19]. This mixture was thoroughly homogenized in a vortex for 1 minute. Then, the homogenate was placed in an orbital shaker at 20°C during 10 minutes and centrifuged at 2325x*g* for 10 minutes at 4°C. The supernatant was saved and the pellet was extracted again following the same procedure as described in the previous paragraph. Both supernatants were charged into Oasis C-18 columns (200 mg) and 6 ml capacity previously conditioned with 6 ml methanol and 6 ml water and washed with 10 ml water. Quinolones were eluted with 3 ml of a mixture methanol-ammonia (75%-25%).[11, 28] Samples were evaporated under nitrogen stream at 35°C reaching almost dryness, the residue was dissolved in 600 µL aqueous formic acid (0.4% v/v) and filtered through a 0,22 µm PVDF membrane. The internal stardard was added and the samples were diluted to 1±0,01 g with aqueous formic acid (0,4% v/v) before injecting 100 µL into the LC-Fl system.

Chicken. The extraction and clean-up procedure was exactly the same as the one described above for pig with only one minor change: milli-Q water (20 ml) is first added to 4 grams of chicken homogenate instead of TCA.[20, 21]

Instrumentation

The HPLC apparatus comprised a 1200 series quaternary pump and a thermally stabilized autosampler from Agilent (Santa Clara, CA, USA) equipped with a fluorescence detector and DAD and an acquisition and data analysis program "ChemStation". Chromatographic separation was achieved using an X-Terra RP-18 (3.5 µm, 150 x 4.6 mm) Waters (Milford, USA) and a Waters pre-column RP-18 (3.5 µm, 3.9 x 20mm). The mobile phase consisted of a mixture of a 0.05 M sodium phosphate buffer; pH 3 (A) with acetonitrile (B). A linear gradient was run (82% A for 5 min; 67% A over the next 10min, and finally 82% A for 3 additional min) at a flow rate of 1 ml/min.

Fluorescence excitation wavelength was at λ_{exc} 280 nm and emission wavelength at λ_{em} 450nm during the first 9 minutes of the run and at λ_{exc} 310 nm and λ_{em} 360 nm from 9 to 27 min.

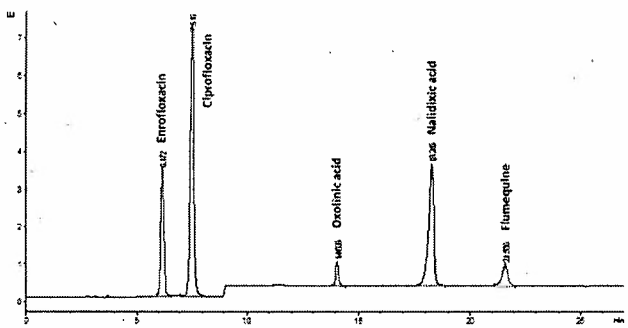

Fig 1: Chromatogram showing the retention times of quinolones in solution.

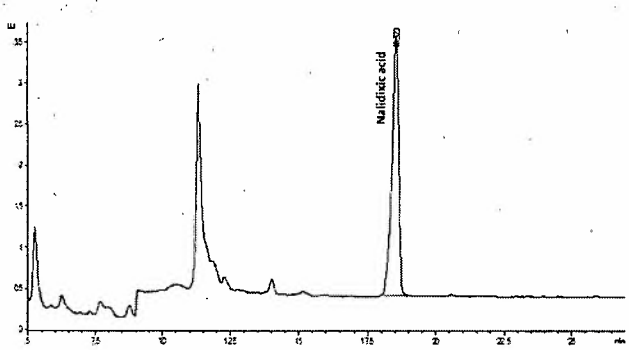

Fig 2: Chromatogram showing chicken blank with adition of nalidixic acid as internal standard

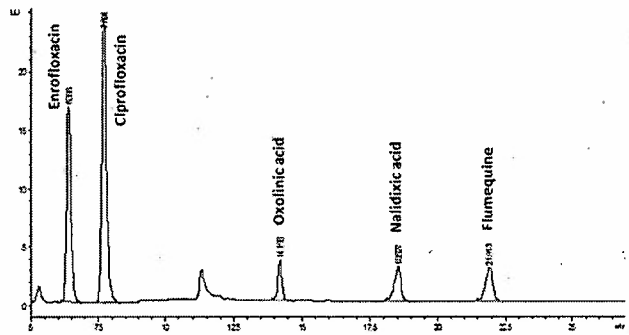

Fig 3: Chromatogram showing a chicken sample fortified to 100ppb with adition of nalidixic acid as internal standard

Validation Scheme

The simultaneous assessment of low concentrations of four quinolones in pig and chicken muscle can be performed using the LC-Fl method described in the previous section. The method validation was carried out following the requirements of the European Union guidelines EC/657/2002[22]. This implies carrying out the complete extraction, purification and quantification procedures in three different days at sample concentrations near the MRL and at half the MRL. In each of these 3 days 26 samples were prepared: 3 blank samples (non-spiked pig and chicken homogenates); 5 calibration samples; 6 standard samples for bracketing assessment (2 low-; 2 medium- and 2 high-concentration standards); 6 control samples at half the MRL and 6 control samples at (or very near) the MRL.

The assignment of "blank samples" to the commercially available pig and chicken used in this study was checked chromatographically, i.e., no detectable signals were obtained at the retention times of the four studied quinolones and the internal standard.

The studied validation parameters included: Linearity of calibration curves within an appropriate range in different days; recovery of spiked samples; within-laboratory reproducibility precision; decision limit (CC_α), capability of detection (CC_β); uncertainty; and limits of detection and quantification.

RESULTS AND DISCUSSION

Calibration linearity and repeatability precision

The calibration curves obtained on three separate days for the four quinolones under study for the spiked pig and chicken samples were linear in the concentration range 0.005-0.200 mg kg^{-1}, thus including ½ MRL and the MRL for all of them. In all cases the slopes and intercepts for each compound in each matrix were essentially the same on the three different days and the coefficients of determination were ≥ 0.989.

Quantification of each quinolone was made using the bracketing technique once the linearity of response from concentration was verified. This technique avoids the instrumental drift errors since the sample concentration is obtained from the interpolation between low and high standard values, which bracket the sample concentration. The average values (N=6, for each day) obtained at ½ MRL and at the MRL together with their corresponding coefficient of variation are shown in Table 2.

Table 2. Average values (μg Kg^{-1}) and coefficients of variation of control samples at ½ MRL and at the MRL for enrofloxacin, ciprofloxacin, oxolinic acid and flumequine in pig and chicken muscle.

Analyte	Day	½ MRL		MRL	
		Pig	Chicken	Pig	Chicken
		Average (CV%) (μg kg^{-1})	Average (CV%) (μg kg^{-1})	Average (CV%) (μg kg^{-1})	Average (CV%) (μg kg^{-1})
Enrofloxacin	1	39.95 (5.7)	44.42 (2.6)	81.85 (7.3)	87.34 (4.4)
	2	40.71 (1.8)	44.10 (3.5)	88.62 (2.2)	88.96 (3.1)
	3	42.56 (4.4)	41.28 (7.5)	87.31 (3.4)	82.92 (4.2)
Ciprofloxacin	1	43.69 (5.5)	50.28 (3.3)	90.53 (6.2)	97.70 (3.4)
	2	44.73 (1.1)	47.19 (4.2)	95.33 (2.5)	95.90 (3.3)
	3	47.50 (4.5)	47.11 (3.8)	96.16 (2.6)	95.15 (5.0)
Oxolinic Acid	1	43.00 (9.1)	40.77 (3.8)	80.60 (8.9)	80.90 (4.3)
	2	42.18 (5.6)	41.35 (3.5)	88.99 (3.3)	81.51 (4.4)
	3	34.95 (14.4)	39.21 (8.4)	81.64 (5.7)	81.72 (2.6)
Flumequine	1	39.24 (4.1)	44.37 (2.3)	76.83 (11.4)	91.74 (4.1)
	2	40.21 (2.1)	41.87 (3.8)	88.10 (2.0)	82.81 (4.7)
	3	41.43 (4.5)	42.30 (6.1)	87.43 (6.8)	87.56 (4.5)

From the results shown in Table 2 it can be seen that the simultaneous quantification of the four quinolones under study can be conveniently accomplished by this method and that the repeatability precision (CV%) is satisfactory for these low concentration values.

Within-laboratory reproducibility precision

The within-laboratory reproducibility precision (N=18) was evaluated by means of a χ^2 test according to ISO 5725[23]. The calculated χ^2 parameter is compared with a critical χ^2_{table}.

Each of these values is obtained from equations 1 and 2, respectively:

$$\chi^2 = \left(\frac{S_w}{\sigma_w}\right)^2 \qquad (1)$$

$$\chi^2_{table} = \left[\frac{\chi^2_{n-1;0.05}}{n-1}\right] \qquad (2)$$

Where Sw is the reproducibility standard deviation, σ_w is the required standard deviation and $\chi^2_{(n-1);0.05}$ is the value found in a χ^2 table for the corresponding degrees of freedom. If $\chi^2 < \chi^2_{table}$ it is concluded that there is no statistical evidence that the method does not have the required precision[23]. Since there are no official reported requirements on an acceptable precision for this type of analysis and considering that the precision level established through the Horwitz equation[24] is unacceptably high a rather stringent CV of 10% was selected as σ_w.

Applying the χ^2 test to the within-laboratory reproducibility standard deviation data for each of the four quinolones, in both edible matrices, at ½ MRL and at the MRL concentrations the results show that in all cases the precision was as good as required.

Recovery (accuracy) tests

Since there are no certified reference materials for the quinolones in animal muscle matrices a direct accuracy or bias test cannot be performed. The accepted way for indirectly testing accuracy of a method is to perform recovery experiments on blank-spiked samples[22]. The average recovery (R) is given by equation 3:

$$R = \frac{C_{obs}}{C_{prep}} x100 \qquad (3)$$

Where C_{obs} is the average concentration found in antibiotic spiked samples and C_{prep} is the antibiotic concentration added to the previously measured samples. In order to evaluate the recovery, it is necessary to assess whether the R value is significantly different than 1 (100% recovery). Thus, a calculated t value is compared with a critical t value. The values for each of both t values are obtained from equations 4 and 5.

$$t = \left[\frac{(R-1)}{u_R}\right] \qquad (4)$$

$$t_c = t_{table(n-1;0.05)} \qquad (5)$$

If $t_{calc.} < t_{crit.}$ There is no statistical evidence that R is different than 1. Table 3 shows the recovery results obtained at ½ the MRL and at the MRL concentrations on 3 separate days for the four quinolones, in pig and chicken muscle.

Table 3. Recovery of the method for the four quinolones in pig and chicken tissue

Analyte	Day	Pig		Chicken	
		% R MR	% R at MRL	% R MRL/2	% R MRL
	1	102	95	103	102
Enrofloxacin	2	103	105	102	104
	3	98	102	95	96
	1	108	102	111	108
Ciprofloxacin	2	110	109	103	106
	3	106	109	102	105
	1	107	91	99	96
Oxolinic Acid	2	104	102	97	97
	3	80	93	91	96
	1	97	87	98	103
Flumequine	2	99	101	92	93
	3	92	99	93	97

The corresponding statistical test was made for each of the results shown in Table 3. The Recovery (R) was not significantly different than 1 in almost all of

the cases, with only 3 exceptions, which were marginally different than 1. Thus, it can be concluded that the indirect assessment of the accuracy of the proposed analytical method by means of recovery assays is satisfactory. Moreover, the results obtained are in line with the proposed recovery values suggested at the EU guidelines[22] stating that for samples spiked at concentrations above 10 µg kg^{-1} the recoveries of a confirmation method should range between 80 to 110%.

Decision limit (CC_α) and capability of detection (CC_β)

The decision limit (CCα) is defined as the limit at and above which it can be concluded with an error probability of α (1% for substances with non permitted limits and 5% for substances with a permitted limit as the MRL) that a sample is non-compliant. On the other hand, the capacity of detection (CCβ) is defined as: the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β (5% for all substances with permitted or no permitted limit).

In our case, the quinolones under study have a MRL (a permitted limit). Thus, the EU guidelines[22] recommend the use of equations 6 and 7 for the evaluation of CCα and CCβ:

$$CC\alpha = C_{MRL} + 1.64\ SD_{20\ \text{representative samples spiked at MRL level}} \quad (6)$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1.64\ SD_{20\ \text{representative samples spiked at CCα level}} \quad (7)$$

Where C_{MRL} is the concentration at the MRL (or alternatively, at ½ the MRL) and SD_{20} is the reproducibility standard deviation of samples spiked at the MRL level. In this study, our validation scheme (see Experimental) included 18 representative spiked samples for each of the quinolones, at ½ MRL and at the MRL and at each of the matrices (pig and chicken muscle). The values for CCα and CCβ experimentally obtained for pig and chicken muscle samples are summarized in Table 4 and 5.

Table 4. Decision limit and detection capability of four quinolones at ½ MRL and at the MRL for pig muscle, together with the corresponding reproducibility coefficient of variation (%).

Analyte	½ MRL		MRL	
	CCα µg kg^{-1}	CCβ µg kg^{-1}	CCα µg kg^{-1}	CCβ µg kg^{-1}
Enrofloxacin	53.4	56.8	104.5	109.0
Ciprofloxacin	54.3	58.6	107.6	115.2
Oxolinic Acid	59.3	68.7	110.8	121.7
Flumequine	52.9	55.8	113.9	127.8

Table 5. Decision limit and detection capability of four quinolones at ½ MRL and at the MRL for chicken muscle, together with the corresponding reproducibility coefficient of variation (%).

Analyte	½ MRL		MRL	
	CCα µg kg^{-1}	CCβ µg kg^{-1}	CCα µg kg^{-1}	CCβ µg kg^{-1}
Enrofloxacin	53.73	57.46	108.52	117.05
Ciprofloxacin	53.14	56.27	108.15	116.30
Oxolinic Acid	53.52	57.03	104.58	109.16
Flumequine	53.53	57.07	109.84	119.67

For all the values presented in Tables 4 and 5 the associated relative reproducibility standard deviation was less than 9%.

Evaluation of the measurement uncertainty

The uncertainty is a parameter associated with the result of a measurement that characterizes the dispersion of values that could be reasonably assigned to the measurement. In this study, quantification of the analytes was made using area and concentration ratios (analyte/internal standard). When area ratios are used for the quantification process the uncertainty of the sample concentration is concisely described as follows:

RC is defined as the analyte/internal standard concentration ratio and RA is the corresponding peak area ratio. Therefore, the associated uncertainty is given by the combination of the uncertainties of each of those concentrations using the law of error propagation. In this way, the uncertainty of RC is obtained from equation 8:

$$u\left(\frac{C_{low-std}}{C_{IS}}\right) = \frac{C_{low-std}}{C_{IS}} \times \sqrt{\left(\frac{u_{C.low-std}}{C_{low-std}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C.IS}}{C_{IS}}\right)^2} \quad (8)$$

On the other hand, in order to estimate the uncertainty associated with the RA values it is necessary to calculate first the ratio of analyte/internal standard areas for each measurement. Then, the uncertainties area ratios are calculated as the standard deviation of the mean value of the ratios obtained in each step divided by the square root of n, which is the number of measurements.

$$u_{RA} = \frac{SD_{\overline{RA_n}}}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

The sample concentration uncertainty is carried out combining the standard uncertainty of the sample/internal standard concentration ratio with the standard uncertainty of the internal standard concentration. Finally, the sample concentration standard uncertainty is calculated from equation 10.[25]

$$u(C_{sample}) = \sqrt{\left(\frac{u_{RA(sample)}}{RA_{(sample)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{RA(low.std)}}{RA_{(low.std)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{RA(high.std)}}{RA_{(high.std)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C(low.std)}}{C_{(low.std)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C(high.std)}}{C_{(high.std)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-SI(low.std)}}{C_{SI(low.std)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-SI(high.std)}}{C_{SI(high.std)}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-SI(sample)}}{C_{SI(sample)}}\right)^2} \quad (10)$$

These mathematical calculations are performed using a Kragten spreadsheet[26]

Table 6. Average (3-day results) relative percentage standard uncertainty values for quinolones concentrations in chicken and pig muscle at ½ MRL and MRL values.

Analyte	Pig		Chicken	
	RU(%) at ½ MRL	RU(%) at MRL	RU(%) at ½ MRL	RU(%) at MRL
Enrofloxacin	5.2	6.3	5.1	5.0
Ciprofloxacin	6.6	6.2	5.7	6.3
Oxolinic acid	10.5	7.2	6.3	6.3
Flumequine	6.8	9.0	5.2	4.8

Typical standard uncertainties for these analytes in pig and chicken muscle have not been reported. However, the relative percentage standard uncertainty values obtained in this study, which are shown in Table 6; appear to be satisfactory when compared with the reported uncertainties for these compounds in several other matrices.[1,27,28]

Evaluation of the limits of detection (LoD) and quantification (LoQ)

The limit of detection is defined as the minimum amount of substance that can be detected at a given confidence limit (usually 95%) but not necessarily accurately quantified. It is generally reported as a concentration or amount of substance and it is derived from the smallest signal that can be detected with a reasonable certainty for a particular analytical method.

The limit of quantification is defined as the amount of analyte that can be quantitatively determined with an acceptable level of trueness and repeatability precision. It is also reported as a concentration or amount of substance.

In the present study the LoD and LoQ values were estimated from the analysis of 9 blank samples of pig and chicken muscle, assessing the standard deviation of the average signals at the retention times of each of the quinolones. The value of 3 times the corresponding standard deviation extrapolated from a calibration curve built with the signal intensity versus concentration of 5 samples fortified at different concentration levels provides an estimation of LoD.

The LoQ is obtained from the same calibration curve described in the above paragraph as 10 times the standard deviation of the average value of the blank signals. The values obtained are summarized in Table 7.

Table 7. Limits of detection and quantification for the analyses of quinolones in pig and chicken muscle using the developed LC-Fl method.

Analyte	Pig		Chicken	
	LoD (μg kg^{-1})	LoQ (μg kg^{-1})	LoD (μg kg^{-1})	LoQ (μg kg^{-1})
Enrofloxacin	1.3	4.3	1.2	2.0
Ciprofloxacin	1.1	3.8	2.7	5.3
Oxolinic Acid	4.1	13.5	13.0	18.4
Flumequine	2.4	8.0	13.2	17.0

As expected, the detection and quantification limits determined for oxolinic acid and flumequine are higher than those obtained for enrofloxacine and ciprofloxacine (Table 7). This is mainly due to the fact that the latter quinolones show a smaller instrumental response at their optimal excitation and emission wavelengths than those belonging to the fluoroquinolones group. This can be seen in figures 1-3. The differences between the LoD and LoQ of oxolinic acid and flumequine in both matrices might be explained by the fact that the impurities removal procedure in the pig matrix is more efficient than the corresponding chicken matrix.

CONCLUSIONS

A LC-Fl multiresidue method was developed that is able to simultaneously identify and quantify four quinolones in pig and chicken muscle. A simple and rapid extraction and clean-up method was used for the latter matrices as compared with other methods reported in the literature[11,29].

This method provides satisfactory results in terms of its working range, recovery, precision and uncertainty. Values of these latter validation parameters are comparable to those reported in the literature.[1,27,28]

Values of CCα and CCβ obtained for the four quinolones in both food matrices are very close to the MRL value with variability lower than 8%; a result that indicates its reliability. In all cases the limits of detection are much lower than ½ the MRL.

The proposed method appears to be suitable for routine analysis in field laboratories taking into account that it can be completely carried out during one working day. However, caution is recommended before implementing modifications to the experimental conditions described in this report.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out with the support of CORFO, Chile through a grant INNOVA 07CN1312M-95

REFERENCES

1. A. Posyniak, K. Mitrowska, Bulletin Veterinary Institute in Pulawy, 52, 427-430, (2008).
2. M. Naem, K. Khan, S. Rafiq, Journal of Applied Science, 2, 373-379, (2006).
3. B. Delepine, D. Hurtaud-Pessel, P. Sanders. The Analyst, 123, 2743-2747, (1998).
4. European Medicines Agency veterinary Medicines and Inspections. EMEA/CUMP/SAGAM/184651/2005. Consultation Committee for medicinal products for veterinary use. Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food producing animals in the European Union: Development of resistance and impact on human and animal health.
5. S. Zhao, H. Jiang, X. Li, T. Mi, C. Li, J. Shen, Journal of Agricultural Food Chemistry, 55, 3829-3834, (2007).
6. Council Regulation 37/2010 of European Communities.
7. Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods, The Japan Food Chemical research Foundation, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html).
8. J. Hernandez-Arteseros, J. Barbosa, R. Compaño, M. Prat, Journal of Chromatography A, 945, 1-24, (2002)
9. M. Ramos, A. Aranda, E. García, T. Reuvers, H. Hooghuis, Journal of Chromatography B, 789, 373-381, (2003).
10. N. Sultana, M. Saed, N. Shafi, A. Naz, S. Naz, H. Shamdhad, Journal of the Chilean Chemical Society, 54, 358-362, (2009).
11. J. Yorke, P. Froc, Journal of Chromatography A, 882, 63-77, (2000).
12. O. Idowu, J. Peggins, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 35, 143-153, (2004).
13. M. Marazuela, Moreno-Bondi M., Journal of Chromatography A, 1034, 25-32, (2004).
14. B. Toussaint, G. Bordin, Janosi A., Rodriguez A., Journal of Chromatography A, 976, 195-206, (2002).
15. L. Johnston, L. Mackay, M. Craft, Journal of Chromatography A, 982, 97-109, (2002).
16. G. van Vyncht, A. Janosi, G. Bordin, G. Toussaint, E. Maghuin-Rogister, E. De Paw, A. Rodriguez, Journal of Chromatography A, 952, 121-129, (2002).
17. S. Turnispseed, J. Roybal, A. Pfenning; P. Kijak, Analytica Chimica Acta, 483, 373-386, (2003).
18. M. Schneider, D. Donoghue, Journal of Chromatography B, 780, 83-92, (2002).
19. E. Verdon, P. Couedor, B. Roudaut, P. Sandérs, Journal of AOAC International, 88, 1179-1192, (2005).
20. N. Van Hoof, K. de Wasch, L. Okerman, W. Reybroeck, S. Poelmans, H. Noppe, H. Brabander, Analytica Chimica Acta, 529, 265-272, (2005).
21. A. Stocker, U. Brinkman, Journal of Chromatography A, 1067, 15-53, (2005).
22. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. OJ 2002, L221, 8-36.
23. ISO 5725 (1 to 6): Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, (1994).
24. W. Horwitz, Analytical Chemistry, 54, 67A-76A, (1982).
25. Guías ISO GUM JCGM100: 2008, JCGM101:2008, JCGM104:2009.
26. J. Kragten, Analyst, 119, 2161-2165, (1994).
27. L. Johnston, L. Mackay, M. Croft, Journal of Chromatography A, 982, 97-102, (2002).
28. R. Galarini, L. Fiorini, F. Angelucci, G. Tovo, E. Cristofani, Journal of Chromatography A, 1216, 8158-8164, (2009).
29. A. Juan-García, G. Font, Y Pico. Electroforesis, 27, 2240-2249, (2006)-

Informe: INFORME FINAL

Proyecto: **DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE MATERIALES DE REFERENCI (07CN13IZM-95 / 07CN13IZM-95)**
Evento: **XIII CONCURSO NACIONAL**
Institución: **FUNDACION CHILE**
Usuario: **GABRIELA MASSIFF DE LA FUENTE (FUNDACION CHILE)**

InnovaChile CORFO

Etapa 1

DISEÑO DE LA PRODUCCION DE MATERIALES DE REFERENCIA
Esta etapa contempla la revalidación de los métodos analíticos necesarios para la asignación del valor de referencia de los analitos que componen los materiales de referencia, a través de técnicas confirmatorias como HPLC-MS-MS; GC-MS e ICP-MS. Además se deberán desarrollar los diseños experimentales o protocolos técnicos según corresponda para enfrentar cada una de las etapas del proceso de producción de materiales de referencia.
El proyecto incluye el desarrollo y la preparación de los siguientes grupos de materiales de referencia: Grupo1: 3 Metales pesados en carne de ave. Grupo 2 : 3 Quinolonas en carne de ave. Grupo 3: 3 Quinolonas en carne de cerdo
Fecha de Inicio Programado: **05 Aug 2008**, Fecha de Inicio Real:
Fecha de Término Programado: **04 Aug 2009**, Fecha de Término Real:

ACTIVIDADES	Inicio	Término	Inicio real	Término real	Desviación de termino
1 - REVALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS Serán revalidados los métodos para la certificación de los MR, esto significa que se aplicará el mismo esquema de extracción usado en las técnicas anteriormente validadas en el Centro pero se cuantificará con técnicas como ICP-MS o HPLC-MS-MS o GC-MS según corresponda. Se determinarán los parámetros de desempeño del método usado con estas nuevas técnicas (ccalfa, ccbeta, sesgo, precisión, incertidumbre, porcentaje de recuperación, robustez,etc)	05 Aug 2008	05 May 2009	05 Aug 2008	30 Jun 2009	56 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°1 Anexo N°1; ANEXO N°2 y Anexo N°3
Observación:
Se realizó la re-validación de la Determinación de los siguientes residuos en alimentos usando técnicas confirmatorias: (a) 4 Quinolonas en musculo de cerdo por HPLC-Ms/Ms (Ácido Oxolinico, Enrofloxacina, Ciprofloxacina y Flumequina);(b) 4 Quinolonas en pollo por HPLC-Ms/Ms (Ácido Oxolinico, Enrofloxacina, Ciprofloxacina y Flumequina); y (c) Plomo en pollo por ICP-MS
Estaba definido realizar 3 quinolonas en musculo de cerdo y 3 quinolonas en carne de pollo finalmente se revalidaron 4 quinolonas en musculo de cerdo y 4 quinolonas en carne de pollo, es decir, 2 quinolonas adicionales.

Hitos de la actividad 1

1 - MÉTODOS REVALIDADOS
Revalidación de 9 métodos usando técnicas confirmatorias de alto desempeño para la asignación del valor de referencia.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Se realizó la revalidación de 9 métodos analiticos por técnicas confirmatorias: (*) por HPLC-Ms/Ms :Ácido Oxolinico, Enrofloxacina, Ciprofloxacina y Flumequina en musculo de cerdo; Ácido Oxolinico, Enrofloxacina, Ciprofloxacina y Flumequina en pollo. (*) por ICP/Ms Plomo en pollo. en resumen 8 métodos para la determinación de residuos veterinarios en carne y 1 método para la determinación de plomo en pollo
Anexo complementario : IAT N°1 Anexo N°1;Anexo N°2 y Anexo N°3

2 - DISEÑO DE LA PREPARACIÓN DE LOS MR DEFINIDOS Esta actividad contempla el estudio preliminar de las variables relevantes para la preparación y asignación del valor de referencia de los MR. Dentro de esto, se incluye a) Definir el material de partida para la preparación de cada MR b) Definir los diseños experimentales de: * Preparación, * Envasado y almacenamiento, * Estudio de Homogeneidad, * Proceso de Asignación del Valor de Referencia, * Estudio de Estabilidad	05 Aug 2008	04 Jun 2009	05 Aug 2009	23 Sep 2009	111 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°2 Anexo N°1
Observación:
Se realizó el diseño de la preparación de: (a) Material de Referencia (MR) de Quinolonas en carne de ave y (b) MR de metales en carne de ave.
Adicionalmente se informó en el IAT N°1 el diseño de preparación del MR de Quinolonas en músculo de cerdo. De este modo se

cuenta con el diseño de preparación para cada uno de los tres grupos considerados en el proyecto.

Hitos de la actividad 2

1 - INFORME DEL DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA PREPARACIÓN DE LOS MR DEFINIDOS
Diseño experimental o protocolos desarrollados para cada uno de los 3 grupos de MR

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Se desarrollaron los protocolos para cada uno de los tres grupos, en ellos se describen las etapas que considera la preparación del MR y los diseños a realizar para el estudio de la homogeneidad y la estabilidad.
Anexo complementario : IAT N°2

3 - REUNIONES INTERNAS DE LOS PROFESIONALES DEL CMQ Semanalmente se reunirán los profesionales del Centro para presentar el avance del trabajo experimental. De acuerdo a los resultados obtenidos se delinearán las estrategias a seguir.	05 Aug 2008	04 Aug 2009	05 Aug 2008	04 Aug 2009	0 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario :
Observación:
Las reuniones de los profesionales del Centro de Metrologia quimica se realizan semanalmente según consta en el cuaderno de actas de reuniones del CMQ.

Hitos de la actividad 3

1 - REUNIÓN INTERNA REALIZADA
Los profesionales del CMQ exponen sus resultados analíticos al resto del grupo y a la Dirección, para análisis y discusión.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Las reuniones internas de los profesioanles del CMQ se realizan con el objetivo propuesto. Las presentaciones son recopiladas por el Coordinador de Aseguramiento de Calidad.
Anexo complementario :

4 - OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE LOS MATERIALES DE REFERENCIA Según el analito del que se trate, éste puede presentarse en la matriz asociado a diferentes compuestos propios de ella, tales como proteínas o grasas. * Si esta asociación es fuerte, la materia prima obtenida deberá poseer el analito en forma natural, para que el MR sea representativo de muestras reales. *Si el analito no presenta asociaciones fuertes con compuestos de la matriz, es posible partir con materia prima que no posee el analito en forma natural, y fortificar este material adicionando en forma externa el compuesto.	05 Nov 2008	04 Aug 2009	05 Nov 2008	18 Dec 2009	136 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario :
Observación:
En una medición preliminar de quinolonas en carne de ave y musculo de cerdo no fue factible encontrar niveles de concentración adecuados para preparar un MR. Por este motivo la materia prima para la preparación de los MR consistió en carne de ave o musculo de cerdo con adición externa de quinolonas. Esto se realiza siguiendo un protocolo claramente definido.
Este barrido también fue realizado para la determinación de metales en carne de ave con resultados similares, es decir, la materia prima definida para una preparación de MR consiste en carne de ave con adición externa de una solución de metales.

Hitos de la actividad 4

1 - MATERIA PRIMA ENTREGADA POR UN ASOCIADO PARA LA PREPARACIÓN DE LOS MR
Que el asociado, en los tiempos definidos, no cumpla con el compromiso de proveer la materia prima.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : La materia prima fue obtenida comercialmente de un proveedor conocido, y el MR fue preparado por spike, es decir, adición externa del analito de interés.
Anexo complementario :

5 - INFORME DE AVANCE Informe de las actividades realizadas durante la Etapa	19 Apr 2009	19 Apr 2009	19 Apr 2009	19 Apr 2009	0 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°1
Observación:
Se envió el informe de avance N°1 en Marzo de 2009

Hitos de la actividad 5

1 - ENTREGA DEL INFORME DE AVANCE N°1
Envío del informe de avance N°1 con la información de las actividades realizadas a la fecha.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Envío del INforme de Avance N°1 con la información de las actividades realizads a la fecha
Anexo complementario : IAT N°1

6 - GENERACIÓN DE CAPACIDADES EN LOS PROFESIONALES DEL CMQ. Un Profesional del CMQ hará una visita a un Centro de Metrología internacional pertinente para conocer los procesos que se realizan en las distintas áreas requeridas para el proceso de producción de materiales de referencia.	05 Jun 2009	05 Jul 2009	05 Jun 2009	05 Jul 2009	0 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : Anexo 1;Anexo2;Anexo3 y Anexo4 del mail respuesta
Observación:
En Noviembre de 2009, dos profesionales del CMQ asisten a INMETRO (Centro de Metrología de Brazil) a una serie de actividades relacionadas con metrología química, entre ellas se destacan las siguientes:(a) workshop técnico sobre la estimación de KCRV (Key Comparison Reference Value) dictado por Maurice Cox (NPL) y Steve Ellison (LGC); (b) workshop técnico "Demonstrating the comparability of certified reference materials" dictado por el Dr. Duewer (NIST);
(c) reunión técnica del Grupo de Trabajo en Análisis Orgánico (OAWG) dirigido por el Dr. Willie May (NIST); (d) reunión técnica del Grupo de Trabajo en Análisis Inorgánico (IAWG) dirigido por el Dr. Mike Sargent (LGC); (e) reunion del SIM Chemical Metrology Working Group.; (f) workshop "SIM CMC Review Meeting" dirigido por la Dra. Reenie Parris (NIST)

Se adjunta la siguiente documentación:
• Anexo 1 Programa de la Reunión del CCQM donde se trataron los temas enunciados en a)
• Anexo 2 Programa de la reunión del grupo de orgánica OAWG, según se informa en c)
• Anexo 3 Programa de la reunión del grupo de inorgánica IAWG , según se informa en d); y Anexo 4 Lista de participantes del grupo de IAWG.

Hitos de la actividad 6

1 - VISITA REALIZADA
Un profesional del CMQ visita un Centro de Metrologia o un Laboratorio de Referencia internacional para conocer aspectos de la producción de MR

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : En las actividades realizadas en la visita de Carlos Gomez, profesional del CMQ, a INMETRO se destaca la relacionada con el workshop técnico "Demonstrating the comparability of certified reference materials" dictado por el Dr. Duewer (NIST). Se mostró un nuevo esquema de KC, en el cual se comparan "Materiales de Referencia Certificados". Se establece una especie de curva de calibración donde los "estándares" corresponden a los MRC de cada NMI. El análisis estadístico se basa en un modelo lineal funcional en el cual la estimación de los parámetros (pendiente e intercepto) es llevada a cabo por el método de máxima verosimilitud (functional relationship estimation by maximum likelihood FREML). Lo que se pretende con este esquema de KC es evaluar las competencias de cada NMI a través del producto final que recibe el cliente, es decir, de un MRC.
Anexo complementario :

7 - PASANTÍAS EN LOS LABORATORIOS DEL CMQ El CMQ transferirá mediante pasantías los métodos validados para la determinación de los residuos definidos en este proyecto (metales pesados, quinolonas) en matriz. Se hará una introducción teórica respecto de los fundamentos del método, del modelo de cuantificación y una demostración práctica del proceso de extracción. Esta pasantía incluye la discusión de los resultados obtenidos y el análisis de los parámetros de desempeño del método.	05 Jun 2009	05 Jul 2009	30 Jul 2009	31 Jul 2009	26 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : anexo 5 del mail respuesta
Observación:
En Julio de 2009 se realiza la actividad teórico-práctica denominada " Espectrometría de Absorción Atómica: Puntos Críticos de la Determinación Analítica y Aseguramiento de calidad de los Resultados. Se mostraron los procesos analíticos para la Determinación de As por Generación de Hidruro, y de Cadmio por Horno grafito en tejido orgánico. Los aspectos prácticos consideraron los siguientes puntos: a) Preparación de estándares de calibración por pesada,b) Descripción de procedimiento de digestión por microondas de muestras de MRC de tejido orgánico a medir; c) Optimización de las condiciones instrumentales para la medición; d) Optimización de programa de temperaturas del horno de grafito; e) Uso y elección de Modificadores de Matriz; f) Medición de muestras problemas (MRCs de agua y de tejido orgánico), g) Calculo de resultados y aseguramiento de la calidad de estos.
A esta actividad asistieron 11 profesionales que se desempeñan en Laboratorios de Ensayos Privados, Públicos, y de empresas productivas.
Se adjunta la siguiente Información:

• Anexo 5 Lista de Participantes (hojas 3 y 4)

Hitos de la actividad 7

1 - REALIZACIÓN DE LA PASANTIA
Profesionales de los laboratorios nacionales que analizan residuos en alimentos conocerán los procesos de medición realizados en el CMQ para los analitos definidos en este proyecto.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Realización de la actividad Espectrometria de Absorción atómica: Puntos Críticos de la Determinación Analítica y Aseguramiento de Calidad de los Resultados. El énfasis de esta actividad estuvo en la Determinación de arsénico en matriz carne de ave.
Anexo complementario : anexo 5 del mail respuesta

8 - FORMACIÓN DE CAPACIDADES EN LOS LABORATORIOS NACIONALES Se impartirá un seminario dirigido a los profesionales de los laboratorios nacionales de tal manera de enseñar a usar correctamente los MR y asegurar la comparabilidad de los resultados.	06 Jul 2009	04 Aug 2009	28 May 2009	29 May 2009	-67 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°2 anexo N°3 y anexo 5 del mail respuesta
Observación:
El CMQ dictó un seminario de Estadística Aplicada a la Química Analítica, en Mayo de 2009. La orientación de este seminario fue entregar una base estadística a los profesionales de los laboaratorios de ensayo para evaluar sus procesos de medición. Diseño de los experimentos para una adecuada aplicación de los test estadísticos y correcta interpretación de los datos. Se impartieron los siguientes temas: (a) Conceptos estadísticos básicos, modelos probabilísticas; (b) Análisis de Varianza en cálculos aplicables a química analítica; (c) Regresión lineal en cálculos aplicables a química analítica.
A este seminario asistieron profesionales tanto del área privada como pública.
En la versión impresa del IAT N°2 se adjunta en el anexo 3 parte de la presentación del seminario de Estadística Aplicada a la Química Analítica. La presentación completa consta de más de 300 diapositivas por lo que no se incluyeron todas.
Además se adjunta la siguiente información:
• Anexo 5 Lista de Participantes (hojas 1 y 2)

Hitos de la actividad 8

1 - SEMINARIO REALIZADO
Se impartirá un seminario a los profesionales de los laboratorios nacionales que entregará las herramienats necesarias para el aseguramiento de calidad de los resultados analíticos.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Se realizó el seminario "Estadística Aplicada a la química Analítica" cuyo objetivo fue entregar las herramientas para que los profesionales del área química apliquen los test estadísticos adecuados para una correcta interpretación de los resultados obtenidos en el Laboratorio.
Anexo complementario : IAT N°2 anexo N°3

Resultados	Fecha estimada	Fecha real	Desviación

Etapa 2

PREPARACIÓN Y CERTIFICACIÓN DE LOS MATERIALES DE REFERENCIA
En esta etapa se implementarán los diseños para la producción de los MR que fueron elaborados en la etapa 1 . El proceso de producción involucra distintas actividades, cada una de ellas es importante para la obtención de un MR estable y homogéneo. Actividades como el procesamiento del material de partida, el muestreo, la preparación propiamente tal, el envasado y almacenamiento deben ser probados y evaluados para definir finalmente cuales son las mejores condiciones para la producción del MR. Para esta evaluación se requiere tener claramente identificados y controlados los factores que introducen fuentes de variabilidad para minimizar sus efectos sobre la calidad del material de referencia.
La evaluación de la homogeneidad y la estabilidad se realiza con los resultados obtenidos con los métodos desarrollados, validados y/o re-validados según corresponda.

Fecha de Inicio Programado: **05 Aug 2009**, Fecha de Inicio Real:
Fecha de Término Programado: **04 Aug 2010**, Fecha de Término Real:

ACTIVIDADES	Inicio	Término	Inicio real	Término real	Desviación de termino
1 - PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES DE REFERENCIA DESCRITOS EN LA ETAPA 1 Se preparará un número determinado de unidades de los MR definidos, se envasarán, sellarán y etiquetarán. Luego, se realizarán pruebas analíticas para evaluar si la preparación fue exitosa, principalmente en lo que se refiere a la homogeneidad	05 Aug 2009	04 Aug 2010	05 Aug 2009	20 May 2011	289 dias

del MR y la concentración aproximada del analito obtenido.
01 Jul 2009 30 Jun 2010

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°2 anexo 4 y anexo 5 e IAT N°3 anexo 1,2 y3
Observación:
Se efectuaron las etapas contempladas en el diseño experimental elaborado en la Etapa 1 para la preparación de los Materiales de Referencia (MR), es decir, los estudios de homogeneidad, de estimación del valor de preparación e incertidumbre, de estabilidad bajo las condiciones de envasado y almacenamiento descritas fueron realizados para cada uno de los MR según se detalla en el IAT N°2 y corresponden a :
a) 4 MR de Quinolonas en músculo de cerdo: Ciprofloxacino, Enrofloxacino, Acido Oxolínico, Flumequina.
b) 4 MR de Quinolonas en carne de ave: Ciprofloxacino, Enrofloxacino, Acido Oxolínico, Flumequina.
Tal como se describe en la versión impresa del IAT N°2, pág.6:
El hito de esta actividad es la preparación de un lote de cada uno de los 3 grupos de MR.
Grupo 1. 3 Metales pesados en carne de ave pendiente
Grupo 2. 3 Quinolonas en carne de ave (+100%) IAT N°2 anexo 5
Grupo 3. 3 Quinolonas en carne de cerdo (+100%) IAT N°2 anexo 4

Para esta actividad se adjunta el Informe Técnico de Preparación y Asignación de valor del MR de Quinolonas en músculo de cerdo y el Informe Técnico de Preparación y Asignación de valor del MR de Quinolonas en carne de ave. Ambos materiales de referencia cuentan con estudios de estabilidad realizados a la fecha. (IAT N°2 anexo 4 y anexo 5)
Cabe destacar que lo comprometido en relación al Material de Referencia de Quinolonas tanto en músculo de cerdo como en carne de ave era para tres compuestos: Ácido Oxolínico, Enrofloxacina, y Ciprofloxacina. El MR de Quinolonas en cada matriz además contiene Flumequina, es decir, un compuesto adicional por cada matriz,
En el informe técnico IAT N°3 se anexan los informes técnicos de producción de un lote de MR correspondiente al Grupo 1, esto es: □Preparación del Material de Referencia de Arsénico, Cadmio y Plomo en músculo de ave. (Anexo 1.) □ Pruebas de Estabilidad del Material de Referencia de Arsénico, Cadmio y Plomo en músculo de ave (Anexo 2.) □ Asignación del Valo

Hitos de la actividad 1

1 - MR PREPARADOS
Un lote de cada uno de los 3 grupos de MR preparados

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Fueron preparados 11 materiales de referencia: 8 Quinolonas y 3 metales pesados, según se detalla a contiuación: (1) MR de Ciprofloxacino en músculo de cerdo; (2) MR de Enrofloxacino en músculo de cerdo; (3) MR de Ac. Oxolínico en músculo de cerdo; (4) MR de Flumequina en músculo de cerdo; (5) MR de Ciprofloxacino en carne de ave; (6) MR de Enrofloxacino en carne de ave; (7) MR de Ac. Oxolínico en carne de ave; (8) MR de Flumequina en carne de ave; (9) Cdamio en músculo de ave; (10) Arsénico en músculo de ave, y (11) Plomo en músculo de ave. Para cada uno de ellos se estudiaron las condiciones de envasado y almacenamiento, y se realizaron las evaluaciones de homogeneidad y estabilidad de acuerdo a los protocolos establecidos previamente.
Anexo complementario : IAT N°2 e IAT N°3

2 - FORMACIÓN DE CAPACIDADES EN LOS LABORATORIOS NACIONALES 05 Nov 2009 05 Dec 2009 20 Aug 2009 21 Aug 2009 -106 dias
Se impartirá durante esta etapa un seminario teórico-práctico, donde se transfiere el uso correcto de Materiales de Referencia, conceptos de Metrología Química y Aseguramiento de Calidad de los Resultados que consideren los últimos requerimientos internacionales referentes a desempeño de métodos analíticos, tales como CCalfa y CCbeta.
01 Apr 2009 31 Dec 2009

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : Anexo 5 del mail de respuesta
Observación:
Se impartió el Seminario "Validación de Métodos Analíticos como Herramienta para asegurar la calidad de los resultados en química analítica". Este curso teórico - práctico contemplo los siguientes items:Introducción a la evaluación de calidad de los resultados analíticos; Limite de Detección, Límite de Cuantificación y CCa, CCb;Precisión; Exactitud; Ensayos de Robustez e Introducción al Cálculo de la Incertidumbre.
Se adjunta la siguiente Información:
• Anexo 5 Lista de Participantes (hojas 5 y 6)

Hitos de la actividad 2

1 - SEMINARIO REALIZADO
Seminario dado por los profesionales del CMQ donde se abordan temas relacionados con el uso apropiado de MR, y conceptos de metrología química

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Se realizó el seminario " Validación de Métodos Analíticos como Herramienta para aegurar la calidad de los resultados en Química Analítica", a él asistieron catorce profesionales representantes de diversas instituciones del área privada como pública.

Anexo complementario : Anexo 5 Lista de Participantes (hojas 5 y 6)

3 - FORTALECIMIENTO DE LAS CAPACIDADES EN LOS PROFESIONALES DEL CMQ Se realizará una visita a un Centro de Metrología o a un Centro de Referencia de Residuos reconocido internacionalmente, continuando con la capacitación especializada de profesionales del CMQ en las áreas pertinentes para el desarrollo del proyecto.	06 Dec 2009	04 Jan 2010	07 Dec 2009	11 Dec 2009	-24 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : anexo 6 del mail de respuesta
Observación:
La Directora del CMQ, Sra. Gabriela Massiff asiste al NMI de Australia , visita los laboratorios y participa en reuniones con el staff del área de metrología química de la Institución. Se delinean posibilidades de trabajo en conjunto.
Se adjunta la siguiente información:
• Anexo 6 Presentación de la Directora del Centro en las reuniones con los profesionales del NMI: CHILE, A FOOD POWER: THE IMPORTANCE OF THE QUALITY AND SAFETY OF EXPORTED PRODUCTS

Hitos de la actividad 3

1 - VISITA DE UN PROFESIONAL REALIZADA
Capacitación especializada de un profesional del CMQ en áreas pertinentes para el desarrollo del proyecto, en un Centro de Metrologia Internacional.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Visita de la Directora del Centro de Metrología Química al NMI de Australia
Anexo complementario :

4 - ASIGNACIÓN DEL VALOR DE REFERENCIA AL MR a) Evaluación de la homogeneidad. Para ello, se seleccionará un número de envases al azar, y se harán las mediciones correspondientes b) Asignación del valor de referencia a cada parámetro de acuerdo a los criterios establecidos internacionalmente c) Cálculo de la incertidumbre del MR e) Inicio del estudio de estabilidad	07 Dec 2009	04 Aug 2010	08 Nov 2009	29 Jan 2010	-187 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°2 anexo 4 y anexo 5
Observación:
Se realiza la evaluación de homogeneidad y la asignación del valor de referencia y evaluación de la incertidumbre a cada parámetro que compone el Material de Referencia (MR). Estos estudios se realizan siguiendo criterios internacionales que se detallan en los respectivos informes Técnicos que se anexan en el IAT N°2
Las mediciones se realizaron con los métodos validados en la Etapa 1 a los siguientes MR:
a) 4 MR de Quinolonas en musculo de cerdo; Ciprofloxacino, Enrofloxacino, Acido Oxolinico y Flumequina.
b) 4 MR de Quinolonas en carne de ave; Ciprofloxacino, Enrofloxacino, Acido Oxolinico y Flumequina.
La información se encuentra en la versión impresa del IAT N°2:
En el Anexo 4 del IAT N°2 " Preparación y Certificación de Materiales de Referencia de Quinolonas en Músculo de cerdo" en el punto 7.5 pág 5 está la Asignación del valor de Concentración de cada una de las 4 quinolonas (Tabla 2).

En el anexo 5 del IAT N°2 " Preparación y Certificación de Materiales de Referencia de Quinolonas en músculo de ave" en el punto 7.5 pág 5 está la Asignación del valor de Concentración de cada una de las 4 quinolonas (Tabla 2).

Hitos de la actividad 4

1 - 6 MR CON VALOR DE REFERENCIA ASIGNADO
Determinación analítica de cada residuo, Estudio de la homogeneidad de cada residuo, Inicio del estudio de estabilidad de cada residuo.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Se han preparado y asignado valor de referencia con su incertidumbre a los siguientes 8 Materiales de Referencia: a) MR de Ciprofloxacino en musculo de cerdo, b) MR de Enrofloxacino en musculo de cerdo, c) MR de Acido Oxolinico en musculo de cerdo, y d) MR de Flumequina en musculo de cerdo. e) MR de Ciprofloxacino en carne de ave, f) MR de Enrofloxacino en carne de ave, g) MR de Acido Oxolinico en carne de ave y h) MR de Flumequina en carne de ave.

Anexo complementario : IAT N°2

5 - INFORME DE AVANCE Informe de las actividades realizadas durante la Etapa	19 Feb 2010	19 Feb 2010	06 Mar 2010	06 Mar 2010	15 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°2

Observación:
El informe de avance N°2 fue enviado en Marzo de 2010, junto con el ingreso de la información al sistema.

Hitos de la actividad 5

1 - INFORME DE AVANCE N°2
Envío del Informe técnico de avance N°2 y actualización del sistema con la información de las actividades desarrolladas a la fecha.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : El INFORME DE AVANCE N°2 fue enviado en su versión impresa en Marzo de 2010, y conjuntamente la información fue ingresada al sistema en linea.
Anexo complementario : IAT N°2

6 - PASANTÍA EN LOS LABORATORIOS DEL CMQ El CMQ continuará con las pasantías en el Centro de Metrología Química. Los profesionales de otros laboratorios tendrán la oportunidad de conocer los procesos analíticos desarrollados por el Centro.	06 May 2010	04 Jun 2010	06 May 2010	-	0 dias

Trabajo realizado: 0 %
Anexo complementario : Informe final
Observación:
El Laboratorio del CMQ sufrió graves daños en sus instalaciones debido al terremoto. Por lo tanto esta actividad no pudo realizarse durante el año 2010 ya que no se contaba ni con el equipamiento ni con la infraestructura adecuada a los requerimientos. La reconstrucción y el proceso de reequipamiento tomó prácticamente todo el año 2010.

Hitos de la actividad 6

1 - PASANTIA REALIZADA
Profesionales del área de residuos en alimentos de laboratorios nacionales conocerán los procesos analiticos desarrollados en el Centro.

Estado del hito : PENDIENTE
Observación : El Laboratorio del CMQ sufrió graves daños en sus instalaciones debido al terremoto. Por lo tanto esta actividad no pudo realizarse durante el año 2010 ya que no se contaba ni con el equipamiento ni con la infraestructura adecuada a los requerimientos. La reconstrucción y el proceso de reequipamiento tomó prácticamente todo el año 2010
Anexo complementario : Informe Final

Resultados	Fecha estimada	Fecha real	Desviación
1 - 1 PASANTÍA EN EL CMQ, DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA, fecha de obtención programada **06/04/2010** El CMQ habrá transferido una técnica analítica desarrollada y revalidada para la determinación de residuos inorgánicos en una de las matrices definidas. **Estado del resultado :** PENDIENTE **Anexo complementario :** Informe final **Observación :** El Laboratorio del CMQ sufrió graves daños en sus instalaciones debido al terremoto. Por lo tanto esta actividad no pudo realizarse durante el año 2010 ya que no se contaba ni con el equipamiento ni con la infraestructura adecuada a los requerimientos. La reconstrucción y el proceso de reequipamiento tomó prácticamente todo el año 2010	04 Jun 2010	04 Jun 2010	0 dias
3 - INFORME DE AVANCE TÉCNICO DEL PROYECTO, fecha de obtención programada **03/06/2010** Entrega del Informe **Estado del resultado :** OBTENIDO **Anexo complementario :** IAT N°2 **Observación :** El INFORME DE AVANCE N°2 en su versión impresa fue enviado en Marzo de 2010, y paralelamente la información fue ingresada al sistema.	06 Mar 2010	06 Mar 2010	0 dias
5 - 9 MATERIALES DE REFERENCIA PREPARADOS, fecha de obtención programada **08/04/2010** El CMQ habrá preparado un lote de cada uno de los 3 grupos de materiales de referencia definidos en la etapa 1. En total 9 residuos en matriz alimento **Estado del resultado :** OBTENIDO **Anexo complementario :** IAT N°2 e IAT N°3 **Observación :**	04 Aug 2010	20 May 2011	289 dias

Se preparaon 11 Materiales de Referencia, segun el siguiente detalle:
a) 4 MR de Quinolonas en músculo de cerdo: Ciprofloxacina, Enrofloxacino; Acido Oxolínico, y Flumequina.
b) 4 MR de Quinolonas en músculo de ave: Ciprofloxacina, Enrofloxacino; Acido Oxolínico, y Flumequina.
c) 3 MR de Metales pesados en músculo de ave: Plomo, Cadmio y Arsénico

6 - VALOR DE REFERENCIA ASIGNADO A CADA UNO DE LOS 6 RESIDUOS QUE CONFORMAN LOS MATERIALES DE REFERENCIA COMPROMETIDOS, fecha de obtención programada **08/04/2010** Cada uno de los residuos que conforman dos de los grupos de material de referencia tendrán asignado el valor de referencia con su incertidumbre expandida, mediante el esquema de medición analítica definido en el diseño experimental.	04 Aug 2010	29 Jan 2010	-187 dias

Estado del resultado : OBTENIDO
Anexo complementario : IAT N°2 anexo 4 y anexo 5
Observación :
8 Materiales de Referencia con valor asignado y evaluación de incertidumbre
a) 4 Quinolonas en músculo de cerdo
b) 4 Quinolonas en múculo de ave

Etapa 3

DEFINICIÓN DE ESTABILIDAD DE LOS MATERIALES DE REFERENCIA
Durante esta etapa, se continuará con la evaluación de estabilidad de los Materiales de Referencia preparados. Se continuará con las actividades de transferencia tecnológica, sumando a los seminarios, la realización de Ensayos de Intercomparación, usando como muestra los MR preparados durante el proyecto.

Fecha de Inicio Programado: **05 Aug 2010**, Fecha de Inicio Real:
Fecha de Término Programado: **04 Aug 2011**, Fecha de Término Real:

ACTIVIDADES	Inicio	Término	Inicio real	Término real	Desviación de termino
1 - EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS MR PREPARADOS. Se continuará con la evaluación de la estabilidad de los MR preparados. Al final de esta etapa, será posible definir un plazo mínimo de duración de los MR. Así, será posible especificar una fecha de expiración del Material.	05 Aug 2010	04 Apr 2011	05 Aug 2010	20 May 2011	46 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°2 anexo 4 y 5 e IAT N°3 anexo 2
Observación:
Se realizaron los estudios de estabilidad a los once materiales de referencia los cuales se informan en el IAT N°2 para las quinolonas tanto en músculo de cerdo como de ave.
El estudio de estabilidad de los 3 metales pesados se informan en el anexo 2 del IAT N°3.
De esta forma se realiza el estudio de estabilidad para los 11 MR preparados de residuos en productos pecurios. Se destaca que este estudio incluye un parámetro adicional como es la Flumequina en músculo de cerdo y ave.

Hitos de la actividad 1

1 - ESTABILIDAD EVALUADA PARA LOS 9 ANALITOS
Estudio de estabilidad realizado para todos los materiales de referencia preparados

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Se realizaron los estudios de estabilidad para cada uno de los once residuos de los cuales se preparó material de referencia (8 quinolonas y 3 metales pesados) estos estudios se informan en los informes técnicos respectivos adjuntos en los anexos de los informes de avance según se describe: IAT N°2 Anexo 4 : 4 Quinolonas en músculo de cerdo IAT N°2 Anexo 5: 4 Quinolonas en músculo de ave IAT N°3 Anexo 2: 3 Metales pesados en músculo de ave.
Anexo complementario : IAT N°2; IAT N°3 anexo 2

2 - ASIGNACIÓN DEL VALOR DE REFERENCIA AL MR a) Evaluación de la homogeneidad. Para ello, se seleccionará un número de envases al azar, y se harán las mediciones correspondientes. b) Asignación del valor de referencia a cada parámetro de acuerdo a los criterios establecidos internacionalmente. c) Cálculo de la incertidumbre del MR e) Inicio del estudio de estabilidad,	05 Aug 2010	04 Jan 2011	05 Aug 2010	20 May 2011	136 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°3 anexo 3 e IAT N°2 anexo 4 y 5

Observación:
Con la asignación de valor al material de referencia de metales pesados en músculo de ave informado en el IAT N°3 se completa esta actividad.
De esta forma se ha establecido el valor de concentración e incertidumbre expandida a cada uno de los once residuos, ocho de los cuales estaban comprometidos. Se destaca que este estudio incluye un parámetro adicional como es la Flumequina en músculo de cerdo y ave. Así entonces se realiza el estudio de homogeneidad y la asignación de valor a cada uno de los tres grupos de MR
Grupo 1: 3 metales pesados (Plomo, Cadmio y Arsénico) en músculo de ave informado en IAT N°3 anexo 3
Grupo 2: 4 quinolonas en músculo de ave (Ciprofloxacino, Enrofloxacino, Acido Oxolínico, Flumequina) informado en IAT N°2 anexo 5
Grupo 3: 4 quinolonas en músculo de cerdo (Ciprofloxacino, Enrofloxacino, Acido Oxolínico, Flumequina) informado en IAT N°2 anexo 4

Hitos de la actividad 2

1 - VALOR DE REFERENCIA ASIGNADO A LOS MR DEL ÚLTIMO GRUPO
Valor de concentración para cada analito con su incertidumbre expandida

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : El anexo 3 del IAT N°3 informa el estudio de homogeneidad y asignacion del valor de concentración e incertidumbre expandida para Plomo, Cadmio y Arsénico en el material de referencia de metales pesados en músculo de ave.
Anexo complementario : IAT N°3 anexo 3

3 - FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES EN PROFESIONALES DEL CMQ Continuando con la especialización de los profesionales del Centro se realizará una visita a un Centro de Metrología internacional o a un Centro de referencia de residuos en alimentos.	06 Oct 2010	04 Nov 2010	09 Apr 2010	11 May 2011	188 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°3 anexo 4 y anexo 5
Observación:
Profesionales del CMQ participaron en diversas actividades internacionales con el objetivo de fortalecer sus capacidades en metrología química en lineamineto con las tendencias dictadas por el máximo organismo en esta materia tanto a nivel mundial como regional. Sólo se nombran algunas de ellas, mayor detalle en el IAT N°3.
a) Asistencia de un profesional a la reunion del Grupo de Trabajo de Química Inorgánica (IAWG) del CCQM (Comité de la Cantidad de Materia del BIPM) 9 de Abril de 2010 en Paris.
b) Asistencia de un profesional a la reunion del Grupo de Trabajo de Química Orgánica (OAWG) del CCQM. 11 y 12 de Abril de 2010 en Paris.
c) Pasantía y Capacitación de un profesional en evaluación de Capacidades de Medición y Calibración (CMC) de los Institutos Nacionales de Metrología (NMIs) del grupo de Química del Sistema Interamericano de Metrología (SIM). 28 de Febrero el 4 de Marzo de 2011 en el NMI de Estados Unidos.
d) Asistencia a la reunión del grupo de Química del SIM en San Jose de Costa Rica los días 9,10 y 11 de Mayo. A ella asisten cuatro profesionales del Centro de Metrología Química, y representantes de 13 países. En el IAT N°3 anexo 5 se adjunta la lista de asistentes a esta actividad.

Hitos de la actividad 3

1 - PASANTÍA DE UN PROFESIONAL REALIZADA
Un profesional del CMQ visita un Centro de Metrología Internacional o un Centro de Referencia de Residuos en Alimentos.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Asistencia de un profesional del CMQ a las reuniones de trabajo de los Grupos de Trabajo de Quimica Orgánica (OAWG) y de Química Inorgánica(IAWG) del CCQM en abril del 2011 en Paris. Pasantía y Capacitación en el NIST (NMI de Estados Unidos) de un profesional en Evaluación de CMC de los NMIs del SIM. Asistencia de 4 profesionales del CMQ a la reunión del Grupo de Trabajo de Química del SIM.
Anexo complementario : IAT N°3 anexo 4 y anexo 5

4 - ORGANIZACIÓN DE ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN POR EL CMQ PARA LOS LABORATORIOS NACIONALES QUE ANALIZAN RESIDUOS EN ALIMENTOS Esta actividad permitirá que cada laboratorio conozca su propio desempeño en sesgo y precisión respecto al Material de Referencia preparado por el CMQ y en comparación con los otros laboratorios participantes.	06 Dec 2010	04 Aug 2011	12 Apr 2011	29 Jul 2011	-6 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°3 anexo 6 y anexo 7
Observación:
Organización del Ensayo de Intercomparación de quinolonas y metales pesados en músculo de ave (PEI-CMQ-42-2011). En esta actividad se preparó un nuevo lote de Material de Referencia (MR) que se envía como muestra a los participantes.A este MR se le asigna un valor de referencia a cada componente, se estudia la homogeneidad y se verifica la estabilidad.

Participan laboratorios del sector público y del sector privado. se adjunta el informe que se envía a los participantes.

Hitos de la actividad 4

1 - ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN REALIZADOS CON LOS MR PREPARADOS POR EL CMQ
Cada laboratorio conocerá su propio desempeño en sesgo y precisión respecto al Material de Referencia y en comparación con los otros laboratorios participantes.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Realización del PEI-CMQ-42-2011 de quinolonas y metales pesados en músculo de ave.
Anexo complementario : IAT N°3 anexo 6 y anexo 7

5 - PASANTÍA EN LOS LABORATORIOS DEL CMQ El CMQ transferirá los métodos desarrollados y revalidados a los profesionales de otros laboratorios que analizan residuos. Esta transferencia será a través de una pasantía demostrativa, dónde se mostrarán los principales aspectos de las técnicas desde el diseño, los procesos de extracción y cuantificación, y el tratamiento de los resultados.	06 May 2011	04 Jun 2011	06 May 2011	24 Jun 2011	20 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°3 anexo 8
Observación:
Esta actividad consiste en pasantías dónde profesionales de otras instituciones ven de manera práctica en los laboratorios del CMQ los procesos analíticos desarrollados por el CMQ, y a la discusión de los resultados obtenidos en un proceso de validación. Esto les permite implantar mejoras en sus propios procesos de tal manera de alcanzar mayor exactitud en sus resultados.
Del 21 al 24 de Junio de 2011 el CMQ realizó el taller " Fortalecimiento de las capacidades analíticas y metrológicas para la determinación de metales pesados usando espectroscopia de Absorción Atómica". Asistieron 9 profesionales. Además del programa, se adjunta lista de participantes.

Hitos de la actividad 5

1 - PASANTÍA REALIZADA
El CMQ transferirá los métodos analíticos a los profesionales de otros laboratorios que analizan residuos, a través de una pasantía demostrativa.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Pasantía de 9 profesionales en los laboratorios del CMQ. Se realizó una actividad práctica en el área de Espectroscopia de Absorción Atómica orientada a la Determinación de metales pesados en matrices.
Anexo complementario : IAT N°3 anexo 8

6 - FORMACIÓN DE CAPACIDADES EN LOS LABORATORIOS NACIONALES Se impartirá un curso tipo taller para entregar las herramientas estadísticas necesarias para evaluar el desempeño de los métodos analíticos. El contar con materiales de referencia de estos analitos en estas matrices entrega la posibilidad de evaluar el sesgo del método, componente fundamental de la exactitud de los resultados obtenidos. Además el programa del curso abarca temas relacionados con el uso de los MR, validación de métodos, cálculo de la incertidumbre.	05 Jun 2011	05 Jul 2011	02 May 2011	03 Jun 2011	-32 dias

Trabajo realizado: 100 %
Anexo complementario : IAT N°3 anexo 9
Observación:
Se realizó el Seminario taller Estadística Aplicada a la Química Analítica, dictado por el área de Estadística del CMQ. A esta actividad asistieron 16 profesionales que representan a 12 instituciones de diversas regiones del país. Se adjunta lista de participantes.

Hitos de la actividad 6

1 - SEMINARIO REALIZADO
El CMQ continuará con los seminarios en su área de competencia. Impartirá cursos tipo taller para entregar las herramientas estadísticas necesarias para evaluar el desempeño de los métodos analíticos.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Seminario Estadística Aplicada a la Química Analítica realizado entre el 2 y 3 de Junio de 2011.
Anexo complementario : IAT N°3

7 - INFORME TECNICO FINAL Informe de las Actividades realizadas durante la Etapa	20 Jul 2011	04 Aug 2011	04 Aug 2011	31 Aug 2011	27 dias

Trabajo realizado: 100 %

Anexo complementario : ITF anexo 1
Observación:
Informe Técnico Final entregado en su versión impresa, junto al Informe Técnico de Avance N°3. Actividades informadas en el Sistema en línea.
El anexo 1 corresponde a la publicación del paper " Validation of a Liquid Chromatography -Fluorescence Spectrometric Method for the Quantification of four Quinolones in Pig and Chicken muscle following the european Union Guideline EC/657/2002" en el J. Chil. Chem. Soc.,56,N°1 (2011).

Hitos de la actividad 7

1 - ENTREGA DEL INFORME FINAL
Se enviará el Informe Final del proyecto y se ingresará la información correspondeinte en el sistema.

Estado del hito : OBTENIDO
Observación : Informe Final entregado. En el anexo 1 se adjunta la publicación del trabajo financiado por INNOVA, CORFO en el J. Chil. Chem. Soc.,56, N°1 (2011)
Anexo complementario : ITF

Resultados	Fecha estimada	Fecha real	Desviación
1 - ESTABILIDAD DEFINIDA PARA LOS 9 RESIDUOS QUE CONFORMAN LOS MATERIALES DE REFERENCIA COMPROMETIDOS., fecha de obtención programada **04/04/2011** Cada uno de los residuos que conforman los distintos grupos de material de referencia tendrán asignado el tiempo de expiración de la validez del valor de referencia asignado, mediante el esquema definido en el diseño experimental. **Estado del resultado** : OBTENIDO **Anexo complementario** : IAT N°3 anexo 2 **Observación** : Estudio de estabilidad realizado para cada uno de los 11 residuos en los materiales de referencia preparados. Se estableció mediante criterios estadísticos la estabilidad y tiempo de vida del material.	04 Apr 2011	20 May 2011	46 dias
2 - ORGANIZACIÓN Y REALIZACIÓN POR EL CMQ DE 9 ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN A NIVEL NACIONAL, fecha de obtención programada **08/04/2011** Se habrá establecido la calidad de las mediciones analíticas de los laboratorios nacionales participantes, respecto del valor del material de referencia. Aquellos laboratorios con desempeño satisfactorio habrán establecido comparabilidad de sus mediciones respecto del CMQ. **Estado del resultado** : OBTENIDO **Anexo complementario** : IAT N°3 anexo 6 y anexo 7 **Observación** : Se organizó y realizó el Ensayo de Evaluación de Desempeño PEI-CMQ-42-2011 de Quinolonas y metales pesados en Músculo de ave. Como resultado de esta actividad se esperaba realizar la evaluación de los tres grupos considerados en el proyecto. Esto no fue posible dado que el desfase producido por la reposición, instalación, puesta en marcha y verificación del nuevo equipamiento por efecto del terremoto de febrero de 2010 desfasó e imposibilitó la evaluación de desempeño de un grupo, el correspondiente al de Quinolonas en músculo de cerdo.	04 Aug 2011	29 Jul 2011	-6 dias
3 - 1 PROFESIONAL DEL CMQ ESPECIALIZADO EN ASPECTOS TÉCNICOS ESPECÍFICOS RELACIONADOS CON EL RESPALDO METROLÓGICO A LA PRODUCCIÓN DE MATERIALES DE REFERENCIA EN OTRAS MATRICES. , fecha de obtención programada **11/04/2010** Se habrá realizado una visita de un profesional del CMQ a un centro de referencia o de metrología internacional dedicado al análisis de residuos en alimentos. **Estado del resultado** : OBTENIDO **Anexo complementario** : IAT N°3 anexo 4 y anexo 5 **Observación** : Formación de Capacidades a través de la particiación en las reuniones de los Grupos Técnicos de Trabajo tanto del área Inorgánica (IAWG) como de orgánica (OAWG) del CCQM y Realización de pasantía en el NMI de Estados Unidos para la evaluación de las CMCs d los NMIs del SIM.	04 Nov 2010	11 May 2011	188 dias
4 - 1 SEMINARIO ORIENTADO A FORTALECER LAS CAPACIDADES DE MEDICIÓN DE LOS LABORATORIOS NACIONALES., fecha de obtención programada **07/05/2011** Se habrá realizado un seminario para los profesionales de los laboratorios que realizan	05 Jul 2011	03 Jun 2011	-32 dias

análisis de residuos en alimentos. El contenido de estos seminarios tiene como objetivo brindar las herramientas metrológicas necesarias para asegurar la calidad de las mediciones analíticas.

Estado del resultado : OBTENIDO
Anexo complementario : IAT N°3
Observación :
Realización del seminario "Estadistica aplicada a la Quimica Analitica", asistieron 16 profesionales que representan a 12 instituciones de diversas regiones del país.

5 - 1 PASANTÍA EN EL CMQ, DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA, fecha de obtención programada **06/04/2011** El CMQ habrá transferido una técnica analítica desarrollada y revalidada para la determinación de residuos orgánicos en una de las matrices definidas. **Estado del resultado :** OBTENIDO **Anexo complementario :** IAT N°3 anexo 8 **Observación :** Realizado el taller " Fortalecimiento de las Capacidades Analíticas y Metrológicas para la Determinación de Metales pesados usando EAA", entre los días 21 y 24 de Junio.	04 Jun 2011	24 Jun 2011	20 dias
6 - VALOR DE REFERENCIA ASIGNADO A LOS 3 RESIDUOS RESTANTES QUE CONFORMAN LOS MATERIALES DE REFERENCIA COMPROMETIDOS, fecha de obtención programada **01/04/2011** Cada uno de los residuos que conforman el último grupo de material de referencia tendrán asignado el valor de referencia con su incertidumbre expandida, mediante el esquema de medición analítica definido en el diseño experimental **Estado del resultado :** OBTENIDO **Anexo complementario :** IAT N°3 anexo 3 **Observación :** Entrega del Informe Técnico " Asignación del Valor Certifcado de arsénico, Cadmio, y plomo en el Material de Referencia de Músculo de ave".	04 Jan 2011	20 May 2011	136 dias
7 - INFORME FINAL DEL PROYECTO, fecha de obtención programada **08/04/2011** Entrega del Informe **Estado del resultado :** OBTENIDO **Anexo complementario :** Informe Final **Observación :** Entrega del Informe Final en su versión Impresa e informe de las actividades, hitos y resultados en el sistema en línea.	04 Aug 2011	31 Aug 2011	27 dias

Formato de Impresión | Enviar Informe

Volver