

	Plan de Validación o Verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S	Identificación: FOR-TC-013
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2017/08/01

PLN-TC-087-01

Plan de verificación del ensayo de determinación Aflatoxinas Totales

AOXLAB S.A.S.

	Plan de Validación o Verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S	Identificación: FOR-TC-013
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2017/08/01

ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE.	4
1.1 Objetivo.	4
1.2 Alcance.	4
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.	4
2.1 Definiciones.	4
2.2 Notaciones.	4
3. REFERENCIAS.	4
4. ESPECIFICACIÓN DE LOS REQUISITOS DEL MÉTODO A CONFIRMAR.	4
5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE CONFIRMACIÓN.	5
5.1 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO A EVALUAR	5
5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	6
5.2.1 Condiciones generales	6
5.2.2 Materiales, equipos y reactivos	7
6. VERIFICACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE CONFIRMACIÓN.	8
7. CONCLUSIONES DE LA CONFIRMACIÓN.	8
8. INFORME.	8
9. RESPONSABILIDADES.	9
9.1 Director Técnico.	9
9.2 Líder de Laboratorio.	9
9.3 Analistas.	9
10. FORMATOS RELACIONADOS.	9
11. ANEXOS.	10

	Plan de Validación o Verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S	Identificación: FOR-TC-013
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2017/08/01

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Establecer la lista de características de desempeño a evaluar, los respectivos criterios de aceptación y describir el diseño experimental para realizar la verificación del método analítico PROC – TC – 087 Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales por la técnica de inmunoensayo. Este método de ensayo es un desarrollo de r-biopharm, el cual se comercializa como kit bajo la referencia R-4701. El desempeño del método analítico será evaluado sobre las siguientes matrices:

- Material vegetal
- Extracto puro

La verificación del procedimiento analítico se realizará atendiendo los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 y el procedimiento PROC-TC-012.

1.2 Alcance.

Aplica para la verificación del procedimiento analítico PROC – TC – 087 Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales, ejecutado sobre las matrices relacionadas en el numeral 1.1

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

Para el presente documento aplicarán las definiciones establecidas en el numeral 2.1 del procedimiento PROC – TC- 012 [1]

2.2 Notaciones.

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

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

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

“**Ítem**”: se refiere al elemento o material bajo ensayo.

3. REFERENCIAS.

[1] PROC – TC – 012. Procedimiento para la validación o confirmación de métodos analíticos.

[2] PROC – TC – 087 Procedimiento para la determinación de Aflatoxinas Totales

4. ESPECIFICACIÓN DE LOS REQUISITOS DEL MÉTODO A CONFIRMAR.

El método bajo verificación debe cumplir los siguientes requisitos, a fin de que sea considerado como apto o válido para el uso previsto.

El método debe permitir la cuantificación de aflatoxinas totales en las matrices descritas en el numeral 1.1.

	Plan de Validación o Verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S	Identificación: FOR-TC-013
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2017/08/01

Así mismo, debe mostrar un adecuado desempeño en todo el rango de operación (0.05 ug/l % – 4.05 ug/l)

5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE CONFIRMACIÓN.

5.1 CARACTERISITICAS DE DESEMPEÑO A EVALUAR

Como resultado del ejercicio de verificación del procedimiento se debe evidenciar que el procedimiento de ensayo cumple con los siguientes parámetros de desempeño para el analito objetivo:

PARAMETRO	CRITERIO	UNIDADES
Exactitud en el rango de calibración	0.05 – 4.05	ug/l
Intervalo de trabajo	1.72 – 4.05	ug/l
Límite de cuantificación	1.72	ug/l
Veracidad	Veraz para el rango de trabajo evaluado	
Recuperación	85% - 115%	%
Precisión - repetibilidad	C. V. % máximo 15%	%

La exactitud se evaluará sobre el material de referencia certificado de maíz contaminado artificialmente con aflatoxinas, el cual fue producido por Trilogy Analytical Laboratory, e identificado con el código R-A100 y lote de producción A-C-2223. Este material tiene fecha de vencimiento 2021-10-31

La repetibilidad se evaluará sobre duplicados de muestras representativas de las matrices objeto del alcance descrito en el numeral 1.1

	Plan de Validación o Verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S	Identificación: FOR-TC-013
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2017/08/01

La trazabilidad de las muestras utilizadas se encuentra en el software para manejo de muestras de AOXLAB S. A. S.

5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.2.1 Condiciones generales

Los parámetros son determinados de acuerdo con las siguientes instrucciones: Se analizarán seis lotes de ítems de ensayo. Estos serán procesados y analizados por el analista Yohiner Alvarez Mora, de acuerdo con las instrucciones dadas en los párrafos siguientes.

Los lotes de análisis tendrán la misma composición, la cual se muestra a continuación:

Tipo de muestra	Muestra
Blanco	Blanco de método
Material certificado de referencia A-C-2223	Material de referencia certificado
Muestra de matriz	Muestra de material vegetal o extracto puro
Duplicado de Muestra de matriz	Muestra de material vegetal o extracto puro

La precisión se evaluará en condiciones de repetibilidad, como el promedio de los coeficientes de variación obtenidos a partir de los resultados de los ensayos duplicados de muestras.

La exactitud se evaluará como porcentaje de recuperación, tomando como 100% el valor asignado por el fabricante al material de referencia A-C-2223. La veracidad del método se establecerá utilizando un contraste *t* de *Student* mediante el cual se comparará el promedio de los resultados obtenidos de ejecutar el ensayo sobre el material de referencia, con el valor declarado por el fabricante de dicho material. Los cálculos y contrastes estadísticos se realizarán de acuerdo con lo establecido en el procedimiento PROC-TC-012.

La exactitud en el rango de calibración, se llevará a cabo comparando el porcentaje de inhibición obtenido al ejecutar el ensayo sobre cada uno de los estándares de calibración suministrados con el kit, con los declarados por el fabricante en el certificado de calidad de éste. Esto se realizará mediante un ajuste por mínimos cuadrados de los pares de datos de porcentaje inhibición declarado en el certificado vs porcentaje de inhibición experimentalmente determinado. La compatibilidad entre los resultados experimentales y los declarados por el fabricante se demostrará, si la ecuación del ajuste tiene una pendiente estadísticamente igual a 1 y un intercepto estadísticamente igual a 0. La compatibilidad de la pendiente con el valor de 1 y del intercepto con el valor 0, se realizará mediante contrastes *t* de *Student*, de acuerdo con lo establecido en el procedimiento PROC-TC-012.

	Plan de Validación o Verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S	Identificación: FOR-TC-013
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2017/08/01

5.2.2 Materiales, equipos y reactivos

Los equipos que se utilizarán para la realización del ejercicio de verificación son:

EQUIPO	ID
Espectrofluorímetro Sinergy HT	072
Balanza analítica	006 /235
Vortex Mixer	239
Micropipeta 100 µL	012
Micropipeta 200 µL	016
Micropipeta 10000 µL	0243
Centrífuga	007
Plancha de agitación magnética y barra de agitación	163

Los equipos deben contar con el respectivo mantenimiento preventivo programado, calificación y/o calibración vigente.

El material con el cual se realizará el ejercicio de verificación es el siguiente:

MATERIAL	CANTIDAD	CALIBRACIÓN
Probeta de vidrio de 100 ml	1	
Embudo de vidrio	6	
Microplacas ELISA	96	
Puntas para pipetas 100 µL	200	
Puntas para pipetas 10000 µL	200	
Puntas para pipetas 200 µL	200	

Los reactivos empleados para la preparación de soluciones y estándares se relacionan en la tabla siguiente:

Metanol 70%
RIDASCREEN® Aflatoxin Total R4701

El procedimiento para llevar a cabo los cálculos se documenta en PROC – TC – 012 Procedimiento de verificación o validación de métodos analíticos.

Los resultados obtenidos son registrados en el formato FOR-TC-047 Formato de informe de confirmación de método analítico.

	<p align="center">Plan de Validación o Verificación de métodos analíticos</p> <p align="center">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: FOR-TC-013
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2017/08/01

6. VERIFICACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE CONFIRMACIÓN.

La verificación de cumplimiento de los parámetros o características del método a confirmar es realizada a través de una tabla comparativa entre los valores de los requisitos a cumplir (numeral 5.1) y los valores obtenidos por la aplicación del método en cada matriz.

Utilizar el formato FOR-TC-047 Formato de informe de confirmación de método analítico.

7. CONCLUSIONES DE LA CONFIRMACIÓN.

Al término de la confirmación, se emitirá una declaratoria acerca de la aptitud del laboratorio para operar el método normalizado, en función de los resultados obtenidos.

Esta declaratoria es registrada en el formato FOR-TC-047 Formato de informe de confirmación de método analítico.

8. INFORME.

La verificación del método es reportada en un Informe de Confirmación, que incluye al menos: a) los resultados obtenidos, b) el procedimiento utilizado para la confirmación y c) una declaración sobre la aptitud del laboratorio para operar el método normalizado.

Usar el formato FOR-TC-047 Formato de informe de confirmación de método analítico.

	<p align="center">Plan de Validación o Verificación de métodos analíticos</p> <p align="center">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: FOR-TC-013
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2017/08/01

9. RESPONSABILIDADES.

9.1 Director Técnico.

Revisar y aprobar el presente plan de verificación

Asegurar los recursos para la ejecución del plan de verificación.

Brindar orientación técnica durante la ejecución del plan de verificación.

9.2 Líder de Laboratorio.

Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.

9.3 Analistas.

Preparar los reactivos y materiales requeridos para ejecutar el plan de verificación, de acuerdo con las instrucciones establecidas en este documento

Realizar los ensayos de acuerdo con el procedimiento de ensayo y el diseño experimental establecido.

10. FORMATOS RELACIONADOS.

FOR-TC-047 Formato de informe de confirmación de método analítico.

FOR-TC-67 Formato de registro de datos primarios de análisis de aflatoxinas totales

	Plan de Validación o Verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S	Identificación: FOR-TC-013
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2017/08/01

11. ANEXOS.


ANEXO 1: FICHA RESUMEN DEL PLAN DE VERIFICACION

IDENTIFICACIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO VERIFICADO

Nombre completo del método: Ddeterminación de aflatoxinas totales Método de referencia: Kit r-biopharm R4701. Procedimiento interno: PROC – TC - 087					
Tipo de método:	Cualitativo		Cuantitativo	X	
Origen del método	Normalizado		No Normalizado	X	Otro
	Normalizado modificado		Interno		
Analitos: <ul style="list-style-type: none"> Aflatoxinas Totales Unidades: ug/l Matrices: <ul style="list-style-type: none"> Materia material vegetal Extracto puro 			Responsables por la verificación		
			Responsable	Firma	
			YAM		
			Fecha de entrega del informe de la verificación: Noviembre 25 de 2019		

PARÁMETROS DE VERIFICACIÓN

Selectividad		Linealidad / intervalo de trabajo	X
Sensibilidad		Límite de detección	X
Límite de cuantificación	X	Veracidad	X
Repetibilidad	X	Reproducibilidad	
Robustez		Recuperación	X

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

DOCUMENTO CONTROLADO


ICR-TC-087-01

**Informe de verificación del ensayo
de Aflatoxinas Totales**

AOXLAB S.A.S.


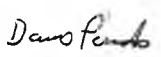
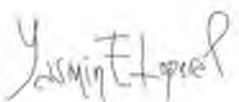
*** PROC – TC – 087 Procedimiento para la determinación de Aflatoxinas Totales**

DOCUMENTO CONTROLADO

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

ICR-TC-087-01 Informe de verificación del ensayo de β -glucanos


Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Wlner Ferney Ruiz Patiño	Líder Laboratorio		2019/11/09
Revisó:	Darío Pardo	Líder de Calidad		2019/11/10
Aprobó:	Yasmín Eliana Lopera Pérez	Gerente y Director Técnico		2019/11/10
Localización del documento:		http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/		

Control de Cambios

Estado	Fecha de inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Vigente	2019/11/10	1	Ninguno (versión original).	WFRP	DPP	YELP

*** PROC – TC – 087 Procedimiento para la determinación de Aflatoxinas Totales**

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10


Informe de verificación del ensayo de Aflatoxinas Totales

ICR-TC-100-01
2019/11/10


FOR-TC-047

AOXLAB S.A.S

ÍNDICE

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

1. OBJETIVO Y ALCANCE.....	5
1.1 Objetivo.....	5
1.2 Alcance.....	5
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	5
2.1 Definiciones.....	5
2.2 Notaciones.....	7
3. REFERENCIAS.....	8
4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO A VERIFICAR.....	9
5. ESPECIFICACIÓN DE LOS REQUISITOS DEL MÉTODO A VERIFICAR.....	9
6. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS A VERIFICAR.....	9
7. VERIFICACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE VERIFICACION.....	10
7.1 RESULTADOS OBTENIDOS.....	10
7.1.1 Intervalo de calibración.....	10
7.1.2 Límites de detección y cuantificación.....	13
7.1.3 Precisión - repetibilidad.....	13
7.1.4 Precisión - reproducibilidad.....	14
7.1.5 Exactitud.....	15
8. CONCLUSIONES DE LA VERIFICACION.....	16
9. INFORME.....	16
9.1 Firmas del personal de verificación.....	16
10. RESPONSABILIDADES.....	17
10.1 Líder de Calidad.....	17
10.2 Líder de Laboratorio.....	17
10.3 Analistas.....	17
11. FORMATOS RELACIONADOS.....	17
12. ANEXOS.....	17

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Evaluar los resultados obtenidos del ejercicio de verificación del método analítico PROC – TC – 087 procedimiento para la determinación de Aflatoxinas Totales, el cual es un desarrollo de r-biopharm, y se comercializa como kit, bajo la referencia R4701. Este ejercicio se desarrolló, de acuerdo con el diseño experimental y criterios de aceptación establecidos en el procedimiento PROC-TC-012 y PLN-TC-087-01 Plan de Verificación del ensayo de Aflatoxinas Totales y atendiendo los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [1].

1.2 Alcance.

Las conclusiones y declaraciones consignadas en el presente documento, están basadas sobre los resultados obtenidos del ejercicio de verificación del método analítico PROC – TC – 087 procedimiento para la determinación de Aflatoxinas Totales, siguiendo fielmente el diseño experimental establecido en PLN-TC-087-01 Plan de Verificación del ensayo de Aflatoxinas Totales.

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

Analito [6].

Componente de un sistema a ser medido químicamente.

Blanco [6].

Material que es similar en matriz y estado físico de preparación a las muestras que están siendo analizadas como muestras problema, pero que no contiene el analito nativo y que es usado con el propósito de dar seguimiento a diferentes aspectos del proceso analítico.

Documento [2].

Información y su medio de soporte.

Ensayo/prueba [2].


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

Incertidumbre [3].

Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza.

Intervalo de trabajo [6].

Intervalo de concentraciones analíticas o los valores de las propiedades sobre las cuales el método va a ser aplicado. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal. Dentro de este intervalo lineal de respuesta habrá una relación lineal con la concentración del analito.

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

Límite de cuantificación [6].

Concentración mínima del analito en una muestra que puede determinarse con un nivel de incertidumbre aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de detección [6].

Mínima concentración de un analito o sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones en que se lleva a cabo el método.

Material de referencia certificado [3].

Material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos.

Precisión [3].

Proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.

Procedimiento [2].

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

Recuperación [6].

Proporción del analito presente o adicionado a una muestra que sirve para evaluar la eficiencia del método de ensayo.

Repetibilidad [3].

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

Reproducibilidad [3].

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad

Robustez [6].


Medida de la capacidad de un método de ensayo de permanecer inalterado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

Selectividad [6].

Capacidad de un método para determinar exacta y específicamente un analito de interés en presencia de otros componentes en la matriz bajo las condiciones de ensayos establecidos y puede ser:

Cualitativa: el grado en el cuál otras sustancias interfieren con la determinación de una sustancia de acuerdo con un procedimiento dado y/o

Cuantitativa: un término usado en conjunto con otros términos (por ejemplo: constante, coeficiente, índice, factor, número) para la caracterización cuantitativa de interferencias.

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

Sensibilidad [6].

La pendiente de la curva de calibración. Si la curva es efectivamente una “curva”, en lugar de ser una línea recta, entonces la sensibilidad será una función de la cantidad o concentración del analito.

Sesgo [6].

Medida del error sistemático de un procedimiento analítico dado y es la desviación, positiva o negativa, de la media de los resultados analíticos con respecto al valor convencionalmente verdadero.

Validación [2].

Verificación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

Verificación [2].

Verificación, a través de la aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos especificados.

Veracidad [3].

Proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia.

2.2 Notaciones.

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

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


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

“**Ítem**”: se refiere al elemento o material bajo ensayo.

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

3. REFERENCIAS.

- [1] ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- [2] ISO 9000:2015 Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary/ Sistemas de gestión de la calidad-- Fundamentos y vocabulario.
- [3] VIM: 2008, International vocabulary of metrology -- Basic and general concepts and associated terms.
- [4] ISO/IEC 17000:2004 Conformity assessment -- Vocabulary and general principles.
- [5] ISO/TR 10013:2001 Guidelines for quality management system documentation.
- [6] NMX-CH-152-IMNC: 2005 Metrología en química-vocabulario
- [7] Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org.
- [8] MILLER, N. J. y MILLER, J. C.: ESTADÍSTICA Y QUIMIOMETRÍA PARA QUÍMICA ANALÍTICA (4ª ed. 2002). ISBN: 84-205-3514-1

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO A VERIFICAR.

El método a verificar se encuentra descrito en el documento PROC – TC – 087 procedimiento para la determinación de Aflatoxinas Totales, el cual es un desarrollo de r-biopharm, y se comercializa como kit bajo la referencia R4701.

La base de la prueba es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos en las tiras de microtitulación están recubiertos con anticuerpos de captura dirigidos contra anticuerpos anti-aflatoxina.

Se añaden los estándares o las soluciones de muestra, el conjugado aflatoxina-enzima y los anticuerpos anti-aflatoxina. Las aflatoxinas libres y conjugadas con enzimas compiten por los sitios de unión de anticuerpos de aflatoxinas (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxina también están unidos por los anticuerpos de captura inmovilizados. Cualquier conjugado enzimático no unido se elimina en una etapa de lavado.

La solución de sustrato / cromógeno se agrega a los pocillos y se incuba. El conjugado enzimático unido convierte el cromógeno en un producto azul. La adición de la solución de parada conduce a un cambio de color de azul a amarillo. La medición se realiza fotométricamente a 450 nm; La absorción es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxinas en la muestra.


5. ESPECIFICACIÓN DE LOS REQUISITOS DEL MÉTODO A VERIFICAR.

Las características deseables del método de ensayo PROC – TC – 087 procedimiento para la determinación de Aflatoxinas Totales, fueron consignadas en el numeral 5 del plan de verificación PLN-TC-087-01 Plan de Verificación del ensayo de Aflatoxinas Totales.

6. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS A VERIFICAR.

Los requisitos correspondientes a los parámetros de desempeño evaluados, que permitieron establecer la aptitud del método analítico son:

PARAMETRO	CRITERIO	UNIDADES
Exactitud en el rango de calibración	0.05 – 4.05	ug/l
Intervalo de trabajo	1.72 – 4.05	ug/l
Límite de cuantificación	1.72	ug/l
Veracidad	Veraz para el rango de trabajo evaluado	
Recuperación	85% - 115%	%
Precisión - repetibilidad	C. V. % máximo 15%	%
Precisión - reproducibilidad	C. V. % máximo 15%	%

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

La exactitud y la reproducibilidad se evaluaron sobre el material de referencia certificado de maíz contaminado artificialmente con aflatoxinas, el cual fue producido por Trilogy Analytical Laboratory, e identificado con el código R-A100 y lote de producción A-C-2223. Este material tiene fecha de vencimiento 2021-10-31. La repetibilidad se evaluó sobre duplicados de muestras representativas, las cuales se identificaron con los códigos 7564-19, 7696-19, 7809-19, 7853-19, 7873-19 y 10116-19.

7. VERIFICACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE VERIFICACION.

A continuación, se presenta la tabla comparativa que muestra los valores de los requisitos a cumplir y los valores obtenidos por la ejecución del método.


PARAMETRO	CRITERIO	RESULTADO	CUMPLE SI/NO
Intervalo de calibración	0.05 – 4.05 ug/l	0.05 – 4.05 ug/l	SI
Intervalo de trabajo	1.72 – 4.05 ug/l	1.49 – 4.05 ug/l	SI
Límite de cuantificación	1.72 ug/l	1.49 ug/l	SI
Veracidad	Veraz para el rango de trabajo evaluado	Veraz para el rango de trabajo evaluado	SI
Recuperación	85% - 115%	92%	SI
Precisión - repetibilidad	C. V. % máximo 15%	12,5%	SI
Precisión - reproducibilidad	C. V. % máximo 15%	15%	SI

7.1 RESULTADOS OBTENIDOS

7.1.1 Intervalo de calibración.

El intervalo de calibración fue evaluado de acuerdo con lo establecido en el plan de calibración PLN-TC087-01, contrastando los porcentajes de inhibición obtenidos en el laboratorio, contra los proporcionados en el certificado del kit empleado. Los datos a partir de los cuales se realiza esta evaluación, se muestran a continuación:

NIVELES CONCENTRACION		
CONCENTRACION (ug/l)	% INHIBICION CERTIFICADO	% INHIBICION OBTENIDA
0,05	89,30	89,418
0,15	78,00	79,241
0,45	55,50	54,335
1,35	34,00	35,057
4,05	13,90	16,667

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

El gráfico correspondiente al ajuste por mínimos cuadrados, la estadística del ajuste de regresión y los resultados arrojados por los test de compatibilidad del intercepto y pendiente, se muestran enseguida:




ESTADISTICA REGRESION		
m =	0,973794	2,222236 = b
DSm =	0,022503	1,368381 = DSb
R2 =	0,9984	1,393075 = DSR
F =	1872,576	3 = gl


TEST INTERCEPTO IGUAL A CERO	
tcalc =	1,62398983
ttabla =	4,176534846

PENDIENTE IGUAL A 1	
tcalc =	1,164525391
tn-2 =	3,182446305

La gráfica anterior muestra que los valores de porcentaje de inhibición obtenidos en el laboratorio para cada uno de los patrones de calibración suministrados en el kit, coinciden con los valores declarados en el certificado por el fabricante. Además, el valor del contraste estadístico para evaluar la compatibilidad del intercepto con el valor de 0, muestra que efectivamente, con una confiabilidad del 95%, el valor del intercepto es estadísticamente compatible con dicho valor. De la misma manera, al evaluar el valor obtenido mediante ajuste por mínimos cuadrados para la pendiente, el contraste estadístico arroja que con un 95% de confiabilidad, que dicho valor es estadísticamente compatible con el valor de 1.

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

Lo anterior permite concluir que los porcentajes de inhibición para cada uno de los patrones de calibración suministrados en el kit, no difieren de los declarados en el certificado suministrados por el fabricante y por tanto este atributo se aprueba.

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

7.1.2 Límites de detección y cuantificación


Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fueron estimados a partir de los resultados obtenidos para los blancos y siguiendo las directrices establecidas en el procedimiento PROC-TC-012. Los datos obtenidos y los resultados de la evaluación se muestran a continuación:

MUESTRA			Blanco
MENSUERANDO	LOTE	FECHA	Aflatoxinas Totales
RESULTADO (ug/l)	1	2019-08-30	1,32
	2	2019-09-06	1,12
	3	2019-09-13	1,61
	4	2019-09-17	0,99
	5	2019-10-28	1,16
	6	2019-10-31	1,16
PROMEDIO			1,23
S₀			0,09
LOD (ug/l)			1,49
LOQ (ug/l)			2,10

De acuerdo con los resultados presentados en la tabla anterior, se encuentra que el límite de detección (LOD) para el método de ensayo obtenido durante el ejercicio fue de 1.49 ug/l, el cual es inferior al criterio establecido en el plan de verificación PLN-TC-087-01, el cual fue de 1.72 ug/l. Además, se establece, que el límite de cuantificación para el método de ensayo ejecutado en el laboratorio es de 2.10 ug/l. Teniendo en cuenta que el LOD obtenido experimentalmente es inferior al criterio establecido, se declara como aprobado el atributo.

7.1.3 Precisión - repetibilidad

Para la evaluación de la precisión, se tomaron muestras representativas del alcance de la aplicación del método de ensayo, con niveles altos y bajos de aflatoxinas totales, que permitieran desafiar el método en todo el rango de aplicación. Los datos primarios y resultados obtenidos, se muestran en las tablas siguientes:

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

MUESTRA	MENSUERANDO	RESULTADO (ug/l)					
		FECHA	2019-08-30	2019-10-31	2019-09-06	2019-09-06	2019-09-06
	MUESTRA	7564-19	10116-19	7696-19	7809-19	7853-19	7873-19
DUPLICADO	Aflatoxinas						
	Totales	4,17	1,36	4,14	5,91	2,56	1,94
MUESTRA DE RUTINA	Aflatoxinas						
	Totales	3,39	1,73	4,47	6,99	2,29	2,33
PROMEDIO		3,78	1,54	4,31	6,45	2,42	2,13
VARIANZA		0,30	0,07	0,06	0,58	0,04	0,08

ESTIMACION DE LA PRECISION		
	VARIANZA	C. V. %
REPETIBILIDAD	0,1855	12,52%

Durante el ejercicio, la precisión en términos de repetibilidad obtenida, expresada como coeficiente de variación fue de 12.52%, valor que es inferior a la meta de precisión establecida en el plan de verificación PLN-TC-087-01, la cual fue de 15%. Lo anterior, permite declarar como aprobado el atributo precisión.


7.1.4 Precisión - reproducibilidad

La reproducibilidad se evaluó sobre los resultados de la ejecución del ensayo sobre el material de referencia A-C-2223 en los seis lotes de análisis. Los datos primarios y resultados se muestran en las tablas siguientes:

MUESTRA	MENSUERANDO	RESULTADO (mg/kg)					
		FECHA	2019-08-30	2019-09-06	2019-09-13	2019-09-17	2019-10-28
	LOTE	1	2	3	4	5	6
MR-AC2223	Aflatoxinas Totales	5,7622	4,3629	4,6073	5,2010	5,1664	3,6986

ESTIMACION DE LA EXACTITUD		
	VARIANZA	C. V. %
PRECISION	0,5324	15%

El resultado del cálculo del coeficiente de variación de la reproducibilidad es igual al criterio propuesto en el plan de validación PLN-TC-087-01, por tanto, este parámetro se aprueba.


	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

7.1.5 Exactitud

Como se indicó en el numeral 5, la exactitud se evaluó sobre material de referencia certificado, cuya matriz es maíz, la cual fue contaminada artificialmente con aflatoxinas. Los resultados de los ensayos realizados sobre dicho MRC y su correspondiente evaluación estadística, se muestran en las tablas siguientes:

MUESTRA	MENSUARANDO	RESULTADO (mg/kg)						
		FECHA	2019-08-30	2019-09-06	2019-09-13	2019-09-17	2019-10-28	2019-10-31
		LOTE	1	2	3	4	5	6
MR-AC2223	Aflatoxinas Totales		5,7622	4,3629	4,6073	5,2010	5,1664	3,6986

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD	
VR. ASIGNADO DEL MENSUARANDO (ug/Kg)	5,2
CONTENIDO DEL MENSUARANDO (ug/Kg)	4,8
SESGO	-0,4
E. R. %	-7,70%
RECUPERACION %	92,30%

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD - VERACIDAD	
tCalc	1,34369186
tTabla	2,57058184
CONCLUSION	EL METODO ES VERAZ

Las tablas anteriores muestran que la recuperación obtenida durante el ejercicio fue del 92.3%, la cual es mayor que establecida como criterio en el plan de verificación PLN-TC-087-01. (85% - 115). Así mismo, los resultados arrojados por el contraste estadístico empleado para evaluar la veracidad del método, arrojaron que el método de ensayo es verás. Esto concuerda con lo propuesto en el correspondiente plan de verificación.

Además de lo anterior, y aunque no fue contemplado en el plan de verificación, al comparar los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos para evaluar la exactitud, se encontraron dentro de los límites establecidos en el certificado emitido por el fabricante del material de ensayo para la incertidumbre para el valor asignado de éste, con un 95% de confiabilidad. (Ver anexos)

Por lo descrito anteriormente, el parámetro exactitud se aprueba.

8. CONCLUSIONES DE LA VERIFICACION.

Con base en los resultados obtenidos, la Directora Técnica de AOXLAB S. A. S., declara que el método es apto para el uso previsto, de acuerdo con los requerimientos establecidos por el laboratorio.

9. INFORME.

El presente informe es aprobado por la Directora Técnica y debe estar disponible para consulta permanente en los archivos correspondientes a este ensayo.

9.1 Firmas del personal de verificación.

Realizó:


Revisó:

Aprobó:

Nombre y firma
Analistas

Nombre y firma
Líder Laboratorio

Nombre y firma
Director técnico

	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

10. RESPONSABILIDADES.

10.1 Líder de Calidad.

Asegurar la disponibilidad del presente documento para su consulta.

10.2 Líder de Laboratorio.

Asegurar la actualización del presente documento por cambios en el método de ensayo o en cualquier caso que se requiera.

10.3 Analistas.

Consultar y actualizar el presente documento cuando se requiera.

11. FORMATOS RELACIONADOS.

FOR-TC-067 Formato para el registro de Aflatoxinas Totales

12. ANEXOS.

Datos primarios correspondientes a los ensayos realizados, consignados en el formato FOR-TC 067

Certificado del valor asignado al material de referencia R-A100 y lote de producción A-C-2223.