	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-100-01
Plan de verificación del ensayo
de determinación de
Glucanos en la materia prima
“Betaglucano de levadura polvo”
y el producto terminado
Vitalwell® cápsulas”


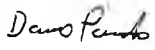
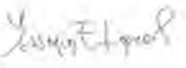
AOXLAB S.A.S.

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

DOCUMENTO CONTROLADO

PLN-TC-100-01 Plan de verificación del ensayo de determinación de glucanos

Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Wlner Ferney Ruiz Patiño	Líder Laboratorio		2019-08-05
Revisó:	Darío Pardo Pardo	Líder de Calidad		2019-08-08
Aprobó:	Yasmín Eliana Lopera Pérez	Gerente y Director Técnico		2019-08-22
Localización del documento:		Z:\7. PROCESO\REGISTROS AOXLAB\REGISTROS (RT)2018\Planes de validación		

Control de Cambios

Estado	Fecha de inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Vigente	2019-08-22	0	Ninguno (versión original).	WFR	DPP	YELP

	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 CARACTERISITICAS DE DESEMPEÑO A EVALUAR.	5
5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	6
5.2.1 Condiciones generales	6
5.2.2 Materiales, equipos y reactivos	7
5.2.3 Preparación de materiales de referencia	8
6. VERIFICACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE CONFIRMACIÓN.	9
7. CONCLUSIONES DE LA CONFIRMACIÓN.	10
8. INFORME.	10
9. RESPONSABILIDADES.	10
9.1 Director Técnico.	10
9.2 Líder de Laboratorio.	10
9.3 Analistas.	10
10. FORMATOS RELACIONADOS.	10
11. ANEXOS.	11

	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 – 100 Procedimiento para la determinación de glucanos, mediante la técnica de hidrolisis enzimática. Este método de ensayo es un desarrollo de Megazyme, el cual se comercializa como kit bajo la referencia K-YBGL08/18.

El desempeño del método analítico será evaluado sobre las siguientes matrices:

- Materia prima Betaglucano de levadura polvo
- Producto terminado Vitawell® cápsulas

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 – 100 Procedimiento para la determinación de beta-glucano, 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 – 100 Procedimiento para la determinación de b-glucanos

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 identificación y cuantificación de β -glucano

	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, el método debe ser aplicable a muestras de levadura (materia prima) y producto terminado. Debe mostrar un adecuado desempeño en todo el rango de operación (1 % – 100 %)

5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE CONFIRMACIÓN.

5.1 CARACTERÍSTICAS 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 todos y cada uno de los analitos especificados en el numeral 4:

PARAMETRO	CRITERIO	UNIDADES
Intervalo de trabajo	1 – 100	%
Límite de cuantificación	1.0	%
Linealidad instrumental	4.00 - 100	ug glucosa/0.1 ml
Exactitud	E. R. % máximo 10%	%
Veracidad	Veraz para el rango de trabajo evaluado	/
Precisión - repetibilidad	C. V. % máximo 10%	%
Precisión - reproducibilidad	C. V. % máximo 10%	%
Robustez ante el cambio de analista y cambios en las condiciones de extracción	Robusto	/

La exactitud se evaluará sobre soluciones estándar preparadas en el laboratorio y sobre los resultados obtenidos sobre las matrices ensayadas, utilizando como valor aceptado el establecido en la ficha técnica.

La linealidad instrumental se evaluará sobre soluciones estándar de glucosa, a las cuales se les desarrollará color y se les medirá la absorbancia, de acuerdo con las instrucciones suministradas en el inserto del kit.

La repetibilidad se evaluará sobre duplicados de muestras representativas de cada matriz.

La evaluación de robustez se llevará a cabo siguiendo el diseño experimental de Youden – Steiner, que se ilustra a continuación:

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

Condición	Normal (Minúscula)	Alterada (Mayúscula)	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura de hidrólisis	100° C	90° C	A	A	A	A	a	a	a	a
Tiempo de hidrólisis	2 horas	1.5 horas	B	B	B	b	B	b	b	b
pH de la dilución paso 8 Literal Aa	5	4.5	C	c	C	c	C	c	C	c
Temperatura de incubación Paso 3 literal Ab	40° C	35° C	D	D	d	d	d	d	D	D
Tiempo de incubación Paso 3 literal Ab	2 horas	1.5 horas	E	e	E	e	e	E	e	E
Temperatura de incubación Paso 4 literal Ba	40° C	35° C	F	f	f	F	F	f	f	F
Tiempo de incubación Paso 4 literal Ba	30 minutos	25 minutos	G	g	g	G	g	G	G	g

Este ejercicio se realizará sobre una muestra de materia prima previamente homogenizada de la cual se sacarán las ocho porciones de análisis, cada una de las cuales se analizará de acuerdo con las condiciones establecidas en la tabla anterior.

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 ocho lotes de ítems de ensayo cada uno en un día diferente. Estos serán procesados y analizados por el analista Sergio Andrés Bedoya Urrego (SABU), de acuerdo con las instrucciones dadas en los numerales siguientes.

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

Tipo de muestra	Muestra
Blanco	Inyección del contenido de un vial con metanol
Estándar límite de reporte	Estándar de 1 %, preparado a partir del material de referencia contenido en el kit de ensayo

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

Tipo de muestra	Muestra
Duplicado Estándar límite de reporte	Estándar de 1 %, preparado a partir del material de referencia contenido en el kit de ensayo
Estándar límite superior del rango de trabajo	Estándar de 49%, preparado a partir del material de referencia contenido en el kit de ensayo
Muestra de materia prima	Muestra de β -glucano de levadura polvo
Muestra de producto terminado 1	Muestra de Vitawell® cápsulas
Muestra retenida	Muestra código 7794-19 retenida por el laboratorio para el control de calidad de los ensayos.

Se evaluará la recuperación sobre la muestra con código 7794-19 retenida por el laboratorio cuyos datos históricos se conservan en los archivos.

5.2.2 Materiales, equipos y reactivos

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

EQUIPO	ID
Espectrofluorímetro Synergy HT	072
Balanza analítica	006 /235
Balanza de platillo externo	170
Vortex Mixer	239
Micropipeta 100 μ L	012
Micropipeta 200 μ L	016
Micropipeta 10000 μ L	0243
Baño María	001
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
BEAKER 500 ml	2	
BEAKER 100 ml	2	
Probeta de vidrio de 100 ml	2	
Tubos falcón de 15 mL	200	
BALON VOLUMETRICO 1000 mL	5	

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

MATERIAL	CANTIDAD	CALIBRACIÓN
BALON VOLUMETRICO 25 mL	5	
MICROPLACAS ELISA	50	
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:

Ácido acético glacial
Hidróxido de sodio >99%
D-Glucosa >99%
Hidróxido de potasio >99%
Ácido sulfúrico 98%
Kit Megazyme K-YBGL 08/18

Estos deben contar con certificado de análisis vigente.

La preparación de las soluciones requeridas para el ensayo se realiza a partir de los reactivos anteriores y de acuerdo con lo establecido en el procedimiento PROC-TC-100.

Muestras a ensayar

CÓDIGO DE MUESTRA	MATRIZ	CANTIDAD REQUERIDA (g)
6739-19	Materia prima β -glucano de levadura polvo	100 g
6735-19	Vitawell® cápsulas	100 g

5.2.3 Preparación de materiales de referencia

5.2.3.1 Solución estándar de 1% de β -glucano para glucanos totales

En un tubo de ensayo tapa rosca de 20 mm X125 mm pesar 20.4 mg del estándar de β -glucano contenido en el kit y disolver en 10 ml de ácido sulfúrico 12M. Transferir cuantitativamente a un balón aforado de 20 ml y aforar con ácido sulfúrico 12M. Tratar esta solución como una muestra durante el ejercicio de validación.

5.2.3.2 Solución estándar de 1% de β -glucano para α -glucano

En un tubo de ensayo tapa rosca de 20 mm X125 mm pesar 20.4 mg del estándar de β -glucano contenido en el kit y disolver en 10 ml de hidróxido de potasio 2M.

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

Transferir cuantitativamente a un balón aforado de 20 ml y aforar con ácido sulfúrico 12M. Tratar esta solución como una muestra durante el ejercicio de validación.

5.2.3.3 Solución estándar de glucosa
 pesar 0.1g de D-glucosa y disolver en 5 ml de agua desionizada. Transferir cuantitativamente a un balón aforado de 10ml y completar a volumen Conagua desionizada.

5.2.3.4 Soluciones estándar de glucosa para la verificación de la linealidad instrumental
 En balones aforados de 10 ml, transferir los siguientes volúmenes de la solución anterior, para obtener las concentraciones relacionadas

Vol. STD glucosa (ul)	Concentración (ug/0,1 mL)
0	0
40	4
100	10
200	20
400	40
500	50
800	80
1000	100

Nota 1: la preparación de las soluciones detalladas en los numerales 5.2.3.1, 5.2.3.2 y 5.2.3.4 se preparan una sola vez y deben almacenarse en refrigeración para analizarse en cada lote de análisis.

Nota 2: Las muestras de materia prima y productos terminados deben homogenizarse y ensayarse de manera independiente en cada uno de los 8 lotes de análisis propuestos en el numeral 5.2.2

El procedimiento para llevar a cabo los cálculos se documenta en PROC – TC – 013 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.

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

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

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.

9. RESPONSABILIDADES.

9.1 Director Técnico.

Revisar y aprobar el presente plan de validación

Asegurar los recursos para la ejecución del plan de validación.

Brindar orientación técnica durante la ejecución del plan de validación.

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 validación, 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-154 Formato de registro de datos primarios de análisis de β -glucanos

	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 VALIDACION

IDENTIFICACIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO VALIDADO

Nombre completo del método: Determinación de β -glucanos Método de referencia: Kit Megazyme K-YBGL 08/18. Procedimiento interno: PROC – TC - 100							
Tipo de método:	Cualitativo		Cuantitativo	X			
Origen del método	Normalizado		No Normalizado	X	Otro		
	Normalizado modificado		Interno				
Analitos: <ul style="list-style-type: none"> α-glucano β-glucano glucanos totales Unidades: % Matrices: <ul style="list-style-type: none"> Materia prima β-glucano de levadura polvo Producto terminado Vitawell® cápsulas 			Responsables por la validación				
			Responsable		Firma		
			SABU				
			Fecha de entrega del informe de la validación:				
			Noviembre 30 de 2019				

PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Selectividad		Linealidad / intervalo de trabajo	X
Sensibilidad		Límite de detección	
Límite de cuantificación	X	Veracidad	X
Repetibilidad	X	Reproducibilidad	X
Robustez	X	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-100-01

Informe de verificación del ensayo de β -glucanos

AOXLAB S.A.S.


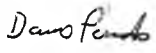
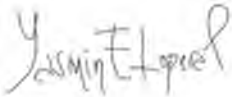
* PROC – TC – 100 Procedimiento para la determinación de β -glucanos

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-100-01 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		2019/11/20
Revisó:	Darío Pardo	Líder de Calidad		2019/11/27
Aprobó:	Yasmín Eliana Lopera Pérez	Gerente y Director Técnico		2019/11/27
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	2019/10/10	1	Ninguno (versión original).	WFRP	DPP	YELP

* PROC – TC – 100 Procedimiento para la determinación de β -glucanos

	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 β -glucanos

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


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 trabajo.....	10
7.1.2 Linealidad instrumental.....	13
7.1.3 Límites de detección y cuantificación.....	16
7.1.4 Precisión- Reproducibilidad y repetibilidad.....	17
7.1.5 Exactitud.....	21
7.1.6 Robustez.....	23
8. CONCLUSIONES DE LA VERIFICACION.....	25
9. INFORME.....	25
9.1 Firmas del personal de validación.....	25
10. RESPONSABILIDADES.....	26
10.1 Líder de Calidad.....	26
10.2 Líder de Laboratorio.....	26
10.3 Analistas.....	26
11. FORMATOS RELACIONADOS.....	26
12. ANEXOS.....	26

	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 – 100 procedimiento para la determinación de β -glucanos, el cual es un desarrollo de Megazyme, y se comercializa como kit, bajo la referencia K-YBGL08/18. Este ejercicio se desarrolló, de acuerdo con el diseño experimental y criterios de aceptación establecidos en el procedimiento PROC-TC-012 y PLN-TC-100-01 Plan de Verificación del ensayo de β -glucanos 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 validación del método analítico PROC – TC – 100 procedimiento para la determinación de β -glucanos, siguiendo fielmente el diseño experimental establecido en PLN-TC-100-01 Plan de Verificación del ensayo de β -glucanos.

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 validar se encuentra descrito en el documento PROC – TC – 100 procedimiento para la determinación de β -glucanos, el cual es un desarrollo de Megazyme, y se comercializa como kit bajo la referencia K-YBGL08/18.

Los 1,3: 1,6- β -D-glucanos, 1,3- β -D-glucanos y α -glucanos se solubilizan en H_2SO_4 12 M enfriado con hielo y luego hidrolizado casi completamente en H_2SO_4 2 M. Los fragmentos de glucano restantes se hidrolizan cuantitativamente a glucosa usando una mezcla de exo-1,3- β -glucanasa y β -glucosidasa altamente purificada. Esto da una medida del glucano total.

Los α -glucanos se miden específicamente por hidrólisis de los glucanos a glucosa usando amiloglucosidasa más α -amilasa y la medición de glucosa se realiza con reactivo GOPOD. El β -glucano está determinado por diferencia.

5. ESPECIFICACIÓN DE LOS REQUISITOS DEL MÉTODO A VERIFICAR.


Las características deseables del método de ensayo PROC – TC – 100 procedimiento para la determinación de β -glucanos fueron consignadas en el numeral 5 del plan de validación PLN-TC-100-01 Plan de Verificación del ensayo de β -glucanos.

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
Intervalo de trabajo	1 – 100	%
Linealidad instrumental	4.00 - 100	ug glucosa/0.1 ml
Límite de cuantificación	1.0	%
Exactitud	E. R.% máximo 10%	%
Veracidad	Veraz para el rango de trabajo evaluado	
Recuperación	70% - 110%	%
Precisión - repetibilidad	C. V. % máximo 10%	%
Precisión - reproducibilidad	C. V. % máximo 10%	%
Robustez ante el cambio de las condiciones de extracción e incubación	Robusto	

La exactitud se evaluó sobre soluciones estándar preparadas en el laboratorio y sobre materiales de referencia, utilizando como valor aceptado el establecido en la ficha técnica.

	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 repetibilidad se evaluó sobre duplicados de muestras representativas de cada matriz.

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 trabajo	1% – 85%	1% – 85%	SI
Límite de cuantificación	1,0%	0,4%	SI
Exactitud	E. R. % máximo 10%	-3,94%	SI
Veracidad	Veraz para el rango de trabajo evaluado	Veraz para el rango de trabajo evaluado	SI
Recuperación	70% - 110%	96%	SI
Precisión - repetibilidad	C. V. % máximo 10%	2,7%	SI
Precisión - reproducibilidad	C. V. % máximo 10%	7,6%	SI
Robustez ante el cambio de las condiciones de extracción e incubación	Robusto	Únicamente para el Tiempo de incubación Paso 4 literal Ba	NO


7.1 RESULTADOS OBTENIDOS

7.1.1 Intervalo de trabajo


Aun cuando en el plan de validación PLN-TC-100-01 se había propuesto evaluar el intervalo de trabajo en el rango de 1% a 100%, no fue posible sino en el intervalo entre 0% y 85% de β -glucanos debido a que no se pudo contar con materiales de referencia con valores asignados superiores.

El intervalo de trabajo se evaluó utilizando blancos, estándares y materiales de referencia grado comercial. Para esto se utilizaron blancos, controles de 10% y 49% de β -glucanos y un material de referencia comercial con un valor de 85% de dicho mensurando. Los resultados obtenidos se compararon contra los valores asignados mediante un ajuste de regresión lineal, evaluando la compatibilidad de la pendiente con el valor de 1 y el intercepto con el valor 0 mediante un contraste *t de Student* con una confiabilidad del 95% y n-2 grados de libertad

Los resultados obtenidos de la evaluación del rango de trabajo se muestran a continuación:

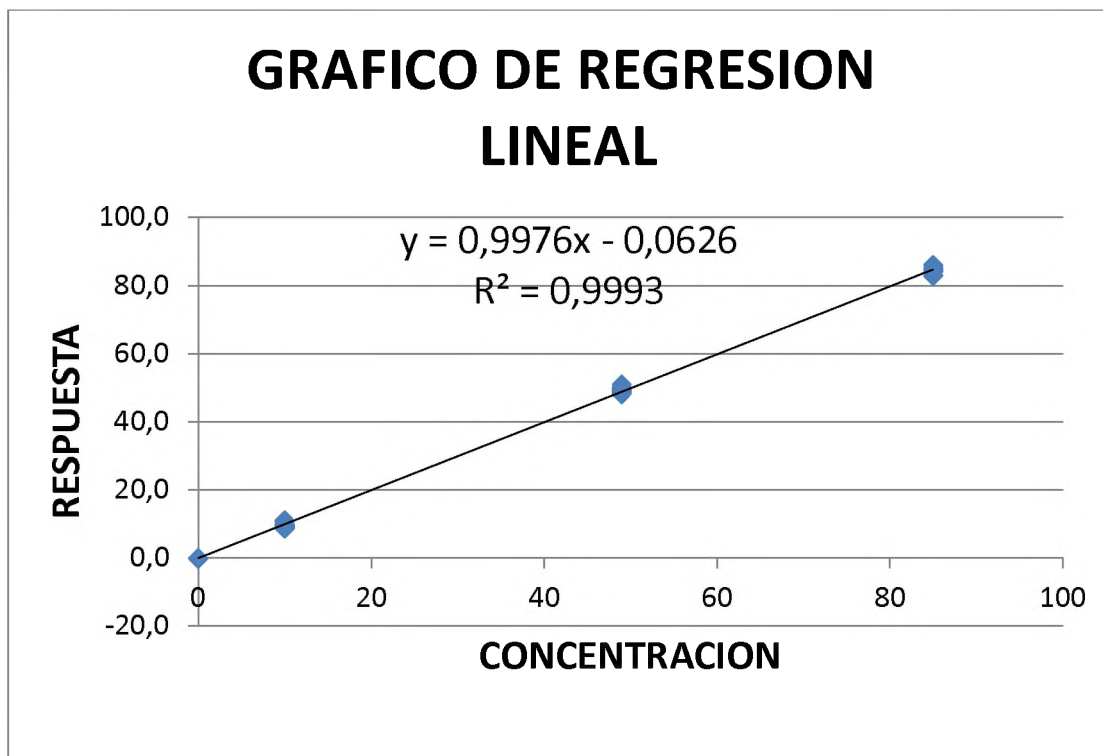
	Informe de validación o confirmación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: FOR-TC-047
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/01/10

LOTE	FECHA DE ANALISIS	LOTE	CONCERNTRACION DE REFERENCIA (%)	CONCENTRACION OBTENIDA (%)
Blanco	2019-09-14	1	0	0,0
Blanco	2019-10-02	7	0	0,0
Blanco	2019-10-05	8	0	0,0
Blanco	2019-09-25	4	0	-0,3
Blanco	2019-09-27	5	0	0,0
Blanco	2019-10-01	6	0	0,0
Control 10%	2019-09-14	2	10	11,0
Control 10%	2019-10-02	7	10	9,5
Control 10%	2019-09-17	3	10	9,8
Control 10%	2019-09-25	4	10	9,7
Control 10%	2019-09-27	5	10	9,3
Control 10%	2019-10-01	6	10	8,6
Control 10%-2	2019-09-14	2	10	10,7
Control 10%-2	2019-10-02	7	10	9,5
Control 10%-2	2019-09-17	3	10	9,0
Control 10%-2	2019-09-25	4	10	9,9
Control 10%-2	2019-09-27	5	10	9,4
Control 10%-2	2019-10-01	6	10	8,7
Control 49%	2019-09-14	2	49	48,9
Control 49%	2019-10-02	7	49	48,2
Control 49%	2019-09-17	3	49	50,3
Control 49%	2019-09-25	4	49	50,0
Control 49%	2019-09-27	5	49	48,8
Control 49%	2019-10-01	6	49	48,6
Control 49%-2	2019-09-14	2	49	49,9
Control 49%-2	2019-10-02	7	49	48,6
Control 49%-2	2019-09-17	3	49	51,0
Control 49%-2	2019-09-25	4	49	50,1
Control 49%-2	2019-09-27	5	49	49,9
Control 49%-2	2019-10-01	6	49	49,3
7794-19	2019-10-05	8	85	86,0
7794-19	2019-10-02	7	85	86,1
7794-19	2019-09-17	3	85	82,9
7794-19	2019-09-25	4	85	83,0
7794-19	2019-09-27	5	85	84,8
7794-19	2019-10-01	6	85	84,9


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

LOTE	FECHA DE ANALISIS	LOTE	CONCERNTRACION DE REFERENCIA (%)	CONCENTRACION OBTENIDA (%)
7794-19-2	2019-10-05	8	85	84,6
7794-19-2	2019-10-02	7	85	85,2
7794-19-2	2019-09-17	3	85	84,4
7794-19-2	2019-09-25	4	85	82,9
7794-19-2	2019-09-27	5	85	84,0
7794-19-2	2019-10-01	6	85	84,2

NOTA: La notación -2 indica que el resultado corresponde al duplicado del ítem de ensayo



ESTADISTICA REGRESION			
m =	0,99762182	-0,06260105	= b
DS _m =	0,00431338	0,22737931	= DS _b
R ² =	0,9992528	0,92125927	= DS _R
F =	53492,9092	40,00	= gl
S ² _i =	45400,429	33,9487455	=R

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

TEST INTERCEPTO IGUAL A CERO

$t_{calc} =$ -0,2753155

$t_{tabla} =$ 2,328934768

INTERCEPTO IGUAL A 0

TEST PENDIENTE DIFERENTE DE 1

$t_{calc} =$ 0,551350106

$t_{n-2} =$ 2,02107539


PENDIENTE IGUAL A 1

A partir del coeficiente de determinación es posible obtener el coeficiente de correlación, cuyo valor es de 0.9988, lo cual evidencia el alto grado de correlación entre los valores asignados y los valores obtenidos a partir del ensayo. Además de lo anterior, el test de compatibilidad del intercepto con el valor de 0 y el correspondiente para la evaluación del valor de la pendiente con 1, muestran que el método es proporcional en el rango evaluado. Por lo anterior, el atributo linealidad se aprueba en el rango entre 0% y 85%.

7.1.2 Linealidad instrumental

Los resultados obtenidos de la medición de la absorbancia a los estándares de D-glucosa preparados siguiendo las directrices establecidas en el plan de validación PLN-TC-100-01 se muestran a continuación:

NIVELES CONCENTRACION					INTERPOLACION	
LOTE	MENSURANDO	FECHA	Glucosa $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$	Absorbancia	Conc interpolada $\mu\text{g}/01, \text{ ml}$	E. R. %
Blanco	Glucosa	2019-11-16	0	0,00025	1	N. A.
Blanco	Glucosa	2019-11-16	0	-0,00075	0	N. A.
Blanco	Glucosa	2019-11-16	0	0,00125	1	N. A.
Blanco	Glucosa	2019-11-16	0	-0,00075	0	N. A.
Estándar 1	Glucosa	2019-11-16	4	0,01725	4	5%
Estándar 1	Glucosa	2019-11-16	4	0,01925	5	15%
Estándar 1	Glucosa	2019-11-16	4	0,02025	5	21%
Estándar 1	Glucosa	2019-11-16	4	0,01725	4	5%
Estándar 2	Glucosa	2019-11-16	10	0,04125	9	-7%
Estándar 2	Glucosa	2019-11-16	10	0,04225	10	-4%
Estándar 2	Glucosa	2019-11-16	10	0,04125	9	-7%
Estándar 2	Glucosa	2019-11-16	10	0,04125	9	-7%


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

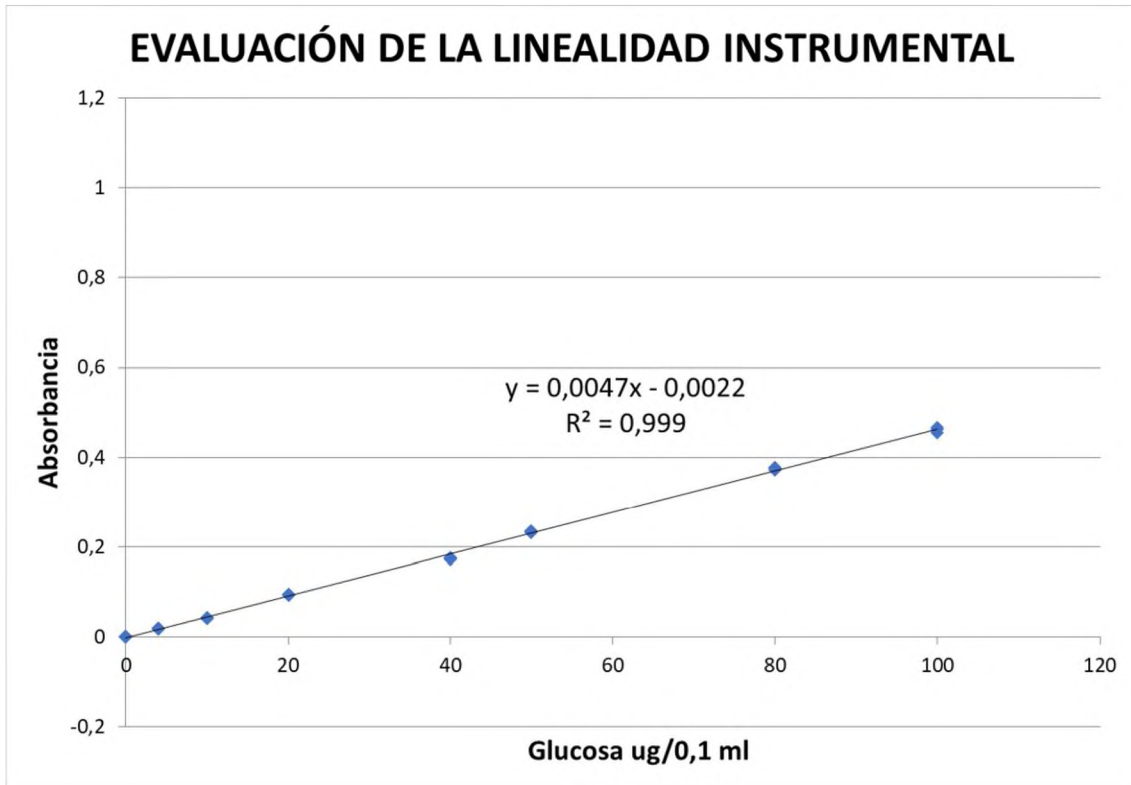
NIVELES CONCENTRACION

INTERPOLACION

LOTE	MENSURANDO	FECHA	Glucosa $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$	Absorbancia	Conc interpolada $\mu\text{g}/01, \text{ ml}$	E. R. %
Estándar 3	Glucosa	2019-11-16	20	0,09425	21	4%
Estándar 3	Glucosa	2019-11-16	20	0,09525	21	5%
Estándar 3	Glucosa	2019-11-16	20	0,09325	21	3%
Estándar 3	Glucosa	2019-11-16	20	0,09225	20	2%
Estándar 4	Glucosa	2019-11-16	40	0,17425	38	-5%
Estándar 4	Glucosa	2019-11-16	40	0,17325	38	-6%
Estándar 4	Glucosa	2019-11-16	40	0,17125	37	-7%
Estándar 4	Glucosa	2019-11-16	40	0,17525	38	-5%
Estándar 5	Glucosa	2019-11-16	50	0,23225	50	1%
Estándar 5	Glucosa	2019-11-16	50	0,23425	51	2%
Estándar 5	Glucosa	2019-11-16	50	0,23025	50	0%
Estándar 5	Glucosa	2019-11-16	50	0,23325	51	1%
Estándar 6	Glucosa	2019-11-16	80	0,37625	81	2%
Estándar 6	Glucosa	2019-11-16	80	0,37525	81	1%
Estándar 6	Glucosa	2019-11-16	80	0,37725	82	2%
Estándar 6	Glucosa	2019-11-16	80	0,37225	80	1%
Estándar 7	Glucosa	2019-11-16	100	0,46325	100	0%
Estándar 7	Glucosa	2019-11-16	100	0,46625	101	1%
Estándar 7	Glucosa	2019-11-16	100	0,46225	100	0%
Estándar 7	Glucosa	2019-11-16	100	0,45425	98	-2%

Se organizaron las parejas de datos de concentración en un plano cartesiano y se realizó el correspondiente ajuste por mínimos cuadrados, obteniéndose el gráfico siguiente:

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



Los contrastes estadísticos obtenidos de la evaluación del ajuste arrojaron los siguientes resultados:

VALIDACION DEL MODELO DE REGRESION

TEST PENDIENTE SIGNIFICATIVA

$F_{calc} =$ 30822,45658

$F_{1\ n-2} =$ 4,170876786


LA PENDIENTE ES SIGNIFICATIVA

TEST INTERCEPTO IGUAL A CERO

$t_{calc} =$ -1,64580735

$t_{tabla} =$ 2,359562459

INTERCEPTO IGUAL A 0

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

TEST PENDIENTE DIFERENTE DE 0

$$t_{\text{calc}} = 175,5632552$$

$$t_{n-2} = 2,042272456$$

PENDIENTE DIFERENTE DE 0


El valor obtenido para el coeficiente de determinación, el cual se muestra en el gráfico, muestra indica que el 99.99% de la variabilidad en la absorbancia es explicada por la variación en la concentración. Además de lo anterior, los contrastes estadísticos para evaluar si la pendiente es estadísticamente significativa y para evaluar la compatibilidad del valor obtenido para la pendiente con el valor de cero, permiten concluir que efectivamente existe una pendiente en el modelo de ajuste, lo que quiere decir, que realmente existe una respuesta proporcional a la concentración. Así mismo, el test estadístico para evaluar la compatibilidad del intercepto con el valor de cero, muestra que evidentemente la calibración pasa por el origen lo que demuestra la ausencia de errores sistemáticos por parte del instrumento. De acuerdo con los resultados obtenidos, se declara como aprobado el parámetro linealidad instrumental.

7.1.3 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	
MENSURANDO	LOTE	FECHA DE ANALISIS	Beta-Glucan
	1	2019-09-14	-0,01
	7	2019-10-02	0,00
RESULTADO (%)	8	2019-10-05	0,00
	4	2019-09-25	-0,30
	5	2019-09-27	0,00
	6	2019-10-01	0,00
PROMEDIO			-0,05
S ₀			0,05
LOD (%)			0,10
LOQ (%)			0,45

A partir de los resultados anteriores, se establece el límite de detección (LOD) para el método analítico en 0.1%. El límite de cuantificación (LOQ) estimado es entonces

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

0.45%, valor que es menor a la meta propuesta, (1%), lo cual permite declarar que el atributo límite de cuantificación se aprueba.

7.1.4 Precisión- Reproducibilidad y repetibilidad

La precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad bajo condiciones de precisión intermedia, variando la condición tiempo (días), fue evaluada sobre estándares correspondientes a un valor de 10% y 49%, obtenidos del control de calidad contenido en el kit de ensayo para β -glucanos. Así mismo, este parámetro fue evaluado sobre las muestras que se relacionan a continuación:

6735-19	Vitalwell® cápsulas
6739-19	Materia Prima
7794-19	Betaglucano de levadura 85%

Los resultados obtenidos de la ejecución de los ensayos y los resultados de la evaluación de la precisión se muestran a continuación:


MUESTRA	MENSURANDO	RESULTADO (%)					
		FECHA	2019-09-14	2019-10-02	2019-09-17	2019-09-25	2019-09-27
	LOTE	2	7	3	4	5	6
Control 10%	Beta-Glucan	10,9945	9,5281	9,8457	9,7319	9,3370	8,6499
Control 10%-2	Beta-Glucan	10,6877	9,4748	9,0105	9,8878	9,4166	8,7125
	PROMEDIO	10,8411	9,5015	9,4281	9,8099	9,3768	8,6812
	VARIANZA	0,04706	0,00142	0,34878	0,01215	0,00317	0,00196

ANALISIS DE LA VARIANZA

VARIANZA ENTRE LOTES	1,0069	F _{calc}	14,5745
VARIANZA DENTRO DE LOTES	0,0691	F _{tabla}	4,3874
VARIANZA NETA ENTRE LOTES			0,4689
CONCLUSION	HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS LOTES		

ESTIMACION DE LA PRECISION


	VARIANZA	C. V. %
REPETIBILIDAD	0,0691	2,74%
PRECISION INTERMEDIA	0,5380	7,64%

	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	MENSURANDO	RESULTADO (%)					
		FECHA	2019-09-14	2019-10-02	2019-09-17	2019-09-25	2019-09-27
	LOTE	2	7	3	4	5	6
Control 49%	Beta-Glucan	48,8881	48,2000	50,3116	49,9504	48,7691	48,6013
Control 49%-2	Beta-Glucan	49,8522	48,5504	50,9943	50,1247	49,8552	49,2881
	PROMEDIO	49,3702	48,3752	50,6530	50,0375	49,3121	48,9447
	VARIANZA	0,46474	0,06141	0,2330	0,01520	0,58975	0,23582

ANALISIS DE LA VARIANZA		
VARIANZA ENTRE LOTES	1,2913	F _{calc} 4,8425
VARIANZA DENTRO DE LOTES	0,2667	F _{tabla} 4,3874
VARIANZA NETA ENTRE LOTES		0,5123
CONCLUSION	HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS LOTES	


ESTIMACION DE LA PRECISION		
	VARIANZA	C. V. %
REPETIBILIDAD	0,2667	1,04%
PRECISIÓN INTERMEDIA	0,7790	1,78%

	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	MENSURANDO	RESULTADO (%)					
		FECHA	2019-09-14	2019-10-02	2019-09-17	2019-09-25	2019-09-27
	LOTE	2	7	3	4	5	6
6735-19	Beta-Glucan	56,6962	65,8464	61,2140	68,8991	69,5059	64,7843
6735-19-2	Beta-Glucan	56,8722	67,0892	61,8081	69,1778	70,1097	64,6012
	PROMEDIO	56,7842	66,4678	61,5111	69,0384	69,8078	64,6927
	VARIANZA	0,01549	0,77221	0,17648	0,03886	0,18229	0,016758

ANALISIS DE LA VARIANZA		
VARIANZA ENTRE LOTES	48,3459	Fcalc 241,3126
VARIANZA DENTRO DE LOTES	0,2003	Ftabla 4,3874
VARIANZA NETA ENTRE LOTES		24,0728
CONCLUSION HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS LOTES		


ESTIMACION DE LA PRECISION		
	VARIANZA	C. V. %
REPETIBILIDAD	0,2003	0,69%
PRECISION INTERMEDIA	24,2731	7,61%

	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	MENSURANDO	RESULTADO (%)					
		FECHA	2019-09-14	2019-10-02	2019-09-17	2019-09-25	2019-09-27
	LOTE	2	7	3	4	5	6
6739-19	Beta-Glucan	77,2796	85,9172	83,7628	88,7771	87,4045	85,1068
6739-19-2	Beta-Glucan	77,0801	84,5832	85,8443	88,8816	86,9123	85,3973
	PROMEDIO	77,1799	85,2502	84,8036	88,8294	87,1584	85,2521
	VARIANZA	0,01990	0,88977	2,16632	0,00546	0,12114	0,04220

ANALISIS DE LA VARIANZA		
VARIANZA ENTRE LOTES	32,1016	F _{calc} 59,3597
VARIANZA DENTRO DE LOTES	0,5408	F _{tabla} 4,3874
VARIANZA NETA ENTRE LOTES		15,7804
CONCLUSION	HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS LOTES	

ESTIMACION DE LA PRECISION		
	VARIANZA	C. V. %
REPETIBILIDAD	0,5408	0,87%
PRECISION INTERMEDIA	16,3212	4,77%

	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	MENSURANDO	RESULTADO (%)					
		FECHA	2019-10-05	2019-10-02	2019-09-17	2019-09-25	2019-09-27
	LOTE	8	7	3	4	5	6
7794-19	Beta-Glucan	85,9654	86,0947	82,8644	82,9727	84,7686	84,8712
7794-19-2	Beta-Glucan	84,6298	85,2420	84,3887	82,9210	83,9899	84,2046
	PROMEDIO	85,2976	85,6684	83,6266	82,9468	84,3793	84,5379
	VARIANZA	0,89181419	0,36350319	1,16174524	0,00133823	0,30319654	0,22215342


ANALISIS DE LA VARIANZA		
VARIANZA ENTRE LOTES	2,0573	Fcalc 4,1932
VARIANZA DENTRO DE LOTES	0,4906	Ftabla 4,3874
VARIANZA NETA ENTRE LOTES		0,7833
CONCLUSION NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS LOTES		

ESTIMACION DE LA PRECISION		
	VARIANZA	C. V. %
REPETIBILIDAD	0,4906	0,83%
PRECISION INTERMEDIA	1,2740	1,34%

El análisis de varianza realizado a los resultados duplicados a través de 6 lotes de ensayo, muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en los diferentes lotes de validación. Esto es debido esencialmente a la alta repetibilidad obtenida durante los ejercicios. (Coeficiente de variación de la repetibilidad bajo). El valor más alto para este estimador fue en el control de 10%, cuyo valor fue de 2.74%, el cual cumple la meta propuesta del 10%. Para este mismo ítem de ensayo se obtuvo el valor más bajo de precisión intermedia, con un coeficiente de variación de 7.64%, el cual es menor que la meta propuesta del 10%. Los coeficientes de variación de la repetibilidad y la precisión intermedia obtenidos para los restantes ítems ensayados, son más bajos que los obtenidos para el control del 10% y por tanto también cumplieron las metas de precisión propuestas, evidenciando el correcto desempeño del método de ensayo sobre los estándares y matrices ensayadas. Por lo anterior, el parámetro precisión se aprueba.

7.1.5 Exactitud

La exactitud se evaluó sobre los controles correspondientes al 10% y 49%, así como sobre el material de referencia identificado con el código 7794-19, cuyo valor asignado por el fabricante es del 85% en β -glucanos. Los datos utilizados para esta

	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 son los mismos que se utilizaron en el numeral anterior para la evaluación de la precisión

La exactitud se evaluó como el sesgo obtenido, expresado como error relativo porcentual (E. R.%), para cada uno de los materiales descritos en el párrafo anterior. El porcentaje de recuperación (R%) fue calculado como $100 - E. R. \%$.


También se evaluó la veracidad del método analítico, contrastando los resultados obtenidos en los ejercicios realizados con su respectivo valor asignado, mediante un contraste *t de Student* con un 95% de confiabilidad y n-1 grados de libertad. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD – SESGO PARA EL CONTROL 10%	
VR. ASIGNADO DEL MENSURANDO (%)	10,00%
CONTENIDO DEL MENSURANDO (%)	9,61%
%R	96.06%
E. R.%	-3,94%

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD – VERACIDAD PARA EL CONTROL 10%	
tCalc	1,93706018
tTabla	2,20098516
CONCLUSION	EL METODO ES VERAZ

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD – SESGO PARA EL CONTROL 49%	
VR. ASIGNADO DEL MENSURANDO (%)	49,00%
CONTENIDO DEL MENSURANDO (%)	49,45%
R%	100.45%
E. R.%	0,92%

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD – VERACIDAD PARA EL CONTROL 49%	
tCalc	1,81655035
tTabla	2,20098516
CONCLUSION	EL METODO ES VERAZ

	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 – SESGO PARA EL MATERIAL DE REFERENCIA 7794-19	
VR. ASIGNADO DEL MENSURANDO (%)	85,00%
CONTENIDO DEL MENSURANDO (%)	84,41%
R%	99,31%
E. R.%	-0,69%

EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD – VERACIDAD PARA EL MATERIAL DE REFERENCIA 7794-19	
tCalc	1,86543749
tTabla	2,20098516
CONCLUSION	EL METODO ES VERAZ


Los datos mostrados en las tablas anteriores, muestran que, al ejecutar el ensayo sobre los materiales de referencia utilizados para la evaluación de la exactitud, se obtuvieron resultados que cumplen con la meta de precisión propuesta en el plan de validación PLN-TC-100-01, la cual es, un error relativo porcentual (E.R.%) menor al 10%.

Además, al comparar los valores de *t de Student* calculados, con los valores críticos correspondientes, se advierte que todos los valores calculados son menores que los críticos. Lo anterior obliga a aceptar la hipótesis nula establecida para el contraste, la cual es que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos mediante la ejecución de los ensayos y los valores asignados. Por tanto, la conclusión de la evaluación de la veracidad al aplicar el método, es que éste es veraz.

Lo discutido en los párrafos anteriores, permite declarar como aprobado el parámetro exactitud.

7.1.6 Robustez

Las condiciones que fueron evaluadas para probar la robustez del método, junto con los resultados obtenidos de los ocho ejercicios realizados de acuerdo con el diseño experimental establecido en el plan PLN-TC-100, se muestran a continuación:

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

FACTOR	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura de hidrólisis	90°C	90°C	90°C	90°C	100° C	100° C	100° C	100° C
Tiempo de hidrólisis	2 h	2 h	2 h	1.5 h	2 h	1.5 h	1.5 h	1.5 h
pH de la dilución paso 8 Literal Aa	4,5	5,0	4,5	5,0	4,5	5,0	4,5	5,0
Temperatura de incubación Paso 3 literal Ab	35° C	35° C	40°C	40°C	40°C	40°C	35° C	35° C
Tiempo de incubación Paso 3 literal Ab	1.5 h	2 h	1.5 h	2 h	2 h	1.5 h	2 h	1.5 h
Temperatura de incubación Paso 4 literal Ba	35° C	40°C	40°C	35° C	35° C	40°C	40°C	35° C
Tiempo de incubación Paso 4 literal Ba	25 min	30 min	30 min	25 min	30 min	25 mi	25 min	30 min
Resultados %	45,5110	38,8945	48,2336	51,3391	72,3755	63,0315	80,5179	77,8355
Desviación estándar MR 7794-19	1,1287							
Criterio	1,5962							


El ejercicio se realizó sobre el material de referencia utilizado en la evaluación de la precisión, exactitud e intervalo de trabajo e identificado con el código número 7794-19. De acuerdo con lo establecido en el procedimiento PROC-TC-012, el criterio contra el cual se evaluó la robustez del método de ensayo ante el cambio en cada una de las condiciones mostradas en la tabla anterior, fue la desviación estándar de la precisión intermedia obtenida durante el ejercicio de verificación para dicho material de referencia, multiplicada por raíz de dos ($\sqrt{2}$). El cálculo de las diferencias obtenidas en los resultados al cambiar las diferentes condiciones, junto con el criterio de comparación del resultado de dicho cálculo, se muestra en la tabla siguiente:

CALCULO DE LOS FACTORES					
FACTOR	X	x	X	x	Rango
Temperatura de hidrólisis	90°C	100° C	45,9945	73,4401	27,4456
Tiempo de hidrólisis	1.5 h	2 h	68,1810	51,2536	16,9274
pH de la dilución paso 8 Literal Aa	4,5	5,0	61,6595	57,7752	3,8843
Temperatura de incubación Paso 3 literal Ab	35° C	40°C	60,6897	58,7449	1,9448
Tiempo de incubación Paso 3 literal Ab	1.5 h	2 h	58,6529	60,7818	2,1289
Temperatura de incubación Paso 4 literal Ba	35° C	40°C	61,7653	57,6694	4,0959
Tiempo de incubación Paso 4 literal Ba	25 min	30 min	60,0999	59,3348	0,7651
Desviación estándar MR 7794-19	1,1287				
Criterio	1,5962				

Al comparar los rangos obtenidos al cambiar los diferentes factores, con el criterio de aceptación establecido, se advierte que para la única condición que no supera el criterio de aceptación es para el tiempo de incubación correspondiente al paso 4 literal Ba.

Esto quiere decir que el método de ensayo no es afectado por el cambio de la temperatura de incubación en este paso, pero es significativamente influenciado por el cambio en las restantes condiciones evaluadas.

La vulnerabilidad ante cambios leves en el pH, tiempo y temperaturas de incubación, es una característica propia de los procesos enzimáticos y por esto es de capital

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

importancia su adecuado control durante la ejecución de los ensayos para obtener resultados confiables.

Por lo anterior, este atributo se aprueba, teniendo en cuenta que debe hacerse un especial énfasis en el control de las condiciones evaluadas durante el ejercicio de robustez, tanto en el procedimiento de ensayo, como durante el entrenamiento de los analistas.

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 validación.

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-154 Formato para el registro de B-glucanos

12. ANEXOS.

Datos primarios correspondientes a los ensayos realizados, consignados en el formato FOR-TC 154

Certificado del valor asignado al material de referencia 7794-19.