


aoxlab	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12




Procedimiento de ensayo de Determinación de Vitamina B12 (Cianocobalamina)


AOXLAB S.A.S.

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-097 Procedimiento de ensayo de determinación Vitamina B12
(Cianocobalamina).
Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	María Carmen Domínguez Gómez	Analista de Laboratorio		2022-09-12
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Director de Calidad		2022-09-12
Aprobó:	Dario Pardo Pardo	Director de Técnico		2022-09-12
Localización del documento:		http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/		

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12


Control de Cambios

Estado	Fecha de inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2018/01/09	1	Ninguno (versión original).	EAAG	WFR	YELP
Obsoleto	2020-04-30	2	Se incorporó el control de calidad establecido en el método de referencia	MCDG	DPP	YELP
Obsoleto	2021-10-22	3	Se actualiza formato	MCDG	DPP	YELP
Vigente	2022-09-12	4	Se corrige en numeral 4.2.3.1 la unidad del agua tomada para el ensayo.	MCDG	APPP	DPP

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12


ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE.....	5
1.1 Objetivo.....	6
1.2 Alcance.....	6
2 DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	7
2.1 Definiciones.....	7
2.2 Notaciones.....	7
3 REFERENCIAS.....	8
4 DESARROLLO.....	9
4.1 CONDICIONES GENERALES.....	9
4.1.1 Revisión general.....	9
4.1.2 Estabilización.....	9
4.1.3 Verificación de equipos.....	9
4.1.4 Manejo de la muestra.....	10
4.1.5 Medidas de seguridad.....	10
4.2 INSTRUCCIONES DE ENSAYO.....	11
4.2.1 Patrones y equipos de medición.....	11
4.2.1.1 Equipos de medición.....	11
4.2.1.2 Materiales y consumibles.....	11
4.2.1.3 Reactivos y soluciones.....	12
4.2.2 Preparación de soluciones.....	12
4.2.2.1 Solución A.....	12
4.2.2.2 Solución B.....	12
4.2.2.3 Buffer Acetato de Sodio 0,4 M, pH 4,0.....	12
4.2.2.4 Solución Cianuro de sodio (1%).....	12
4.2.2.5 Solución diluyente.....	12
4.2.2.6 Estándar Stock de Vitamina B12 (100 µg/mL).....	12
4.2.2.7 Estándar intermedio de Vitamina B12 (400 ng/mL).....	13
4.2.2.8 Curva de calibración.....	13
4.2.3 Preparación de muestra.....	13
4.2.3.1 Reconstitución muestras sólidas.....	13
4.2.3.2 Reconstitución productos basados en aminoácidos.....	14
4.2.3.3 Reconstitución muestras líquidas.....	14
4.2.3.4 Extracción.....	14
4.2.3.5 Limpieza en columna de inmunoafinidad.....	14

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

4.2.4	Condiciones cromatográficas	15
4.3	INFORME.....	16
4.4	CONTROL DE LA CALIDAD	17
5	RESPONSABILIDADES.....	19
5.1	Director técnico.....	19
5.2	Director de Calidad.....	19
5.3	Líder de Laboratorio.....	19
5.4	Analista.....	19
6	FORMATOS RELACIONADOS.....	20
7	ANEXOS	20

1

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

1. . OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Describir los pasos para realizar el ensayo de determinación de Vitamina B12 (Cianocobalamina) de acuerdo con las directrices establecidas en el método de referencia AOAC 2014.02 [2] y los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [1].


1.2 Alcance.

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Determinación de Vitamina B12 (Cianocobalamina)	AOAC 2014.02 [2]	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Este método es aplicable a las siguientes matrices:

- Leche y productos lácteos

En el intervalo comprendido entre 0,25 µg /100 g y 7,2 µg/100g.

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

2 DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

Documento [3].

Información y su medio de soporte.

Ensayo/prueba [3].

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

Procedimiento [3].

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

Calibración [4].

Operación que, bajo condiciones especificadas, en un primer paso, establece una relación entre los valores de las magnitudes con su incertidumbre de medición provista por patrones de medición y las indicaciones correspondientes con incertidumbres de medición asociadas y, en segundo paso, usa esta información para establecer una relación para obtener un resultado de medición de una indicación.

Vitamina B12 [6].

Toda la vitamina B12 presente de forma natural en la dieta humana es sintetizada por microorganismos antes de ser incorporarse a los alimentos de origen animal. Las fuentes alimentarias de vitamina B12 incluyen las vísceras (hígado, menudillos de aves), mariscos, pescado, carne, productos lácteos, huevos y productos de cereales fortificados. Los productos animales suelen ser las mejores fuentes de esta vitamina, a excepción de los productos de cereales fortificados. Las pequeñas cantidades de vitamina B12 que se observan en los alimentos de origen vegetal se producen como resultado de la presencia de microorganismos y son una consideración importante para los vegetarianos estrictos


2.2 Notaciones.

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

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


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

“**Ítem**”: se refiere a los objetos o materiales bajo ensayo.

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

3 REFERENCIAS.

- [1] ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- [2] AOAC 2014.09 Vitamin B12 (Cyanocobalamin) in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula. Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection. Final Action 2017
- [3] ISO 9000:2015 Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary/ Sistemas de gestión de la calidad- Fundamentos y vocabulario.
- [4] VIM: 2012, International vocabulary of metrology -- Basic and general concepts and associated terms.
- [5] ISO/IEC 17000:2004 Conformity assessment -- Vocabulary and general principles.
- [6] Food análisis by HPLC, third edition (2012), water soluble vitamins, vitamin B12(cobalamins), pag 379.
- [7] PROC-TC-012 Procedimiento de validación o verificación de método analíticos.
- [8] EASI EXTRACT VITAMIN B12 LGE P88 V17 by R-biopharm. Immunoaffinity columns for use in conjunction with HPLC. For *in vitro* use only.

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

4 DESARROLLO

4.1 CONDICIONES GENERALES

4.1.1 Revisión general.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, ésta es inspeccionada con el fin de verificar que las condiciones de cantidad, empaque y preservación se mantienen, conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio". Garantizar la custodia de la muestra protegiéndola en todo momento de la luz.

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que se cuenta con mínimo 50 gramos de muestra para realizar este análisis.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

4.1.2 Estabilización.


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

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

4.1.3 Verificación de equipos.

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

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

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

Además de lo anterior, debe verificarse la fecha de expiración de los patrones, materiales de referencia y controles de calidad empleados en el ensayo con el fin de evitar el uso de materiales vencidos. Verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio". En caso de que se encuentre alguna anomalía al respecto, avisar a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.

4.1.4 Manejo de la muestra.

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

Sí la muestra es líquida, mezclar hasta homogeneidad aparente mediante agitación magnética, y con la ayuda de un gotero o una pipeta tomar la cantidad necesaria de muestra, mientras se continúa con la agitación.

Sí la muestra es sólida, moler o triturar en su totalidad hasta homogeneidad aparente, y realizar un cuarteo atendiendo los siguientes pasos:


- Colocar la muestra previamente homogeneizada sobre una superficie lisa, limpia y seca, donde no existan corrientes de aire fuertes.
- Limpiar los instrumentos a utilizar (espátula o cuchara).
- Mezclar la muestra echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.
- Juntar todo el material dándole forma circular con espesor uniforme.
- Dividir el material en cuatro sectores iguales.
- Eliminar los sectores opuestos quedando la masa del material reducida a la mitad.
- Mezclar los dos sectores restantes echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.

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

4.1.5 Medidas de seguridad.

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

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

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

PRECAUCION: El cianuro es mortal si se ingiere, se inhala o entra en contacto con la piel. Utilice guantes de protección, ropa y gafas de protección. Lávese las manos inmediatamente después manipular el producto. El cianuro reacciona con los ácidos para formar gas de cianuro de hidrógeno altamente tóxico y de acción rápida. Utilizar sólo en un dispositivo eficaz de eliminación de humos para eliminar los vapores generados. Destruir los residuos con una solución alcalina de NaOCl alcalino.

4.2 INSTRUCCIONES DE ENSAYO.


4.2.1 Patrones y equipos de medición

4.2.1.1 Equipos de medición

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC)
- Columna Luna C18(2) 150 x 3mm, 3 µm
- Balanza analítica con resolución de 0.1 mg
- Transferpipetas de 1000 µL y 10 mL
- Titulador potenciométrico
- Ultrasonido
- Vortex
- Agitador orbital
- Probeta de 50
- Baño maría
- Plancha de calentamiento

4.2.1.2 Materiales y consumibles

- Micro espátula metálica
- Tubos Falcon de 50 mL
- Tubos de vidrio
- Jeringas desechables de 5 mL
- Micro filtros desechables de 0.22 µm
- Balones ámbar aforados de 25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL y 250 mL.
- Balón volumétrico 1000 mL
- Beaker de 100 mL, 1000 mL y 2000 mL
- Puntas para micropipeta de 1000 µL y 10 mL
- Viales ámbar de 2 mL con tapa
- Embudo de vidrio
- Papel filtro
- Manifold
- IACs: Easi-Extrakt Vitamin B12 (LGE) from r-Biopharm o equivalente.
- Probeta de 200 mL

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

4.2.1.3 Reactivos y soluciones

- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido acético glacial
- Cianuro de sodio
- TFA $\geq 99\%$ (ácido trifluoroacético)
- Acetato de sodio trihidratado
- Takadiastasa para aspergillus oryzae aproximadamente 1,5 units/mg (α -amilasa)
- Estándar Cianocobalamina, $>98\%$

4.2.2 Preparación de soluciones

4.2.2.1 Solución A

En un balón 1000 mL, adicionar aproximadamente 900 mL de agua tipo I, adicionar 250 μ L de TFA, llevar a volumen con agua tipo I y homogenizar.

4.2.2.2 Solución B

En un balón 1000 mL, adicionar aproximadamente 900 mL de acetonitrilo, adicionar 250 μ L de TFA, llevar a volumen con acetonitrilo y homogenizar.

4.2.2.3 Buffer Acetato de Sodio 0,4 M, pH 4,0

En un vaso de precipitados de 100 mL, disolver 65,6 g de acetato de sodio anhidro. Transferir cuantitativamente a un vaso de precipitados de 2000 mL que contiene aproximadamente 1800 mL de agua tipo I, disolver. Añadir 50 mL de ácido acético y ajustar a pH 4,0. Transferir a un balón aforado de 2000 mL y luego llevar a volumen con agua tipo I.


4.2.2.4 Solución Cianuro de sodio (1%)

En un balón volumétrico ámbar de 50 mL, pesar 0,5 g de cianuro de sodio, diluir a volumen con agua tipo I. **NOTA: CUALQUIER EXCESO DE SOLUCION DE CIANURO DE SODIO AL 1% DEBE SER DESTRUIDO ADICIONANDO 1,5 mL DE UNA SOLUCION DE 15% DE HIPOCLORITO DE SODIO POR CADA mL DE SOLUCION DE CIANURO DE SODIO**

4.2.2.5 Solución diluyente

En un beaker de 250mL, adicionar 90 mL de la solución A y 10 mL de la solución B, homogenizar manualmente.

4.2.2.6 Estándar Stock de Vitamina B12 (100 μ g/mL)

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

Pesar 20 mg de cianocobalamina en un balón ámbar de 200 mL. Adicionar 150 mL de agua, disolver sometiendo a ultrasonido por 10 minutos. Diluir a volumen con agua tipo I. (Esta solución es estable por 6 meses a -20°C)

4.2.2.7 Estándar intermedio de Vitamina B12 (400 ng/mL)

Tomar 1 mL de la solución stock de vitamina B12 (4.2.2.6) en un balón volumétrico ámbar de 250 mL y llevar a volumen con agua tipo I.

4.2.2.8 Curva de calibración

4.2.2.8.1 Estándar 100 ng/ml: En un balón de 10 mL, adicionar una alícuota de 2500 µL del estándar intermedio (4.2.2.7.) medidos con la micropipeta, llevar a volumen con solución diluyente.

4.2.2.8.2 Estándar 60 ng/ml: En un balón de 10 mL, adicionar una alícuota de 1500 µL del estándar intermedio (4.2.2.7.) medidos con la micropipeta, llevar a volumen con solución diluyente.

4.2.2.8.3 Estándar 40 ng/ml: En un balón de 10 mL, adicionar una alícuota de 1000 µL del estándar intermedio (4.2.2.7.) medidos con la micropipeta, llevar a volumen con solución diluyente

4.2.2.8.4 Estándar 20 ng/ml: En un balón de 10 mL, adicionar una alícuota de 500 µL del estándar intermedio (4.2.2.7.) medidos con la micropipeta, llevar a volumen con solución diluyente

4.2.2.8.5 Estándar 10 ng/ml: En un balón de 10 mL, adicionar una alícuota de 250 µL del estándar intermedio (4.2.2.7.) medidos con la micropipeta, llevar a volumen con solución diluyente

4.2.2.8.6 Estándar 5 ng/ml: En un balón de 10 mL, adicionar una alícuota de 125 µL del estándar intermedio (4.2.2.7.) medidos con la micropipeta, llevar a volumen con solución diluyente


4.2.3 Preparación de muestra

NOTA: La columna de inmunoafinidad debe estar a temperatura ambiente antes de ser usada.

Cuando la muestra este finalmente homogenizada se procede a realizar la preparación de la solución de prueba como se describe a continuación:

4.2.3.1 Reconstitución muestras sólidas

Pesar 25,0 g (W1) de muestra en un vaso de precipitados de 250 mL. Calentar agua tipo I a $40 \pm 5^\circ\text{C}$. en plancha de calentamiento, añadir 200mL de esta agua medida en probeta, mezclar con una varilla de vidrio hasta que la suspensión sea homogénea. Continúe el análisis como se describe en la extracción (4.2.3.4).

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

4.2.3.2 Reconstitución productos basados en aminoácidos

Pesar 25,0 g (W1) de muestra de polvo en un vaso de precipitados de 250 mL. Añadir 190 g (W2) de agua a $40 \pm 5^\circ\text{C}$ y 10 g (W3) de leche descremada en polvo. Mezclar con una varilla de vidrio hasta que la suspensión sea homogénea. Paralelamente, realizar un blanco sustituyendo la muestra por agua (215 g de agua + 10 g de leche desnatada en polvo). Diluir ambos, la muestra reconstituida y el blanco, dos veces en agua (por ejemplo, 50 g de muestra reconstituida o de blanco + 50 g de agua). Continúe el análisis como se describe en la extracción (4.2.3.4).

4.2.3.3 Reconstitución muestras líquidas

Mezclar bien para asegurar la homogeneidad de la porción de muestra. Proceder como se describe en la extracción (4.2.3.4). En el caso de productos nutricionales con alto contenido en grasa, si la recuperación es baja, las muestras pueden diluirse en agua (por ejemplo, 50 g de muestra + 50 g de agua) antes de la extracción para mejorar la recuperación.


4.2.3.4 Extracción

Mezclar con agitación magnética durante 10 minutos para asegurar la homogeneidad de la porción de muestra.

- Pesar 60 g de muestra en un balón ámbar de 100 mL.
- Adicionar 1 mL de cianuro de sodio 1%
- Si la muestra contiene almidón adicionar aproximadamente 0,05 g de α -amilasa, agitar minuciosamente e incubar y mezclar en un baño de agua a 40°C por 15 min.
- Con una probeta, medir 25 mL de buffer acetato de sodio 0,4 M, adicionar y mezclar.
- Tapar el balón y sellar con papel plástico la tapa para evitar su desprendimiento durante la extracción.
- Transferir el balón a un segundo baño a 100°C por 30 minutos.
- Enfriar el balón y llevar a volumen con agua tipo I.
- Filtrar la muestra a través de un filtro Whatman 5971/2 o equivalente. **NOTA:** si la muestra presenta dificultades en la filtración someter centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos.

4.2.3.5 Limpieza en columna de inmunoafinidad

- Retire la tapa superior e inferior de la columna, disponer la columna en el manifold y deje que el tampón de almacenamiento drene por gravedad. Esto tomará aproximadamente 5 minutos. Vuelva a colocar la tapa inferior y coloque la columna en el manifold.
- Adicionar 9 mL del filtrado a la columna ya preparada
- Colocar la tapa superior.

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

- Invertir la columna con el tapón para asegurarse de que el gel quede bien mezclado y no se acumule en la parte inferior de la columna. Agite la columna lentamente por 15 minutos en agitador orbital.
- Vuelva a colocar la columna en el soporte y deje que repose por 5 minutos. Abra la tapa para que el líquido escurra por gravedad.
- Lave la columna pasando 10 mL de agua medidos con una probeta.
- Con una jeringa desechable de 10 ml, pasar un volumen de aire de 10 mL, repetir el proceso 3 veces para eliminar el líquido residual.
- Eluir la vitamina de la columna adicionando con la micropipeta 3 mL de metanol 100% adicionados con la micropipeta y recoger en un tubo de vidrio.
- Pasar otros 0,5 mL de metanol 100% a través de la columna. Con una jeringa pasar 20 mL aire y recolectar todo en el mismo tubo.
- Evaporar hasta sequedad bajo nitrógeno en baño de agua de 50 °C
- Reconstituir adicionando con la micropipeta 300 µL de solución diluyente. Agitar en vortex
- Inyecte 100uL en el sistema HPLC

4.2.4 Condiciones cromatográficas

Modo: HPLC

Detector: UV 361 nm

Columna: Luna C18(2) 150x 3mmID, 3 µm

Fase móvil: (TFA 0.025%: Acetonitrilo) Gradiente

Flujo: 0,25 mL/min

Temperatura horno: 30 °C


Volumen de inyección: 100 µL

Gradiente:

Tiempo, min	Solución A	Solución B
0,0	90	10
0,5	90	10
4,0	75	25
5,0	10	90
9,0	10	90
11,0	90	10
16,0	90	10

Temperatura horno: 30 °C

Volumen de inyección: 100 µL

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

NOTA: El sistema cromatográfico debe equilibrarse por al menos 15 minutos antes de la inyección

4.3 INFORME

Los datos serán registrados en el formato FOR-TC- 146 "Formato para el registro de datos primarios de Vitamina B12 (Cianocobalamina)"

Los resultados cromatográficos son registrados en el cuadro de mando de Excel del laboratorio para análisis de complejo B, SOFT-TC-042 "Cuadro de mando para el ensayo de Vitamina B12 (Cianocobalamina)", en la ruta de acceso \laboratorio\REGISTROS\REGISTROS RT.

Los resultados se analizan de la siguiente manera:

Se realiza la calibración del cromatógrafo para la determinación de Vitamina B12 (Cianocobalamina), las soluciones de calibración indicadas en el numeral 4.2.2.8

El software Labsolutions realiza el ajuste de la función de calibración entre la concentración que representa cada volumen de inyección y el área del pico cromatográfico correspondiente a cada analito, siguiendo el modelo de regresión lineal. El área del pico cromatográfico correspondiente a cada analito en los extractos de las muestras es interpolada en la función de calibración, obteniéndose así la concentración de cada compuesto de interés presente en dicho extracto.

El cálculo de la cantidad de cada analito presente en la muestra se realiza de acuerdo con la siguiente ecuación:

Para fórmulas infantiles, nutrición para adultos y otras matrices:

$$\text{Contenido vitamina} \left(\frac{\mu\text{g}}{100\text{g}} \right) = \frac{(A-I) \times (W1+W2) \times V1 \times V3 \times 100}{S \times W1 \times m \times V2 \times 100}$$

A: respuesta (área o altura) del pico obtenido en la solución muestra

I: intercepto de la curva de calibración


S: pendiente de la curva de calibración

W1: peso de la muestra usada para reconstituir

W2: peso del agua usada para reconstituir

m: peso de la muestra para suspensión

V1: volumen del test de solución (volumen usado para disolver el test de solución), mL

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

V2: volumen de la alícuota tomada de la solución muestra, pasada por la columna de inmunoafinidad

V3: volumen de la alícuota tomada para reconstituir después de la limpieza de la columna de inmunoafinidad

Para formulas basadas en aminoácidos:

$$C_{sample} = ((A_{blanco} - A_{sample}) - I) \times \frac{(W1+W2+W3) \times V1 \times V3 \times D \times 100}{S \times W1 \times m \times V2 \times 1000}$$

Donde,

Ablanco: respuesta (altura o área) del pico obtenido en el blanco

Asample: respuesta (altura o área) del pico obtenido en la solución muestra

I: Intercepto de la curva de calibración

S: pendiente de la curva de calibración

W1: peso de la muestra usada para reconstituir

W2: peso de agua usada para reconstituir

W3: peso de la leche desnatada en polvo

m: peso de la muestra para suspensión

V1: volumen del test de solución (volumen usado para disolver el test de solución), mL

V2: volumen de la alícuota tomada de la solución muestras pasada por la columna de inmunoafinidad


V3: volumen de la alícuota tomada para reconstituir después de la limpieza de la columna de inmunoafinidad

D: factor de dilución.

Además del resultado, debe consignarse los criterios de cumplimiento, CUMPLE / NO CUMPLE basados en la normativa vigente si esta aplica.


4.4 CONTROL DE LA CALIDAD

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

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

CONTROL	PERIODICIDAD	CRITERIO
Verificación de la contaminación de los reactivos (Blanco de reactivos)	En cada lote de ensayo	No deben aparecer picos cuantificables en los tiempos de retención de vitamina B12.
Duplicado por matriz	Cada que se realiza el ensayo	El coeficiente de variación obtenido debe ser menor o igual al 10%
Aptitud del sistema: Estándar de 20 ng/mL (4.2.2.8.4)	Cada que se realiza el ensayo - Realizar 6 inyecciones al inicio de la corrida y una al final	El coeficiente de variación obtenido entre las réplicas debe ser menor o igual al 5%. El coeficiente de variación obtenido en el tiempo de retención debe ser menor o igual a 1% % de recuperación entre el 90 y el 110% para el promedio de las inyecciones iniciales y para la inyección final.
Participación en Interlaboratorio (Rotación de matriz)	Anual	Debe obtenerse una calificación satisfactoria en la participación

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

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

5 RESPONSABILIDADES.

5.1 Director técnico.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.

Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.

Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.

Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

5.2 Director de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.

Revisar los resultados obtenidos del aseguramiento de calidad del método.

Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

5.3 Líder de Laboratorio.

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

Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.

Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.

Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.

Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.

Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.


Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

5.4 Analista.

Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio.

Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.

Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.

	Procedimiento de ensayo Determinación de vitamina B12 por HPLC AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-097
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2022-09-12

Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.

Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.

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

Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica. Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.

Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.

Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.

Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

6 FORMATOS RELACIONADOS.

SOFT-TC-042 "Formato cuadro de mando de análisis de Vitamina B12"

FOR-TC- 097 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de Vitamina B12".

7 ANEXOS

No Aplica