
	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX


Procedimiento de Determinación Ácidos Clorogénicos.

AOXLAB S.A.S.

	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX


DOCUMENTO CONTROLADO
PROC-TC-118. Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos.

Copia controlada No. : 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Edwin Alexander Arboleda	Analista		2018/xx/xx
Revisó:	Wlner Ferney Ruiz	Líder de laboratorio		2018/xx/xx
Aprobó:	Yasmin Eliana Lopera Pérez	Gerente y Director Técnico		2018/xx/xx
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	2018/xx/XX	1	Ninguno (versión original).	Alexander	WFR	YELP

	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX


ÍNDICE

Contenido

1. OBJETIVO Y ALCANCE	5
1.1 Objetivo.....	5
1.2 Alcance.....	5
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES	5
2.1 Definiciones.....	5
Calibración [4].....	5
Ensayo/prueba [3].....	5
Procedimiento [3].....	5
Ácido Clorogénico [5].....	6
2.2 Notaciones.....	6
3. REFERENCIAS	6
4. EQUIPOS	6
5. INSPECCIÓN VISUAL	7
5.1 Revisión general.....	7
5.2 Estabilización.....	7
5.3 Verificación de equipos.....	7
5.4 Manejo de la muestra.....	7
5.5 Medidas de seguridad.....	8
6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO	9
6.1 Reactivos y/o Soluciones.....	9
6.2 Aptitud del sistema.....	9
6.2.1 Requisitos de aptitud.....	9
6.3 Preparación del estándar de Ácidos Clorogénicos.....	9
6.3.1 Estándar patrón:.....	9
6.3.2 Estándar de trabajo.....	10
6.3.3 Curva de calibración.....	10
6.4 Preparación de la muestra:.....	10
6.5 Condiciones Cromatográficas.....	10
7. INFORME	11

	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX

8. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	12
9. RESPONSABILIDADES	12
9.1 Director técnico	12
9.2 Líder de Calidad	12
9.3 Líder de Laboratorio	12
9.4 Analista	12
10. FORMATOS RELACIONADOS	12
11. ANEXOS	13

	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Describir los pasos para realizar en la Determinación del análisis de Ácidos Clorogénicos de acuerdo los parámetros de Deutsches Institut fur Normung E.V. (DIN) 10767 Edition, August 2015 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 Ácidos Clorogénicos	Deutsches Institut fur Normung E.V. (DIN) 10767 Edition, August 2015	Cromatografía Líquida De alta resolución (HPLC)

Este método se aplica a las siguientes matrices:

- Café y Derivados

El intervalo de trabajo del método es de Xx g/x g.

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

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.

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.

	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX

Ácido Clorogénico [5]

El ácido clorogénico (CGA) es el éster de ácido cafeico y ácido (-)quínico, funcionando como un intermedio en la biosíntesis de la lignina. El término "ácido clorogénico" se refiere a una familia de ésteres de polifenol relacionados, incluyendo ácidos hidroxicinámicos (ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico) conácido quínico.

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.

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] Deutsches Institut fur Normung E.V. (DIN) 10767 Edition, August 2015
- [3] ISO 9000:2015 Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary/ Sistemas de gestión de la calidad-- Fundamentos y vocabulario.
- [4] ISO/IEC 17000:2004 Conformity assessment -- Vocabulary and general principles.
- [5] Clifford, M. N.; Johnston, K. L.; Knigh, S.; Kuhnert, N. (2003). «Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids». Journal of Agricultural and Food Chemistry.


4. EQUIPOS.

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:

No. Inventario	Equipos y/o componentes clave	Marca	Modelo	No. Serie
0207	Cromatógrafo líquido de alta resolución	Shimadzu	LC-2030C 3D PLUS	L21455510235 AE
0006 A	Balanza analítica	RADWAG	AS 220/C/2	348577/12
0001	Baño Maria	MEMERT	-----	L13120239
	Cafetera	IMUSA	2511	NC00022634

Comentado [A1]: Quité la plancha de calentamiento ya que no se usa en el método y así mismo quitarla del formato de datos primarios de clorogénicos.

Comentado [A2]: La cafetera no tiene código interno.

	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX

0003 A	Vortex Mixer	VELP SCIENTIFICA	F202A0173	251121
0012	Micropipeta	CAPP BRAVO		KE11309

Comentado [A3]: Agregué vortex y micropipeta a esta tabla y así mismo adicionarlas en el formato de datos primarios de clorogénicos FOR TC 081

5. INSPECCIÓN VISUAL.

5.1 Revisión general.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se garantizan las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que la muestra se encuentra empacada y sellada herméticamente, y etiquetada con el sticker de identificación interna del laboratorio. Se debe contar con al menos 100 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.

5.2 Estabilización.

Una vez revisada la muestra, se aplican las siguientes instrucciones:


Los patrones y equipos de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo y la muestra se mantienen en el lugar de ensayo, y encendidos (si es el caso), antes de realizar las mediciones. El cromatógrafo líquido de alta resolución debe encenderse 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.

5.3 Verificación de equipos.

A fin de confirmar que los equipos a utilizar en el ensayo se encuentran en condiciones adecuadas para realizar el servicio, se inspecciona la verificación de cada uno de los equipos mencionados en el ítem 4. Y la verificación diaria de la balanza analítica teniendo en cuenta los factores de corrección obtenidos del certificado de la última calibración.

5.4 Manejo de la muestra.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX

Las muestras que vienen para análisis de vitaminas hidrosolubles y liposolubles deben tener protección actínica.

Al tomar de la porción de análisis, la muestra debe estar a temperatura ambiente y correctamente homogeneizada. Si 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.

Si 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.

5.5 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio: Verificar que el sticker de calibración y mantenimiento del equipo se encuentre vigente y no requiere alguna intervención. 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, dar aviso a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.

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

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 Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX

6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

6.1 Reactivos y/o Soluciones

- Agua tipo I
- Acetonitrilo Grado HPLC
- Ácido Fosfórico Grado Analítico.
- Ácido Criptoclorogénico (estándar)
- Ácido Neoclorogénico (Estándar)
- Ácido Clorogénico (Estándar)
- Ácido Cafeico (Estándar)
- Ácido 3,5 Dicafeolquinico (Estándar)
- Ácido 4,5 Dicafeolquinico (Estándar)
- Ácido Fosfórico 1% (tomar 12,5 ml de ácido fosfórico y llevarlo a un volumen de 1000 con agua Tipo I)

Comentado [A4]: Agregué el uso del agua tipo I y por favor añadirla al formato de datos primarios de clorogénicos.

6.2 Aptitud del sistema

Para la aptitud del sistema cromatográfico Se corre El nivel 3 De la curva de calibración de la mezcla de estándares de Ácido clorogénicos por triplicado y se evalúa la desviación estándar relativa, los platos teóricos de la columna y la asimetría. Se genera por medio del software un informe de aptitud y se guarda en la carpeta de aptitud del sistema.

6.2.1 Requisitos de aptitud.


Desviación estándar Relativa (RSD): < 2,0 %

Platos Teóricos: > 1000

Asimetría: <2,0 %

6.3 Preparación del estándar de Ácidos Clorogénicos.

6.3.1 Estándar patrón:

	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX

Pesar de cada estándar 10,0 mg en balones volumétricos de 25 mL, Diluir con 20 ml de Agua Tipo I y homogenizar en vortex por 60 s, luego aforar con Agua Tipo I.

6.3.2 Estándar de trabajo.

De la solución anterior tomar una alícuota de cada estandar de 5mL en un balón volumétrico de 50mL, diluir con Agua Tipo I y agitar en vortex por 40 s y luego aforar con Agua tipo I. (equivalente a 40 ug/mL). Filtrar la solución con filtro de membrana de 0,22 um en un vial LC.

6.3.3 Curva de calibración.

Inyectar en el sistema cromatográfico los siguientes volúmenes.

Nivel 1: 1 uL

Nivel 2: 5 uL

Nivel 3: 10 uL

Nivel 4: 20 uL

Nivel 5: 50 uL

Nivel 6: 100 uL

6.4 Preparación de la muestra:

Antes de iniciar con la preparación acondicionar el sistema de la cafetera con dos preparaciones previas antes del análisis. Tomar la muestra homogenizada y pesar una cantidad de 30,0000 g con una precisión de 0,0001g en un papel filtro de cafetera, colocarlo en la cafetera previamente acondicionada y adicionar 500 mL de Agua tipo I, luego encender la cafetera hasta que halla terminado el proceso de goteo. Dejar enfriar y filtrar con filtro de membrana de 0,22 um.


Nota: Si es necesario hacer dilución a la muestra de modo que los analitos entren dentro del rango de la curva de calibración.

Nota: Si el cliente solicita una preparación diferente del café, comunicarlo con el líder del laboratorio.

6.5 Condiciones Cromatográficas

Modo: HPLC

Detector: UV 325 nm

	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX

Columna: Kinetex 2.6um F5 100 °A 150x 4,6mm

Fase móvil: Gradiente (Ácido Fosforico 1 %: Acetonitrilo).

Tiempo, min	Flujo, mL/min	SIn Ácido Fosforico 1%	Acetonitrilo.
0,01	0,8	90	10
25	0,8	80	20
30	0,8	70	30
35	0,8	60	40
40	0,8	60	40
45	0,8	90	10
50	0,8	90	10

Flujo: 0,8mL/min

Temperatura columna: 27 °C

Volumen de inyección: 50 uL

7. INFORME


Los datos serán registrados en el formato FOR-TC- 081 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de Ácidos Clorogénicos"

Los resultados se analizan de la siguiente manera:

En el cromatógrafo se corre una curva de calibración del estándar de Ácidos Clorogénicos descrito en el punto [6.3.3] y también se corre por duplicado las muestras preparadas descritas en el punto [6.4], se adiciona un blanco y el nivel 3 de la curva por triplicado para la aptitud del sistema, con las condiciones cromatográficas descritas en el punto [6.5].

El software de lab solutions calcula la muestra por medio de la regresión lineal arrojando una concentración. Ese dato de la concentración se registra en el cuadro de mando de Excel del laboratorio para análisis instrumental, SOFT-TC-003 "Formato cuadro de mando de análisis de Ácidos Clorogénicos", en la ruta de acceso\LABORATORIO\REGISTROS RT. Esa Concentración se multiplica por el peso y la dilución de la muestra y se obtiene el resultado de cada Ácido correspondiente.

El Reporte que se genera en el software se guarda con la siguiente codificación (HP_Año_Cod procedimiento_Mes_Dia_Lote diario_ID de la muestra)

	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX

8. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, se debe verificar los requisitos de aptitud del sistema del equipo cromatográfico establecidos en este procedimiento, además se corre un blanco, y correr duplicados de matriz y evaluar semestralmente con un material de referencia.

Estos datos son registrados en las cartas control, lo que permite realizar el análisis de tendencias, de acuerdo con PROC -TC – 077(Procedimiento de Elaboración de gráficos de control).

9. RESPONSABILIDADES.

9.1 Director técnico.

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

Aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.

9.2 Líder de Calidad.

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

9.3 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.

9.4 Analista.

Aplicar el presente documento llevando a cabo todas las instrucciones y reglamentos del laboratorio, ingresar los resultados en los tiempos pactados, entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.

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

10. FORMATOS RELACIONADOS.

	Procedimiento de Determinación de Ácidos Clorogénicos. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-XXX
		Revisión: 1
		Inicio de vigencia: 2018/XX/XX

SOFT-TC-003 "Formato cuadro de mando de análisis de Ácidos Clorogénicos".

FOR-TC- 081 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de Ácidos Clorogénicos".

11. ANEXOS.