

Proyecto de caracterización de la leche cruda identificando la presencia del Glicomacropéptido de Caseína c-GMP.

INFORME VALIDACIÓN TÉCNICA

Anexo 4 - 2020



Presidente

Camilo Fernández de Soto

Vicepresidente de Agroindustria

Amira del Pilar Ortiz Olaya

Gerente de Agroindustria

Fabián Camilo Acosta Puentes

Profesional Senior

Sector Agroindustria

Jenifer Yaneth Guzmán Gualteros

Operador Técnico

Consortio Consultoría PTP (Biotrends Laboratorios S.A.S y RyG Asesorías).

Murcia F., Prieto P., Ávila O., Bernal O.,
Murcia A., Amaya C., Morales M., Arias W

Edición

Jenifer Guzmán
Profesional Lácteo

Diseño

Leonardo Pérez
Profesional comunicaciones

Colombia Productiva
2020

Anexo 4 – Informe Validación
Determinación de Glicomacropéptido
de Caseína (c-gmp) en leche líquida.

Bogotá, Colombia

www.colombiaproductiva.com

Contenido

DETERMINACIÓN DE GLICOMACROPÉPTIDO DE CASEÍNA (C-GMP) EN LECHE LÍQUIDA.....	4
OBJETIVOS:	4
ALCANCE.....	4
DISEÑO DEL EJERCICIO	4
VARIABLES POR ESTUDIAR.....	6
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	12
Límite de detección y cuantificación.....	13
Precisión del sistema instrumental (bajo condiciones de repetibilidad)	14
Precisión del método (bajo condiciones de repetibilidad)	15
Precisión Intermedia (bajo condiciones de reproducibilidad).....	16
Veracidad	18
Robustez.....	19
Intervalo de trabajo	21
CONCLUSIONES	26
REFERENCIAS	28
DECLARACIONES	29

Determinación de Glicomacropéptido de Caseína (c-gmp) en leche líquida

Objetivos:

Presentar los resultados del ejercicio de validación del ensayo "Determinación de glicomacropéptido de caseína c-GMP en leche líquida", el cual se ejecuta según los lineamientos establecidos en el método de análisis P-CSO-001 Versión 01 del Laboratorio Físicoquímico de Alimentos, el cual tiene su base en el documento "Laboratório Nacional agropecuario – LANAGRO/RS MAPA, Laboratório de produtos de origem animal – MAPA/SDA/CGAL - Código: MET POA/04/03/01 Fecha de emisión: 13/02/2014. Página de 1 a 11". Determinar experimentalmente si el método utilizado para la determinación de c-GMP en leche líquida es adecuado para el fin previsto.

Alcance

El presente documento aplica para el análisis de c-GMP en leche líquida, los lineamientos se establecieron de acuerdo con la metodología descrita en el procedimiento **P-CSO-001** Versión 01, el cual está basado en el documento "Laboratório Nacional agropecuario – LANAGRO/RS MAPA, Laboratório de produtos de origem animal – MAPA/SDA/CGAL - Código: MET

POA/04/03/01 Fecha de emisión: 13/02/2014. Página de 1 a 11". El alcance se establecerá una vez concluido el estudio de la presente validación.

Diseño del ejercicio

Los criterios establecidos para dar cumplimiento a los diferentes parámetros evaluados son tomados del Official Methods of Analysis AOAC, los cuales corresponden para la precisión un RSD menor o igual a 5,3% para estándares y muestras preparadas independientemente, para la exactitud un porcentaje de recuperación entre 80 y 110%. El criterio para el coeficiente de correlación de la linealidad fue extraído del método brasilero "Laboratório Nacional agropecuario – LANAGRO/RS MAPA, Laboratório de produtos de origem animal – MAPA/SDA/CGAL - Código: MET POA/04/03/01 Fecha de emisión: 13/02/2014", el cual indica que el coeficiente de correlación (R^2) debe ser mayor a 0,95.

POBLACIÓN Y MUESTRAS

El cálculo del tamaño de la muestra se incluye en el ejercicio de confirmación del método muestras que cubran el rango de

trabajo, así como muestras que permitan evaluar los parámetros preestablecidos para el ejercicio. La cantidad de réplicas establecidas fue determinada de acuerdo con el documento ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.

PERSONAL

Para el presente ejercicio de validación, los ensayos serán realizados por analistas que cuentan con experiencia en el montaje de la técnica empleada (HPLC). Si los criterios establecidos por el método se alcanzan, serán autorizados para la ejecución de

este, incluyendo los equipos utilizados para su ejecución. Adicionalmente, los resultados obtenidos serán la base para establecer el aseguramiento de calidad del método

- Analista 1: C167
- Analista 2: C45
- Analista 3: C27

EQUIPOS

Los siguientes fueron los equipos principales empleados en la validación del método y los cuales tenían sus correspondientes operaciones de confirmación metrológica.

Tabla N°. 1: equipos principales empleados para la validación del método

EQUIPO	ÚLTIMA ACTIVIDAD METROLÓGICA	PROVEEDOR	NÚMERO DE INFORME	FECHA DE CERTIFICADO
LB-002 – Balanza Analítica Adventur Ohaus	2019-07	OMECOL SAS	14788 LM-1	2019-07-10
LB-099 Cromatógrafo líquido	2020-01	KHYMOS	KH9573	2020-01-10

ESTÁNDAR UTILIZADO

Para la cuantificación, se utilizó estándar Glicomacropéptido de Caseína. Lote

4J1493. Marca: Davisco Foods, Arla Foods. Fecha de Vencimiento: 22/12/2020, Pureza: 76%. En el anexo 1 del presente informe se encuentra la ficha técnica del producto utilizado.

LUGAR

La ejecución del presente ejercicio de validación se realizó en las instalaciones de Biotrends Laboratorios S.A.S.¹ en la Calle 64 H N°. 71 D -31 ubicada en la ciudad de Bogotá D.C., Laboratorio Físicoquímico de Alimentos.

- Precisión del Sistema Instrumental
- Precisión del Método
- Precisión Intermedia
- Veracidad
- Robustez
- Intervalo de trabajo
- Incertidumbre

Variables por estudiar

Los parámetros con los cuales se validará el método para la determinación de c-GMP en leche son:

- Linealidad
- Límite de detección
- Límite de Cuantificación

LINEALIDAD

Se realizará una curva de calibración con las concentraciones referenciadas en la tabla N°.1, se evaluará cada punto de la curva con al menos dos réplicas por punto. El diseño experimental se encuentra en la Tabla N°. 2. De acuerdo con ensayos previos se establece dos rangos de linealidad: rango bajo (entre 0 y 200,0 mg/L) y rango alto (entre 100 y 5000 mg/L).

Tabla N°.2: Diseño para establecer la linealidad del método.

Curva rango bajo		
Concentración de c-GMP (mg/L)	Réplicas	
0,00	Réplica 1	Réplica 2
10,0	Réplica 1	Réplica 2
30,0	Réplica 1	Réplica 2
50,0	Réplica 1	Réplica 2
70,0	Réplica 1	Réplica 2
100,0	Réplica 1	Réplica 2
200,0	Réplica 1	Réplica 2

¹ Biotrends Laboratorio hace parte del Consorcio Consultoría PTP.

Curva rango alto

Concentración de c-GMP (mg/L)	Réplicas	
100,0	Réplica 1	Réplica 2
700,0	Réplica 1	Réplica 2
1000,0	Réplica 1	Réplica 2
2000,0	Réplica 1	Réplica 2
3000,0	Réplica 1	Réplica 2
5000,0	Réplica 1	Réplica 2

Criterio: El valor del coeficiente de correlación debe ser $\geq 0,95$ por mínimos cuadrados.

Límite de detección

Siendo la menor cantidad del analito en estudio que puede ser distinguida del fondo del ruido del método con cierto nivel de confianza especificado, se establecerá teóricamente como:

$$LOD = 3 \times s'_0$$

Donde:

s'_0 = desviación estándar (en concentración) obtenida de blanco de reactivos o blancos fortificados a concentraciones muy bajas.

Límite de cuantificación

Siendo la menor cantidad del analito en estudio que puede ser determinada cuantitativamente, con la precisión y veracidad establecida en el método y con una incertidumbre asociada, para un nivel dado de

confianza, el límite de cuantificación se establecerá inicialmente en 10,0 mg/L en la curva de cuantificación. Este estándar será preparado 10 veces y se inyectará cada preparación una vez, para obtener 10 resultados independientes bajo condiciones de repetibilidad (mismo analista, mismo día). El diseño para la estimación del límite de cuantificación se encuentra en la tabla N°.3

Tabla N°. 3: Diseño experimental para la determinación del límite de cuantificación

Concentración: 10,0 (mg/L)
Réplica 1
Réplica 2
Réplica 3
Réplica 4
Réplica 5
Réplica 6
Réplica 7
Réplica 8
Réplica 9
Réplica 10

Criterio de aceptación: Se establecerá esta concentración como límite de cuantificación si se obtiene una desviación estándar relativa (RSD) menor al 5,3% y un Porcentaje de Recuperación entre el 80 - 110%.

Precisión del sistema instrumental (bajo condiciones de repetibilidad)

Se determinará analizando repetidamente el estándar bajo (60,0 mg/L), el estándar medio (500 mg/L) y el estándar alto (4000 mg/L), los cuales serán inyectados 6 veces (bajo condiciones de repetibilidad (mismo analista, mismo día). En la tabla N°. 4 se encuentra el esquema para el análisis de la repetibilidad del sistema instrumental.

Precisión del método (bajo condiciones de repetibilidad)

Este parámetro se evaluará bajo el mismo esquema de la repetibilidad instrumental (mismo analista, mismo día). El lote de muestras se analizará sobre réplicas, es decir la muestra o estándar se analiza independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados). Se trabajará según el modelo presentado en ICH Q2 (R1) donde se analizarán 6 réplicas de muestras y estándares. Las muestras para analizar serán: estándar de control bajo (60,0 mg/L), estándar de control medio (500 mg/L) y estándar de control alto (4000 mg/L) y una muestra de leche cruda (matriz). El esquema de trabajo se presenta en la siguiente tabla (Tabla N°.5).

Tabla N°.4: Diseño experimental para la repetibilidad del sistema instrumental

Estándar control bajo (60,0 mg/L)	Estándar control medio (500 mg/L)	Estándar control alto (4000 mg/L)
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3
Réplica 4	Réplica 4	Réplica 4
Réplica 5	Réplica 5	Réplica 5
Réplica 6	Réplica 6	Réplica 6

Tabla N°. 5: Diseño experimental para la determinación de Repetibilidad del Método

Estándar control bajo (60,0 mg/L)	Estándar control medio (500 mg/L)	Estándar control alto (4000 mg/L)	Muestra de leche cruda
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3
Réplica 4	Réplica 4	Réplica 4	Réplica 4
Réplica 5	Réplica 5	Réplica 5	Réplica 5
Réplica 6	Réplica 6	Réplica 6	Réplica 6

Criterio de aceptación: El RSD debe ser menor a 5,3%.

Precisión Intermedia (bajo condiciones de reproducibilidad)

Para evaluar la precisión intermedia se contempla cambio de analista; se realizarán los lotes de muestras establecidos en la precisión del método Tabla 5, pero se analizará en conjunto los resultados obtenidos por los dos analistas. La presente tabla indica el esquema a trabajar.

Tabla N°.6: Diseño experimental para la Precisión Intermedia

ANALISTA 1			
Estándar control bajo (60,0 mg/L)	Estándar control medio (500 mg/L)	Estándar control alto (4000 mg/L)	Muestra de leche cruda
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3
Réplica 4	Réplica 4	Réplica 4	Réplica 4
Réplica 5	Réplica 5	Réplica 5	Réplica 5
Réplica 6	Réplica 6	Réplica 6	Réplica 6

ANALISTA 2

Estándar control bajo (60,0 mg/L)	Estándar control medio (500 mg/L)	Estándar control alto (4000 mg/L)	Muestra de leche cruda
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3
Réplica 4	Réplica 4	Réplica 4	Réplica 4
Réplica 5	Réplica 5	Réplica 5	Réplica 5
Réplica 6	Réplica 6	Réplica 6	Réplica 6

Criterio de aceptación: Se realizará un Análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias significativas entre los lotes de muestras. Si el F calculado es menor al F tabulado, se establece que no hay diferencias significativas entre los analistas.

Veracidad

Para la evaluación de la veracidad se realizará el análisis sobre réplicas del estándar bajo (60,0 mg/L), estándar medio (500 mg/L) y del estándar alto (4000 mg/L). Se analizarán 6 réplicas en condiciones de reproducibilidad. La veracidad se evaluará como el porcentaje de recuperación hallado en cada réplica analizada, el porcentaje de recuperación relativo se calculará de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%REC = \frac{\text{Valor obtenido}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

La presente tabla indica el esquema a trabajar.

Tabla N°.6: Diseño experimental para la veracidad del método

Estándar control bajo (60,0 mg/L)	Estándar control medio (500 mg/L)	Estándar control alto (4000 mg/L)
Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1
Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2
Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3
Réplica 4	Réplica 4	Réplica 4
Réplica 5	Réplica 5	Réplica 5
Réplica 6	Réplica 6	Réplica 6

Criterio de aceptación: El % de Recuperación debe estar entre 80 – 110%.

Robustez

Para evaluar la robustez de la técnica se realizará una comparación de los resultados obtenidos en leche sin adición de preservante y con adición de preservante. El preservante utilizado es el peróxido de hidrógeno al 0,02%. Se realizará una prueba F para estimar si las varianzas de las curvas en las dos condiciones diferentes son homogéneas y posteriormente se realizará una prueba t-student para evaluar si hay diferencias significativas en las curvas obtenidas.

Criterio de aceptación

Si F_{cal} es menor a $F_{tabulado}$ se consideran varianzas homogéneas, si t_{cal} es menor a t_{tab} se consideran datos estadísticamente iguales.

Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo se determinará una vez se hayan analizado todos los datos obtenidos en el presente ejercicio de validación. Inicialmente el intervalo se define entre el límite de detección hallado experimentalmente en el presente ejercicio hasta la muestra o estándar más alto trabajado durante el proceso. Sin embargo, se establecerá una vez se analicen los resultados obtenidos.

Incertidumbre

La incertidumbre será estimada de acuerdo con lo establecido por la Guía para la expresión de la Incertidumbre de Medida - GUM y documentados en procedimientos internos del Laboratorio.

Resultados y análisis de resultados

En el anexo 2 se encuentran los datos primarios utilizados para el cálculo de los siguientes apartados. Se evalúa el resultado estadístico obtenido del análisis de datos contra el criterio establecido en el numeral 4.0 del presente documento.

Linealidad

Con los resultados obtenidos se evidencia que el método cumple con el criterio establecido en el rango bajo (0 a 200 mg/L) y en el rango alto (100 a 5000 mg/L) ya que se obtuvo para cada uno de los rangos un coeficiente de correlación $\geq 0,95$.

Con las áreas obtenidas y a través de un análisis de regresión por mínimos cuadrados, se construyó la curva de calibración del método a rango bajo (Gráfica N°.1) y a rango alto (Gráfica N°. 2), en las tablas 7 y 8 se evidencian los resultados de las regresiones estadísticas obtenidas para cada rango.

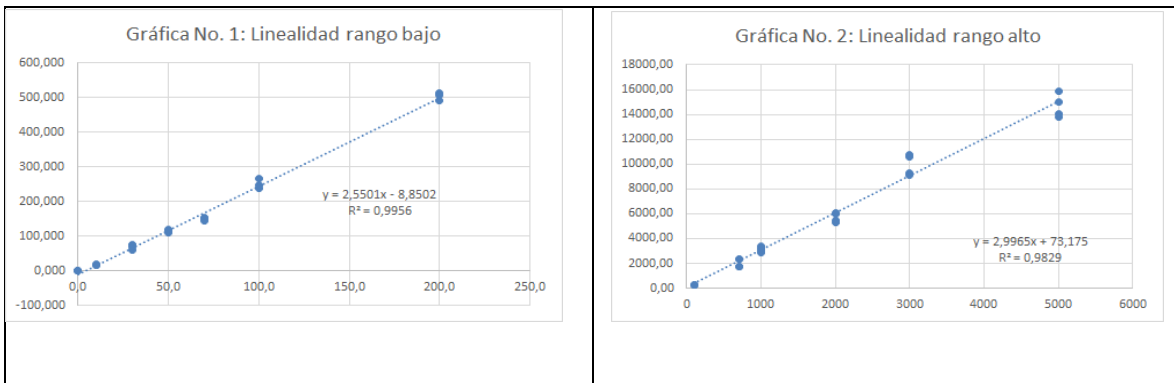


Tabla N°.7: Regresión lineal de la curva de calibración (rango bajo).

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9974
Coefficiente de determinación R²	0,994807
R² ajustado	0,994534
Error típico	12,22093
Observaciones	21

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Intercepción	-13,0712	3,8397	-3,4042	0,0030
Variable X 1	2,5362	0,0420	60,3305	0,0000

Tabla N°.8: Regresión lineal de la curva de calibración (rango alto).

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,991
Coefficiente de determinación R²	0,983
R² ajustado	0,982
Error típico	227,15
Observaciones	24

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Intercepción	-9,09E-13	72,19625	-1,26E-14	1
Variable X 1	1	0,028138	35,53925	6,28E-21

Criterio: el valor de coeficiente de correlación debe ser $\geq 0,95$ por mínimos cuadrados.

Conclusión: Para cada uno de los rangos trabajados se presentó un coeficiente de determinación lineal mayor a 0,95, de esta forma para rango bajo se obtuvo un $R^2 = 0,99$ y para rango alto el valor fue de 0,98; por lo tanto se demuestra que existe una alta correlación entre la concentración del c-GMP y el área del pico cromatográfico, se afirma que de esta manera la ecuación de la curva de calibración del método fue capaz de explicar la respuesta instrumental a partir del de la concentración de c-GMP en los estándares trabajados.

Límite de detección y cuantificación

Inicialmente el límite de cuantificación se estableció a una concentración de 10,0 mg/L, se analizó 10 veces de acuerdo al diseño experimental, sin embargo, a esta concentración, no se obtuvo una adecuada repetibilidad (el % RSD es de 54,7%), a pesar de que se evidencia un pico cromatográfico diferente al ruido de fondo del equipo, se decide establecer esta concentración como límite de detección del método (**Tabla N°. 9**). La siguiente concentración analizada fue de 20,0 mg/L, la cual se analizó 10 veces, para esta concentración se obtuvo una repetibilidad adecuada por lo que se establece como límite de cuantificación la concentración de 20,0 mg/L (**Tabla N°. 9**).

Tabla N°.9: Resultados obtenidos para el límite de detección y cuantificación del método.

LÍMITE DE DETECCIÓN		LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	
10,0 (mg/L)		20,0 (mg/L)	
mg/L	%rec	mg/L	%rec
7,9	79,3%	20,8	103,8%
17,4	174,0%	22,1	110,6%
19,0	190,2%	19,9	99,3%
13,8	137,8%	21,7	108,4%
30,6	306,3%	20,8	104,2%
18,5	184,6%	19,5	97,6%
23,2	231,8%	21,0	105,0%
2,8	27,8%	19,7	98,7%
26,6	266,4%	20,5	102,7%
40,6	405,7%	20,4	101,8%
Promedio	20,04	Promedio	20,64
s	10,96	s	0,83
%Rec	200,4%	%Rec	103,2%
RSD	54,7%	RSD	4,0%

Criterio de aceptación: Se establecerá la concentración analizada como límite de cuantificación si se obtiene un RSD menor o igual al 5,3% y un porcentaje de recuperación entre 80 y 110%.

Conclusión: Para la concentración analizada del límite de cuantificación se obtiene un % Recuperación de 103,2% y un RSD de 4,0%, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos por el método.

Precisión del sistema instrumental (bajo condiciones de repetibilidad)

Se determinó analizando repetidamente el estándar bajo (60 mg/L), el estándar medio (500 mg/L) y el estándar alto (4000 mg/L), 6 veces (según criterio ICH) bajo condiciones de repetibilidad (mismo analista, mismo día). Los resultados se encuentran en la tabla N°. 10.

Tabla N°. 10: Resultados precisión del sistema instrumental.

	Rango Bajo	Rango medio	Rango Alto
	60 mg/L	500 mg/L	4000 mg/L
	58,4	536,2	4000,5
	60,5	481,1	4188,6
	60,7	485,9	4055,6
	57,3	493,2	4024,7
	61,8	501,5	4059,6
	63,9	493,7	4186,8
Promedio	60,4	498,6	4086,0
s	2,4	19,7	81,7
%RSD	3,95%	3,95%	2,00%

Criterio de aceptación: El RSD debe ser menor a 5,3%.

Conclusión: Con los resultados obtenidos se concluye que el sistema instrumental es repetible ya que se obtuvieron valores de RSD menores a 5,3% para todo el rango evaluado.

Precisión del método (bajo condiciones de repetibilidad)

Este parámetro se evaluó bajo el mismo esquema de repetibilidad instrumental de acuerdo con lo definido en el numeral 4.4 del presente documento. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla N°. 12: Evaluación de la precisión del método

Analista	Rango Bajo	Rango medio	Rango Alto	Muestra
	60 mg/L	500 mg/L	4000 mg/L	
1	58,37	536,20	4000,52	153,29
1	60,51	481,07	4188,64	157,09
1	60,66	485,93	4055,55	150,03
1	57,28	493,16	4024,72	157,00
1	61,83	501,51	4059,59	152,85
1	63,93	493,70	4186,84	158,10
2	63,31	480,44	4214,97	151,93
2	56,31	484,22	3937,48	166,49

Analista	Rango Bajo 60 mg/L	Rango medio 500 mg/L	Rango Alto 4000 mg/L	Muestra
2	58,74	468,63	4092,76	151,17
2	65,14	472,96	3934,81	167,45
2	63,76	468,31	3949,70	143,79
2	63,07	507,76	3969,42	146,35
Promedio	60,43	489,49	4051,25	154,73
s	2,39	19,1674	101,2045	3,15
%RSD	3,95%	3,92%	2,50%	2,04%

Criterio de aceptación: El RSD debe ser menor 5,3%

Conclusión: El RSD obtenido experimentalmente para cada conjunto de datos es menor al 5,3%, por lo tanto se concluye que el método utilizado es repetible para ambos analistas y con las diferentes muestras analizadas.

Precisión Intermedia (bajo condiciones de reproducibilidad)

La evaluación de la precisión intermedia se realizó de acuerdo con lo establecido en el numeral 4.5 del presente documento. A cada conjunto de datos (presentados en la tabla N°. 13) se realizó un análisis de varianza para establecer diferencias significativas debido a diferentes analistas.

Tabla N°. 13: Evaluación de la precisión intermedia del método para todo el intervalo evaluado.

ESTÁNDAR BAJO 60 mg/L		ESTÁNDAR MEDIO 500 mg/L		ESTÁNDAR ALTO 4000 mg/L		MUESTRA	
Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
58,37	63,31	536,20	480,44	4000,52	4214,97	153,29	151,93
60,51	56,31	481,07	484,22	4188,64	3937,48	157,09	166,49
60,66	58,74	485,93	468,63	4055,55	4092,76	150,03	151,17
57,28	65,14	493,16	472,96	4024,72	3934,81	157,00	167,45
61,83	63,76	501,51	468,31	4059,59	3949,70	152,85	143,79
63,93	63,07	493,70	507,76	4186,84	3969,42	158,10	146,35

Tabla N°. 14: Anova para el estándar bajo (60 mg/L).

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Analista 1	6	362,59	60,43	5,69
Analista 2	6	370,33	61,72	11,67

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4,99	1	4,990	0,575	0,466	4,965
Dentro de los grupos	86,82	10	8,682	--	--	--
Total	91,81	11	--	--	--	--

Tabla N°. 15: Anova para el estándar medio (400 mg/L).

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Analista 1	6	2991,6	498,6	388,7
Analista 2	6	2882,3	480,4	220,6

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	994,56	1	994,562	3,264	0,101	4,965
Dentro de los grupos	3046,72	10	304,672	--	--	--
Total	4041,28	11	--	--	--	--

Tabla N°. 16: Anova para el estándar alto (5000 mg/L).

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Analista 1	6	24515,9	4086,0	6678,1
Analista 2	6	24099,1	4016,5	12960,8

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	14471,37	1	14471,37	1,47	0,25	4,96
Dentro de los grupos	98194,59	10	9819,46	--	--	--
Total	112665,95	11	--	--	--	--

Tabla N°. 17: Anova para la muestra

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Analista 1	6	928,36	154,73	9,95
Analista 2	6	927,17	154,53	102,08

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,118	1	0,1179	0,0021	0,9643	4,9646
Dentro de los grupos	560,125	10	56,0125	--	--	--
Total	560,243	11	--	--	--	--

Criterio de aceptación: El F calculado debe ser menor al F tabulado.

Conclusión: Para cada conjunto de datos se obtuvo un F calculado menor al F tabulado por lo que se concluye que el método utilizado es repetible para ambos analistas y con las diferentes muestras analizadas.

Veracidad

La evaluación de la veracidad se realizó sobre el análisis de réplicas de los estándares analizados en todo el ejercicio de validación, de acuerdo con lo establecido en el numeral 4.6 del presente documento. Los resultados obtenidos se observan en la tabla N°. 18

Tabla N°. 18: Evaluación de la veracidad del método

Bajo (mg/L)	60	Medio (mg/L)	500	Alto (mg/L)	4000
Resultado	%Rec	Resultado	%Rec	Resultado	%REC
58,37	97,3%	536,20	107,2%	4000,52	100,0%
60,51	100,9%	481,07	96,2%	4188,64	104,7%
60,66	101,1%	485,93	97,2%	4055,55	101,4%
57,28	95,5%	493,16	98,6%	4024,72	100,6%
61,83	103,1%	501,51	100,3%	4059,59	101,5%
63,93	106,6%	493,70	98,7%	4186,84	104,7%
63,31	105,5%	480,44	96,1%	4214,97	105,4%

	Bajo (mg/L)	60	Medio (mg/L)	500	Alto (mg/L)	4000
	56,31	93,8%	484,22	96,8%	3937,48	98,4%
	58,74	97,9%	468,63	93,7%	4092,76	102,3%
	65,14	108,6%	472,96	94,6%	3934,81	98,4%
	63,76	106,3%	468,31	93,7%	3949,70	98,7%
	63,07	105,1%	507,76	101,6%	3969,42	99,2%
Promedio	60,43	1,018	489,49	0,979	4051,25	1,013
% Rec	100,7%		97,9%		101,3%	

Criterio de aceptación: El porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 80 y 110 %

Conclusión: De acuerdo con los resultados se observa que, para las concentraciones evaluadas, el porcentaje de recuperación estuvo dentro del criterio de aceptación. Por lo tanto, se puede concluir que el ensayo de c-GMP para el intervalo trabajado, cumple con la veracidad requerida por el método bajo las condiciones del laboratorio fisicoquímico.

Robustez

Para evaluar la robustez del método se realizó una curva de calibración adicionando peróxido de hidrógeno al 0,2% para evaluar la influencia del peróxido en el ensayo. Los datos obtenidos se muestran a continuación

Tabla N°. 19: Evaluación de la robustez del método (Curva con Peróxido de hidrógeno al 0,2%)

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99791
Coefficiente de determinación R²	0,99583
R² ajustado	0,99541
Error típico	377,78
Observaciones	12

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	340476467	340476467	2385,7	3,12402E-13
Residuos	10	1427167,793	142716,8		
Total	11	341903634,8			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	115,75	169,80	0,68	0,51	-	494,09	-	494,09
Variable X 1	3,23	0,07	48,84	0,00	3,08	3,38	3,08	3,38

Se realizó una prueba F entre las curvas obtenidas, para establecer si las varianzas de las dos pendientes son homogéneas o no. Para esto se utilizó la siguiente ecuación

$$F_{cal} = \frac{S^2_{b1}}{S^2_{b2}}$$

Donde se divide la varianza mayor sobre la menor. El resultado del F obtenido es de 0,52. El F tabulado es de 2,47.

Criterio de aceptación: $F_{calculado}$ es menor al $F_{crítico}$.

Conclusión: Como el $F_{calculado}$ (0,52) es menor al $F_{crítico}$ (2,47), se concluye que la varianza de las dos pendientes obtenidas es homogénea.

Para establecer si existe diferencia significativa entre los dos tratamientos, sin preservante y con conservante se realiza una prueba t-student.

$$t_{cal} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{S^2_{b1} + S^2_{b2}}}$$

Se obtuvo un t-calculado de 0,015, que comparado con el t-tabulado (2,02) es menor.

Criterio de aceptación: $t_{\text{calculado}}$ es menor al t_{tabulado} .

Conclusión: Como el $t_{\text{calculado}}$ (1,49) es menor al t_{tabulado} (2,02), se concluye que las curvas obtenidas (con peróxido y sin peróxido) no son diferentes significativamente.

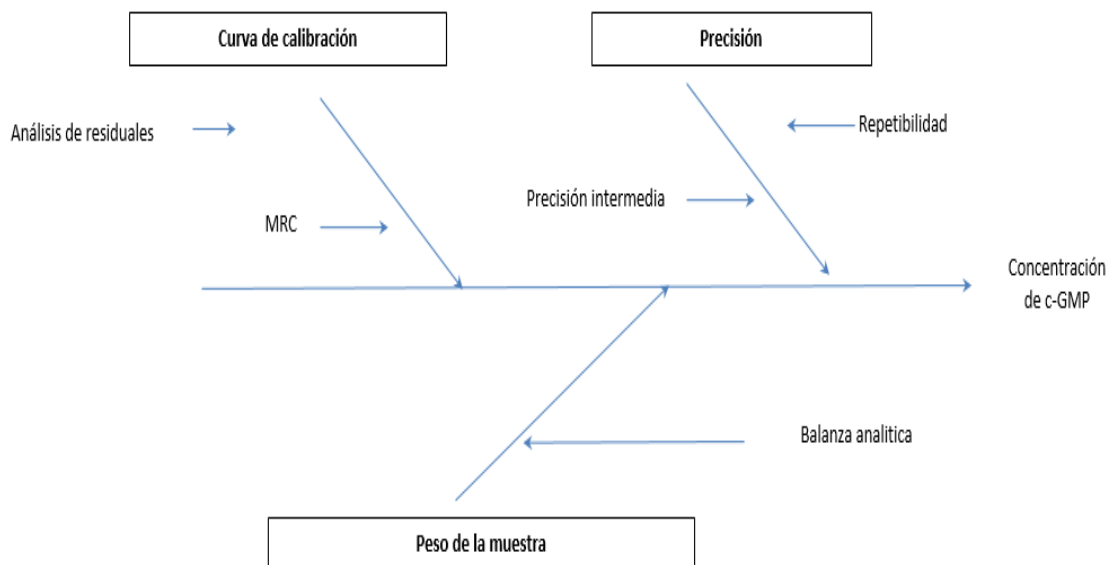
Intervalo de trabajo

De acuerdo con los resultados obtenidos, se establece que el intervalo de trabajo para el ensayo de c-GMP y teniendo en cuenta la pureza del estándar utilizado (76%) en leche líquida es de:

15,2 mg/L a 3800 mg/L

Incertidumbre

Se realiza la estimación de la incertidumbre teniendo en cuenta inicialmente el modelo matemático para la obtención del resultado. Inicialmente se establecen las fuentes de incertidumbre por medio del diagrama causa – efecto, como sigue.



ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE A PARTIR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Análisis de residuales (Curva obtenida experimentalmente)

$$\alpha = b_1\gamma + b_0$$

γ = Concentración en ppm

α = Respuesta observada en el equipo

b_0 = Ordenada al origen (intercepto)

b_1 = Pendiente de la curva

$$u(\gamma(x)) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\gamma(x) - \bar{\gamma}_{MRC})^2}{S_{xx}}}$$

bo	-8,850	Intercepto
b1	2,550	Pendiente
n	21,000	Número de resultados
r	0,998	Coef. Correlación
S	11,340	Desv. Est. Residual lecturas
p	6,000	Número de med. Sol.
$\gamma(x)$	50,000	Resultado muestra
$\bar{\gamma}_{MRC}$	65,714	Promedio conc.
Sxx	84514,286	Desv. Est. Conc.
U_v		2,0724

Material de Referencia

MRC	c-GMP
Concentración	0,76
μ_{exp}	0,02
u rel	0,011547

Incertidumbre combinada Curva de Calibración (a y b)

$$u_{curva} = \sqrt{(u_{\gamma})^2 + (u_{MRC})^2}$$

$$u_{curva} = 2,0725$$

Estimación de la incertidumbre a partir de la preparación de la muestra:

Peso de muestra

$$u_{balanza} = \frac{U_{exp}}{k}$$

$$U_{EXP} = 0,00014g + 5,7E - 07 \times w_i$$

Donde w_i es la indicación de la balanza

Equipo	Balanza analítica LB-002
Calibrado por	Omeacol SAS
Peso	10
Uexp	0,000141
k	2
u balanza	0,000070
Urela	0,000007

Incertidumbre combinada Preparación de la muestra (a y b)

$$u_{muestra} = \sqrt{(u_{balanza})^2}$$

$$u_{muestra} = 0,00014057$$

ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE A PARTIR DE LOS DATOS OBTENIDOS DE LA VALIDACIÓN:

Repetibilidad Instrumental

Precisión - REPETIBILIDAD				
Rango	Rango Bajo	Rango medio	Rango Alto	Muestra
Promedio	60,43	498,59	4085,98	154,73
Desv Est	2,39	19,72	81,72	3,15
n	12	12	12	12
u 1	0,69	5,69	23,59	0,91
u rel 1	0,011	0,011	0,006	0,006

$\mu_{combinada}$	0,012
-------------------	--------------

Precisión intermedia

Precisión Intermedia				
Rango	Rango Bajo	Rango medio	Rango Alto	Muestra
Promedio	60,43	489,49	4051,25	154,73
Desv Est	2,39	19,17	101,20	3,15
n	12	12	12	12
u 1	0,69	5,53	29,22	0,91
u rel 1	0,011	0,011	0,007	0,006

$\mu_{combinada}$	0,0116
-------------------	---------------

COMBINACIÓN DE LAS FUENTES DE INCERTIDUMBRE

$$u_{comb} = \sqrt{(u_{curva})^2 + (u_{muestra})^2 + (u_{validación})^2}$$

$$u_{comb} = 2,0725$$

INCERTIDUMBRE EXPANDIDA

Considerando un nivel de confianza del 95% y una factor de cobertura de $K=2$ se tiene

$$U_{exp} = 4,1$$

Conclusiones

Se realizó la validación del método bajo las condiciones rutinarias del laboratorio fisicoquímico de alimentos en Biotrends Laboratorio SAS, encontrando los siguientes resultados, tabla N°.20.

Los analistas que intervinieron en el presente estudio, alcanzaron los criterios establecidos por el método de ensayo por lo tanto se utilizarán para su autorización.

Tabla N°. 20: Resultados validación método de c-GMP en leche líquida.

Parámetro	Especificación	Resultado Obtenido	Estado de desempeño del método
Intervalo de trabajo	No Aplica	15,2 a 3 800	No aplica
Linealidad	$R^2 > 0,95$	$R^2 > 0,95$	Cumple
Límite de Detección	Concentración mínima diferente al ruido de fondo	7,6	No aplica
Límite de Cuantificación	Concentración mínima que cumpla con $\%RSD < 5,3\%$ $\%Rec = 80 - 110\%$	Concentración establecida: 15,2 $\%RSD = 4,00\%$ $\%Rec = 103,2\%$	Cumple
Precisión del sistema Instrumental	$\%RSD < 5,3\%$	$\%RSD$ (Control bajo) = 3,95% $\%RSD$ (Control medio) = 3,95% $\%RSD$ (Control alto) = 2,00%	Cumple
Precisión del Método	$\%RSD < 5,3\%$	$\%RSD$ (Control bajo) = 3,95% $\%RSD$ (Control medio) = 3,92%	Cumple

		%RSD (Control alto) = 2,50%	
		%RSD (muestra) = 2,04%	
Precisión Intermedia	Fcal < Ftab	Fcal < Ftab	Cumple
Veracidad	%Rec = 80 -110%	%Rec (LOQ) = 103,2%	Cumple
		%Rec (Control bajo) = 100,7%	
		%Rec(Control medio) = 97,9%	
		%Rec (Control alto) = 101,3%	
Robustez	tcalculado < ttabulado	tcalculado < ttabulado	Cumple
Incertidumbre			U (k=2) = 4,1

Referencias

- "Laboratório Nacional agropecuário – LANAGRO/RS MAPA, Laboratório de produtos de origem animal – MAPA/SDA/CGAL - Código: MET POA/04/03/01 Fecha de emisión: 13/02/2014. Página de 1 a 11".
- Norma Técnica NTC-ISO-IEC Colombiana 17025, Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Ensayo y Calibración, 2017.

Declaraciones

Una vez analizados los resultados del presente ejercicio, Biotrends Laboratorios S.A.S. declara que al aplicar el ensayo "Determinación de c-GMP en leche líquida" según el procedimiento **P-CSO-001**, se logra demostrar que en las condiciones propias del laboratorio, se comporta según las especificaciones para su uso previsto y responde a las necesidades de los clientes.

Biotrends Laboratorios S.A.S. certifica que los datos, cálculos y resultados que se presentan en este informe son veraces al momento y condiciones en que se realizaron los ensayos; la firma de este informe por parte de las personas involucradas en su realización lo legitima. Este informe se firma el día 27 de junio de 2020.

REVISÓ:

Olga Ávila

TP: PQ-3733

Jefe de Laboratorio

Biotrends Laboratorios S.A.S.

APROBÓ:

Fernando Murcia Rubiano

Director Técnico

Biotrends Laboratorios S.A.S.

FIN DE INFORME



2021