

## METROLOGÍA APLICADA AL ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA COMO MEDIO PARA PROTEGER AL CONSUMIDOR

Ignacio García Lombardero <sup>(1)</sup>, Lidia Fernández Paredes<sup>(1)</sup>, Estefanía Valencia Vera<sup>(1)</sup>, Ana María Rodríguez Rubio<sup>(1)</sup>, Inés Sastre Marcos<sup>(1)</sup>, Pilar Morillo Gómez<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Centro de Investigación y Control de la Calidad, Departamento de Cromatografía de Líquidos. Avda. Cantabria, 52 28042 MADRID

<sup>(1)</sup> [igarcialo@consumo.gob.es](mailto:igarcialo@consumo.gob.es). Teléfono: 918224708.

### RESUMEN

El Centro de Investigación y Control de la Calidad (CICC) es un laboratorio oficial de control de alimentos y productos industriales. Trabaja bajo la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración" que establece unos criterios de trabajo y gestión de los laboratorios de análisis, como son entre otros: elaborar procedimientos normalizados de trabajo (PNTs), garantizar la trazabilidad de las mediciones, establecer criterios de precisión y veracidad y programar la participación en ejercicios de intercomparación.

En este trabajo se describirá la sistemática seguida por el laboratorio para adaptar sus métodos analíticos a dicha Norma, con el objeto de conseguir resultados fiables que den confianza al consumidor.

### 1. INTRODUCCIÓN

El Centro de Investigación y Control de la Calidad (CICC) perteneciente al Ministerio de Consumo realiza análisis, pruebas y ensayos, a distintos productos, tanto alimenticios como industriales, que puedan ponerse a disposición de los consumidores. Su objeto es verificar la calidad, la seguridad y la veracidad de la información presentada en el etiquetado y de que dichos productos se adecuen a las diferentes reglamentaciones y normas que les sean aplicables. Actualmente está acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) según el expediente de acreditación nº: 178/LE389.

El departamento de Cromatografía Líquida tiene como objetivo aportar al conjunto del laboratorio un soporte analítico y científico eficaz, desarrollando las técnicas de ensayo que requieren de una instrumentación más específica. Trabaja bajo la Norma de Calidad internacional UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 dentro del sistema de garantía de calidad implantado en el centro como política general. Esto implica exigentes protocolos de trabajo, trazabilidad de ensayos, (mediante el uso de materiales de referencia certificados), controles internos (adiciones, muestras ciegas) y externos (ejercicios de aptitud), que contribuyen a proporcionar resultados de alta fiabilidad. Esto, además, incluye la validación de métodos y el cálculo de veracidad, precisión e incertidumbre.

El departamento de cromatografía de líquidos dispone de diversos ensayos acreditados y otros en proceso de acreditación, que siguen la misma sistemática, lo que asegura su competencia técnica, de manera que los resultados emitidos proporcionen confianza al consumidor. Estos, incluyen, entre otros, el análisis de aditivos como edulcorantes, conservadores o antioxidantes; el estudio de posibles mezclas de aceites de oliva con aceites de semillas gracias al parámetro ECN 42 real; adición fraudulenta de azúcares; determinación de histamina en pescados; análisis del tipo de mineralización de aguas minerales y posibles contaminaciones; presencia de sustancias peligrosas como cromo

VI en cuero, el análisis de filtros solares en productos cosméticos, glicerina y etilenglicol en anticongelantes y dietilenglicol en dentríficos.

## 2. DESARROLLO/DESCRIPCIÓN

Dada la gran variedad de determinaciones y la heterogeneidad de las matrices analizadas por cromatografía líquida, ha sido necesario establecer diferentes estrategias de validación para cumplir los requisitos legales y normativos.

Con el objetivo de asegurar la calidad de los resultados de ensayo, el laboratorio sigue la sistemática definida en la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017, por la cual, debe cumplir una serie de requisitos [1]:

### 2.1. Procedimientos normalizados de trabajo (PNTs)

El laboratorio debe seguir y tener definida por escrito la sistemática para llevar a cabo un análisis mediante procedimientos normalizados de trabajo (PNTs). El laboratorio de cromatografía líquida del CICC tiene PNTs de todos los métodos validados, independientemente si están o no bajo el alcance de la acreditación. De los 31 PNTs de métodos realizados en el departamento de cromatografía de líquidos, 10 están bajo alcance de acreditación.

### 2.2. Validación

Estos métodos han sido validados con el fin de evaluar si el método se adecúa a unos criterios de veracidad y precisión establecidos *a priori*. Estos criterios pueden estar legislados (como en el caso de la determinación de aniones en aguas emvasadas) o se calculan mediante medios estadísticos (Horwitz-Thompson). En cualquier caso, el método debe cumplir los criterios para verificar que es adecuado al fin previsto.

Los parámetros más importantes que tenemos que evaluar son los de veracidad y precisión:

La veracidad es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y el valor de referencia o aceptado. Se evalúa con la recuperación obtenida al analizar distintas matrices con diferentes concentraciones conocidas del analito de interés.

La precisión es el grado de concordancia entre dos resultados obtenidos por el laboratorio en unas condiciones determinadas. Si es en un espacio de tiempo corto, se denomina repetibilidad ( $r$ ), si es en un espacio de tiempo más largo, efectuado el análisis por diferentes analistas, diferentes equipos, etc, se denomina reproducibilidad ( $R$ ). La forma de calcular la precisión es mediante la repetición en cada lote analítico de una muestra, un material de referencia certificado o una muestra adicionada con un patrón, con esto podemos estimar la repetibilidad y reproducibilidad intermedia.

Las validaciones se pueden llevar a cabo siguiendo diferentes estrategias, según las necesidades y los recursos disponibles para cada método. Así, la estrategia más recomendable sería usar materiales de referencia; entendiéndose por un material o sustancia cuyos valores del analito a medir son suficientemente homogéneos y están bien establecidos como para ser usados en la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición, o para la asignación de valores a los materiales de control interno. En el CICC, se ha validado usando estos materiales de referencia los métodos de histamina en pescados y vinos. Esta alternativa tiene limitaciones económicas debido al coste elevado de este tipo de materiales, y logísticas, pues en

ocasiones es difícil encontrar un material de referencia suficientemente representativo de la muestra a validar.

Otra alternativa, es estimar la veracidad y la precisión, analizando muestras añadidas con tres concentraciones distintas (baja, media y alta) que abarquen la totalidad del rango de trabajo. Estas adiciones estándar deben prepararse con una solución estándar de trabajo distinta a la utilizada para la elaboración de las rectas de calibrado.

La mayoría de los métodos que se encuentran validados en el laboratorio han empleado esta estrategia, como la determinación de edulcorantes (ciclamarato, sacarina, acesulfame K, aspartame y sucralosa), conservadores en alimentos y bebidas refrescantes (ácido benzoico y ácido sórbico), aniones en agua (cloruros, sulfatos, bromuros, fluoruros, nitratos, nitritos y fosfatos), azúcares (lactosa), quinina en tónicas, cafeína y taurina en bebidas refrescantes. También se ha empleado este tipo de validación en la determinación de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en legumbres y conservas vegetales.

Un caso especial son las validaciones de productos industriales como la determinación de cromo VI en cuero. En estos casos, al no existir material de referencia en el mercado, se realizaron adiciones de concentraciones conocidas de cromo VI a un extracto de cuero.

Cuando un método está suficientemente establecido y se ha participado periódicamente en ejercicios de intercomparación se pueden utilizar *a posteriori* los resultados de los ejercicios en los que se haya participado para validar el método por pares de valores. La participación en estos ejercicios permite evaluar el sesgo, lo que demuestra que se mantiene dentro de los criterios de aceptación definidos por normas, reglamentos o por el laboratorio. Así, se validó en el CICC la determinación de azúcares en productos alimenticios y cafeína en té y café.

### 2.3. Trazabilidad de las medidas

La trazabilidad metrológica es la propiedad de un resultado de medición por la cual puede relacionarse dicho resultado con un patrón de referencia, mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones.

Para realizar la validación y calibración de los métodos se debe contar con materiales de referencia o patrones cuyos valores y sus incertidumbres asociadas están establecidos o se puedan estimar.

En cromatografía de líquidos se utilizan diferentes tipos de materiales de referencia: patrones de calibración para elaborar la curva de calibrado, muestras que tengan valores de referencia establecidos, muestras de ensayo que han sido adicionadas con un patrón del analito con certificado de análisis.

### 2.4. Equipos

Los equipos necesarios para realizar el análisis (cromatógrafos, pipetas, balanzas...) deben tener un plan de mantenimiento y calibración adecuados a su uso.

Calibración: "conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores de magnitudes indicados por un instrumento o sistema de medición y los correspondientes valores aportados por patrones de referencia." Gracias a la calibración obtenemos la incertidumbre, deriva y el posible sesgo del equipo de medida.

Verificación: “comparar las medidas proporcionadas por el instrumento con las de un equipo calibrado y de calidad metrológica igual o superior al equipo a verificar, con el fin de confirmar que el equipo mide con un error menor al especificado por el fabricante o menor del requerido para la realización de un determinado trabajo”. La verificación sirve para comprobar que el equipo sigue funcionando en condiciones similares a las de calibración.

Las calibraciones pueden ser externas o internas. El CICC ha establecido un procedimiento general de calibración y verificación de equipos de uso común como balanzas, granatarios, baños de agua, material volumétrico, neveras y congeladores.

De forma específica, el laboratorio de cromatografía de líquidos ha fijado como norma general que los cromatógrafos se calibran de manera interna al uso, comprobando que cumplen los requisitos establecidos en la validación.

Una excepción a lo expuesto anteriormente es la determinación de aniones en aguas envasadas por cromatografía iónica con detector de conductividad. En este caso, debido a la gran estabilidad del equipo y al número de analitos analizados, la calibración es anual, realizando una verificación al uso con cada secuencia. En ella, se analizan valores bajos, medios y altos del rango de trabajo para comprobar que se mantienen las condiciones de calibración.

## **2.5. Aseguramiento de la calidad**

El aseguramiento de la calidad se define como el conjunto de acciones planificadas y sistemáticas implantadas dentro del sistema de calidad del laboratorio para proporcionar confianza a la dirección y a los clientes de que se cumplen los requisitos para la calidad.

En el CICC se realizan diversos tipos de controles de calidad (internos y externos) para comprobar la validez de los ensayos.

### **2.5.1. Aseguramiento interno de la calidad**

La unidad de cromatografía de líquidos tiene establecido un plan de control interno para asegurar la calidad de los resultados; en él se detalla el nivel y la periodicidad de cada control.

Como norma general en todos los ensayos deberá realizarse una muestra control de calidad interno para evaluar la exactitud y precisión por cada lote analítico. Esta muestra de control puede proceder de sobrantes de ejercicios de intercomparación (como histamina en pescados y vinos, taurina, ciclamato y sacarina en bebidas refrescantes) o bien se puede preparar mediante una adición de una solución de patrón conocido a una muestra sin el analito a estudiar (lactosa, ácido sórbico, ácido benzoico en alimentos y bebidas).

Mediante gráficos de control de Shewhart se analizan los datos obtenidos y se comprueba que para un lote analítico la respuesta del equipo ha sido correcta. La evaluación de la precisión se realizará mediante un duplicado, de una muestra o material de referencia.

Los valores obtenidos deberán ser menores o iguales a los establecidos en la validación para asegurar que las condiciones de ésta se mantienen.

El control de calidad incluye todo el rango de trabajo, es decir, no siempre se controla el mismo nivel de concentración.

### 2.5.2. Aseguramiento externo de la calidad

El aseguramiento externo de la calidad se lleva a cabo mediante ejercicios de intercomparación, intentando cubrir la totalidad de los ensayos. De esta forma, el laboratorio participa de forma periódica y regular en aquellos programas de intercomparación organizados por entidades acreditadas como FAPAS, GSC o BIPEA, y por los Laboratorios Nacionales de Referencia (Laboratorio Arbitral Agroalimentario, LAS y CNA).

Los organizadores de los ejercicios interlaboratorios proporcionan una muestra de concentración desconocida del analito de interés para su análisis. Con los resultados obtenidos, evalúan el grado de concordancia con el valor asignado en el ejercicio mediante diferentes parámetros estadísticos como Z-Score y Z'-Score. Con posterioridad, el laboratorio realiza una evaluación del ejercicio teniendo en cuenta:

- Si el número de participantes es adecuado.
- Si asignación del valor consenso es correcta.
- La dispersión de los resultados del conjunto de participantes.
- La incertidumbre del valor asignado.

Una vez realizada la programación de los ejercicios de intercomparación si no se ha cubierto la participación, al menos una vez al año, en alguno de los ensayos, la sección de garantía de calidad del CICC, procederá, por petición de las distintas unidades, a la programación y a la gestión de las muestras control. Estas muestras control se denominan ciegas puesto que el analista desconoce el contenido de analito en la muestra. Por ejemplo, la determinación de EDTA en conservas y salsas.

En el caso de determinaciones realizadas en productos industriales como la determinación de cromo VI en cuero, es difícil participar en ejercicios interlaboratorios por falta de organizadores que lo oferten.

### 2.6. Auditorías

Periódicamente, el laboratorio debe pasar por una auditoría interna y por otra de seguimiento o reevaluación de ENAC. La última auditoría externa que se realizó al CICC fue en mayo de 2022 y la interna en febrero de 2022.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los laboratorios de control, como el CICC, cumplen una labor esencial en el mercado, pues dan respuesta (a través de las denuncias de consumidores, control oficial del mercado, campañas específicas de productos, ...) y transmiten confianza a los consumidores sobre cuestiones como la seguridad y calidad de los productos, así como la información aportada en el etiquetado.

La legislación europea [2] ha establecido la obligatoriedad de que las autoridades competentes solo designen para los controles oficiales de productos alimenticios a laboratorios acreditados de acuerdo con la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017, que es una herramienta que facilita el desarrollo de mercados seguros y la libre circulación de productos, a la vez que contribuye a reforzar la protección de los consumidores. [3]

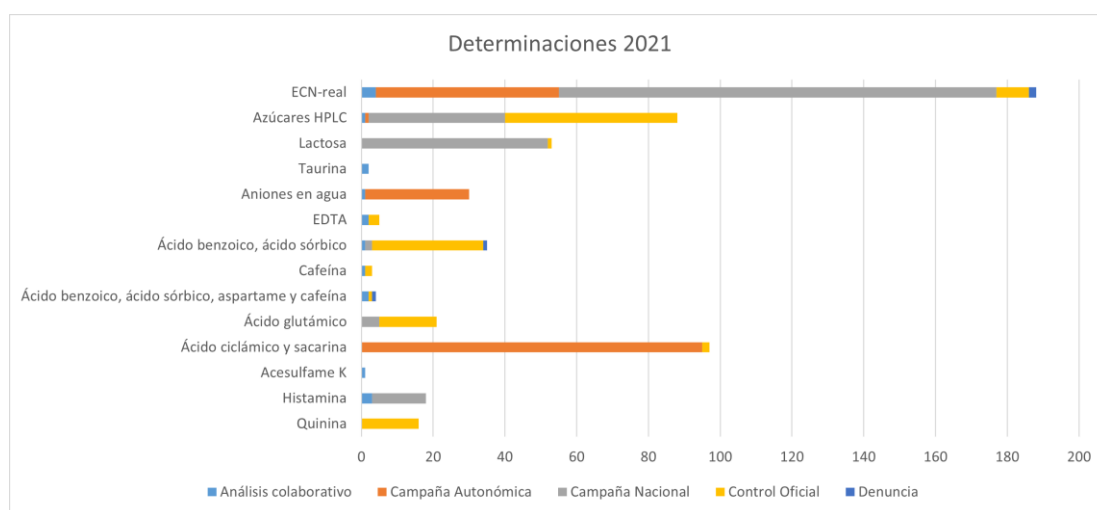
El CICC participa en el control de mercado de productos a disposición del consumidor. La selección de los productos que van a ser objeto de controles de mercado se basa en un análisis de riesgo que tiene en cuenta los cambios normativos, el consumo del

producto o las reclamaciones realizadas por los usuarios. Además, recibe denuncias de consumidores y de organismos oficiales de productos alimenticios e industriales.

El año 2021, el laboratorio de cromatografía líquida participó en 10 campañas:

- Determinación de ECN-42 en aceite de oliva (una campaña nacional y otra autonómica)
- Determinación de lactosa en productos sin lactosa (campaña nacional)
- Determinación de azúcares en bollería industrial (campaña nacional)
- Determinación de histamina en pescado (campaña nacional)
- Determinación de ciclamato, sacarina y azúcares en bebidas refrescantes (campaña autonómica)
- Determinación de aniones en agua envasada (campaña autonómica).
- Determinación de azúcares en yogures (campaña autonómica).
- Determinación de EDTA en conservas vegetales y salsas (campaña autonómica).
- Determinación de quinina en tónicas (campaña autonómica).

En el año 2021 se analizaron en el departamento de cromatografía de líquidos 561 muestras, entre análisis colaborativo (18), campañas (410), control oficial (129) y denuncias (4). La determinación más frecuente es el análisis en el aceite de oliva virgen del número de carbonos equivalente (ECN real) para comprobar si ha sido adulterado con aceites de semillas.



**Fig.1. Resumen de las determinaciones realizadas en el departamento de cromatografía de líquidos en 2021.**

La finalidad de todos estos controles es conseguir un mercado con productos y servicios seguros y que cumplan las normativas vigentes.

#### 4. CONCLUSIONES

El desarrollo de métodos analíticos en el laboratorio siguiendo las pautas de la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 ha demostrado ser una herramienta eficaz para

garantizar la calidad de los resultados y asegurar que son comparables a los emitidos por cualquier otro laboratorio acreditado.

Además, el cumplimiento de esta Norma sirve para que el laboratorio puede establecer acciones de mejora y correctoras que permitan mejorar el desempeño de sus actividades.

Con campañas de control de mercado y evaluación de las denuncias de consumidores, el laboratorio contribuye al control oficial de los alimentos y productos industriales y a proteger al consumidor frente a posibles fraudes.

## 5. REFERENCIAS

[1] UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.*

[2] Reglamento (UE) 625/2017, de 15 de marzo, del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, salud vegetal y productos fitosanitarios.

[3] Entidad Nacional de Acreditación. *Acreditación. Administración Pública.* [https://www.enac.es/documents/7020/15699/F\\_ADMINISTRACION.pdf/08ab02e2-bb32-4080-9805-4ca77ebc99e4](https://www.enac.es/documents/7020/15699/F_ADMINISTRACION.pdf/08ab02e2-bb32-4080-9805-4ca77ebc99e4).