

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EN ALIMENTOS BAJO LA NORMA NMX-F-608-NORMEX-2011

Zaragoza García J.M. <sup>a,\*</sup>, García López I.G. <sup>a</sup>, Guzmán Mar J.L. <sup>a</sup>,  
Saavedra Villarreal N. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Alimentos , Medicamentos y Toxicología, Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, CP 66455, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. \*[jemzaragoza@yahoo.com.mx](mailto:jemzaragoza@yahoo.com.mx)

### RESUMEN:

La validación de métodos analíticos en los laboratorios de análisis es una práctica frecuente y es un requisito obligatorio si el laboratorio se encuentra acreditado bajo la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 ante organismos acreditadores de laboratorios de prueba o ensayo tales como la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA). El propósito de este trabajo fue llevar a cabo la validación o comprobación del método analítico para la determinación de proteínas en alimentos y bebidas no alcohólicas de la Norma Mexicana NMX-F-608-NORMEX-2011 vigente actualmente. El proceso de validación se realizó en un laboratorio acreditado ante el organismo acreditador ya mencionado con la finalidad de verificar que el método cumple con los parámetros evaluados y demostrar que el laboratorio es competente para llevar a cabo dicho método en sus instalaciones realizado por su personal técnico. Los parámetros evaluados fueron el recobro, límite de cuantificación, el intervalo de trabajo, la repetibilidad, reproducibilidad y el sesgo además de la incertidumbre expandida. Los resultados para los parámetros evaluados fueron satisfactorios por lo que el laboratorio puede ofrecer a sus clientes el análisis de proteína según este método bajo las condiciones establecidas gracias a la validación del método.

### ABSTRACT:

The validation of analytical methods in laboratories is a common practice and is a mandatory requirement if the laboratory is accredited according the current regulation, NMX-EC-17025-IMNC-2006 by certification bodies such as the Mexican Accreditation Entity (EMA). The purpose of this study was to carry out validation or verification of the analytical method for protein determination in foods and non-alcoholic beverages according the Mexican Standard NMX-F-608-NORMEX-2011 currently in force. The validation process was conducted in a accredited laboratory (by the accrediting body mentioned) in order to verify that the method meets the parameters evaluated and demonstrate that the laboratory is competent to carry out said method in its facilities and by laboratory technical staff. The parameters evaluated were the recovery, limit of quantification, working range, repeatability, reproducibility and bias plus the expanded uncertainty. The results for the evaluated parameters were satisfactory so the lab can offer its customers the analysis of protein by this method under the conditions laid down by the method validation.

### Palabras clave:

Proteína en alimentos, validación de métodos analíticos, incertidumbre.

### Keyword:

Protein in foods, validation of analytical methods, uncertainty.

**Área:** Otros.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de las actividades en un laboratorio de ensayo (o prueba) en el cual se ha implementado un sistema de gestión de la calidad y se encuentra acreditado o en proceso de acreditación ante organismos como la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) o la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) se deben incluir las siguientes, para las cuales debe existir un programa que establezca la frecuencia con la que se llevan a cabo:

1. Mantenimiento preventivo y calibración de equipos e instrumentos de medición
2. Validación (comprobación o confirmación) de los métodos analíticos
3. Ensayos de aptitud (competencia técnica del laboratorio)
4. Pruebas de desempeño inicial (competencia del personal)

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para su uso en el laboratorio de prueba (o laboratorio de ensayo). La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados emitidos evaluando el efecto sobre los mismos, tanto de los errores sistemáticos como los aleatorios.

Según los criterios de aplicación de la Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 Evaluación de la conformidad - Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, los laboratorios de ensayo deben realizar la confirmación de todos sus métodos y demostrar así que poseen la competencia técnica para realizarlos correctamente en sus instalaciones, con su equipo, instrumentos y personal (químicos analistas).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la determinación del contenido de proteína con el propósito de la validación o comprobación del método se utilizó una matriz alimenticia compleja, en este caso una muestra certificada de leche en polvo proporcionada por el Centro Nacional de Metrología (CENAM) con un valor de referencia conocido de 28.70 g/100g o % del analito de interés, es decir de proteína, obtenido multiplicando el porcentaje de nitrógeno por un factor de conversión de 6.38. Los pasos para el análisis de proteína según la Norma Mexicana NMX-F-608-NORMEX-2011 de forma resumida son:

1. **Digestión:** Se pesa una cantidad de muestra homogénea adecuada y se coloca dentro de un matraz Kjeldahl junto con el catalizador (mezcla de sulfato de cobre y sulfato de potasio), ácido sulfúrico concentrado y cuerpos de ebullición para la digestión.
2. **Destilación:** Una vez obtenido el residuo digerido éste se deja enfriar y se adiciona agua desionizada, granalla de zinc, solución de hidróxido de sodio 1:1 y algún agente antiespumante de ser necesario para la destilación. El

destilado se recibe en ácido bórico con mezcla de indicadores (rojo de metilo/verde de bromocresol).

3. **Titulación:** Una vez recolectado el destilado se procede a una titulación ácido-base con un ácido fuerte valorado (ácido clorhídrico 0.1 N en este caso) hasta vire del indicador de verde o azul a ligeramente rojizo, o bien con ayuda de un potenciómetro, previamente calibrado. El punto final de la titulación tiene lugar a pH de 4.6. Además de la muestra se trabaja un blanco de reactivos y un estándar de un aminoácido puro (glicina en este caso).

Por tratarse de un método normalizado, para la validación del análisis de proteína según la NMX-F-608-NORMEX-2011 “Alimentos – Determinación de Proteínas en Alimentos – Método de ensayo (prueba)” se evaluaron los siguientes parámetros:

**Recuperación o recobro:** Cantidad del analito recuperada cuando la muestra de prueba es conducida a través del método analítico completo. Es un parámetro cuantitativo para evaluar la exactitud.

**Límite de cuantificación:** Es la concentración más baja a la cual el analito puede cuantificarse con una precisión y veracidad aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas.

**Intervalo de trabajo:** El intervalo de trabajo es el comprendido entre las concentraciones superior e inferior (incluyéndolas) para las que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de repetibilidad, recuperación y linealidad.

**Repetibilidad:** Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista, utilizando los mismos instrumentos y método en intervalos cortos de tiempo.

**Reproducibilidad:** Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por varios analistas, utilizando los mismos instrumentos y método en intervalos cortos de tiempo o bien por un mismo analista, en intervalos de tiempo mayores.

**Sesgo:** Es la diferencia entre el valor promedio obtenido de los resultados de prueba con respecto a un valor de referencia aceptado o conocido. Es otro parámetro cuantitativo útil para evaluar la exactitud.

**Incertidumbre:** Estimación (valor expresado en las mismas unidades que el analito) que caracteriza el intervalo de valores, dentro de los cuales se encuentra el valor convencionalmente verdadero de la magnitud medida.

Las metodologías utilizadas para la evaluación de cada parámetro se mencionan a continuación:

**Recuperación o recobro:** Se determinó una muestra certificada de leche en polvo con un valor de referencia conocido de 28.70 g/100g del analito de interés (proteína). El recobro se calculó como la relación (% analito obtenido/% analito esperado) expresada como porcentaje.

**Límite de cuantificación (LC):** Se realizó el análisis a una serie de blancos de reactivos y el límite de cuantificación (LC) se determinó utilizando la siguiente fórmula:  $LC=10*DS$  donde DS es la desviación estándar de los valores.

**Intervalo de trabajo:** Se determinó cuantificando el analito de interés en diferentes matrices (con niveles bajo, medio y alto del analito) por triplicado y posteriormente evaluando el recobro como medida de la exactitud cuándo se tenía un valor de referencia así como el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración del analito. Se tomó en consideración el contenido esperado de nitrógeno (y proteína) en la muestra para establecer la masa de muestra a pesar pudiendo ir desde 0.1 a 0.2 gramos para sales de amonio o estándares de aminoácidos puros o desde 0.5 a 5 gramos para matrices alimenticias. El criterio de aceptación para el coeficiente de variación fue: valores menores a 4% para niveles bajos del analito, así como valores menores a 3% y 2% para niveles medios y altos respectivamente.

**Repetibilidad (r), reproducibilidad (R) y sesgo:** Se utilizó también la misma muestra certificada utilizada para calcular el recobro. Se procedió a analizar tres porciones de la misma muestra en un mismo día por un total de tres días. Posteriormente se determinó la variación entre los resultados obtenidos en un mismo día y también la variación entre los resultados obtenidos en los diferentes días en que se llevaron a cabo las pruebas. La repetibilidad (r) se obtuvo como la desviación estándar para los resultados de un mismo día para un mismo analista ( $S_d$ ). La reproducibilidad (R) se calculó a partir de la varianza entre los días utilizando la siguiente fórmula:

$$R = \sqrt{S_L^2 + S_d^2}$$

Donde  $S_L$  es igual a:

$$S_L = \sqrt{S_e^2 - \frac{S_d^2}{n}}$$

Para determinar el grado de repetibilidad y reproducibilidad del método ambos parámetros se expresaron como coeficiente de variación como se muestra a continuación:

$$CV_{rep} = \frac{r}{\bar{X}_s} \times 100$$

$$CV_{repro} = \frac{R}{\bar{X}_s} \times 100$$

Donde CV es el coeficiente de variación expresado como porcentaje, r es la repetibilidad y R la reproducibilidad. Xs representa el valor promedio de la concentración del analito de interés. Para determinar la existencia de sesgo se utilizó la prueba estadística de análisis de varianza (ANDEVA ó ANOVA) obteniendo y comparando a partir de los resultados tabulados los valores de F calculada y F crítica. El sesgo se obtuvo como la diferencia (positiva o negativa) entre la concentración promedio obtenida para el analito en la muestra certificada y el valor de referencia conocido para la misma.

**Incertidumbre (U):** Se determinaron en primer lugar el modelo matemático para el análisis y las fuentes de incertidumbre atribuibles al método volumétrico (Kjeldahl) para la cuantificación de nitrógeno orgánico ya que el contenido de proteína se cuantifica como la multiplicación de un factor numérico por dicho contenido de nitrógeno en la muestra. El modelo matemático en la determinación de nitrógeno (y por lo tanto del contenido de proteína) es el siguiente:

$$\% \text{Nitrógeno} = \left[ \frac{(V_a - V_b)(N)(0.014)}{g \text{ muestra}} \right] \times 100$$

Donde:

V<sub>a</sub>= Volumen del titulante para la muestra (mL)

V<sub>b</sub>= Volumen del titulante para el blanco (mL)

N= Normalidad del titulante

0.014= miliequivalentes de nitrógeno

g= gramos

Las fuentes que contribuyen a la incertidumbre incluyen, pero no se limitan necesariamente, a los patrones de referencia y los materiales de referencia utilizados, los métodos y equipos utilizados, las condiciones ambientales, así como a los principios de medición de las propiedades y la condición de la muestra sometida al ensayo, al material, instrumentos y equipos calibrados y al analista. Para el cálculo de la incertidumbre se sigue la ley de propagación de incertidumbres y para el caso de la incertidumbre combinada del método a validar (*U<sub>proteína</sub>*) se consideran las contribuciones individuales de las incertidumbres combinadas atribuidas al volumen dispensado por el material volumétrico (*U<sub>vo</sub>*), el estándar primario de carbonato de sodio utilizado (*U<sub>std</sub>*), el titulante (*U<sub>HCl</sub>*) y la muestra pesada (*U<sub>mta</sub>*).

Se determinaron en primer lugar las incertidumbres (calculadas por separado) debidas a la pesada (*U<sub>masa</sub>*) del estándar primario, a su pureza (*U<sub>pureza</sub>*) y a su peso fórmula (*U<sub>pF</sub>*) respectivamente. Para el cálculo de la incertidumbre combinada asociada a la concentración del titulante (ácido clorhídrico 0.1 N) se utilizó la siguiente fórmula:

$$U_{HCl} = \sqrt{(U_{repetibilidad})^2 + (U_{std})^2 + (U_{vo})^2}$$

Donde se utilizan las incertidumbres debidas a la repetibilidad (calculada por separado) y las debidas a la masa del estándar primario y el volumen dispensado por el material volumétrico ya calculadas en los pasos anteriores respectivamente. Para el cálculo de la incertidumbre asociada a la pesada de la muestra se consideraron las incertidumbres individuales atribuidas a la linealidad del instrumento para pesar y la repetibilidad según la siguiente fórmula:

$$U_{mta} = \sqrt{(U_{repetibilidad})^2 + (U_{linealidad})^2}$$

También se calcularon posteriormente las incertidumbres asociadas a la repetibilidad del análisis de % de nitrógeno ( $U_{repet}$ ) y a el peso equivalente del nitrógeno ( $U_{pFN}$ ) para calcular, a partir de todas las incertidumbres ya conocidas, la incertidumbre combinada para la determinación del contenido de proteína en una muestra con base a la siguiente fórmula:

$$U_{proteína} = \sqrt{(U_{repet})^2 + (U_{pFN})^2 + (U_{mta})^2 + (U_{std})^2 + (U_{HCl})^2 + (U_{vo})^2}$$

Finalmente la incertidumbre expandida del método se obtuvo multiplicando la incertidumbre combinada ( $U_{proteína}$ ) por un factor de cobertura ( $k$ ) de 2.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Los resultados obtenidos durante la validación o comprobación del método para la determinación del contenido de proteína en alimentos y bebidas no alcohólicas según la Norma Mexicana NMX-F-608-NORMEX-2011 se presentan enseguida. La comprobación de este método analítico se puede complementar en un futuro con pruebas de aptitud técnica o comparaciones entre laboratorios (que en algunos casos son consideradas también como una comprobación del método).

El recobro o recuperación del analito (proteína) para la muestra certificada con un valor de referencia conocido de 28.70 g/100g fue de 100.20%. El criterio de aceptación establecido es de 98-102%. El valor medio de la concentración de proteína determinada en el laboratorio para la muestra fue de 28.76 g/100g. Se determinó a partir de los blancos analizados un límite de cuantificación para el método de 0.18 g/100g de nitrógeno.

El límite de cuantificación expresado como proteína varía según el factor de conversión utilizado, por ejemplo para alimentos en los que se utilice el factor general de 6.25 el límite de cuantificación sería de 1.12 g/100g como proteína. Se encontraron coeficientes de variación menores a la especificación para matrices (muestras) con un contenido de nitrógeno iguales o mayores a 0.18 g/100g e iguales o menores a 18.5 g/100g de nitrógeno (equivalentes a valores que van desde 1.1 hasta 99.9 g/100g de proteína) siempre y cuando se aplique el criterio que establece la masa de muestra a pesar en función del porcentaje de nitrógeno esperado. En el caso de los valores considerados como medios (4.5 g/100g de nitrógeno) y altos (18.5 g/100g de nitrógeno) se evaluó además del coeficiente de variación el recobro

ya que se tenía un valor de referencia, siendo éstos aceptados por encontrarse entre un 98 y 102%.

Los resultados de la determinación de la repetibilidad, reproducibilidad y sesgo para el método analítico evaluado indican que aunque existe una diferencia positiva (0.06 g/100g de proteína) entre el valor promedio de la concentración del analito obtenido para el material de referencia y su valor conocido, esto no representa un sesgo de importancia estadística ya que el análisis de varianza estableció que no existe una diferencia significativa con un  $\alpha$  de 0.05 (F calculada es menor a la F crítica). Los coeficientes de variación para la repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) fueron en ambos casos de 0.85% por lo que fueron aceptados.

Por último, la estimación de las diferentes incertidumbres combinadas atribuidas a la determinación del contenido de proteína en alimentos y bebidas no alcohólicas por el método Kjeldahl determinaron una incertidumbre combinada de 0.08 g/100g y una incertidumbre expandida de 0.17 g/100g utilizando un factor de cobertura de  $k=2$ . Por lo tanto, para la muestra certificada analizada se determinó un contenido de proteína de  $28.76 \pm 0.17$  g/100g utilizando un factor de conversión de 6.38.

### **CONCLUSIONES:**

La validación o comprobación periódica de los métodos analíticos además de ser un requisito a cumplir, es una actividad necesaria para mantener bajo control al método es decir, conocer que tan grande es su variación y el impacto de los cambios en los equipos, instrumentos o personal en dicha variación así mismo la validación nos permite saber el alcance real (limitaciones) de cada método aplicado en el laboratorio y por lo tanto bajo qué condiciones se puede ofrecer un servicio analítico a los clientes y atender sus necesidades.

### **BIBLIOGRAFÍA:**

Instituto Mexicano de Normalización y Certificación IMNC. 2006. NMX-EC-17025-IMNC-2006 Evaluación de la conformidad - Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. D.F., México.

Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación. 2011. Norma Mexicana NMX-F-608-NORMEX-2011 Alimentos – Determinación de Proteínas en Alimentos – Método de ensayo (prueba). D.F., México.

Entidad Mexicana de Acreditación EMA. Manual de procedimientos: política de incertidumbre de mediciones. Ensayos-Directorio (online). Disponible en:

Miller J.N., Miller J.C. 2004. Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4a Edición, Editorial Prentice Hall:México.