

Evaluación de los parámetros de desempeño para determinar nitrógeno básico volátil total mediante destilación de un extracto desproteínizado con ácido tricloroacético

Garbari, Delfina; Spath, Carolina; Bononi, Melisa
INTI Mar del Plata
dgarbari@inti.gob.ar

OBJETIVO

La determinación de nitrógeno básico volátil total (NBVT) es una de las pruebas analíticas más ampliamente utilizadas para evaluar el grado de frescura del pescado y los productos derivados. Este concepto incluye la determinación de compuestos nitrogenados de carácter volátil que se liberan como consecuencia del proceso de degradación post-mortem: trimetilamina, dimetilamina y amoníaco.

El método de destilación de un extracto desproteínizado mediante ácido tricloroacético para la determinación NBVT en músculo de merluza (*Merluccius hubbsi*) se fundamenta en extraer las bases nitrogenadas volátiles de la muestra mediante una solución de ácido tricloroacético al 6%. Una vez alcalinizado, el extracto se somete a destilación al vapor y los componentes básicos volátiles se absorben mediante un receptor ácido. La concentración de NBVT se determina mediante titulación de las bases absorbidas.

Hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados, para su finalidad y propósito perseguido. La validación junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad permiten demostrar que los resultados obtenidos son técnicamente válidos, exactos y confiables.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la robustez, repetibilidad, precisión intermedia y recuperación del método. Se establece como criterio de aceptación de resultados que la desviación estándar en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia sea < 1 mg/100 g.

DESCRIPCIÓN

Para la realización de los ensayos se adquirió un bloque de 7 kg de filetes de merluza sin piel, interfoliados, congelados en altamar, de la empresa Moscuza SA. El bloque fue fraccionado en bolsas de 0,5 kg aproximadamente, que se almacenaron a -18 °C.

Cada día de análisis, se descongeló y homogeneizó cantidad suficiente de muestra para la realización de los ensayos que fue

mantenida a temperatura de refrigeración (4°C) hasta el momento de ser analizada.

Para evaluar la repetibilidad y precisión intermedia del método se realizaron 9 replicados de la muestra llevados a cabo por distintos analistas y realizados en diferentes días de análisis. Para ello se homogeneizaron 10 g de muestra con 50 ml de ácido tricloroacético al 6%. Posteriormente, el homogenato se centrifugó a 10000 rpm, durante 15 minutos a 15 °C. Una vez finalizado este proceso se filtró el sobrenadante utilizando papel de filtro. Del extracto obtenido se tomó una alícuota de 25 ml en un tubo de destilación y se agregaron algunas gotas del indicador fenoltaleína para comprobar que el extracto esté alcalinizado. Se añadió al mismo 10 ml de NaOH al 10% y se inició la destilación en la unidad automática 1002 Foss Tecator (Figura 1). Las bases volátiles se recogieron sobre ácido bórico al 3% con indicador Tashiro (rojo de metilo/azul de metileno (2:1), hasta obtener un volumen final de destilado de 200 ml. Por último, las bases volátiles se titularon con ácido sulfúrico 0,1 N. El NVB-T se cuantifica como mg de N/100 g muestra.

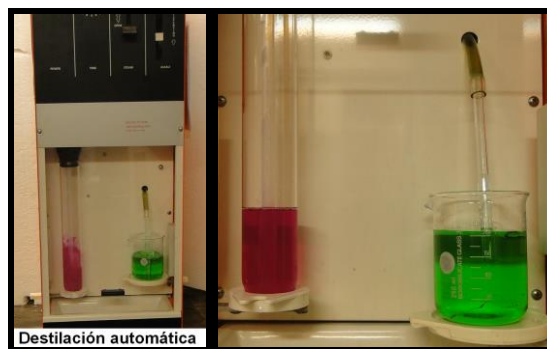


Figura 1: Equipamiento

La repetibilidad y precisión intermedia se evaluaron a través de los resultados del análisis de varianza de un factor (ANOVA).

Para evaluar la robustez del método se identificaron los posibles factores que pudieran tener influencia sobre el método y que necesiten ser controlados. Cada factor se evaluó en dos niveles, uno superior y otro inferior respecto a lo establecido en el método. Para ello se diseñó el modelo de 5 efectos y 6 análisis según se describe en la norma ASTM E 1169-07 que se presenta en la Tabla 1. Cada

análisis se llevó a cabo por duplicado. De esta manera se identificaron los efectos que deben ser controlados.

Tabla 1: Diseño experimental Plackett-Burman

Análisis	EFECTOS				
	A	B	C	D	E
1	Si	Téc. 1	25	150	4
2	No	Téc. 1	25	230	3
3	No	Téc. 2	25	230	4
4	Si	Téc. 2	40	230	3
5	No	Téc. 1	40	150	3
6	Si	Téc. 2	25	150	3

A: centrifugación; B: analistas; C=volumen (ml) extracto; D: volumen (ml) destilado; E: % de ácido bórico.

Asimismo, se examinó el comportamiento del método a través del ensayo de recuperación de amoníaco, usando como patrón 0,15 g de sulfato de amonio, previamente secado en estufa, que equivaldría a un contenido de NBVT del 21,09 mg N/100 g.

RESULTADOS

El análisis de varianza de un factor (ANOVA) de los resultados de los 9 replicados realizados por dos analistas en distintos días de análisis (Tabla 2), demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$). Bajo estas condiciones la desviación estándar en condiciones de repetibilidad (S_r) se calculó como $PC_d^{1/2}$ siendo PC_d el promedio de cuadrados dentro de los grupos del análisis ANOVA. S_r es 0,49 mg N/100 g. La desviación estándar en condiciones de precisión intermedia (S_{pi}) se calculó como $(SC_t / (N-1))^{1/2}$, siendo SC_t la suma de cuadrados totales del análisis ANOVA y N el número total de análisis realizados. S_{pi} es 0,49 mg N/100 g. Tanto S_r como S_{pi} cumplen con el criterio de aceptación previamente establecido.

Tabla 2: Resultados de NBV-T (mg N/100 g) obtenidos por dos analistas (Téc. 1 y Téc. 2)

Téc. 1	14,18	12,97	13,88	13,00	13,32	13,61	13,30	13,62	13,84
Téc. 2	13,86	13,90	14,47	14,55	13,32	13,92	13,17	12,88	13,78

Los resultados obtenidos en el ensayo de robustez se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados ensayo robustez

Análisis	Resultado 1	Resultado 2	Promedio	Diferencia
1	12,66	11,75	12,21	0,91
2	14,72	13,21	13,26	1,51
3	12,9	12,28	12,59	0,62
4	10,57	11,13	10,85	-0,56
5	12,61	12,34	12,48	0,27
6	11,08	12,03	11,56	-0,95
sd Diferencia				0,92
Sd Resultados				0,65
Sd Efectos				0,38

Sd: desviación estándar

A partir de estos resultados es posible calcular el valor p para cada efecto (Tabla 4).

Tabla 4: Valores p obtenidos

Efecto	Efecto principal	t Student	Valor p
A	1,24	3,30	0,02
B	0,98	2,61	0,05
C	0,74	1,97	0,11
D	0,16	0,41	0,70
E	0,36	0,96	0,38

Dado que el valor de p obtenido para el efecto A (centrifugación) es menor que 0,05 se concluye que dicha variable posee un efecto significativo sobre el método, por lo tanto debe ser estrictamente controlada.

Los resultados del examen del comportamiento del método en la recuperación de amoníaco partiendo de sulfato de amonio se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5: Porcentajes de recuperación de amoníaco

Ensayo	Destilación extracto desproteínizado con ácido tricloroacético
1	100,27
2	100,21
3	100,60
4	100,34
5	99,87
6	99,93
7	100,60
8	100,35
Promedio	100,27

Las diferencias encontradas respecto al valor teórico de 100 % se deben al error experimental del propio método.

CONCLUSIONES

Los parámetros de desempeño evaluados cumplen con los criterios previamente establecidos. En la próxima etapa de nuestra investigación planeamos evaluar la veracidad e incertidumbre del método, para lo cual se deberá adquirir un material de referencia certificado (MRC) que cuente con valor asignado e incertidumbre para este parámetro. Una vez concluida esta etapa se completará la validación y podrá confirmarse que el método es apto para la aplicación específica prevista.