

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Alejandro Barragán Ocaña, Ma. de los Ángeles Olvera Treviño
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Ciudad Universitaria circuito escolar edificio A de la Facultad de Química, PB laboratorio de Metrología anexo al A004

Tel 56223759 Fax: 56162010 maot@servidor.unam.mx

Resumen: En este trabajo se desarrollan puntos críticos metrológicos de un sistema de control de mediciones con la finalidad de cumplir con la evidencia objetiva de calidad en los resultados producidos por un método de prueba. Se consideran cinco puntos críticos metrológicos a cumplir: La definición de las características metrológicas, la confirmación del equipo, el control del proceso de medida, la trazabilidad de la medición y la estimación de la incertidumbre.

1.-INTRODUCCIÓN

Para asegurarnos que los resultados de medir sean confiables y comparables es necesario tener en nuestro sistema de calidad un efectivo sistema de control de mediciones que nos asegure que el equipo de medida y el proceso de medida sean apropiados para su uso, que no produzcan resultados incorrectos y efectos en la calidad del producto. Existe normatividad internacional y nacional en donde se proponen pautas a seguir para lograr un efectivo sistema de control de mediciones. Sin embargo, lograr cubrir esas recomendaciones se dificulta, cuando se trata de un método de prueba, en este documento se propone un camino para implementar un efectivo sistema de control de mediciones en un método de prueba específico: la determinación de ácido ascórbico.

Existen muchos métodos para la determinación de ácido ascórbico, en el que nos enfocaremos es aquél usado tanto en alimentos como en productos farmacéuticos, aunque no es el más recomendado, si es uno de los más usados por su bajo costo.

Objetivo

Plantear un sistema de aseguramiento de mediciones basado en normatividad y que sea evidencia objetiva de la calidad de los resultados obtenidos por un método de prueba

Metodología

El sistema de control de mediciones debe asegurar que los requerimientos metrológicos específicos sean satisfechos, nuestra propuesta para lograrlo esta basada en la recomendación ISO 10012 y en los requisitos de la 17025. Nos enfocaremos en tres aspectos críticos: el equipo, el proceso de medida y la medición, el equipo es controlado a través de la confirmación metrológica, el proceso de medida a través de

un control estricto y la validación del método y la medición a través de la estimación de la incertidumbre y la trazabilidad.

1.-Método de medición.-

Identificación del método: Método normalizado NMX-F-461-1984. Principio de medición: reacción redox de primer orden, mediante una titulación usando el reactivo 2, 6-diclorofenolindofenol.

2.-Características metrológicas específicas.-

Como segundo paso del sistema de control de mediciones proponemos definir los requerimientos metrológicos específicos, en este trabajo le llamaremos las características metrológicas, las que estarán dictadas por el análisis de la normatividad mexicana existente.

La NMX-F-463-1984 "Alimentos para infantes y niños de corta edad" establece que el contenido mínimo de ácido ascórbico por porción debe de ser de 40 mg/100 cm³.

Los límites mínimos y máximos permitidos para la adición, fortificación y enriquecimiento de alimentos y bebidas no alcohólicas será del 5% al 100% por porción de la ingestión diaria recomendada, considerando una porción de bebida no alcohólica de 200 mL; según la Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA-1-1994. Si para adultos la ingestión diaria es de 60 mg, el 5% corresponde a: 3mg. Lo mínimo que debe detectarse en una porción es de 3 mg. Para asegurarnos no tener un fuerte impacto en la salud por una alimentación carente de ácido ascórbico en la dieta y debido a que la norma no especifica el grado de algún requerimiento metrológico para la evaluación de la medición, se escoge, basado en lo mínimo que debe detectarse en una porción (3 mg), como requerimiento metrológico para evaluar la calidad de la medición la incertidumbre ($u_{mgA.A}$)

con un valor de $\pm 0,5 \text{ mg}$. ($u_{\text{mgA.A.}} = \pm 0,5 \text{ mg}$) Si el proceso de medir es capaz de medir con esta incertidumbre nos aseguramos que el contenido de ácido ascórbico en la bebida analizar este contenido en el requisito de la normatividad.

Por lo anterior podemos concluir que un laboratorio que tiene como objetivo medir ácido ascórbico en cualquier bebida para jugos, necesita ser capaz de medir como límite mínimo ($3 \pm 0,5$) mg de ácido ascórbico por porción de alimento.

3.-Confirmación del equipo.-la confirmación del equipo debe llevarse a cabo por primera vez, repetirse de manera periódica (mediante un programa), cada vez que el equipo fue a mantenimiento (preventivo y/o correctivo) y después de cada calibración.

3.1.-El equipo involucrado en la medición: pipeta volumétrica de 50 mL, pipeta volumétrica de 100 mL, bureta de 50 mL, matraz volumétrico balanza analítica. Para cumplir con los requerimientos específicos requerimos material volumétrico clase A y una balanza clase I con una incertidumbre máxima de 0,01 mg para que sea capaz de detectar 0,5 mg de incertidumbre. El material volumétrico y la balanza fueron calibrados en un laboratorio acreditado.

3.2.-Para diseñar el sistema de confirmación metrológica se compararon las exigencias metrológicas del usuario (EMU) que corresponden a las referidas en el punto 3.1 y las características del equipo de medición (CEM). Las CEM corresponde a lo informado por el laboratorio de calibración.

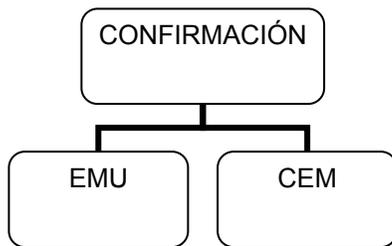


Fig.1 diagrama de confirmación metrológica

4.-Control del proceso de medición

El proceso de medición debe ser planeado, validado, documentado, aprobado e implementado. En la medición se incluye el principio de medición, el método y el procedimiento. El VIM define claramente cada

uno de estos términos: Principio de medición: fenómeno que sirve de base para la medición; en este trabajo nuestro principio de medición es la titulación redox de la muestra con un colorante durante la cual la oxidación del ácido ascórbico va acompañada de la reducción del indicador redox en su forma incolora. Método de medición: descripción genérica de una secuencia lógica de operaciones usadas en la medición; en este trabajo en el método esta incluido el uso del colorante 2,6-diclorofenolindofenol. Procedimiento de medición que corresponde a la descripción detallada de una medición de acuerdo a un principio de medición y con un método de medición dado, en este trabajo se presenta en el punto 2.1

Queremos que la medición sea capaz de detectar ($3 \pm 0,5$) mg de ácido ascórbico por porción de alimento. Consultando la bibliografía el principio de medida unido con el método tiene un límite de detección de $6 \mu\text{g/mL}$ y linealidad de $200 \mu\text{g/mL}$ Por lo tanto cumple con las características metrológicas. Sin embargo es necesario demostrar que el laboratorio lo logra para ello requiere un procedimiento de validación. Para validar el proceso de medida se desarrollaron tres parámetros: el límite de detección, límite de cuantificación y la precisión intermedia vía el coeficiente de variación.(CV).

Se trabajo con un material estándar de ácido ascórbico cuyas 10 lecturas en mg/mL fueron: (1) 0,992 (2) 0,988 (3) 0,988 (4) 0,990 (5)0,988 (6) 0,992 (7) 0,988 (8) 0,990 (9)0,992 (10) 0,990

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} = 0,9898 \tag{1}$$

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} = 0,00175119 \tag{2}$$

$$CV = \frac{s}{\bar{y}}(100) = 0,1769\% \tag{3}$$

donde:

y= media

s= desviación estándar

CV=coeficiente de variación

Límite de detección:

$$LD = \bar{y} + 3(s) = 0,9950 \quad (4)$$

Límite de cuantificación:

$$LQ = 6(s) = 0,0105 \text{ mg/L} \quad (5)$$

5.-Trazabilidad en la medición.

Para lograr la trazabilidad es necesario cumplir con los siguientes puntos: 1.- Describir el método de medición (ver puntos 1 y 4) 2.- Identificación de las variables involucradas (ver punto 6) 3.- Identificar los instrumentos de medición involucrados, los cuales son: bureta, pipeta, balanza, instrumentos para la medición de las condiciones ambientales: temperatura, humedad. Todos los instrumentos deben estar calibrados en laboratorios acreditados, el informe de calibración proporcionará la incertidumbre que será contabilizada como se muestra en el punto 6. 4.- Listado de sustancias químicas y materiales de referencia. El ácido ascórbico y el 2,6-dicloroindofenol deben ser MRC (Material de referencia certificado) La evidencia objetiva de trazabilidad de estas sustancias es el certificado del material de referencia. 5.- Trazado de las cartas de trazabilidad para cada instrumento de medición y para el MRC, cada carta de trazabilidad debe contener la incertidumbre del instrumento, fecha de calibración, patrón al que esta trazado, incertidumbre del patrón y fecha de calibración.

6.-Estimación de la incertidumbre.

La estimación de la incertidumbre se hace de acuerdo a la GUM y partiendo del modelo matemático:

$$C_{AA} = (X - B) \left(\frac{F}{E} \right) \left(\frac{V}{Y} \right) \quad (6)$$

$$C_{AA} = (1,76 - 0,1) \left(\frac{0,122}{250} \right) \left(\frac{250}{50} \right) = 0,00407 \text{ g/mL}$$

donde:

C_{AA} = concentración de ácido ascórbico

X= volumen gastado en la titulación de la muestra

B= volumen gastado en la titulación del blanco

F= g de ácido ascórbico equivalentes a 1.0 mL de solución estándar de indofenol

E= volumen de ensayo

V= volumen inicial de la muestra de ensayo

Y= volumen de la muestra para la titulación

F es obtenido a partir de:

$$F = \frac{(V_{SI})(M_{AA})}{V_T} \quad (7)$$

donde:

V_{SI} = volumen de solución estándar de indofenol

M_{AA} = masa de ácido ascórbico

Las fuentes de incertidumbre las podemos esquematizar en el siguiente diagrama de causa y efecto.

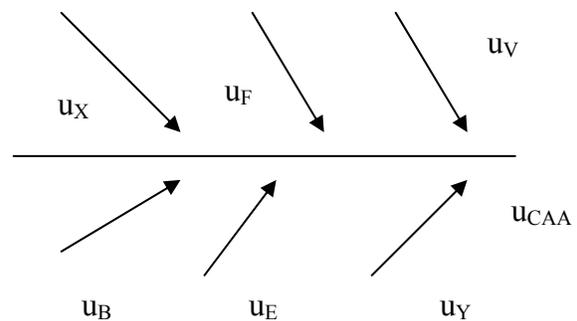


Fig.2 Diagrama fuentes de incertidumbre

Incertidumbre aportada por el volumen de 2,6-dicloroindofenol gastados en la titulación de la muestra: u_X .

Incertidumbre de la repetibilidad: u_R

La titulación fue hecha por triplicado y el promedio de estos valores tuvieron una desviación estándar de 0,0577 mL, esta desviación estándar arroja una incertidumbre de tipo A cuyo mejor estimador es la desviación estándar de la media:

$$u_R = \left(\frac{0,0577}{\sqrt{3}} \right) = 0,033 \text{ mL} \quad (8)$$

Incertidumbre de la bureta: u_B

Del informe de calibración tenemos una incertidumbre de 0,0099 mL con un factor de cobertura $k=2$

$$u_B = \frac{0,0099}{2} = 0,00495 \quad (9)$$

Temperatura: u_T

La temperatura del 2,6-dicloroindofenol vario durante la determinación en $\pm 3^\circ\text{C}$ esta variación arroja una incertidumbre debido a la expansión volumétrica del líquido comparada con el recipiente. La incertidumbre de un volumen de 1,76mL, usando el coeficiente de expansión volumétrica del agua de $2,1 \times 10^{-4} \text{C}^{-1}$ y suponiendo una distribución rectangular:

$$u_T = \frac{(1,76)(2,1 \cdot 10^{-4})(3)}{\sqrt{3}} = 0.00064017 \quad (10)$$

Lectura : u_L

La bureta tiene una división mínima de 0,1 considerando la capacidad de leer a la mitad de esta división mínima y que se comporta como una distribución rectangular tenemos:

$$u_L = \frac{0,1}{2\sqrt{3}} = 0,0288 \quad (11)$$

La incertidumbre de X corresponde a:

$$u_X = \sqrt{u_R^2 + u_B^2 + u_T^2 + u_L^2} = 0,0443 \quad (12)$$

Incertidumbre aportada por el volumen de 2,6-dicloroindofenol gastados en la titulación del blanco: u_B .

Formada por tres incertidumbres: Incertidumbre de la bureta: u_{B_x} corresponde a la del informe de calibración tenemos una incertidumbre de 0,0099 mL con un factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre del efecto por cambio en la temperatura, para 0,1 mL de titulante con 3 grados Celsius de diferencia de temperatura y un coeficiente de expansión del agua de $2,1 \times 10^{-4} \text{C}^{-1}$ tenemos:

$$u_T = \frac{(0,1)(2,1 \cdot 10^{-4})(3)}{\sqrt{3}} = 3,63 \cdot 10^{-5} \quad (12)$$

La bureta tiene una resolución de 0,1 mL; la incertidumbre de la resolución:

$$u_{RB} = \frac{0,1}{2\sqrt{3}} \quad (13)$$

$$u_B = \sqrt{u_{cal}^2 + u_T^2 + u_{Res}^2} = 0.029 \quad (14)$$

Incertidumbre de la masa de ácido ascórbico u_M

El ácido ascórbico es un material de referencia cuya incertidumbre en el informe de calibración

corresponde a: $\pm 0,008$ mg considerando una distribución rectangular tenemos:

$u_{pureza} = 0,008 / \sqrt{3}$. El ácido ascórbico fue

pesado en una balanza cuyo informe de calibración da una incertidumbre de $u_{balanza} = 0,0002$ mg. El proveedor de la balanza recomienda considerar una distribución rectangular en la estimación de la incertidumbre.

$$u_c = 0,0002 / \sqrt{3} = 0,000115$$

La incertidumbre estimada por la medición de la masa del ácido ascórbico:

$$u_{M_{AA}} = \sqrt{(0,0046)^2 + (0,000115)^2} = 0,0046 \quad (15)$$

Incertidumbre de F.

Partiendo de la ecuación (7) tenemos:

$$u_F = \sqrt{\left(\frac{\partial F}{\partial V_{s,i}}\right)^2 u_{V_{s,i}}^2 + \left(\frac{\partial F}{\partial M_{AA}}\right)^2 u_{M_{AA}}^2 + \left(\frac{\partial F}{\partial V_T}\right)^2 u_{V_T}^2} \quad (16)$$

La incertidumbre del volumen de la solución estándar de indofenol $u_{V_{SI}}$

La solución de indofenol fue valorada titulando una solución de ácido ascórbico estándar. Para la titulación se tomaron partes alícuotas de 2 mL. La incertidumbre del informe de calibración de la pipeta volumétrica es de 0,08 mL, considerando una distribución triangular:

$$u_{I.C.P} = \frac{0,08}{\sqrt{6}} = 0,0326 \quad (17)$$

La dilatación por temperatura esta dada por:

$$u_{d,i,p} = \frac{(2\text{mL})(2,1 \cdot 10^{-4})(3)}{\sqrt{3}} = 0.00069282 \quad (18)$$

Incertidumbre del volumen

$$u_p = \sqrt{(0,0326)^2 + (0,00069)^2} = 0.033 \quad (19)$$

Incertidumbre del volumen de titulación u_{VT} :

La incertidumbre de la bureta calibrada es de 0,0099 mL con un factor de cobertura $k=2$. La variación de temperatura es considerada de 3 grados si el volumen de titulación es de 8,2 mL y la división mínima de la bureta de 0,1 mL la incertidumbre del volumen de titulación está dada por:

$$u_{VT} = \sqrt{\left(\frac{0,0099}{2}\right)^2 + \left(\frac{(8,2\text{mL})(2,1 \cdot 10^{-4})(3)}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,1}{2\sqrt{3}}\right)^2} \quad (20)$$

$$u_{VT} = 0,0294$$

Regresando a la ecuación (16)

$$u_F = \sqrt{\left(\frac{M_{AA}}{V_T}\right)^2 (u_{V_T})^2 + \left(\frac{V_{ST}}{V_T}\right)^2 (u_{V_{ST}})^2 + \left(-\frac{V_{ST} M_{AA}}{V_T^2}\right)^2 (u_{V_T})^2}$$

$$u_F = 0,00044$$

Incertidumbre de los mL usados para la prueba.(E)

u_E:

Para este volumen se utilizó una pipeta volumétrica de 100 mL y una de 50 mL. Los informes de calibración proporciona una incertidumbre de ±0,08 mL considerando una distribución rectangular, se considera la incertidumbre aportada por la diferencia de temperatura.

$$u_{p1} = \sqrt{u_{calib}^2 + u_{temp}^2}$$

$$u_{p1} = \sqrt{\left(\frac{0,08}{\sqrt{6}}\right)^2 + \left(\frac{(100)(2,1 \cdot 10^{-4})(3)}{\sqrt{3}}\right)^2}$$

$$u_{p1} = 0,0488$$

Se hace el mismo procedimiento para la pipeta de 50 mL y se repite la contribución de la pipeta de 100 mL por utilizarse dos veces.

$$u_E = \sqrt{u_{p1}^2 + u_{p2}^2 + u_{p3}^2} = 0,074$$

Incertidumbre aportada por el volumen inicial de la muestra de ensayo (V) u_v

Este volumen corresponde a toda la muestra de ensayo y fue medido de la misma manera que E por lo que la incertidumbre aportada por el volumen de la muestra de ensayo utilizada en la titulación corresponde: u_v=0,074 mL

Incertidumbre aportada por el volumen de la muestra alícuota titulada.

La muestra titulada fue de 50 mL y se uso una pipeta volumétrica.

$$u_Y^2 = \sqrt{u_{calib}^2 + u_T^2} = 0,027$$

La incertidumbre combinada la tenemos de acuerdo a la ecuación 6

$$u_{m g A A} = \sqrt{\left(\frac{\partial m g A A}{\partial X}\right)^2 u_X^2 + \left(\frac{\partial m g A A}{\partial B}\right)^2 u_B^2 + \left(\frac{\partial m g A A}{\partial F}\right)^2 u_F^2 + \left(\frac{\partial m g A A}{\partial E}\right)^2 u_E^2 + \left(\frac{\partial m g A A}{\partial V}\right)^2 u_V^2 + \left(\frac{\partial m g A A}{\partial Y}\right)^2 u_Y^2}$$

$$u_{m g A A} = \sqrt{\left(1,17 \times 10^{-8}\right)^2 + \left(5,9 \times 10^{-9}\right)^2 + \left(2,21 \times 10^{-10}\right)^2 + \left(1,46 \times 10^{-12}\right)^2 + \left(1,46 \times 10^{-12}\right)^2 + \left(4,94 \times 10^{-12}\right)^2}$$

$$u_{m g A A} = 0,000134 \text{ m g / m L}$$

$$u_{E m g A A} = (2)(0,000134) = 0,000268 \text{ m g / m L}$$

$$C_{AA} = (0,00407 \pm 0,000134) \text{ g/mL}$$

Corresponde a la concentración de ácido ascorbico en la muestra con una incertidumbre expandida estimada con un nivel de confianza del 95,45% con n grados de libertad,

Conclusiones:

El aseguramiento de mediciones es diseñado considerando 5 puntos críticos principales; Identificación de los requerimientos metrológicos, la confirmación metrológica de los instrumentos, validación del método de medición, trazabilidad e incertidumbre. Los requerimientos metrológicos estan dictados por los requisitos de medición de ácido ascórbico en alimentos, los que se encuentran en normatividad, la fuente de incertidumbre que mas contribuye es la de la medición del volumen de titulación de la muestra. La trazabilidad debe mantenerse principalmente en la balanza, las pipetas y el ácido ascórbico como material de referencia certificado.

Referencias.-

1. AOAC Official Methods 987.21 Ascorbic Acid.
2. Christophe Perruchet y Marc Priel, Estimación de la incertidumbre. Medidas y ensayos. AENOR. España 2000:17
3. EURACHEM Working Group Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory Guide to Method Validation an Related Topics.
4. ISO/IEC 10012:2000 Measurement control system
5. BIPM,IEC,IFCC,ISO,IUPAC,IUPAP,OIM L.Guide to the expression of Uncertainty in Measurement. 1995