

OCTUBRE 2001

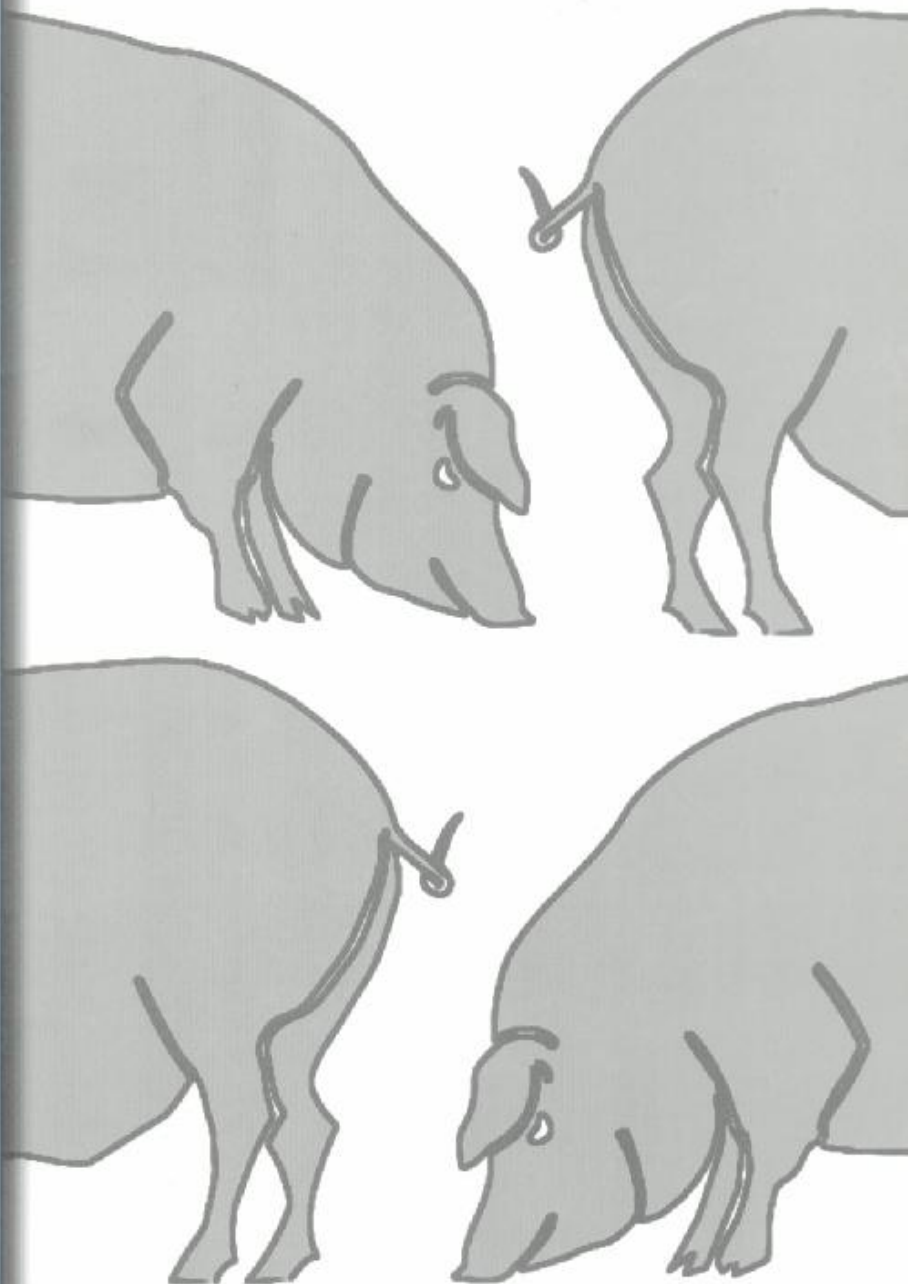
Nº 7



CERDO
IBERICCO



AECERIBER





Determinación de la precisión en el análisis de ácidos grasos de grasas de cerdo ibérico mediante cromatografía de gases, Resultados de un estudio colaborativo.

J. García Olmo¹, E. De Pedro¹, A. Garrido¹, A. Paredes², C. Sanabria³, M. Santolalla⁴, J. Salas⁴, J.R. García Hierro⁵, I. González⁶, M.D. García Cachan⁷, J. Guirao⁷.

1 Dpto. (de Producción Animal. 1.'1'.S.1.A.M.. Universidad de Córdoba. (Córdoba).

2 Asociación Interprofesional del Cerdo Ibérico (ASICI). Zafra, (Badajoz).

3 Instituto de Tecnología Agroalimentaria. Junta de Extremadura. (Badajoz).

4 Laboratorio Agroalimentario Córdoba. Junta de Andalucía. (Córdoba).

5 Laboratorio Arbitral Agroalimentario. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. (Madrid).

6 Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Universidad de Salamanca. (Salamanca)

7 Estación Tecnológica de la Carne. Junta de Castilla y León. Guijuelo (Salamanca).

INTRODUCCIÓN

Hoy en día está suficientemente establecido que las características de la grasa de cerdo Ibérico dependen fundamentalmente del tipo de alimentación que ha recibido durante su finalización y que el empleo de diferentes tipos de dietas, a base de bellotas o pienso, repercute de manera significativa sobre la composición en ácidos grasos del tejido adiposo de la canal (Flores et al., 1988; Casillas, 1994; De Pedro et al., 1995; Ruiz et al., 1998). Entre las técnicas analíticas empleadas para evaluar la composición en ácidos grasos de muestras de grasa destaca la cromatografía de gases. Mediante dicha técnica se separan y cuantifican los ésteres metílicos de los ácidos grasos de 8 a 24 átomos de carbono procedentes de los triglicéridos y fosfolípidos de la grasa (UNE Método 5508, 1996; AOAC Method 963.22, 1999).

Dado el efecto del régimen alimenticio en la composición en ácidos grasos del tejido adiposo de la canal, las Denominaciones de Origen de productos de cerdo Ibérico, la Asociación Interprofesional del cerdo Ibérico (ASICI) e industrias del Sector, han empleado el análisis de ácidos grasos de tejido adiposo subcutáneo mediante cromatografía de gases como criterio para poder diferenciar las calidades existentes en



cuanto al tipo de alimentación aportada a los cerdos en la fase de cebo. Además, el propio Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación aprueba cada año un contrato tipo para la compra-venta de cerdos Ibéricos con destino a sacrificio. En él se incluyen los niveles (%) que han de presentar los 4 ácidos grasos mayoritarios, analizados por cromatografía de gases, en las muestras de grasa subcutánea de cerdos Ibéricos (ácido palmítico o C16:0; ácido esteárico o C18:0; ácido oleico o C18:1; ácido linoleico o C18:2) para que una determinada partida sea clasificada dentro de la categoría comercial de "Bellota", "Recebo" o "Pienso".

El objetivo de este estudio colaborativo fue el de determinar la precisión del análisis de ácidos grasos en grasa de cerdo Ibérico mediante cromatografía de gases. Para ello, se compara



ron los resultados obtenidos por los principales laboratorios del Sector, con el fin de conocer tanto los errores existentes en cada laboratorio (repetibilidad) como entre los diferentes laboratorios participantes (reproducibilidad).

MATERIAL Y MÉTODOS

Tratamiento y análisis de muestras

Se tomaron muestras de 30 canales de cerdos Ibéricos finalizados con un régimen alimenticio a base de pienso, de la zona de inserción del rabo en la region coxal. Esta zona es la empleada por las Denominaciones de Origen, ASICI, y los laboratorios participantes a la hora de realizar la toma de muestras de canales de cerdos Ibéricos. Cada muestra de tejido adiposo subcutáneo contiene todos los acúmulos grasos y, una vez eliminados los restos de piel y magro, fue dividida en 2 submuestras. Dichas submuestras fueron procesadas de acuerdo con las diferentes metodologías de extracción de grasa líquida propuestas: fusión mediante microondas y extracción a temperatura ambiente con disolvente. Se dispuso por tanto de un total de 60 muestras de grasa fundida, 30 obtenidas mediante fusión con microondas y 30 obtenidas mediante extracción con disolvente.

Este conjunto total de 60 muestras fueron las empleadas para llevar a cabo el estudio colaborativo. Para ello, cada uno de los 6 laboratorios participantes recibió las muestras, mediante mensajería urgente y a temperatura de congelación con la recomendación de realizar los análisis por duplicado para poder evaluar la repetibilidad del método.

La composición de ácidos grasos se determinó mediante el análisis por cromatografía en fase gaseosa con columna capilar de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, de acuerdo con la norma UNE 5508. La preparación de los ésteres metílicos se realizó siguiendo, en líneas generales, el procedimiento de metilación en frío indicado en el apartado 5 del método IUPAC n° 2301. Todas las características del método cromatográfico (equipos, columnas, reactivos, condiciones de operación y mantenimiento) empleado por cada laboratorio para la separación y cuantificación de los ésteres metílicos, se encontraron dentro de las recomendaciones dadas por la norma UNE 5508.

Tratamiento estadístico de resultados

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos en este estudio colaborativo se realizó de acuerdo con la norma ISO 5725-2 (1994) o la respectiva norma española UNE 82009-2 (1999), que exponen la metodología a seguir para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad de un método de medida estándar. En ella se especifican los criterios empleados para el rechazo de resultados anómalos y los procedimientos matemáticos empleados en el cálculo del error intralaboratorio (repetibilidad) e interlaboratorios (reproducibilidad). Para la evaluación de resultados anómalos se emplearon dos procedimientos: técnicas de representación gráfica (h y k de Mandel) y test numéricos (test de Cochran y los test de Grubss sencillo y doble).

Los parámetros estadísticos empleados en el análisis fueron la desviación típica de la repetibilidad (s_r) y la desviación típica de la reproducibilidad (s_R). Además, de acuerdo con la norma AOAC (1995) para la realización de estudios colaborativos, se puede definir los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad como múltiplos de las medidas de precisión expresadas anteriormente. Estas definiciones vienen dadas en forma de intervalos de predicción e indican que la máxima diferencia absoluta entre 2 resultados, y sólo 2, obtenidos sobre la misma muestra, ya sea en un mismo laboratorio (repetibilidad) o en 2 laboratorios diferentes (reproducibilidad), no serán superiores al valor de repetibilidad (r) o reproducibilidad (R) en un 95% de los casos. De esta forma y asumiendo una distribución normal de los resultados y un nivel de probabilidad de 95%, las fórmulas para los valores de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) quedarían simplificadas a:

$$r = \text{repetibilidad} = \sqrt{2} \times 2 \times s_r = 2.8 \times$$

$$R = \text{reproducibilidad} = \sqrt{2} \times 2 \times s_R = 2.8s_R$$

Otros parámetros estadísticos importantes son la desviación estándar relativa de la repetibilidad (RSD_r) y de la reproducibilidad (RSD_R). Aportan información ya que normalmente son independientes de la concentración del analito en un rango razonable. Ello facilita la comparación de las variabilidades a diferentes con-



centraciones o entre varias variables. Sus fórmulas son:

$$RSD_r(\%) = \frac{s_r}{y} \times 100$$

$$RSD_R(\%) = \frac{s_R}{y} \times 100$$

donde y es la media global de dicha variable para todas las muestras y laboratorios.

En el tratamiento de datos aportados por los laboratorios participantes y en cálculo de los estadísticos expuestos con anterioridad, se emplearon los programas Excel y SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si bien todos los laboratorios aportaron los valores del perfil completo de ácidos grasos existentes en grasa de cerdo Ibérico (desde C14:0 a C20:1), sólo se consideraron en este estudio los valores correspondientes a los ácidos grasos mayoritarios en dicha grasa (con concentración superior al 5%) como son C16:0, C18:0, C18:1 y C18:2. El motivo fundamental de dicha simplificación fue el considerar para los cálculos de este estudio, únicamente aquellos 4 ácidos grasos empleados por el Contrato-tipo homologado y por la mayoría de las Denominaciones de Origen para

do, con el objetivo de poder evaluar el error existente dentro de cada laboratorio (repetibilidad). Sin embargo, 2 laboratorios (*Lab 2 y Lab 4*) sólo aportaron 1 único dato por muestra. Si bien esto complicó el tratamiento estadístico de los datos, ningún laboratorio fue rechazado a priori y todos los resultados se incluyeron en los cálculos del estudio. La única consideración a realizar fue que para el cálculo de la repetibilidad sólo se tuvieron en cuenta los datos de 4 laboratorios mientras que para el cálculo de la reproducibilidad, se incluyeron los datos de los 6 laboratorios participantes.

En la Tabla 1 se recogen los resultados de composición media y desviación típica de los 4 ácidos grasos mayoritarios aportados por los laboratorios participantes en el estudio colaborativo. Tal y como se observa en dicha tabla, tras una comparación de los valores medios de los ácidos grasos, existen diferencias entre los datos aportados por los diferentes laboratorios. Sin embargo, dados los altos valores de las desviaciones típicas (DT) de los ácidos grasos, provocados por la variabilidad animal existente dentro de una partida, se ha de realizar un análisis de la varianza junto con un test de comparación de medias para una correcta comparación de los valores medios de ácidos grasos.

Tabla 1. Media y desviación típica de ácidos grasos en las muestras analizadas por cada laboratorio*

Ácido Graso (%)	LAB 1		LAB 2		LAB 3		LAB 4		LAB 5		LAB 6	
	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT
C16:0	23,02 a	1,37	23,13 a	1,35	24,69 b	1,42	24,29 b	1,33	23,39 a	1,33	23,34 a	1,38
C18:0	11,00 a	0,92	10,85 a	0,94	10,70 a	0,96	9,78 h	1,20	10,98 a	0,92	10,67 a	0,94
C18:1	49,25 a	1,74	50,45 c	1,83	48,76 a	1,88	50,15 bc	1,60	49,39 ab	1,78	50,26 be	1,85
C18:2	9,44 ab	0,56	9,33 bc	0,55	9,11 c	0,55	9,67 a	0,69	9,45 ab	0,55	9,23 bc	0,54

*Valores medios seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes a nivel del 1 %.

clasificar los cerdos en función del tipo de alimentación.

De acuerdo con las recomendaciones realizadas, cada uno de los 6 laboratorios participantes en el estudio debía de realizar el análisis de cada una de las muestras remitidas por duplica-

La Tabla 1 muestra la presencia de ciertas diferencias significativas tras el análisis de la varianza de los datos medios aportados por cada laboratorio, si bien los resultados fueron diferentes dependiendo del ácido graso considerado. Así, las variables C16:0 y C18:0 destacaron por



una mayor homogeneidad en los valores medios, observándose diferencias en un pequeño número de laboratorios (*Lab 3* y *Lab 4* para el C16:0 y *Lab 4* para el C18:0). Sin embargo, para los valores medios de C18:1 y C18:2, se observaron diferencias significativas entre un mayor número de grupos de laboratorios.

A continuación se procedió al desarrollo de los test gráficos y numéricos empleados para la detección de muestras anómalas (test de Cochran y test de Grubbs simple y doble).

Tras aplicar el test de Cochran, se apreció que *Lab 1* fue aquel que presentó un mayor número de muestras anómalas para todos los ácidos grasos considerados (2 muestras anómalas por ácido graso). es decir, la variabilidad que presentaron los duplicados en algunas muestras determinadas en este laboratorio fue superior a lo admisible. Esto se pudo deber a que *Lab 1* fue el único laboratorio que realizó una inyección manual de las muestras en el cromatógrafo (el resto de laboratorios emplearon inyector automático) lo cual es una fuente de error importante en el análisis de réplicas.

Tras realizar el test de Grubbs sencillo y doble, el mayor número de anómalos se observó para *Lab 4* (fundamentalmente para C18:0 y en menor medida para C16:0 y C18:2) y *Lab 3* (para C16:0 y en menor medida para C18:0 y C18:2). Esto indicó que, para dichas muestras, los valores de los ácidos grasos determinados por *Lab 3* y *Lab 4*, presentaron valores que se diferenciaron estadísticamente de los datos aportados por el resto de laboratorios.

Una vez eliminados todos los valores de las muestras detectadas como anómalas tanto por los test de Cochran como de Grubbs (sencillo y

doble), se procedió a calcular los estadísticos de desviación típica de la repetibilidad (s_r) y desviación típica de la reproducibilidad (s_R). Dicho valores oscilaron, en general y para todos los ácidos grasos, entre 0,05 y 0,15 para s_r , y entre 0,27 y 0,88 para s_R . Dichos resultados, junto con la media global, los valores de repetibilidad y reproducibilidad y las correspondientes desviaciones estándar relativas (RSD_r y RSD_R) aparecen reflejados en la Tabla 2.

Se ha de incidir de nuevo en que los valores de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) indican la máxima diferencia absoluta (para un 95% de los casos) entre 2 resultados, y solo 2, obtenidos sobre la misma muestra ya sea en un mismo laboratorio (repetibilidad) o en 2 laboratorios diferentes (reproducibilidad).

Tal y como se observa, la máxima diferencia absoluta entre 2 muestras analizadas en un mismo laboratorio (repetibilidad, r) puede llegar a ser de 0,37 para el C16:0, 0,15 para C18:0, 0,41 para C18:1 y 0,18 para C18:2. Como es lógico, los valores de reproducibilidad (R), es decir, la máxima diferencia absoluta entre los resultados de ácidos grasos de una misma muestra analizada en 2 laboratorios diferentes fueron sensiblemente más altos (2,00 para C16:0, 1,05 para C18:0, 2,47 para C18:1 y 0,75 para el C18:2). Para poder comparar los estadísticos obtenidos con las diferentes variables, se calcularon las desviaciones típicas relativas (RSD_r y RSD_R). Los resultados de RSD_r oscilaron entre 0,29% (para el C18:1) y el 0,69% (para el C18:2) mientras que para la RSD_R oscilaron entre 1,78% (para el C18:1) y 3,54% (para el C18:0).

En la norma 963.22 de la AOAC (1999) se

Tabla 2. Parámetros estadísticos de repetibilidad y reproducibilidad

Ácido graso	Media Global y	DT Repetibilidad s_r	DT Reproducibilidad s_R	Repetibilidad r	Reproducibilidad R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
C16:0	23,60	0,13	0,71	0,37	2,00	0,56	3,04
C18:0	10,78	0,05	0,38	0,15	1,05	0,49	3,54
C18:1	49,71	0,15	0,88	0,41	2,47	0,29	1,78
C18:2	9,37	0,07	0,27	0,18	0,75	0,69	2,86



especifica la precisión que ha de tener el método de análisis empleado en este estudio, indicando los valores máximos de repetibilidad y reproducibilidad que han de presentar los ácidos grasos mayoritarios (>5%) en las muestras de grasas o aceites. Así, los valores de r y R han de ser inferiores a 1 y 3 respectivamente, mientras que los valores de RSD no deben ser superiores a 3% y los valores de RSD_r , no deben superar el 10%. Tal y como se observa, los valores de r , R , RSD_r y RSD_R para los 4 ácidos grasos analizados en este estudio son inferiores a los valores recomendados como máximos por la AOAC por lo que se puede concluir que la precisión obtenida en este estudio ha de ser considerada como adecuada para esta metodología de análisis.

Al mismo tiempo, estos resultados son de mayor precisión a los obtenidos por Firestone and Horwitz (1979) en la determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases en grasa de mantequilla (RSD_r %C16:0 = 1.88; RSD_R %C16:0 = 3.88; RSD_r %C18:0 = 0.74; RSD_R %C18:0 = 10.52; RSD_r %G18:1 = 1.09; RSD_R %C18:1 = 3.45; RSD_r %C18:2 = 5.45; RSD_R %C18:2 = 13.22) y del mismo orden a los obtenidos por Cert et al. (1996) en aceites de oliva con similar composición de ácidos grasos (RSD_r %C16:0 = 1.44-1.78; RSD_R %C16:0 = 3.44-4.45; RSD_r %C18:0 = 0.66-1.97; RSD_R %C18:0 = 4.77-5.46; RSD_r %C18:1 = 0.27-0.49; RSD_R %C18:1 = 0.95-1.17; RSD_r %C18:2 = 0.49-1.94; RSD_R %C18:2 = 2.10-3.29).

CONCLUSIONES

Los resultados de repetibilidad, reproducibilidad, desviación estandar relativa de la repetibilidad y desviación estandar relativa de la reproducibilidad obtenidos para los 4 ácidos grasos mayoritarios en grasa de cerdo Ibérico, muestran que la precisión obtenida mediante cromatografía de gases ha de ser considerada como alta y adecuada para este método de análisis así como del mismo orden a la obtenida en otras grasas y aceites de similar composición.

Los valores de repetibilidad y reproducibilidad aportados en este estudio han de ser tenidos en cuenta a la hora de estimar la incertidumbre en el análisis de una muestra de grasa de cerdo realizada en un laboratorio o en laboratorios di-

ferentes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación por el apoyo económico concedido para la realización del presente estudio. Una versión más detallada de este trabajo se puede consultar en la revista *Meat Science* (en prensa, 2001).

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC Method 963.22. (1999). Methyl esters of fatty acids in oils and fats. Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis. AOAC International, USA.
- AOAC Official Methods of Analysis (1999). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. AOAC International, USA
- Casillas, M. (1994). Metodologías de caracterización de grasa de cerdo Ibérico para el control de calidad de sus productos. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Cert, A., Moreda, W., Lean-Camacho, M. y Perez-Camino, M.C. (1996). *Grasas y Aceites* 47, 6, 401-410.
- De Pedro, E., Garrido, A., Lobo, A., Dardenne, P and Murray 1. (1995). En: *Leaping ahead with Near Infrared Spectroscopy*, Batten, G.D et al. (eds.) Royal Australian Chemical Institute. Victoria (Australia). p: 291-295.
- Firestone, D. and Horwitz, W. (1979). *IUPAC Journal of Association of Official Analytical Chemists* 62, 4, 709-721.
- Flores, J., Biron, C., Izquierdo, L. y Nieto, P. (1988). *Meat Science* 23, 253-262.
- ISO 5725-2 (1994). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. International Organization for Standardization, Switzerland
- IUPAC n° 2301 (1987). Preparation of the fatty acid methyl esters. Standard Methods for [he analysis of oils, fats and derivatives. International Union of Pure and Applied Chemistry, UK.
- Ruiz, J., Cava, R., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., López-Bote, C.J. (1998). *Meat Science* 49, 155-163.
- UNE 5508 (1996). Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Análisis por cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de ácidos grasos. Asociación española de Normalización y Certificación (AENOR), España.
- UNE 82009-2 (1999). Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 2: Método básico para la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad de un método de medición normalizado. Asociación española de Normalización y Certificación (AENOR). España.