



MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE 2-MONOPALMITATO DE GLICERILO

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este método describe el procedimiento analítico para la determinación del porcentaje de ácido palmítico en posición 2 de los triglicéridos mediante la evaluación del 2-monopalmitato de glicerilo.

ADVERTENCIA: Este método puede requerir el uso de aparatos o productos químicos peligrosos, así como la ejecución de operaciones peligrosas. El método no especifica todas las cuestiones de seguridad relacionadas con su uso. Por lo tanto, serán los usuarios quienes deberán adoptar previamente las oportunas medidas de seguridad y cumplir las disposiciones legales correspondientes.

Nota: Este método es aplicable a los aceites vegetales que son líquidos a temperatura ambiente (20°C).

2. PRINCIPIO

La muestra de aceite, oportunamente tratada, se somete a la acción de la lipasa pancreática: se produce una hidrólisis parcial, específica para las posiciones 1 y 3 de la molécula de triacilglicerol, obteniéndose 2-monoacilglicérols como productos de reacción. El porcentaje de 2-monopalmitato de glicerilo en la fracción monoglicérica se determina, tras *silanización*, mediante cromatografía de gases con columna capilar.

3. APARATOS Y FUNGIBLES

- 3.1. Matraz Erlenmeyer de 25 ml
- 3.2. Vasos de precipitados de 100, 250 y 300 ml
- 3.3. Columna para cromatografía de vidrio, diámetro interno 21-23 mm, longitud 400 mm, con tabique poroso y llave
- 3.4. Probetas graduadas de 10, 50, 100 y 200 ml

- 3.5. Matraces de fondo redondo de 100 y 250 ml
- 3.6. Evaporador rotatorio
- 3.7. Tubos de centrifuga de fondo cónico, de 10 ml, con tapón esmerilado
- 3.8. Centrifuga apta para tubos de 10 y 100 ml
- 3.9. Baño termostático para mantener la temperatura a $40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- 3.10. Pipetas graduadas de 1 y 2 ml
- 3.11. Jeringa hipodérmica de 1 ml
- 3.12. Microjeringa de 100 μl
- 3.13. Embudo de separación de 1000 ml
- 3.14. Cromatógrafo de gases, apto para columnas capilares, con inyector on column en frío para la introducción directa de la muestra en la columna y horno capaz de mantener la temperatura deseada con una precisión de $\pm 1^{\circ}\text{C}$
 - 3.14.1. Inyector on column en frío para la introducción directa de la muestra en la columna
 - 3.14.2. Detector de ionización de llama dotado de conversor-amplificador
 - 3.14.3. Registrador-integrador apto para funcionar con el conversor-amplificador, con un tiempo de respuesta no superior a 1 segundo y velocidad de trazado variable
- 3.15. Columna capilar de vidrio o sílice fundido de 8-12 m, con un diámetro interno de 0,25-0,32 mm, recubierta por dentro con metilpolisiloxano o metilpolisiloxano con fenilo al 5%, con un espesor de 0,10-0,30 μm y apta para ser usada a 370°C
- 3.16. Microjeringa de 10 μl , con aguja endurecida, de una longitud mínima de 7,5 cm, apta para la inyección directa en la columna

4 REACTIVOS

- 4.1 Gel de sílice, con un tamaño de partículas comprendido entre 0,063-0,200 mm (70/280 mesh), preparado como sigue: colocar el gel de sílice en una cápsula de porcelana, secar en estufa a 160°C durante 4 horas y, a continuación, enfriar a temperatura ambiente en un desecador. Añadir un volumen de agua equivalente al 5 % del peso de gel de sílice, de la siguiente forma: en un matraz Erlenmayer de 500 ml pesar 152 g de gel de sílice y añadir 8 g de agua destilada, tapar y homogeneizar cuidadosamente. Dejar reposar un mínimo de 12 horas antes de usar.

- 4.2 n-hexano para cromatografía (ver B.2)
- 4.2.1. Isopropanol
- 4.2.2. Mezcla isopropanol/agua 1:1 (v/v)
- 4.3 Lipasa pancreática¹, actividad comprendida entre 2,0 y 10 unidades por mg
- 4.4 Solución tampón de tris(hidroxi metil)aminometano: solución acuosa 1 M, ajustada a pH 8 (controlado con un potenciómetro) con HCl concentrado (1:1 v/v)
- 4.5 Colato de sodio, de calidad enzimática: solución acuosa 0,1% (esta solución debe utilizarse dentro de los 15 días siguientes a haber sido preparada)
- 4.6 Cloruro cálcico, solución acuosa al 22 %
- 4.7 Éter dietílico para cromatografía (ver B.1)
- 4.8 Disolvente de elución: mezcla n-hexano-éter dietílico 87:13 v/v
- 4.9 Hidróxido de sodio, solución al 12% en peso
- 4.10 Fenolftaleína, solución etanólica al 1%
- 4.11 Gas portador: hidrógeno o helio para cromatografía gaseosa
- 4.12 Gases auxiliares (ver B.6): - hidrógeno, pureza mínima 99%, exento de humedad y sustancias orgánicas – y aire para cromatografía gaseosa de la misma pureza
- 4.13. Reactivo para la silanización: mezcla piridina/hexametil-disilazano/trimetilclorosilano 9/3/1 (v/v/v)² (ver B.3, B.4, B.5)
- 4.14. Muestras de referencia: monoglicéridos puros y mezclas de éstos con una composición porcentual conocida, similar a la de la muestra.

¹ La lipasa pancreática con actividad comprendida entre 2 y 10 unidades por mg de enzima está disponible en el mercado.

² Existen en el mercado disoluciones listas para ser usadas. También pueden utilizarse otros reactivos para la silanización ,por ejemplo: bis trimetilsilil trifluoracetamida + 1% trimetilclorosilano diluido con igual volumen de piridina anhidra.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Preparación de la muestra

5.1.1. Los aceites con una acidez libre inferior al 3% no precisan ser neutralizados antes de la cromatografía de columna con gel de sílice. Los aceites con una acidez libre superior al 3% tienen que ser neutralizados como se describe en el procedimiento (5.1.1.1.).

5.1.1.1. En el embudo de separación de 1000 ml (3.13) introducir 50 g de aceite y disolver en 200 ml de n-hexano. Añadir 100 ml de isopropanol y la cantidad de solución de hidróxido de sodio al 12% (4.9), correspondiente a la acidez libre del aceite más un exceso del 5%. Agitar enérgicamente durante 1 minuto, añadir 100 ml de agua destilada, volver a agitar y dejar reposar.

Tras la separación, eliminar la capa inferior que contiene los jabones. A menudo se forma una capa intermedia de mucílagos y sustancias insolubles, que también ha de eliminarse. Lavar varias veces la solución hexánica del aceite, utilizando cada vez 50-60 ml de una mezcla de isopropanol/agua 1:1 (v/v) (4.2.2.) hasta que el líquido de lavado no reaccione a la fenolftaleína.

Eliminar la mayor parte del hexano mediante destilación al vacío (por ejemplo, con un evaporador rotatorio) y transferir el aceite al matraz de fondo redondo de 100 ml (3.5); secarlo al vacío hasta la completa eliminación del disolvente. Al término de este procedimiento la acidez del aceite ha de ser inferior al 0,5%.

5.1.2. Introducir 1,0 g de aceite preparado como se acaba de describir en un matraz Erlenmeyer (3.1.) y disolverlo en 10 ml del disolvente de elución (4.8). Dejar reposar la solución durante un mínimo de 15 minutos antes de la cromatografía de columna con gel de sílice. Si la solución está turbia, centrifugarla para garantizar las condiciones óptimas para la cromatografía (Nota 1)

Nota 1: Pueden utilizarse microcartuchos de gel de sílice (SPE) de 500 mg listos para ser usados.

5.1.3. Preparación de la columna cromatográfica

Llenar la columna (3.3.) con unos 30 ml del disolvente de elución (4.8), insertar un trozo de algodón en la base de la columna con ayuda de una varilla de vidrio y presionar para eliminar el aire.

En un vaso de precipitados preparar una suspensión de 25 g de gel de sílice (4.1.) en unos 80 ml de disolvente de elución y transferirla a la columna ayudándose con un embudo.

Asegurarse de que todo el gel de sílice ha sido transferido a la columna. Lavar con el disolvente de elución (4.8). Abrir la llave y dejar que el disolvente fluya hasta que su nivel esté 2 mm por encima del gel de sílice.

5.1.4. Cromatografía de columna

En un matraz Erlenmeyer de 25 ml (5.1.2.) pesar 1,0 g exacto de la muestra, preparada como se describe en 5.1.

Disolver la muestra en 10 ml de disolvente de elución (4.8.). Transferir la solución a la columna cromatográfica, preparada como se acaba de describir (5.1.3.). Evitar mover la superficie de la columna.

Abrir la llave y dejar que la solución de la muestra fluya hasta alcanzar el nivel del gel de sílice. Eluir con 150 ml del disolvente de elución. Regular el flujo a una velocidad de 2 ml/min (de esta forma, pasarán 150 ml a través de la columna en 60-70 minutos).

Recuperar el eluido en un matraz de fondo redondo de 250 ml tarado previamente. Evaporar el disolvente al vacío y eliminar las últimas trazas de éste mediante corriente de nitrógeno. Pesar el matraz y calcular la materia recuperada (Nota 2)

Nota 2: Si se utilizan cartuchos SPE listos para ser usados (Nota 1), proceder del siguiente modo:

Introducir 1 ml de la solución (5.1.2.) en los cartuchos, previamente acondicionados con 3 ml de n-hexano.

Tras la percolación de la solución, eluir con 4 ml de n-hexano/éter dietílico 9/1 (v/v).

Recuperar el eluido en un tubo de 10 ml y evaporar con corriente de nitrógeno. Someter el residuo seco a la acción de la lipasa pancreática (5.2.). Es indispensable comprobar la composición en ácidos grasos antes y después del paso por los cartuchos SPE.

5.2. Hidrólisis con lipasa pancreática

5.2.1. En el tubo de centrifuga pesar 0,1 g de aceite, preparado como se describe en 5.1. Añadir 2 ml de solución tampón (4.4.), 0,5 ml de la solución de colato de sodio (4.5.) y 0,2 ml de cloruro cálcico, agitando bien después de cada adición.

Tapar el tubo con el tapón de vidrio y ponerlo en el baño termostático a $40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

5.2.2. Añadir 20 mg de lipasa, mezclar cuidadosamente (evitando mojar el tapón) y poner en el baño termostático durante 2 minutos exactos. Sacar del baño, agitar enérgicamente durante 1 minuto exacto y enfriar.

5.2.3. Añadir 1 ml de éter dietílico, tapar y agitar enérgicamente. A continuación, centrifugar y transferir la solución de éter a un tubo limpio con una microjeringa.

5.3. Preparación de los derivados silanizados y cromatografía de gases

5.3.1. Tomar 100 µl de solución (5.2.3.) con ayuda de la microjeringa y transferirla a un tubo de fondo cónico de 10 ml.

Eliminar el disolvente con corriente suave de nitrógeno, añadir 200 µl de reactivo de silanización (4.13), taponar el tubo y dejar reposar durante 20 minutos.

A los 20 minutos, añadir 5 ml de n-hexano: la solución resultante está lista para la cromatografía de gases.

5.4. Cromatografía de gases

Las condiciones operativas son las siguientes:

- Temperatura del inyector inferior a la temperatura de ebullición del disolvente (68°C).
- Temperatura del detector: 350°C.
- Programación de la temperatura del horno: 60°C durante 1 minuto -aumento de 15°C/min hasta alcanzar 180°C - aumento de 5°C/min hasta alcanzar 340°C – 340°C durante 13 minutos.
- Gas portador: hidrógeno o helio, regulado a la velocidad lineal adecuada para obtener la resolución reflejada en la Figura 1. El tiempo de retención del triacilglicerol C54 debe ser de 40±5 minutos (ver Figura 2) (Nota 3).
- Volumen de inyección: 0,5-1 µl de la solución (5.3.1.).

Nota 3: Las anteriores condiciones operativas son orientativas. Cada operador debe optimizar estas condiciones para conseguir la resolución deseada. El pico correspondiente al 2-monopalmitato de glicerilo debe tener como mínimo una altura del 10% del valor de la escala real.

5.4.1. Identificación de los picos

Cada monoglicérido se identifica según los tiempos de retención obtenidos y comparándolos con los obtenidos con las mezclas de monoglicéridos estándar analizadas en las mismas condiciones de ensayo.

5.4.2. Evaluación cuantitativa

El área de cada pico se calcula mediante integración electrónica.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El porcentaje de monopalmitato de glicerilo se calcula a partir de la relación entre el área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de todos los monoglicéridos (ver Figura 2), según la siguiente fórmula:

$$\text{Monopalmitato de glicerilo (\%)}: \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

en la que: A_x = área del pico del monopalmitato de glicerilo
 ΣA = suma de las áreas de los picos de todos los monoglicéridos

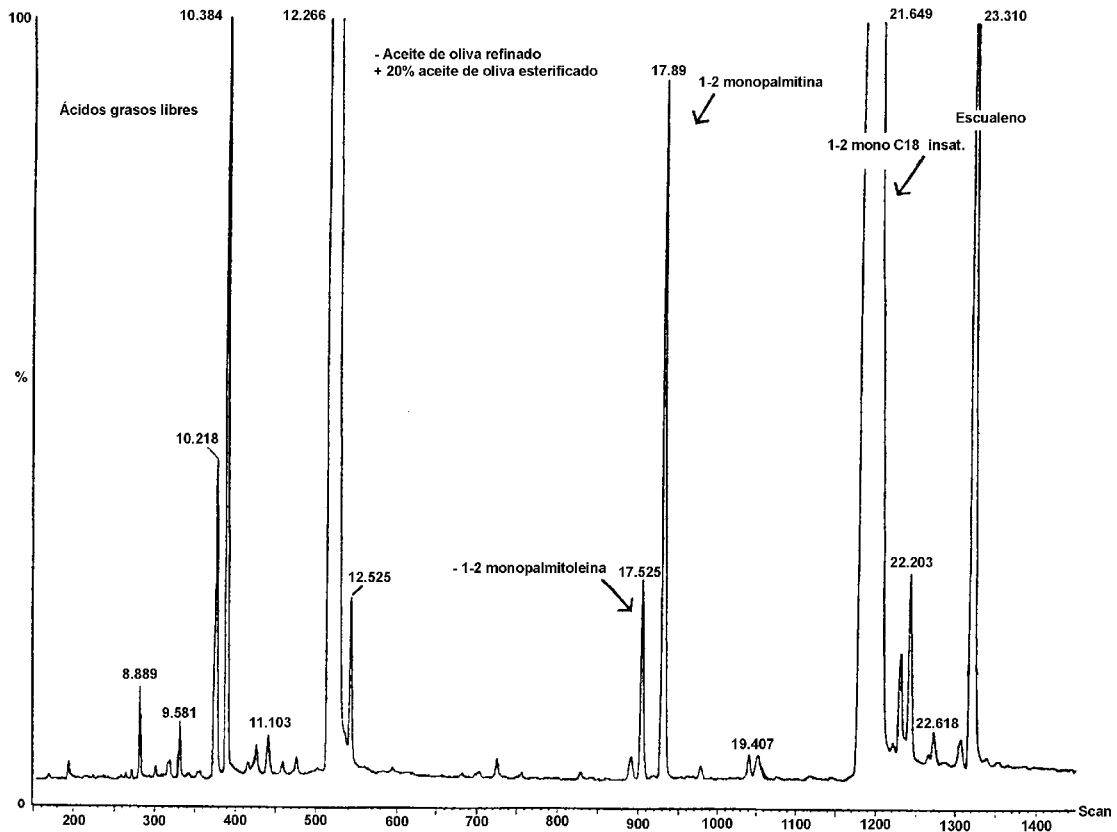
El resultado se expresa con un decimal.

7. INFORME DEL ENSAYO

En el informe del ensayo debe constar:

- la referencia del presente método;
- toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra;
- el resultado del ensayo;
- cualquier desviación del método por acuerdo entre las partes o por cualquier otra razón;
- los datos de identificación del laboratorio, la fecha en que se realizó el ensayo y la firma de los supervisores del mismo.

Figura 1:

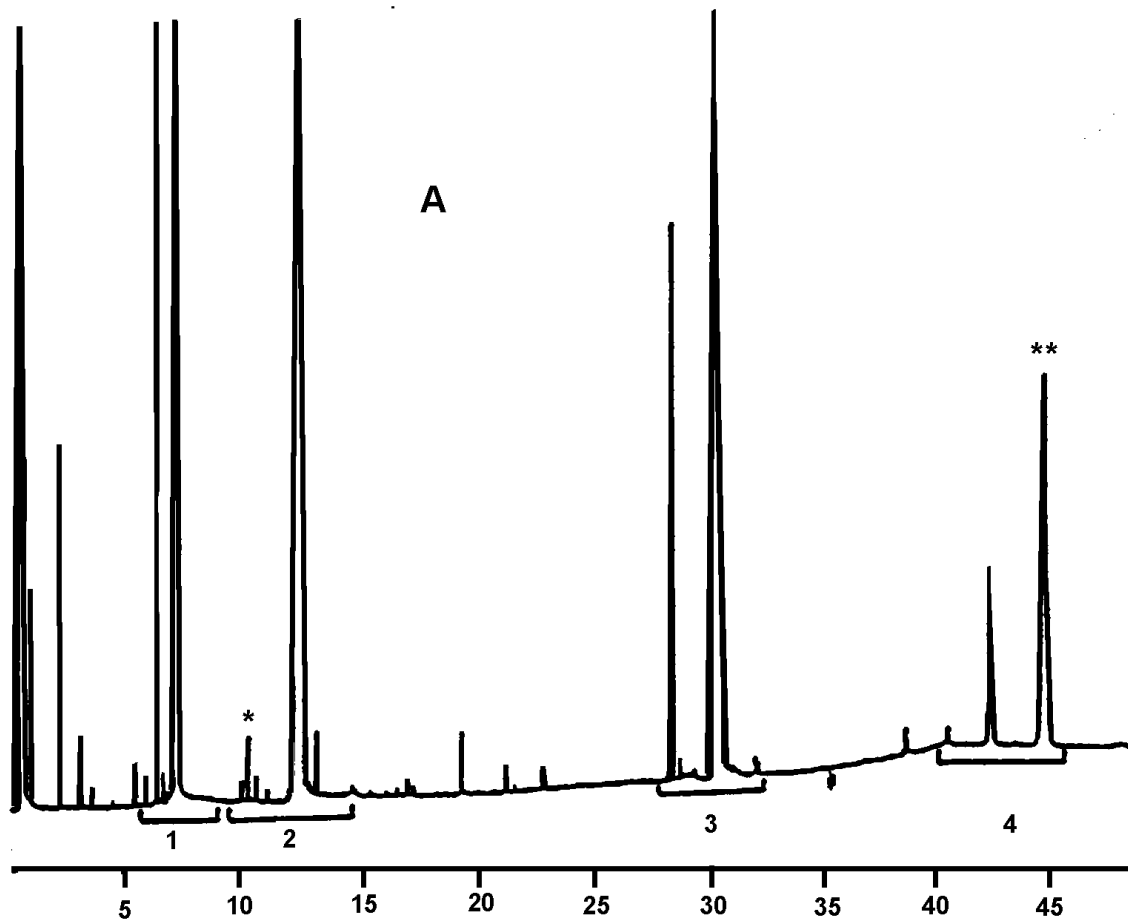


Cromatograma de los productos de la reacción de silanización obtenidos por la acción de la lipasa en un aceite de oliva refinado encabezado con un 20% de aceite esterificado (100%).

Figura 2:

Cromatograma de:

- A) un aceite de oliva genuino tras la reacción de la lipasa, después de la silanización. En estas condiciones (columna capilar de 8-12 m), las ceras eluyen junto con los diglicéridos o poco después de éstos. Tras la reacción de la lipasa, el contenido en triglicéridos no debe superar el 15%.



Leyenda:

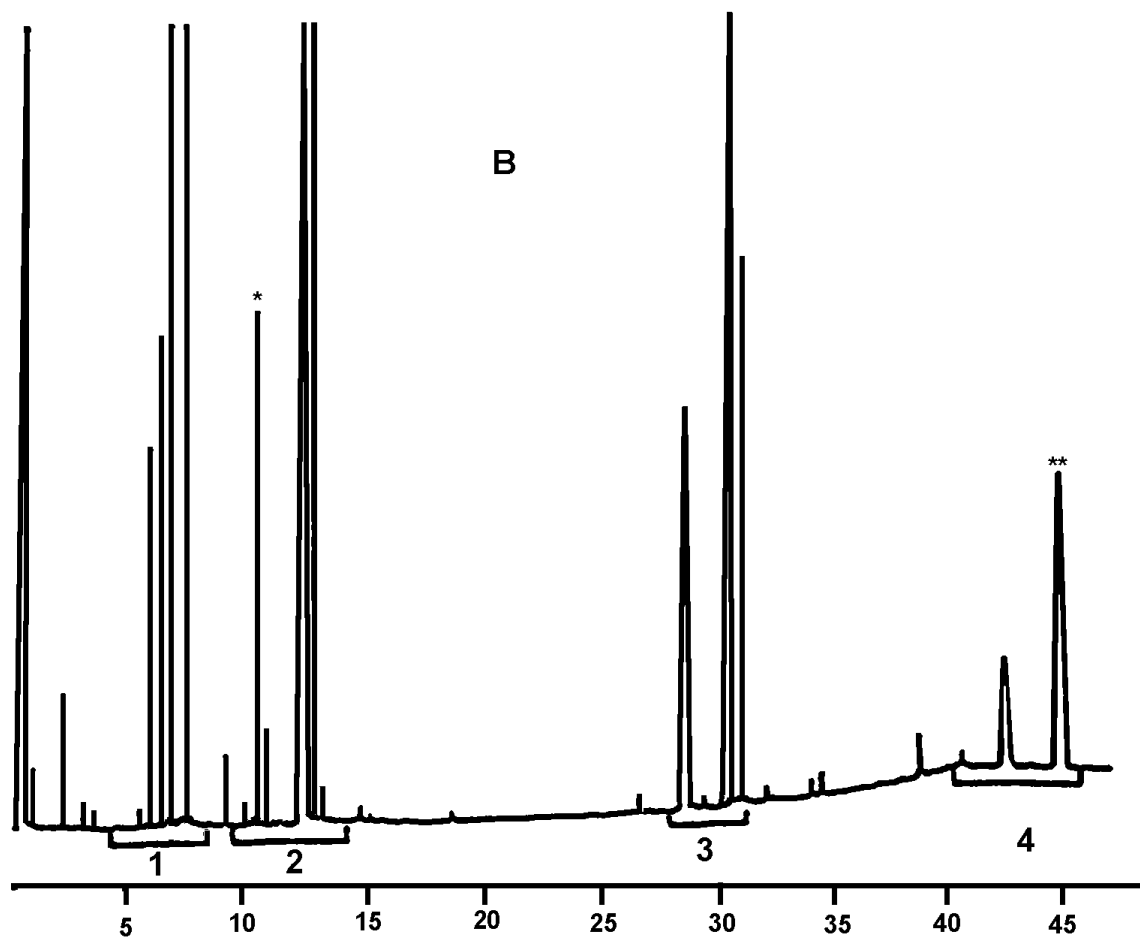
1 = Ácidos grasos libres
2 = Monoglicéridos

3 = Diglicéridos
4 = Triglicéridos

(*) 2-monopalmitina
(**) Triglicérido C54

B) un aceite esterificado tras la acción de la lipasa, después de la silanización. En estas condiciones (columna capilar de 8-12 m), las ceras eluyen junto con los diglicéridos o poco después de éstos.

Tras la acción de la lipasa, el contenido en triglicéridos no debe superar el 15%.



Leyenda:

1 = Ácidos grasos libres
2 = Monoglicéridos

3 = Diglicéridos
4 = Triglicéridos

(*) 2-monopalmitina
(**) Triglicérido C54

ANEXO A

(informativo)

A.1. PREPARACIÓN DE LA LIPASA

La lipasa está disponible en el mercado pero también puede prepararse en el laboratorio del modo siguiente:

Coger 5 kg de páncreas de cerdo fresco, refrigerado a 0°C. Eliminar la grasa sólida y el tejido conjuntivo que lo rodean y triturarlo en una batidora para obtener una pasta fluida. Remover esta pasta durante 4-6 horas con 2,5 l de acetona anhidra y centrifugar. Efectuar tres extracciones más en el residuo con el mismo volumen de acetona anhidra, otras dos extracciones con una mezcla de acetona y éter dietílico 1/1 (v/v), y otras dos con éter dietílico.

Secar el residuo al vacío durante 48 horas para obtener un polvo estable. Si se guarda en el frigorífico y se protege de la humedad se conserva durante mucho tiempo.

A.2. CONTROL DE LA ACTIVIDAD DE LA LIPASA

Preparar como sigue una emulsión de aceite de oliva:

Agitar durante 10 minutos en un mezclador adecuado una mezcla de 165 ml de solución de goma arábica a 100 g/l, 15 g de hielo picado y 20 ml de aceite de oliva neutralizado.

En un vaso de precipitados de 50 ml introducir 10 ml de esta emulsión, 0,3 ml de solución de colato de sodio a 0,2 g/ml y 20 ml de agua destilada.

Colocar el vaso en un termostato a 37°C e introducir los electrodos de un pH-metro y un agitador espiral.

Con una pipeta añadir, gota a gota, 0,1 N de la solución de hidróxido de sodio, hasta obtener un pH de 8,3.

Añadir una suspensión acuosa de la lipasa (0,01 g/ml de lipasa). Medir el pH y en cuanto alcance el valor de 8,3 poner en marcha un cronómetro e ir añadiendo la solución de hidróxido de sodio con la velocidad necesaria para mantener el pH en 8,3. Anotar el volumen de solución consumido cada minuto.

Registrar las observaciones en un eje de coordenadas, indicando en abcisas los tiempos y en ordenadas los mililitros de solución alcalina 0,1 N requeridos para mantener constante el pH. Deberá obtenerse una gráfica lineal.

La actividad de la lipasa, medida en unidades lipásicas por mg, se calcula con la siguiente fórmula:

$$A = \frac{V \times N \times 100}{m}$$

En la que:

- A* es la actividad en unidades lipásicas/mg;
- V* es el volumen de solución de hidróxido de sodio 0,1 N consumido por minuto (calculado a partir de la gráfica), en ml;
- N* es la normalidad de la solución de hidróxido de sodio;
- m* es la masa de lipasa utilizada en el ensayo, en mg

La unidad lipásica se define como la cantidad de enzima que libera 10 µeq de ácido por minuto.

ANEXO B

PRECAUCIONES OPERATIVAS

B.1. Éter dietílico

Altamente inflamable. Moderadamente tóxico. Irrita la piel. Nocivo si es inhalado. Puede dañar los ojos. Puede tener efectos retardados. Puede formar peróxidos explosivos. Los vapores son inflamables. Mantener alejado de fuentes de calor, chispas o llamas desnudas. Asegurarse de que las botellas están convenientemente cerradas. Utilizar con ventilación adecuada. Evitar la acumulación de vapores y eliminar cualquier posible causa de incendio, como calentadores o aparatos eléctricos que no estén fabricados con material antiinflamable. No evaporar hasta sequedad o cuasi-sequedad. La adición de agua o de un agente reductor puede reducir la formación de peróxidos. No ingerir. Evitar respirar los vapores. Evitar el contacto prolongado o repetido con la piel.

B.2. n-Hexano

Altamente inflamable. Los vapores pueden incendiarse. Mantener alejado de fuentes de calor, chispas y llamas desnudas. Asegurarse de que las botellas están convenientemente cerradas. Utilizar con ventilación adecuada. Evitar la acumulación de vapores y eliminar cualquier posible causa de incendio, como calentadores o aparatos eléctricos que no hayan sido fabricados con material antiinflamable. Nocivo si es inhalado ya que puede dañar las células del sistema nervioso. Evitar respirar los vapores, utilizando si fuera necesario un aparato respirador adecuado. Evitar el contacto con los ojos y la piel.

B.3. Piridina

Altamente inflamable. Nociva si es inhalada, si entra en contacto con la piel o si es ingerida. Si el producto entra en contacto con los ojos, enjuagar abundantemente con agua y consultar con un médico. Si entra en contacto con la piel, lavar inmediatamente con abundante agua.

B.4. Hexametildisilizano

Líquido altamente inflamable. Mantener en un recipiente bien cerrado y protegido de la humedad. Mantener alejado de llamas o chispas. No fumar.

B.5. Trimetilclorosilano

Líquido altamente inflamable. Irrita los ojos, el tracto respiratorio y la piel. Mantener en un recipiente bien cerrado y protegido de la humedad.

B.6. Hidrógeno comprimido en bombonas

Altamente inflamable, bajo presión. Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llamas desnudas o aparatos eléctricos que no hayan sido fabricados con material antiinflamable. Asegurarse de que la válvula de la bombona esté cerrada cuando no esté en uso. Utilizar siempre con un reductor de presión. Destensar el muelle del reductor antes de abrir la válvula de la bombona. No colocarse delante del agujero de salida de la bombona al abrir la válvula. Utilizar con la ventilación adecuada. No transferir el hidrógeno de una bombona a otra.

No mezclar gas en la bombona. Asegurarse de que las bombonas no puedan caerse. Mantenerlas alejadas del sol y de fuentes de calor. No almacenar en ambientes corrosivos. No utilizar bombonas dañadas o sin etiquetar.

B.7. Aire comprimido en bombonas

Gas comprimido a alta presión. Utilizar con precaución en presencia de sustancias combustibles ya que la temperatura de auto-ignición de la mayoría de los compuestos orgánicos en el aire se reduce considerablemente bajo alta presión. Tener siempre bien cerrada la válvula de la bombona cuando no esté usándose. Utilizar siempre un reductor de presión. Destensar el muelle del reductor antes de abrir la válvula de la bombona. No colocarse delante del agujero de salida de la bombona al abrir la válvula.

No transferir el gas de una bombona a otra. No mezclar gas en la bombona. Asegurarse de que las bombonas no puedan caerse. Mantenerlas alejadas del sol y de fuentes de calor. No almacenar en un ambiente corrosivo. No utilizar bombonas dañadas o sin etiquetar. El aire destinado a usos técnicos no debe utilizarse para ser inhalado o en aparatos respiradores.

MÁRGENES DE PRECISIÓN DEL MÉTODO

Los márgenes de precisión del método se presentan en el cuadro que figura a continuación.

El ensayo colaborativo para la obtención de estos datos fue organizado por el Consejo Oleícola Internacional y coordinado por el profesor Enrico Tiscornia y la doctora Rafaella Boggia, de la Universidad de Génova, y participaron 12 laboratorios de 5 países.

El ensayo se hizo con cinco muestras diferentes y sus correspondientes replicados (a y b). La identificación de las muestras es la siguiente:

- A: aceite de oliva virgen extra
- B: aceite de oliva virgen lampante
- C: aceite de oliva refinado
- D: aceite de oliva refinado + aceite reesterificado (90 : 10)
- E: aceite de oliva refinado + aceite reesterificado (80 : 20)

El análisis estadístico de los resultados del ensayo colaborativo se efectuó de acuerdo a los requisitos establecidos en las normas ISO 5725 “**Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure**”. Los valores aberrantes se determinaron aplicando el test de Cochran y el test de Grubbs a los resultados de los laboratorios para cada determinación (replicados a y b) y cada muestra.

El cuadro contiene los siguientes elementos, cuyo significado es el siguiente:

- n** Número de laboratorios que participaron en el ensayo
- outliers** Número de laboratorios con resultados aberrantes
- mean** Media de los resultados aceptados
- r** Valor por debajo del cual se sitúa, con una probabilidad del 95%, el valor absoluto de la diferencia entre los resultados de dos ensayos individuales independientes, obtenidos con el mismo método, utilizando una muestra idéntica, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, con los mismos aparatos y en un corto intervalo de tiempo. (**Repetibilidad**).

S_r Desviación estándar de la repetibilidad

RSD_r (%) Coeficiente de variación de la repetibilidad ($S_r \times 100 / \text{mean}$)

R Valor por debajo del cual se sitúa, con una probabilidad del 95 %, el valor absoluto de la diferencia entre dos resultados de ensayo individuales obtenidos con el mismo método, utilizando una muestra idéntica, en laboratorios diferentes, por operadores distintos y con distintos aparatos. **(Reproducibilidad)**

S_R Desviación estándar de la reproducibilidad

RSD_R (%) Coeficiente de variación de la reproducibilidad ($S_R \times 100 / \text{mean}$)

Cuadro correspondiente:

	A	B	C	D	E
N	12	12	12	12	12
outliers	0	0	0	0	0
Mean	0,4583	0,7500	0,9042	1,8125	2,8208
R	0,1143	0,1143	0,1715	0,0990	0,2619
S_r	0,0408	0,0408	0,0612	0,0354	0,0935
RSD_r (%)	8,9072	5,4433	6,7728	1,9506	3,3161
R	0,1421	0,2659	0,2573	0,5616	0,8591
S_R	0,0508	0,0950	0,0919	0,2006	0,3068
RSD_R (%)	11,0731	12,6598	10,1649	11,0658	10,8764