



MÉTODO DE ANÁLISIS

DETERMINACIÓN DE LOS ESTIGMASTADIENOS EN LOS ACEITES VEGETALES

1. OBJETO

Determinación de los estigmastadienos en los aceites vegetales con bajas concentraciones de estos hidrocarburos, especialmente en los aceites de oliva vírgenes y en el aceite de orujo de oliva bruto.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

La norma es aplicable a todo tipo de aceites vegetales, aunque las determinaciones sólo sean válidas para contenidos de estos hidrocarburos comprendidos entre 0,01 y 4,0 mg/kg. Este método es especialmente adecuado para detectar la presencia de aceites vegetales refinados (oliva, orujo de oliva, girasol, soja, palma, etc.) en el aceite de oliva virgen, dado que los aceites refinados contienen estigmastadienos y los vírgenes no.

3. PRINCIPIO

Aislamiento de la materia insaponificable. Separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos mediante cromatografía en columna sobre sílica gel y análisis por cromatografía de gases en columna capilar.

4. MATERIAL

- 4.1. Matraces de fondo plano de 250 ml con refrigerante de reflujo.
- 4.2. Embudos de decantación de 500 ml.
- 4.3. Matraces de fondo redondo de 100 ml.
- 4.4. Evaporador rotatorio.

- 4.5. Columna de vidrio para cromatografía (1,5 cm de diámetro interno por 50 cm de longitud)

provista de una llave de Teflón. En su parte inferior se coloca un tapón de lana de vidrio. Preparación de la columna sobre sílica gel: echar hexano en la columna para cromatografía hasta una altura aproximada de 5 cm, rellenar con papilla de sílica gel en el hexano (15 g en 40 ml) con la ayuda de pequeñas porciones de hexano. Dejar sedimentar y completar la sedimentación aplicando una ligera vibración. Añadir sulfato sódico anhidro hasta un altura de 0,5 cm; finalmente, eluir el exceso de hexano.

- 4.6. Cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama, un inyector de tipo divisor o "on column" y un horno programable, con precisión $\pm 1^\circ\text{C}$.
- 4.7. Columnas capilares de sílice fundida para cromatografía de gases (0,25 o 0,32 mm de diámetro interno por 25 m de longitud) recubiertas interiormente de una fase de metilsilicona al 5% (0,25 μm de espesor).

Nota 1: Pueden utilizarse otras columnas de polaridad similar o inferior.

- 4.8. Integrador-registrador que permita la integración según el modo valle-valle.
- 4.9. Microjeringa de 5-10 μl para cromatografía de gases con aguja cementada.

5. REACTIVOS

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos deben ser de calidad analítica. El agua utilizada debería ser agua destilada o agua con una pureza más o menos equivalente.

- 5.1. Hexano o mezcla de alcanos, intervalo del punto de ebullición a $65-70^\circ\text{C}$, destilado en una columna de rectificación.

Nota 2: Es necesario destilar el hexano para eliminar impurezas.

- 5.2. Alcohol etílico 96 v/v.
- 5.3. Sulfato sódico anhidro.
- 5.4. Solución alcohólica de hidróxido potásico al 10% p/v. Añadir 10 ml de agua a 50 g de hidróxido potásico, agitar y después diluir hasta 500 ml con etanol.

Nota 3: La potasa alcohólica adquiere un tono marrón con el tiempo. Debería prepararse cada día de nuevo y guardarse en botellas de vidrio oscuro bien cerradas.

- 5.5. Sílica gel 60 para cromatografía en columna, 70-230 mesh, (Merck, ref. 7734 o similar).

Nota 4: Normalmente, la sílica gel puede ser utilizada directamente a partir de su envase original sin aplicarle ningún tratamiento. No obstante, algunos lotes de sílice pueden presentar una débil actividad que dé como resultado malas separaciones cromatográficas. En tales circunstancias, la sílica gel debe someterse al siguiente tratamiento: desactivar la sílica gel calentándola durante cuatro horas como mínimo a 550°C . A continuación, introducir la

sílica gel en un desecador y, una vez enfriado, transvasarlo a un matraz cerrado. Añadir 2% de agua y agitar para asegurar la completa eliminación de los grumos y la salida normal del polvo.

En caso de que se obtengan cromatogramas con picos de interferencia, la sílica gel utilizada debería someterse al tratamiento arriba indicado. Como alternativa, se puede utilizar sílica gel extra pura 60 (Merck, ref. 7754).

- 5.6. Disolución concentrada (200 ppm) de colest-3,5-dieno (Sigma, 99% de pureza) en hexano (10 mg en 50 ml).
- 5.7. Disolución patrón de colest-3,5-dieno en hexano con una concentración de 20 ppm, obtenida por dilución de la disolución 5.6.

Nota 5: Si se conservan a una temperatura inferior a 4°C, las soluciones 5.6 y 5.7 permanecen inalteradas durante un periodo de 4 meses como mínimo.

- 5.8. Gas portador para cromatografía: helio o hidrógeno de calidad N-50.
- 5.9. Gases auxiliares para el detector de ionización de llama: hidrógeno de calidad N-50 y aire purificado.
- 5.10. Solución n-nonacosano en hexano con una concentración de aproximadamente 100 ppm.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación del insaponificable:

- 6.1.1. Pesar exactamente $20 \pm 0,1$ g de aceite en un matraz de 250 ml, añadir 1 ml de la disolución patrón de colest-3,5-dieno (20 µg) y 75 ml de potasa alcohólica al 10%, colocar el refrigerante de reflujo y calentar hasta ligera ebullición durante 30 minutos. Retirar el matraz que contiene la muestra y dejar enfriar ligeramente (si se deja enfriar completamente, la muestra se solidifica). Añadir 100 ml de agua y transferir la solución a un embudo de decantación con la ayuda de 100 ml de hexano. Agitar vigorosamente la mezcla durante 30 segundos y dejar decantar.

Nota 6: Si hay formación de emulsiones, esperar un instante, ya que éstas desaparecen rápidamente. En caso de persistencia, añadir pequeñas cantidades de etanol.

- 6.1.2. Transferir la fase acuosa inferior a un segundo embudo de decantación y extraer de nuevo con ayuda de 100 ml de hexano. Transferir de nuevo la fase acuosa inferior y lavar los extractos de hexano (reunidos en otro embudo de decantación) tres veces cada vez con una mezcla de 100 ml de etanol-agua (1:1) hasta neutralidad del pH.
- 6.1.3. Pasar la solución de hexano a través de sulfato sódico anhidro (50 g), lavar con 20 ml de hexano y evaporar en un rotavapor a 30°C a presión reducida hasta sequedad.

6.2. Separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos:

6.2.1. Transferir el residuo a la columna de fraccionamiento con ayuda de dos porciones de 1 ml de hexano, introducir la muestra en la columna teniendo cuidado de que el nivel de la solución cubra el sulfato sódico. Iniciar la elución cromatográfica con hexano a un flujo de 1 ml/min. aproximadamente. Eliminar la primera elución de 25-30 ml y entonces recoger la fracción siguiente de 40 ml.

Nota 7: La primera fracción contiene hidrocarburos saturados (Figura 1a) y la segunda incluye los hidrocarburos esteroideos. Una elución ulterior proporciona los picos del escualeno y de los constituyentes. Una buena separación entre los hidrocarburos saturados y los hidrocarburos esteroideos exige la optimización de los volúmenes de las fracciones. Para lograrlo, el volumen de la primera fracción debería ser ajustado de forma que se garantice que los picos que representan a los hidrocarburos saturados (Figura 1c) sean bajos en el momento del análisis de la segunda fracción; si estos picos no aparecen pero la intensidad del pico del patrón interno es baja, el volumen debería reducirse. No obstante, no es necesaria una separación completa entre los componentes de la primera y de la segunda fracción, ya que no existe solapamiento de picos durante el análisis mediante CPG. Por lo general, la optimización del volumen de la segunda fracción no es necesaria, ya que existe una buena separación entre los hidrocarburos esteroideos y los componentes eluidos ulteriormente. No obstante, la presencia de un pico importante en un tiempo de retención inferior en 1,5 minutos aproximadamente al del patrón interno se debe al escualeno e indica que la separación no se ha efectuado correctamente.

6.2.2. Evaporar la segunda fracción en el rotavapor a 30°C y a presión reducida hasta sequedad. Disolver inmediatamente el residuo en 0,2 ml de hexano. Guardar la solución en el refrigerador hasta el momento del análisis.

Nota 8: Los residuos de 6.1.3. y 6.2.2. no deben permanecer ni secos ni a temperatura ambiente. Tan pronto como se hayan obtenido, debe añadirse el disolvente y guardar las soluciones en el refrigerador.

6.3. Cromatografía de gases

6.3.1. Condiciones de trabajo:

- Temperatura del inyector: 300°C.
- Temperatura de la columna: 320°C.
- Registrador integrador: los parámetros de integración de los picos se fijarán de manera que se obtenga una evaluación correcta de las áreas. Es recomendable el modo de integración valle-valle.
- Sensibilidad instrumental: aproximadamente 16 veces la atenuación mínima.

- Cantidad de disolución inyectada: 1 μ l.
- Programación de la temperatura del horno: temperatura inicial de 235°C durante 6 minutos y luego aumentar a razón de 2°C/min. hasta 285°C.
- Relación de división: 1:15 con inyector del tipo divisor.
- Gas portador: helio o hidrógeno a una presión de 120 kPa aproximadamente.

Las condiciones de trabajo pueden modificarse en función de las características del cromatógrafo y de la columna, de forma que se obtengan cromatogramas que cumplan los siguientes requisitos: pico del patrón interno \pm 5 minutos con relación a los tiempos de retención indicados en el apartado 6.3.2.; el pico del patrón interno debería alcanzar al menos el 80% de la escala del registrador.

El funcionamiento del sistema de cromatografía de gases debería verificarse inyectando una mezcla de la solución concentrada de colestadieno (5.6) y de n-nonacosano (5.10). El pico del colestadieno-3,5-dieno deberá aparecer delante del de n-nonacosano (Figura 1c); si no sucede así, se puede bien reducir la temperatura inicial del horno, bien sustituir la columna de CPG por una columna de polaridad inferior.

6.3.2. Identificación de los picos

El pico del patrón interno aparece en el tiempo de retención de 19 minutos aproximadamente y el del estigmasta-3,5-dieno en el tiempo de retención relativo de 1,29 (Figura 1b).

El estigmasta-3,5-dieno no aparece con pequeñas cantidades de un isómero y, normalmente, los dos dan lugar a un solo pico cromatográfico. No obstante, si la columna es demasiado polar o muestra un poder de resolución elevado, el isómero puede presentarse como un pequeño pico y aparecer delante y próximo al pico del estigmasta-3,5-dieno. En ese caso, las dos áreas deben ser sumadas (Figura 2).

Es conveniente eliminar el estigmastadieno fraccionado y sustituir la columna por una columna de polaridad inferior o con un diámetro interno mayor.

Nota 9: Los estigmastadienos de referencia pueden obtenerse aplicando el método para la determinación de los hidrocarburos esteroideos a un aceite vegetal refinado. Los estigmastadienos presentan en efecto un pico importante y de fácil localización en el cromatograma.

Nota 10: Hay que tratar de evitar el solapamiento del patrón interno y de los estigmastadienos con los picos que aparecen durante la elución de la primera fracción mediante cromatografía en columna sobre sílica gel.

6.3.3. Determinación cuantitativa

El contenido en estigmastadienos se determina según la siguiente fórmula:

$$\text{mg/kg de estigmastadienos} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

siendo: A_s = área del pico de los estigmastadienos (si el pico es fraccionado, sumar las áreas de los dos isómeros).

A_c = área del patrón interno (colestadieno).

M_c = peso, en microgramos, del patrón interno añadido.

M_o = peso, en gramos, del aceite tomado.

Límite de detección: alrededor de 0,01 mg/kg.

Nota 11: Si el cromatograma hace aparecer un contenido en estigmastadienos superior a 4 mg/kg, su cuantificación, si es necesaria, debe efectuarse aplicando el método para la determinación de los hidrocarburos esteroideos.

Figura 1. Cromatogramas obtenidos a partir de muestras de aceite de oliva analizadas en columna capilar sobre sílice fundido (0,25 mm de diámetro interno y 25 m de longitud) recubierta interiormente de fenilmetilsilicona en un 5% (0,25 μm de espesor).

- a) Primera fracción (30 ml) perteneciente a un aceite virgen, al que se le ha añadido colestadieno.
- b) Segunda fracción (40 ml) perteneciente a un aceite de oliva que contenga 0,10 mg/Kg de estigmastadienos.

- c) Segunda fracción (40 ml) que contenga una pequeña porción de la primera fracción.

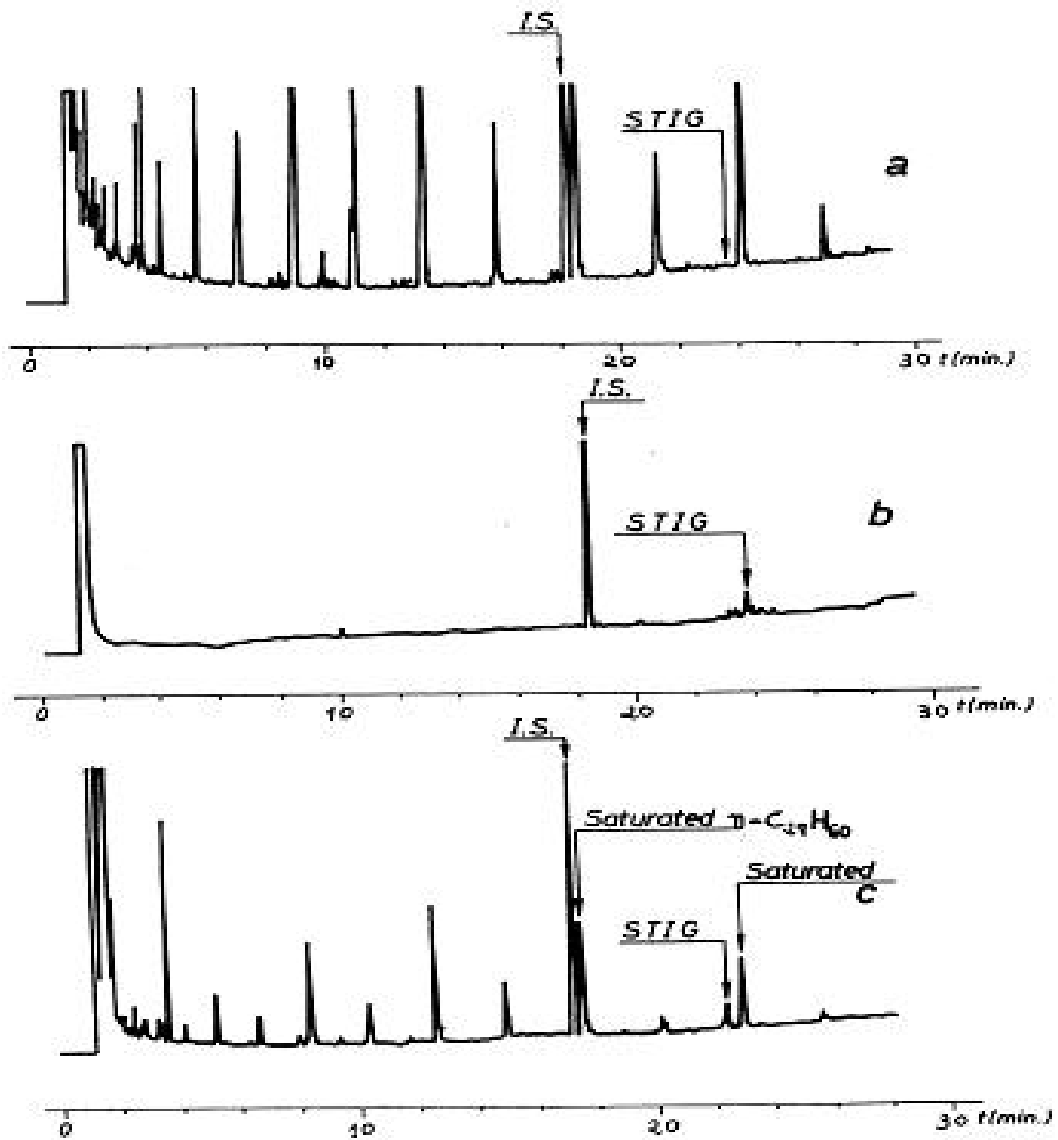


Figura 1

Figura 2. Cromatograma obtenido a partir de una muestra de aceite de oliva refinado analizado en columna DB-5, que muestra el isómero del estigmasta-3,5-dieno.

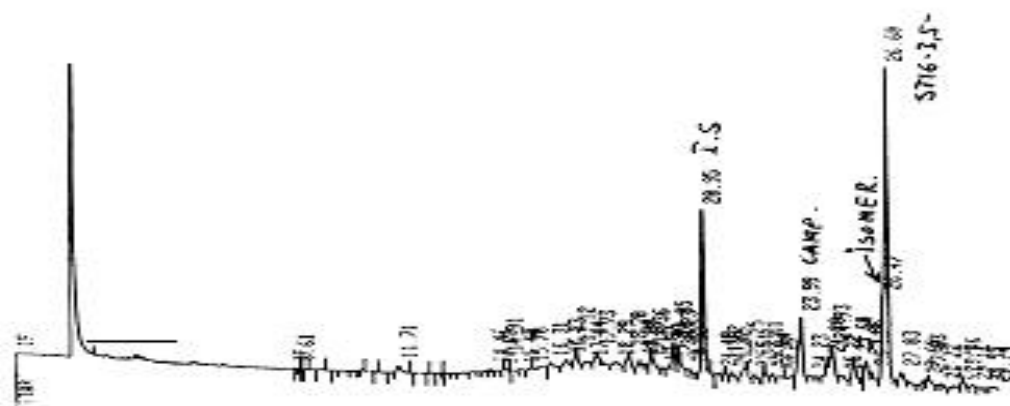


Figura 2

MÁRGENES DE PRECISIÓN DEL MÉTODO

1. Análisis de los resultados del ensayo colaborativo

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

El ensayo colaborativo propuesto por la Secretaría Ejecutiva en 1999 a los laboratorios reconocidos por el Consejo Oleícola Internacional fue realizado por 19 laboratorios de 8 países.

El ensayo se hizo con cinco muestras:

- A: aceite de oliva virgen extra
- B: aceite de oliva virgen + aceite de girasol refinado
- C: aceite de oliva virgen + aceite de orujo de oliva refinado
- D: aceite de oliva virgen + aceite de soja refinado + aceite de girasol refinado
- E: aceite de oliva refinado + aceite de orujo de oliva refinado + aceite de soja refinado + aceite de oliva virgen lampante.

El análisis estadístico de los resultados del ensayo colaborativo realizado por la Secretaría Ejecutiva del Consejo Oleícola Internacional se efectuó según los requisitos establecidos en las normas ISO 5725 **Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure**. Los valores anómalos 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:

- n** Número de laboratorios que participaron en los ensayos
- 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
- S_r** Desviación estándar de repetibilidad
- RSD_r (%)** Coeficiente de variación de 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

S_R Desviación estándar de reproducibilidad

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

Contenido en estigmastadienos (ppm)

| | A | B | C | D | E |
|----------------------------|-----------------------------|------|------|-------|------|
| n | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 |
| outliers | 3 | 5 | 7 | 2 | 5 |
| mean | 0.01 | 0.80 | 9.49 | 0.22 | 7.55 |
| r | 0.01 | 0.08 | 0.39 | 0.05 | 0.48 |
| S_r | 0.004 | 0.03 | 0.14 | 0.01 | 0.17 |
| RSD_r (%) | 32.43 _(not sig.) | 3.70 | 1.5 | 8.41 | 2.29 |
| R | 0.033 | 0.15 | 1.66 | 0.06 | 1.59 |
| S_R | 0.012 | 0.05 | 0.59 | 0.025 | 0.57 |
| RSD_R(%) | 98.59 _(not sig.) | 6.73 | 6.26 | 11.45 | 7.55 |

2. Bibliografía

ISO 5725-1:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 1: Principes généraux et définitions

ISO 5725-2: 1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée

ISO 5725-5: 1998 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 5: Méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée

ISO 5725-6:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 6: Utilisation dans la pratique des valeurs d'exactitude