



## **MÉTODO DE ANÁLISIS**

### **DETERMINACION DE LOS ESTERENOS EN LOS ACEITES VEGETALES REFINADOS**

#### **1. OBJETO**

Determinación de los esterenos (campestadienos y estigmastadienos), hidrocarburos derivados de los esteroides durante los tratamientos de refinado o de desesterolización aplicados a los aceites vegetales.

#### **2. AMBITO DE APLICACIÓN**

La presente norma puede utilizarse para detectar la presencia de aceites de semillas desesterolizados en el aceite de oliva refinado, en el aceite de orujo de oliva refinado y en las mezclas de estos aceites con el aceite de oliva virgen. Este método puede utilizarse también para la dosificación de los estigmastadienos en los aceites con un contenido en estas sustancias superior a 4,0 mg/kg.

#### **3. PRINCIPIO**

Separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice impregnado de nitrato de plata y análisis por cromatografía de gases con columna capilar.

#### **4. MATERIAL**

- 4.1 Matracas de fondo redondo de 100 ml.
- 4.2 Matracas de fondo redondo de 500 ml.
- 4.3 Matracas Erlenmeyer de 25 ml.
- 4.4 Desecador que contenga gel de sílice activada.

- 4.5 Evaporador rotatorio.
- 4.6 Columna de vidrio para cromatografía (de 1,5-2,0 cm de diámetro interno por 50 cm de longitud), provista de una llave de Teflón. En la parte inferior se coloca un tapón de lana de vidrio o una placa de vidrio sinterizado. Preparación de la columna de gel de sílice: se vierte el hexano en la columna hasta una altura de unos 5 cm y se rellena con una papilla de gel de sílice impregnada de plata (5.5) en el hexano (20 g en 40 ml) con ayuda de porciones de hexano. Se deja decantar y se completa la sedimentación aplicando una ligera vibración. Se añade sulfato sódico anhídrido hasta una altura de 0,5 cm. Finalmente se eluye el exceso de hexano.
- 4.7 Cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama, un inyector de tipo divisor (o "on-column" frío) y un horno programable con una precisión de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- 4.8 Columna capilar de sílice fundido para cromatografía de gases (0,25 mm diámetro interno por 25 m de longitud), recubierta interiormente con una fase de fenilmetilsilicona al 5% (película de 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor).

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

- 4.9 Registrador-integrador que permita la integración según el modo valle-valle.
- 4.10 Microjeringa de 5-10  $\mu\text{l}$  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 al menos equivalente.

Para verificar la pureza de los reactivos, efectuar una prueba en blanco.

- 5.1 Hexano o mezcla de alcanos, intervalo del punto de ebullición a 65-70°C, destilado en una columna de rectificación.
- 5.2 Nitrato de plata.
- 5.3 Sulfato sódico anhídrido.
- 5.4 Gel de sílice 60 para cromatografía en columna, 70-230 mallas, (Merck ref. 7734 o similar), calentada en el horno a 110°C durante dos horas o más, después enfriar en el desecador (4.4).
- 5.5 Preparación del gel de sílice impregnado de plata para dos columnas.

En un matraz de fondo redondo de 500 ml (4.2), pesar 30 g de gel de sílice activado (5.4). En un matraz Erlenmeyer de 25 ml (4.3), disolver 3,0 g de nitrato de plata en 7 ml de agua destilada; después, con ayuda de una pipeta, añadir gota a gota la solución sobre el gel de sílice, agitando de vez en cuando. Cerrar el matraz y agitar vigorosamente durante 20 segundos, colocar el matraz en el evaporador rotatorio y dejar que dé vueltas durante 30 minutos a la presión atmosférica y a la temperatura ambiente. El gel de sílice se vuelve ligeramente gris y puede mantenerse en la oscuridad en el matraz cerrado.

- 5.6 Disolución madre (200 ppm) de colest-3,5-dieno (Sigma) 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 2:** Las disoluciones 5.6 y 5.7, si se conservan a una temperatura inferior a 4°C, no sufren deterioro alguno durante un periodo de al menos 4 meses.

- 5.8 Disolución de n-nonacosano en el hexano con una concentración de unas 100 ppm aproximadamente.
- 5.9 Gas portador para cromatografía: helio o hidrógeno, pureza 99,9990%.
- 5.10 Gases auxiliares para el detector de ionización de llama: hidrógeno (pureza 99,9990% y aire purificado).

## 6. PROCEDIMIENTO

- 6.1 Separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos.
  - 6.1.1 Pesar  $1 \pm 0,01$  g de aceite en un vaso de precipitados de 10 ml, añadir 1 ml de disolución patrón de colest-3,5-dieno (20  $\mu$ g) y transferir la mezcla a la columna de fraccionamiento con ayuda de dos porciones de 1 ml de hexano. Introducir la muestra en la columna procurando que el nivel de la disolución cubra el sulfato sódico.
  - 6.1.2 Iniciar la elución cromatográfica con hexano a un flujo de 1 ml/min aproximadamente. Desechar la primera elución de 40 ml, después recoger la fracción siguiente de 60 ml y, por separado, la siguiente fracción de 20 ml.

**Nota 3:** La optimización de los volúmenes de la primera y de la segunda fracción puede garantizarse examinando los cromatogramas obtenidos de cada fracción. La primera fracción debe contener los hidrocarburos saturados y no contiene colestadieno; la segunda fracción debe mostrar los hidrocarburos esteroideos que no son saturados y la tercera fracción no debería contener esteroides (Figura 1).

**Nota 4:** Al final del proceso cromatográfico, la columna debería ser extraída y el gel de sílice impregnado de plata deshidratado debería pasarse a un recipiente y conservarse con objeto de reciclar la plata.

- 6.1.3 Transferir la segunda fracción a un matraz de fondo redondo de 100 ml (4.1) y evaporar en un evaporador rotativo a 30°C a presión reducida hasta sequedad. Disolver el residuo en 0,2 ml de hexano y guardar la solución en el refrigerador hasta el momento de su análisis.

**Nota 5: El residuo (6.1.3) no debe conservarse a temperatura ambiente, sino que recién obtenido debe añadirse el disolvente y guardar después la solución en el frigorífico.**

## 6.2. Cromatografía de gases.

### 6.2.1 Condiciones de trabajo para el inyector tipo divisor.

- Temperatura del inyector: 300°C.
- Temperatura del detector: 320°C.
- Programación de la temperatura del horno: temperatura inicial de 235°C durante 6 minutos, aumentando después a razón de 2°C/min hasta 285°C.
- Relación de división del inyector tipo divisor: 1:15.
- Cantidad de disolución inyectada: 2  $\mu$ l.
- Sensibilidad: al menos 16 veces la atenuación mínima.
- Gas portador: helio o hidrógeno a una presión aproximada de 120 y 80 kPa respectivamente.
- Integrador-registrador. Los parámetros de integración deben fijarse de forma que se garantice una valoración correcta de las áreas.

Estas condiciones deben modificarse en función de las características del cromatógrafo y de la columna, de modo que se obtengan cromatogramas que cumplan los siguientes requisitos: el pico del patrón interno debe aparecer al cabo de  $\pm$  3 minutos con relación a los tiempos de retención indicados en el apartado 6.2.2; el pico del patrón interno debe alcanzar al menos el 80% de la escala del registrador.

El funcionamiento del sistema de cromatografía de gases debe verificarse inyectando una mezcla de la disolución madre de colestá-3,5-dieno (5.6) y de la disolución de n-nonacosano (5.8). El pico resuelto del colestá-3,5-dieno debe aparecer antes que el del n-nonacosano (**Figura 2**); si no ocurriese así, se puede actuar de dos maneras: modificar la temperatura del horno y/o utilizar una columna de polaridad inferior. En estas condiciones, no hay interferencia entre los picos de los hidrocarburos saturados y los picos de los esterenos (**Figura 2**).

### 6.2.2 Identificación de los picos

Si se utilizaba helio como gas portador, el pico del patrón interno aparecía a un tiempo de retención aproximado de 19 minutos y el estigmasta-3,5-dieno al tiempo de retención relativo de 1,28 aproximadamente (**Figura 1b**). El pico del campesta-3,5-dieno aparecía al tiempo de retención de 1,15 aproximadamente con relación al patrón interno y de 0,90 con relación al estigmasta-3,5-dieno.

Si se utiliza hidrógeno como gas portador, el pico del patrón interno aparece a un tiempo de retención de 15 minutos aproximadamente y el del estigmasta-3,5-dieno al tiempo de retención relativo de 1,33 aproximadamente. El pico del campesta-3,5-dieno aparece al tiempo de retención de 1,18 aproximadamente con relación al patrón interno y de 0,88 aproximadamente con relación al estigmasta-3,5-dieno.

El campesta-3,5-dieno y el estigmasta-3,5-dieno pueden aparecer con pequeñas cantidades de los isómeros 2,4 respectivos. Normalmente, estos dos grupos de compuestos se eluyen juntos y dan lugar a dos picos cromatográficos. No obstante, si la columna es demasiado polar o demuestra tener un poder de resolución elevado, los isómeros 2,4 pueden presentarse como un pequeño pico y aparecer

antes y al lado del pico de los isómeros 3,5 respectivos (**Figura 3**). Con el fin de asegurar la elución en un solo pico de los estigmastadienos, se recomienda sustituir la columna por una columna de polaridad inferior o que tenga un diámetro interior mayor.

**Nota 6:** Las referencias cromatográficas de estos hidrocarburos esteroideos pueden obtenerse analizando muestras de aceite de palma o de girasol refinado o de aceite de girasol calentado con 10% v/p de ácido sulfúrico: agua (1:1) a 150°C durante 5 minutos.

### 6.2.3 Análisis cuantitativo.

El contenido en estigmastadienos se determina según la fórmula:

$$\text{mg/kg de estigmastadienos} = \frac{A_e * M_c}{A_c * M_o}$$

siendo:

$A_e$  = área del pico de los estigmastadienos.

$A_c$  = área del patrón interno.

$M_c$  = masa, en microgramos, del patrón interno añadido.

$M_o$  = masa, en gramos, del aceite tomado.

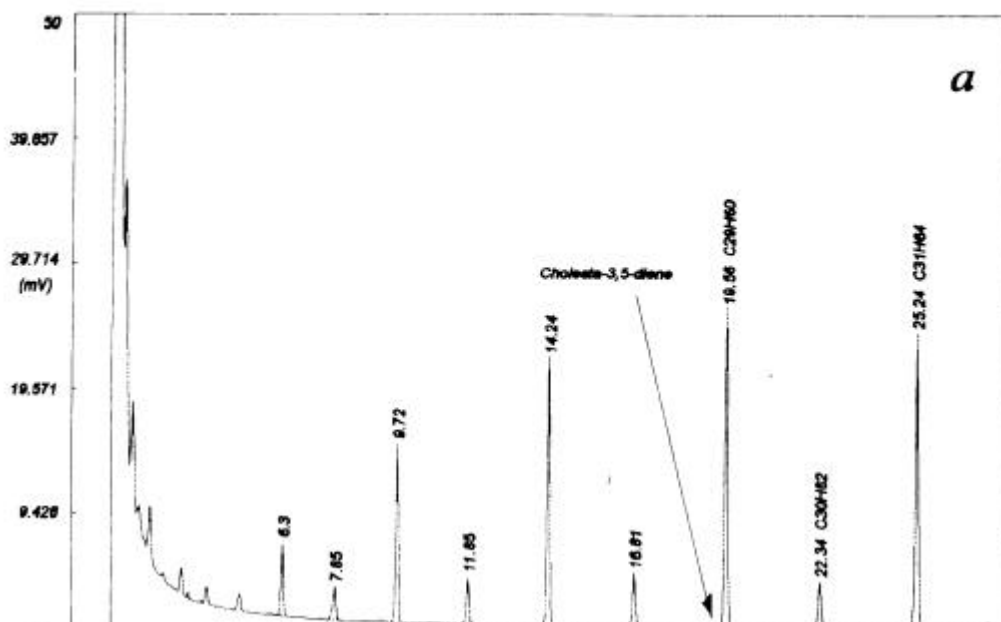
Las relaciones entre los hidrocarburos se calculan como sigue:

$$R1 = \frac{\text{área del pico de los estigmastadienos}}{\text{área del pico de los campestadienos}}$$

Normalmente, cada par de isómeros proporciona un solo pico cromatográfico; no obstante, si los dos isómeros dan origen a dos picos diferentes, las dos áreas deben sumarse.

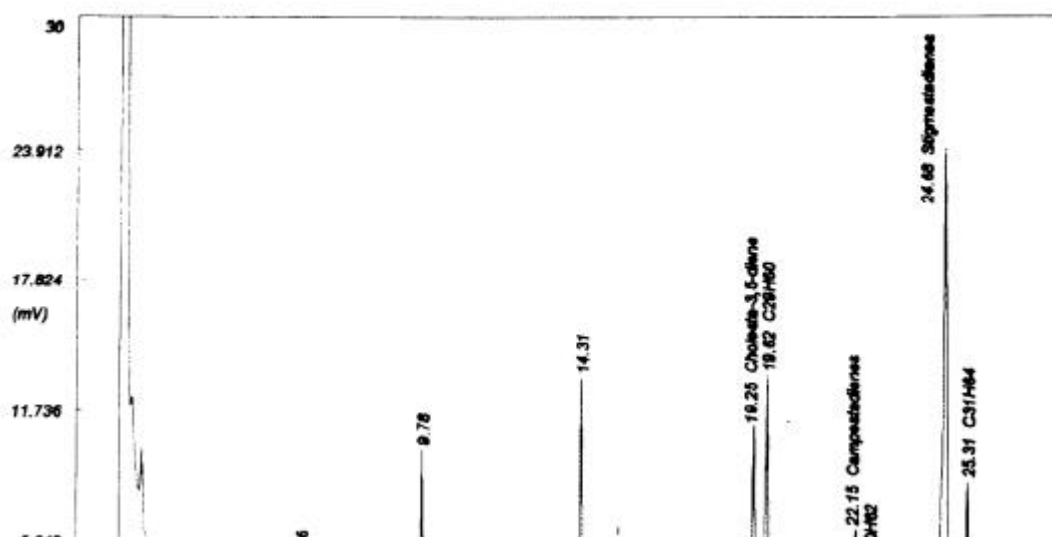
Para que estas relaciones sean válidas, la altura del pico de los estigmastadienos debe alcanzar al menos el 50% de la escala del registrador.

**Nota 7.** Si la cantidad de estigmastadienos es superior a 50 ppm, el análisis debe repetirse en una muestra de aceite más pequeña con el fin de obtener una cuantificación más exacta.

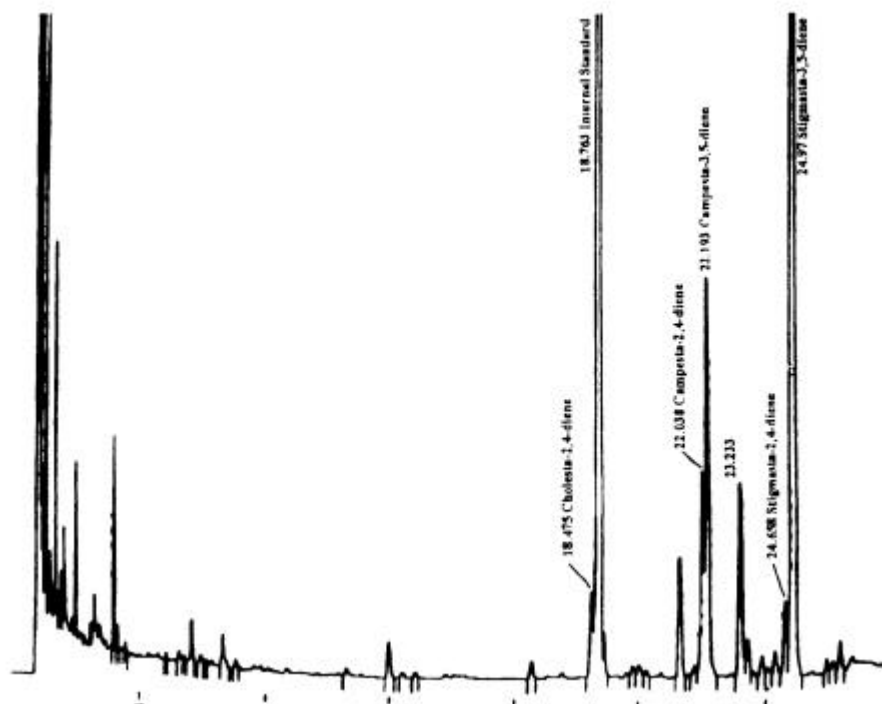


**Figura 1.** Cromatogramas de las fracciones primera y segunda obtenidos a partir de muestras analizadas en columna capilar (0,25 mm de diámetro interno por 25 m de longitud) recubierta interiormente con una fase de fenilmetilsilicona al 5% (película de 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor), utilizando helio como gas portador.

- (a) Primera fracción de una muestra de aceite de oliva.
- (b) Segunda fracción de una muestra de aceite de cacahuete.



**Figura 2.** Cromatograma (1<sup>a</sup> + 2<sup>a</sup> fracción) obtenido a partir de una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceite de girasol desesterolizado, analizado en columna capilar (de 0,25 mm de diámetro interno por 25 m de longitud) recubierta interiormente con una fase de fenilmetilsilicona al 5% (película de 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor), utilizando helio como gas portador.





**Figura 3.** Cromatograma de la segunda fracción de la muestra de aceite de palma, analizado en columna polar (fase de fenilmetilsilicona al 65%) que muestra los isómeros de los estereno.

## 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:

<b>n</b>	Número de laboratorios que participaron en los ensayos
<b>outliers</b>	Número de laboratorios con resultados aberrantes
<b>mean</b>	Media de los resultados aceptados
<b>r</b>	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
<b>S<sub>r</sub></b>	Desviación estándar de repetibilidad
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	Coefficiente de variación de repetibilidad ( $S_r \times 100 / \text{mean}$ )
<b>R</b>	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
<b>S<sub>R</sub></b>	Desviación estándar de reproducibilidad
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	Coefficiente de variación de reproducibilidad ( $S_R \times 100 / \text{mean}$ )

### Relación R1 de esterenos

	A	B	C	D	E
<b>n</b>			18		19
<b>outliers</b>			5		7
<b>mean</b>			19.96		15.86
<b>r</b>			1.67		1.25
<b>S<sub>r</sub></b>			0.59		0.45
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>			3.00		2.84
<b>R</b>			4.38		3.04
<b>S<sub>R</sub></b>			1.56		1.08

<b>RSD<sub>R</sub>(%)</b>	7.85	6.86
---------------------------	------	------

## **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