



## **MÉTODO DE ANÁLISIS**

### **PRUEBA ESPECTROFOTOMÉTRICA EN EL ULTRAVIOLETA**

#### **INTRODUCCIÓN**

La prueba espectrofotométrica en el ultravioleta puede proporcionar indicaciones sobre la calidad de una materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos.

Las absorciones en las longitudes de onda indicadas en el método se deben a la presencia de sistemas diénicos y triénicos conjugados. Los valores de estas absorciones se expresan en extinción específica  $E_{1\%}^{1\text{ cm}}$  (extinción de una solución de la materia grasa al 1% en el disolvente determinado, en un espesor de 1 cm) que se expresará convencionalmente como K, también denominado coeficiente de extinción.

#### **1. OBJETO**

El método describe el procedimiento de ejecución de la prueba espectrofotométrica en el ultravioleta de las materias grasas.

#### **2. PRINCIPIO**

La materia grasa se disuelve en el disolvente requerido y se determina la extinción de la solución a las longitudes de onda prescritas, respecto al disolvente puro. A partir de los valores espectrofotométricos se calculan las extinciones específicas.

#### **3. MATERIAL Y APARATOS**

- 3.1. Espectrofotómetro para medidas de extinción en el ultravioleta entre 220 y 360 nm, con posibilidad de lectura para cada unidad nanométrica.
- 3.2. Cubetas de cuarzo, con tapadera, con paso óptico de 1 cm. Las cubetas, llenas de agua o de otro disolvente adecuado, no deben presentar entre ellas diferencias superiores a 0,01 unidades de extinción.
- 3.3. Matraces aforados de 25 ml.
- 3.4. Columna de cromatografía, de 450 mm de longitud y 35 mm de diámetro, equipada con un tubo de reflujo de un diámetro aproximado de 10 mm.

#### **4. REACTIVOS**

- 4.1. Isooctano (2,2,4-trimetilpentano) para espectrofotometría: debe tener, respecto al agua destilada, una transmitancia del 60% como mínimo a 220 nm y del 95% como mínimo a 250 nm;
- o
- ciclohexano de calidad para espectrofotometría: debe tener, respecto al agua destilada, una transmitancia del 40% como mínimo a 220 nm y del 95% como mínimo a 250 nm; u
  - otro disolvente adecuado, que permita obtener una disolución completa de la materia grasa (por ejemplo, alcohol etílico para el aceite de ricino).
- 4.2. Alúmina básica para cromatografía en columna, preparada y controlada como se describe en el apéndice I.
- 4.3. n-Hexano para cromatografía.

## **5. PROCEDIMIENTO**

- 5.1. La muestra debe ser perfectamente homogénea y estar exenta de impurezas en suspensión. Los aceites líquidos a temperatura ambiente se filtran con papel de filtro a una temperatura aproximada de 30°C, las grasas sólidas se homogeneizan y se filtran a una temperatura superior en 10°C como máximo a su temperatura de fusión.
- 5.2. Se pesan con precisión 0,25 g aproximadamente de la muestra preparada y se colocan en un matraz aforado de 25 ml, se completa con el disolvente adecuado y se homogeneiza. La solución resultante debe estar perfectamente clara. Si presenta opalescencia o turbidez, se filtrará rápidamente con papel de filtro.
- 5.3. Se llena una cubeta con la solución obtenida y se miden las extinciones, usando como referencia el disolvente empleado, a las longitudes de onda comprendidas entre 232 y 276 nm. Los valores de extinción obtenidos deben estar comprendidos en el intervalo entre 0,1 y 0,8; en caso contrario es necesario repetir la medida utilizando soluciones más concentradas o más diluidas según el caso.
- 5.4. Cuando se quiera determinar la extinción específica después del tratamiento con alúmina se procederá del siguiente modo: en la columna para cromatografía se introducen 30 g de alúmina básica en suspensión en hexano; después de asentarse el absorbente se elimina el exceso de hexano, hasta 1 cm aproximadamente sobre el nivel superior de la alúmina. Se disuelven 10 g de materia grasa, homogeneizada y filtrada tal como se describe en el punto 5.1, en 100 ml de hexano y se vierte esta solución en la columna. Se recoge el líquido eluido y se evapora totalmente el disolvente en vacío a una temperatura inferior a 25°C. Con la materia grasa así obtenida se procede inmediatamente tal como se indica en el punto 5.2.

## **6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS**

- 6.1. Se expresan las extinciones específicas (coeficientes de extinción) a las diversas longitudes de onda, calculadas como sigue:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s}$$

donde:

$K_{\lambda}$  : extinción específica a la longitud de onda  $\lambda$  ;

$E_{\lambda}$  : extinción medida a la longitud de onda  $\lambda$  ;

$c$  : concentración de la disolución en g por 100 ml;

$s$  : espesor de la cubeta en cm.

Los resultados deben expresarse con dos decimales.

- 6.2. La prueba espectrofotométrica del aceite de oliva según el método oficial de los reglamentos oficiales de la Comunidad Europea requiere la determinación de la extinción específica, en solución en isoctano, a las longitudes de onda de 232 y 270 nm, y la determinación de la variación de la extinción específica ( $\Delta K$ ) definida como:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} - 4 + K_{m+4}}{2}$$

donde  $K_m$  es la extinción específica a la longitud de onda  $m$ , longitud de onda de máxima absorción alrededor de 270 nm.

## APÉNDICE I

### Preparación de la alúmina y control de su actividad

#### A.1.1. Preparación de la alúmina

En un recipiente que pueda cerrarse herméticamente se echa la alúmina previamente desecada en horno a 380-400°C durante tres horas, se añade agua destilada en una proporción de 5 ml por 100 g de alúmina, se cierra rápidamente el recipiente, se agita repetidas veces y se deja reposar durante 12 horas como mínimo antes del uso.

#### A.1.2. Control de la actividad de la alúmina

Se prepara una columna para cromatografía con 30 g de alúmina. Se opera tal como se describe en el apartado 5.4. Se hace pasar a través de la columna una mezcla formada por:

- 95% de aceite de oliva virgen, con extinción específica a 268 nm menor que 0,18,

- 5% de aceite de cacahuete tratado con tierras decolorantes en el proceso de refinado, con una extinción específica a 268 nm mayor o igual que 4.

Si, después del paso por la columna, la mezcla presenta una extinción específica a 268 nm mayor que 0,11, la alúmina es aceptable; en otro caso se debe aumentar el porcentaje de hidratación.

### **Ajuste del espectrofotómetro**

- A.2. El aparato debe revisarse periódicamente (por lo menos cada seis meses) tanto en lo que se refiere a la conformidad de la longitud de onda como a la exactitud de la respuesta.
- A.2.1. El control de la respuesta de la longitud de onda puede hacerse mediante una lámpara de vapor de mercurio o mediante filtros adecuados.
- A.2.2. Para controlar la célula fotoeléctrica y el fotomultiplicador se procede como sigue: se pesan 0,2000 g de cromato potásico de calidad para espectrofotometría, se disuelven, en un matraz aforado de 1000 ml, en una solución de hidróxido potásico 0,05 N y se completa hasta el enrase. De la solución obtenida se toman exactamente 25 ml, se transvasan a un matraz aforado de 500 ml y se completa hasta el enrase con la misma solución de hidróxido potásico.

Se mide la extinción a 275 nm de la solución así obtenida, utilizando la solución de hidróxido potásico como referencia. La extinción medida en cubeta de 1 cm deberá ser de  $0,200 \pm 0,005$ .

### **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<sub>r</sub>** Desviación estándar de repetibilidad
- RSD<sub>r</sub> (%)** 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<sub>R</sub>** Desviación estándar de reproducibilidad
- RSD<sub>R</sub> (%)** Coeficiente de variación de reproducibilidad ( $S_R \times 100 / \text{mean}$ )

## Absorbancia en el ultravioleta

### - a 270 nm

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
<b>n</b>	17	18	18	18	18
<b>outliers</b>	3	0	1	0	5
<b>mean</b>	0.110	0.253	0.202	0.212	0.561
<b>r</b>	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018
<b>S<sub>r</sub></b>	0.002	0.004	0.004	0.006	0.007
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	1.961	1.431	2.283	2.691	1.191
<b>R</b>	0.016	0.026	0.021	0.031	0.020
<b>S<sub>R</sub></b>	0.006	0.009	0.008	0.011	0.007
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	5.052	3.770	3.872	5.470	1.302

### -Delta K

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
<b>n</b>	17	18	18	18	18
<b>outliers</b>	1	2	0	1	1
<b>mean</b>	0.000	0.020	0.010	0.003	0.040
<b>r</b>	-	0.000	0.003	0.002	0.007
<b>S<sub>r</sub></b>	-	0.001	0.001	0.001	0.003
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	-	7.720	17.920	25.660	6.421
<b>R</b>	-	0.004	0.006	0.004	0.017
<b>S<sub>R</sub></b>	-	0.002	0.002	0.002	0.006
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	-	8.271	37.021	50.201	14.210

## 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