



MÉTODO DE ANÁLISIS

DETERMINACIÓN DE LA DIFERENCIA ENTRE EL CONTENIDO REAL Y EL CONTENIDO TEÓRICO EN TRIGLICÉRIDOS CON ECN 42

1. Objeto

Determinación de la diferencia existente entre el valor teórico de los triglicéridos (TG) de número de carbonos equivalente a 42 ($ECN42_{teórico}$), calculado a partir de la composición en ácidos grasos, y los resultados analíticos ($ECN42_{HPLC}$) obtenidos por determinación en el aceite mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

2. Campo de aplicación

La presente norma es aplicable a los aceites de oliva. El método puede utilizarse para detectar la presencia de pequeñas cantidades de aceites de semillas (ricos en ácido linoleico) en todos los tipos de aceites de oliva.

3. Principio

El contenido teórico de triglicéridos con ECN 42 (calculado sobre la base de la determinación de la composición de ácidos grasos mediante GLC) y el contenido de triglicéridos con ECN 42 determinado mediante HPLC se corresponden dentro de unos límites en el caso de los aceites de oliva genuinos. Las diferencias superiores a los valores adoptados respecto a cada tipo de aceite indican que el aceite contiene aceites de semillas.

4. Método

El método para calcular la diferencia entre el contenido teórico y el contenido real de triglicéridos con ECN 42 se compone de tres fases :

- determinación de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases en columna capilar (GLC)
- cálculo de la composición teórica de triglicéridos con ECN 42
- determinación de los triglicéridos con ECN 42 mediante HPLC.

4.1. Aparatos

- 4.1.1. Matraces de fondo redondo de 250 y 500 ml.
- 4.1.2. Vasos de precipitados de 100 ml.
- 4.1.3. Columna de vidrio para cromatografía, de 21 mm de diámetro interior y 450 mm de longitud, con llave en el extremo inferior y con unión cónica (hembra) normalizada en el extremo superior.
- 4.1.4. Embudos de decantación de 250 ml, con cono (macho) normalizado en el extremo inferior, para conexión con el extremo superior de la columna.
- 4.1.5. Varilla de vidrio de 600 mm de longitud.
- 4.1.6. Embudo de vidrio de 80 mm de diámetro.
- 4.1.7. Matraces aforados de 50 ml.
- 4.1.8. Matraces aforados de 20 ml.
- 4.1.9. Evaporador rotatorio.
- 4.1.10. Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia, con control termostático de la temperatura de la columna.
- 4.1.11. Sistema de inyección cromatográfico para volúmenes de 10 µl.
- 4.1.12. Detector cromatográfico de tipo refractómetro diferencial. La sensibilidad de toda la escala deberá ser como mínimo de 10^{-4} unidades de índice de refracción.
- 4.1.13. Columna cromatográfica de acero inoxidable de 250 mm de longitud y 4,5 mm de diámetro interno, rellena de partículas de sílice de 5 µm de diámetro con un 22 - 23% de carbono en forma de octadecilsilano*.
- 4.1.14. Registrador-integrador de la señal.

* Ejemplos: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333
Lichosphere (Merck) 100 CH18 arr 50377 o equivalente

4.2. Reactivos

Los reactivos deberán ser de calidad para análisis. Los disolventes de elución deberán desgasificarse y podrán reciclarse varias veces sin que ello afecte a las separaciones.

- 4.2.1. Éter de petróleo, 40 - 60°C, para cromatografía.
- 4.2.2. Éter etílico, libre de peróxidos, recién destilado.
- 4.2.3. Disolvente de elución para la purificación del aceite por cromatografía en columna: mezcla de éter de petróleo/éter etílico 87:13 (v/v).
- 4.2.4. Gel de sílice, 70 - 230 mallas, tipo Merck 7734, con contenido de agua normalizado al 5% (p/p)
- 4.2.5. Lana de vidrio.
- 4.2.6. Acetona para HPLC.

- 4.2.7. Acetonitrilo para HPLC.
- 4.2.8. Disolvente de elución para HPLC: acetonitrilo + acetona (las proporciones se ajustarán para obtener la separación deseada; comenzar con una mezcla de 50:50 (v:v) ó propionitrilo.
- 4.2.9. Disolvente de solubilización: acetona.
- 4.2.10. Triglicéridos de referencia: pueden utilizarse triglicéridos comerciales (tripalmitina, trioleína, etc.), en cuyo caso se reflejarán en un gráfico los tiempos de retención frente al número equivalente de carbono, o bien cromatogramas de referencia correspondientes a aceite de soja, a una mezcla de aceite de soja y aceite de oliva 30:70 y a aceite de oliva puro (véanse las notas 1 y 2 y las figuras 1, 2, 3 y 4).

4.3. Preparación de la muestra

Como pueden obtenerse falsos resultados positivos debido a la presencia de diversas sustancias que interfieren, la muestra debe someterse siempre a un proceso de purificación según el método IUPAC 2.507, relativo a la determinación de los compuestos polares en las grasas de fritura.

4.3.1. Preparación de la columna cromatográfica

Llenar la columna (4.1.3.) con aproximadamente 30 ml de disolvente de elución (4.2.3.); introducir un poco de lana de vidrio (4.2.5.), empujándola hasta el fondo de la columna con la varilla de vidrio (4.1.5.).

Preparar en un vaso de precipitados de 100 ml una suspensión con 25 g de gel de sílice (4.2.4.) en 80 ml de la mezcla de elución (4.2.3.) y transferirla a la columna con ayuda de un embudo de vidrio (4.1.6.).

Para realizar la transferencia total del gel de sílice a la columna, lavar el vaso de precipitados con la mezcla de elución y pasar también los líquidos de lavado a la columna.

Abrir la llave de la columna y dejar que salga el disolvente de ella hasta que su nivel se sitúe aproximadamente 1 cm por encima del gel de sílice.

4.3.2. Cromatografía en columna

Pesar, con la precisión de 0,001 g, $2,5 \pm 0,1$ g de aceite previamente filtrado, homogeneizado y, en caso necesario, deshidratado, en un matraz aforado de 50 ml (4.1.7.). Disolver en 20 ml aproximadamente de disolvente de elución (4.2.3.). Si es necesario, calentar ligeramente para facilitar la disolución. Enfriar a temperatura ambiente y enrasar con el disolvente de elución.

Con una pipeta aforada introducir 20 ml de solución preparada como se indica en 4.3.1., abrir el grifo y eluir el disolvente hasta que alcance el nivel superior de la capa de gel de sílice de la columna.

Eluir con 150 ml de disolvente de elución (4.2.3.), regulando el flujo de disolvente a 2 ml por minuto aproximadamente (de modo que pasen a través de la columna 150 ml en 60-70 minutos).

Recoger el eluido en un matraz redondo de 250 ml (4.1.1.) previamente tarado y pesado exactamente. Eliminar el disolvente a presión reducida (Rotavapor) y pesar el residuo que se utilizará en la preparación de la solución para el análisis por HPLC y en la preparación de los ésteres metílicos.

Tras pasar por la columna, debe recuperarse como mínimo un 90% de la muestra en el caso de aceite de oliva de las categorías virgen extra, virgen corriente, aceite de oliva refinado y aceite de oliva, mientras que en el de los aceites de oliva vírgenes lampantes y de los aceites de orujo de oliva los porcentajes de recuperación no pueden ser inferiores al 80%.

4.4. SEPARACION POR HPLC DE LOS TRIGLICÉRIDOS

4.4.1. Preparación de la muestra para el análisis cromatográfico

Preparar una solución al 5% de la muestra que vaya a analizarse del siguiente modo: pesar $0,5 \pm 0,001$ g de la muestra en un matraz aforado de 10 ml y enrasar con el disolvente de solubilización (4.2.9.).

4.4.2. Procedimiento

Poner en marcha el sistema cromatográfico, bombeando el disolvente de elución (4.2.8.) a un flujo de 1,5 ml por minuto para purgar todo el sistema. Esperar hasta que se obtenga una línea de base estable. Inyectar 10 µl de la muestra preparada como se indica en el punto.

4.4.3. Cálculo y expresión de los resultados

Utilizar el método de normalización interna, es decir, considerar que la suma de las áreas de los picos correspondientes a los triglicéridos con ECN comprendido entre 42 y 52, ambos inclusive, es igual a 100. Calcular el porcentaje relativo de cada triglicérido mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de triglicérido} = \text{área del pico} \times 100 / \text{suma de las áreas de todos los picos}$$

El resultado se expresa con dos decimales como mínimo.

Ver notas 1, 2, 3 y 4.

4.5. Cálculo de la composición teórica de los triglicéridos (% moles) a partir de los datos experimentales por GLC de composición en ácidos grasos (% de área)

4.5.1. Determinación de la composición de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos se determina con arreglo al método ISO 5508, utilizando columna capilar. La preparación de los ésteres metílicos se realiza según el método COI/T.20/Doc.n° 24.

4.5.2. Ácidos grasos considerados para el cálculo

Los triglicéridos se agrupan en función de su número equivalente de carbono (ECN), teniendo en cuenta las equivalencias que figuran a continuación entre ECN y ácidos grasos. Sólo se han considerado los ácidos grasos con 16 y 18 átomos de carbono, ya que son los mayoritarios en el aceite de oliva.

Ácido graso (AG)	Abreviatura	Peso molecular (PM)	ECN
Ácido palmítico	P	256,4	16
Ácido palmitoleico	Po	254,4	14
Ácido esteárico	S	284,5	18
Ácido oleico	O	282,5	16
Ácido linoleico	L	280,4	14
Ácido linolénico	Ln	278,4	12

4.5.3. Transformación del porcentaje de área en moles de cada los ácidos grasos

$$\begin{array}{l}
 \text{moles P} = \frac{\% \text{ sup. P}}{\text{PM P}} \quad \text{moles S} = \frac{\% \text{ sup. S}}{\text{PM S}} \quad \text{moles Po} = \frac{\% \text{ sup. Po}}{\text{PM Po}} \\
 \text{moles O} = \frac{\% \text{ sup. O}}{\text{PM O}} \quad \text{moles L} = \frac{\% \text{ sup. L}}{\text{PM L}} \quad \text{moles Ln} = \frac{\% \text{ sup. Ln}}{\text{PM Ln}}
 \end{array} \quad (1)$$

4.5.4. Normalización al 100% de los ácidos grasos

$$\begin{array}{l}
 \% \text{ moles P (1,2,3)} = \frac{\text{moles P} * 100}{\text{moles (P +S +Po +O +L +Ln)}} \\
 \% \text{ moles S (1,2,3)} = \frac{\text{moles S} * 100}{\text{moles (P +S +Po +O +L +Ln)}} \\
 \% \text{ moles Po (1,2,3)} = \frac{\text{moles Po} * 100}{\text{moles (P +S+Po+O +L +Ln)}} \\
 \% \text{ moles O (1,2,3)} = \frac{\text{moles O} * 100}{\text{moles (P +S+Po +O +L +Ln)}} \\
 \% \text{ moles L (1,2,3)} = \frac{\text{moles L} * 100}{\text{moles (P +S +Po +O +L +Ln)}} \\
 \% \text{ moles Ln (1,2,3)} = \frac{\text{moles Ln} * 100}{\text{moles (P +S +Po +O +L+Ln)}}
 \end{array} \quad (2)$$

El resultado proporciona el porcentaje de cada ácido graso en % moles en todas las posiciones (1, 2 y 3) de los TG.

A continuación se calculan la suma de los ácidos grasos saturados (AGS) P y S y los ácidos grasos insaturados (AGI) Po, O, L y Ln:

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles AGS} &= \% \text{ moles P} + \% \text{ moles S} \\ \% \text{ moles AGI} &= 100 - \% \text{ moles AGS.} \end{aligned} \right\} (3)$$

4.5.5. Cálculo de la composición de los ácidos grasos en las posiciones 2 y 1-3 de los TG

Los ácidos grasos se distribuyen en tres grupos del siguiente modo: dos idénticos para las posiciones 1 y 3 y uno para la posición 2, con coeficientes diferentes para los ácidos saturados (P y S) y los insaturados (Po, O, L y Ln).

4.5.5.1. Ácidos grasos saturados en la posición 2 [P(2) y S(2)] de los TG

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles P(2)} &= \% \text{ moles P (1,2,3)} * 0,06 \\ \% \text{ moles S(2)} &= \% \text{ moles S (1,2,3)} * 0,06 \end{aligned} \right\} (4)$$

4.5.5.2. Ácidos grasos insaturados en la posición 2 [(Po(2), O(2), L(2) y Ln(2)] de los TG:

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles Po(2)} &= \frac{\% \text{ moles Po(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * (100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}) \\ \% \text{ moles O(2)} &= \frac{\% \text{ moles O(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * (100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}) \\ \% \text{ moles L(2)} &= \frac{\% \text{ moles L(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * (100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}) \\ \% \text{ moles Ln(2)} &= \frac{\% \text{ moles Ln(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * (100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}) \end{aligned} \right\} (5)$$

4.5.5.3 Ácidos grasos en las posiciones 1 y 3 [(P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) y Ln(1,3)] :

$$\begin{aligned} \% \text{ moles P(1,3)} &= \frac{\% \text{ moles P(1,2,3)} - \% \text{ moles P(2)}}{2} + \% \text{ moles P(1,2,3)} \\ \% \text{ moles S(1,3)} &= \frac{\% \text{ moles S(1,2,3)} - \% \text{ moles S(2)}}{2} + \% \text{ moles S(1,2,3)} \\ \% \text{ moles Po(1,3)} &= \frac{\% \text{ moles Po(1,2,3)} - \% \text{ moles Po(2)}}{2} + \% \text{ moles Po(1,2,3)} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \% \text{ moles P(1,3)} \\ \% \text{ moles S(1,3)} \\ \% \text{ moles Po(1,3)} \end{aligned}} \right\} (6)$$

$$\begin{aligned} \% \text{ moles O(1,3)} &= \frac{\% \text{ moles O(1,2,3)} - \% \text{ moles O(2)}}{2} + \% \text{ moles O(1,2,3)} \\ \% \text{ moles L(1,3)} &= \frac{\% \text{ moles L(1,2,3)} - \% \text{ moles L(2)}}{2} + \% \text{ moles L(1,2,3)} \\ \% \text{ moles Ln(1,3)} &= \frac{\% \text{ moles Ln(1,2,3)} - \% \text{ moles Ln(2)}}{2} + \% \text{ moles Ln(1,2,3)} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \% \text{ moles O(1,3)} \\ \% \text{ moles L(1,3)} \\ \% \text{ moles Ln(1,3)} \end{aligned}} \right\} (6)$$

4.5.6. Cálculo de los triglicéridos

4.5.6.1. TG con un ácido graso (AAA; en este caso, LLL, PoPoPo)

$$\% \text{ moles AAA} = \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles A(2)} * \% \text{ moles A(1,3)}}{10.000} \quad \left. \vphantom{\% \text{ moles AAA}} \right\} (7)$$

4.5.6.2. TG con dos ácidos grasos (AAB; en este caso, PoPoL, PoLL)

$$\begin{aligned} \% \text{ moles AAB} &= \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles A(2)} * \% \text{ moles B(1,3)} * 2}{10.000} \\ \% \text{ moles ABA} &= \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles B(2)} * \% \text{ moles A(1,3)}}{10.000} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \% \text{ moles AAB} \\ \% \text{ moles ABA} \end{aligned}} \right\} (8)$$

4.5.6.3. TG con tres ácidos grasos diferentes (ABC; en este caso, OLLn, PLLn, PoOLn, PPOLn)

$$\% \text{ moles ABC} = \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles B(2)} * \% \text{ moles C(1,3)} * 2}{10.000}$$

$$\% \text{ moles BCA} = \frac{\% \text{ moles B(1,3)} * \% \text{ moles C(2)} * \% \text{ moles A(1,3)} * 2}{10.000}$$

$$\% \text{ moles CAB} = \frac{\% \text{ moles C(1,3)} * \% \text{ moles A(2)} * \% \text{ moles B(1,3)} * 2}{10.000}$$

} (9)

4.5.6.4. Composición teórica de triglicéridos con ECN 42

Los triglicéridos con ECN 42 se calculan según las ecuaciones 7, 8 y 9 y se relacionan a continuación según el orden previsto de elución en la cromatografía de HPLC (normalmente se observan sólo tres picos cromatográficos).

LLL

PoLL e isómero de posición LPoL

OLLn e isómeros de posición OLnL y LnOL

PoPoL e isómero de posición PoLPo

PoOLn e isómeros de posición OPoLn y OLnPo

PLLn e isómeros de posición LLnP y LnPL

PoPoPo

SLnLn e isómero de posición LnSLn

PPOLn e isómeros de posición PLnPo y PoPLn

La composición teórica de triglicéridos con ECN 42 se obtienen mediante la suma de los nueve triglicéridos, incluidos sus isómeros de posición. El resultado se expresa con dos decimales, como mínimo.

5. Evaluación de los resultados

Se comparan el contenido teórico calculado y el determinado por HPLC. Si la diferencia entre los datos de HPLC y los datos teóricos es superior a los valores establecidos en la Norma en vigor para la categoría correspondiente de aceite, la muestra contiene aceite de semillas.

Los resultados de la diferencia se expresan con un decimal.

6. Ejemplo (la numeración hace referencia a las secciones del texto del método)

- 4.5.1. Cálculo del porcentaje de moles de los ácidos grasos a partir de los datos obtenidos por GLC (% área)

Los datos siguientes de la composición de ácidos grasos se obtienen mediante CPG:

AG	P	S	Po	O	L	Ln
PM	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
% centésimal	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

- 4.5.3. Transformación del % de área en moles para todos los ácidos grasos

$$\text{moles P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles P}$$

$$\text{moles S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moles S}$$

$$\text{moles Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moles Po}$$

$$\text{moles O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles O}$$

$$\text{moles L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles L}$$

$$\text{moles Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ moles Ln}$$

$$\text{Total} = 0,35822 \text{ moles TG}$$

véase formula (1)

- **4.5.4. Normalización al 100% de los ácidos grasos**

$$\% \text{ moles P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moles P} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 10,888\%$$

$$\% \text{ moles S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moles S} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 2,944\%$$

$$\% \text{ moles Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moles Po} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,097\%$$

$$\% \text{ moles O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moles O} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 74,113\%$$

$$\% \text{ moles L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moles L} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 9,956\%$$

$$\% \text{ moles Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moles Ln} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,003\%$$

véase fórmula (2)

Total % moles = 100,0%

Suma de los ácidos grasos saturados e insaturados en las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol:

$$\% \text{ moles AGS} = 10,888\% + 2,944\% = \mathbf{13,831\%}$$

$$\% \text{ moles AGI} = 100,000\% - 13,831\% = \mathbf{86,169\%}$$

véase fórmula (3)

- **4.5.5. Cálculo de la composición de ácidos grasos en las posiciones 2 y 1-3 del glicerol**

- **4.5.5.1. Ácidos grasos saturados en la posición 2 [P(2) y S(2)]**

$$\% \text{ moles P(2)} = 10,888\% * 0,06 = 0,653 \% \text{ moles}$$

$$\% \text{ moles S(2)} = 2,944\% * 0,06 = 0,177 \% \text{ moles}$$

véase fórmula (4)

- **4.5.5.2. Ácidos grasos insaturados en la posición 2 [Po(2), O(1,3), L(2) y Ln(2)]**

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles Po}(2) &= \frac{1,097\%}{86,169\%} * (100--0,659-0,177) = 1,263 \% \text{ moles} \\ \% \text{ moles O}(2) &= \frac{74,113\%}{86,169\%} * (100--0,659-0,177) = 85,295 \% \text{ moles} \\ \% \text{ moles L}(2) &= \frac{9,956\%}{86,169\%} * (100--0,659-0,177) = 11,458 \% \text{ moles} \\ \% \text{ moles Ln}(2) &= \frac{1,003\%}{86,169\%} * (100--0,659-0,177) = 1,154 \% \text{ moles} \end{aligned} \right\} \text{ véase fórmula (5)}$$

- **4.5.5.3 Ácidos grasos en las posiciones 1 y 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) y Ln(1,3)]**

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles P}(1,3) &= \frac{10,888 - 0,659}{2} + 10,888 = 16,005 \% \text{ moles} \\ \% \text{ moles S}(1,3) &= \frac{2,944 - 0,177}{2} + 2,944 = 4,327 \% \text{ moles} \\ \% \text{ moles Po}(1,3) &= \frac{1,097 - 1,263}{2} + 1,097 = 1,015 \% \text{ moles} \\ \% \text{ moles O}(1,3) &= \frac{74,113 - 85,295}{2} + 74,113 = 68,522 \% \text{ moles} \\ \% \text{ moles L}(1,3) &= \frac{9,956 - 11,458}{2} + 9,956 = 9,205 \% \text{ moles} \\ \% \text{ moles Ln}(1,3) &= \frac{1,003 - 1,154}{2} + 1,003 = 0,927\% \text{ moles} \end{aligned} \right\} \text{ véase fórmula (6)}$$

- **4.5.6. Cálculo de la composición teórica de triglicéridos con ECN 42**

A partir de la composición calculada de los ácidos grasos en las posiciones sn-2 y sn-1,3:

AG en	Posic. 1 y 3	Posic. 2
P	16,005%	0,653%
S	4,327%	0,177%
Po	1,015%	1,263%
O	68,522%	85,295%
L	9,205%	11,458%
Ln	0,927%	1,154%
Suma	100,0%	100,0%

se calculan los triglicéridos siguientes:

LLL

PoPoPo

PoLL con un isómero de posición

SLnLn con un isómero de posición

PoPoL con un isómero de posición

PPoLn con dos isómeros de posición

OLLn con dos isómeros de posición

PLLn con dos isómeros de posición

PoOLn con dos isómeros de posición

- **4.5.6.1. TG con un ácido graso (LLL, PoPoPo)**

Véase fórmula (7)

$$\% \text{ moles LLL} = \frac{9,205\% * 11,458\% * 9,205\%}{10.000} = \underline{\underline{0,09708 \text{ mol LLL}}}$$

$$\% \text{ moles PoPoPo} = \frac{1,015\% * 1,263\% * 1,015\%}{10.000} = \underline{\underline{0,00013 \text{ mol PoPoPo}}}$$

- **4.5.6.2 TG con dos ácidos grasos (PoLL, SLnLn, PoPoL)**

Véase fórmula (8)

$$\% \text{ moles PoLL+LLPo} = \frac{1,015\% * 11,458\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,02141$$

$$\% \text{ moles LPoL} = \frac{9,205\% * 1,263\% * 9,205\%}{10.000} = 0,01070$$

0,03211 mol PoLL

$$\% \text{ moles SLnLn+LnLnS} = \frac{4,327\% * 1,154\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,00093$$

$$\% \text{ moles LnSLn} = \frac{0,927\% * 0,177\% * 0,927\%}{10.000} = 0,00002$$

0,00095 mol SLnLn

$$\% \text{ moles PoPoL+LPoPo} = \frac{1,015\% * 1,263\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,00236$$

$$\% \text{ moles PoLPo} = \frac{1,015\% * 11,458\% * 1,015\%}{10.000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

- **4.5.6.3 TG con tres ácidos grasos diferentes (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)**

Véase fórmula (9)

$$\% \text{ moles PPoLn} = \frac{16,005\% * 1,263\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,00375$$

$$\% \text{ moles LnPPo} = \frac{0,927\% * 0,653\% * 1,015\% * 2}{10.000} = 0,00012$$

$$\% \text{ moles PoLnP} = \frac{1,015\% * 1,154\% * 16,005\% * 2}{10.000} = 0,00375$$

0,00762 mol PPoLn

$$\% \text{ moles OLLn} = \frac{68,522\% * 11,458\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,14577$$

$$\% \text{ moles LnOL} = \frac{0,927\% * 85,295\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,14577$$

$$\% \text{ moles LLnO} = \frac{9,205\% * 1,154\% * 68,522\% * 2}{10.000} = 0,14577$$

0,43671 mol OLLn

$$\% \text{ moles PLLn} = \frac{16,005\% * 11,458\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,03400$$

$$\% \text{ moles LnPL} = \frac{0,927\% * 0,653\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,00111$$

$$\% \text{ moles LLnP} = \frac{9,205\% * 1,154\% * 16,005\% * 2}{10.000} = 0,03400$$

0,06911 mol PLLn

$$\% \text{ moles PoOLn} = \frac{1,015\% * 85,295\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,01605$$

$$\% \text{ moles LnPoO} = \frac{0,927\% * 1,263\% * 68,522\% * 2}{10.000} = 0,01605$$

$$\% \text{ moles OLnPo} = \frac{68,522\% * 1,154\% * 1,015\% * 2}{10.000} = 0,01605$$

0,04815 mol PoOLn

composición teórica de TG con ECN42 = **0,69540 mol TG**

Nota 1: El orden de elución puede determinarse mediante el cálculo del número equivalente de carbono, que con frecuencia viene dado por la fórmula $ECN = CN - 2n$, siendo CN el número de carbono y n el número de enlaces dobles; puede calcularse con mayor precisión teniendo en cuenta el origen del enlace doble. Si n_o , n_l y n_{ln} son los números de enlaces dobles de los ácidos oleico, linoleico y linolénico, respectivamente, el número equivalente de carbono puede calcularse mediante la fórmula siguiente:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln},$$

siendo d_o , d_l y d_{ln} coeficientes que pueden calcularse mediante los triglicéridos de referencia. En las condiciones que se especifican en el presente método la fórmula obtenida será similar a la siguiente:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_l) - (2,17 n_{ln}).$$

Nota 2: Con varios triglicéridos de referencia también es posible calcular la resolución de un triglicérido con respecto a la trioleína:

$$\alpha = TR' / TR' \text{ trioleína}$$

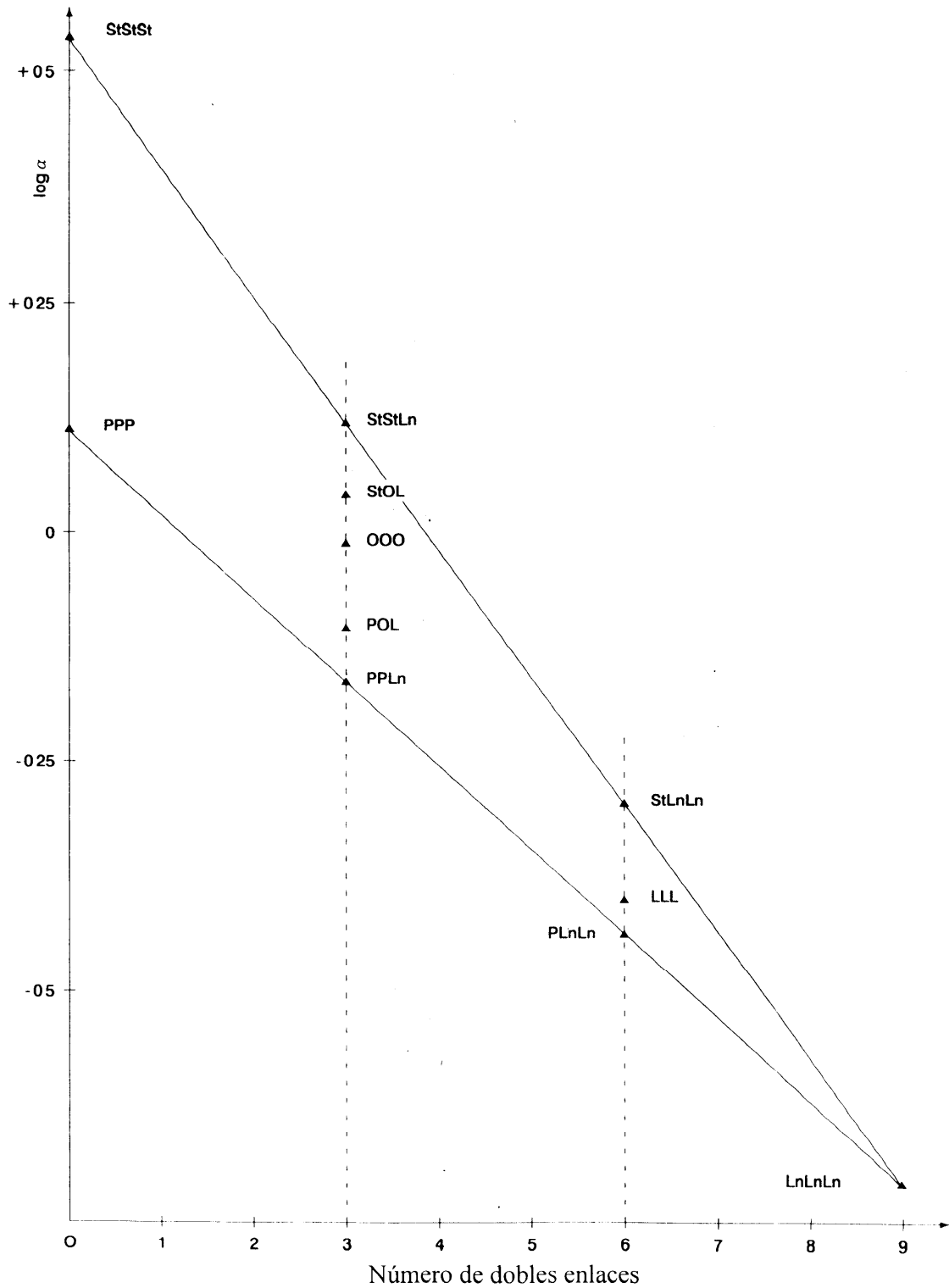
utilizando el tiempo de retención reducido $TR' = TR - TR \text{ disolvente}$.

La representación gráfica del $\log \alpha$ frente a f (número de enlaces dobles) permite determinar los valores de retención de todos los triglicéridos de los ácidos grasos contenidos en los triglicéridos de referencia (véase la figura 1).

Nota 3: La resolución de la columna debe permitir separar claramente el pico de la trilinoleína de los picos de los triglicéridos con un tiempo de retención próximo. La elución se prosigue hasta el pico con ECN 52.

Nota 4: Para obtener un cromatograma que permita una medida correcta de las áreas de todos los picos de interés en la presente determinación, es necesario que el segundo pico correspondiente al ECN 50 tenga una altura igual al 50% de la escala completa del registrador.

Figura 1: Evolución del log. α en función de f (número de dobles enlaces)



Nota: La: ácido laurico; My: ácido mirístico; P: ácido palmítico; St: ácido esteárico;
O: ácido oleico; L: ácido linoleico; Ln: ácido linolénico.

Figura 2: Aceite de soja

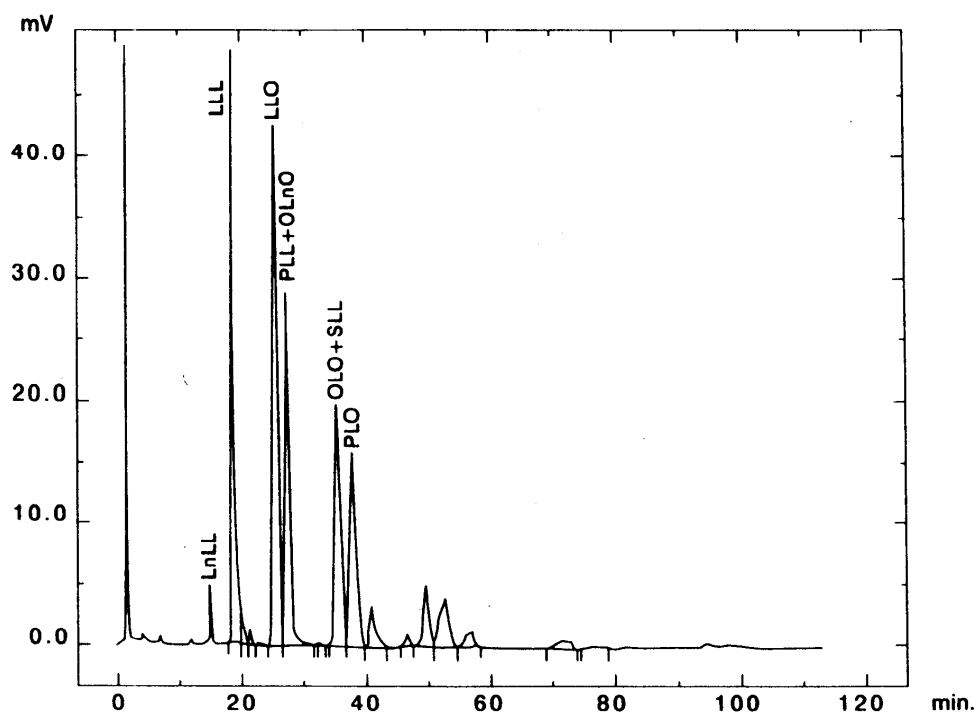


Figura 3: Aceite de soja / Aceite de oliva 30:70

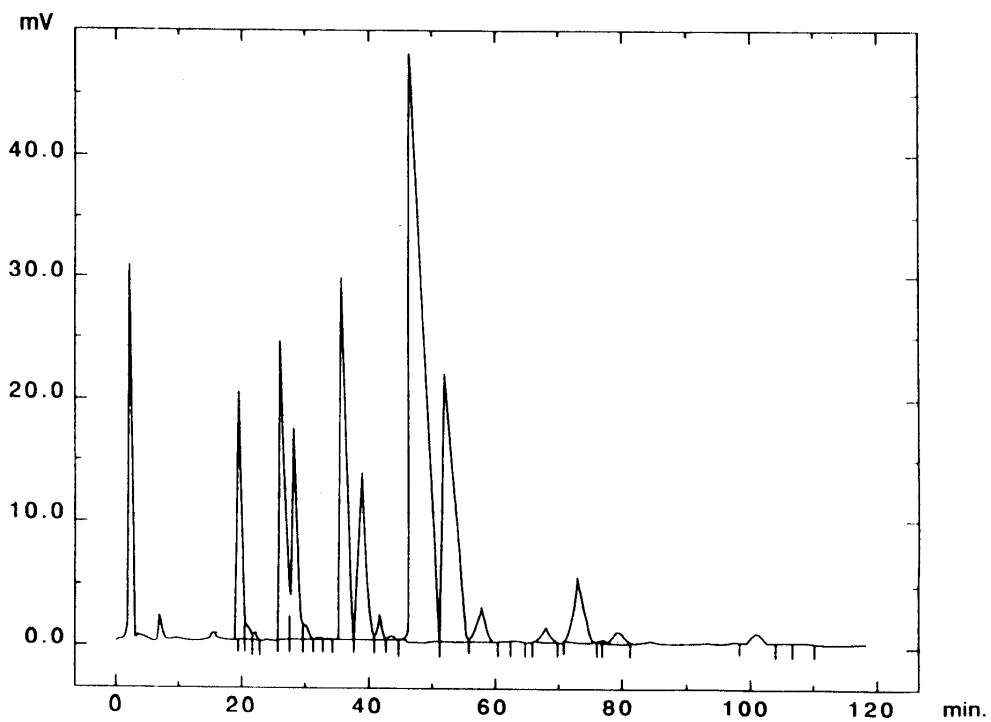
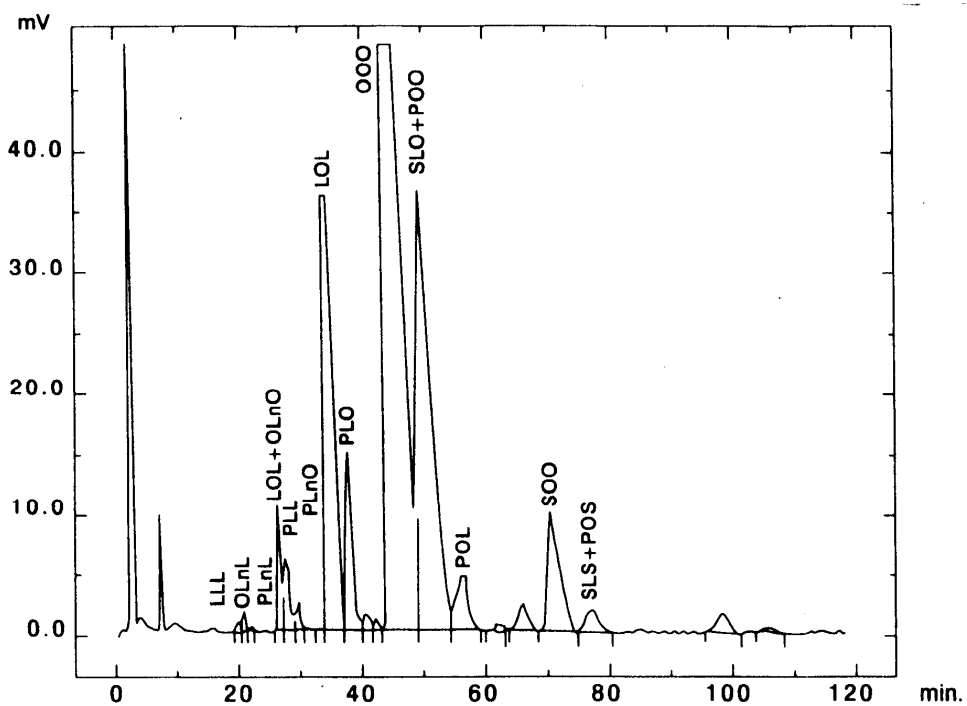


Figura 4: Aceite de oliva



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 ($S_R \times 100 / \text{mean}$)

Diferencia entre el contenido real y el contenido teórico en triglicéridos con ECN 42

	A	B	C	D	E
n	19	19	19	19	19
outliers	1	0	0	0	3
mean	0.04	1.66	0.04	0.18	0.82
r	0.08	0.12	0.09	0.11	0.11
S_r	0.02	0.04	0.03	0.04	0.041
RSD_r (%)	82.24 _(not sig.)	2.77	76.11 _(not sig.)	22.51	5.07
R	0.12	0.25	0.16	0.22	0.24
S_R	0.05	0.09	0.05	0.08	0.08
RSD_R(%)	127.56 _(not sig.)	5.42	132.17 _(not sig.)	46.19	10.85

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