



## MÉTODO DE ANÁLISIS

### DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y DEL CONTENIDO EN ESTEROLES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON COLUMNA CAPILAR

#### **1. OBJETO**

El presente método describe el procedimiento para la determinación del contenido en esteroleos individuales y totales de las materias grasas.

#### **2. PRINCIPIO DEL MÉTODO**

Saponificación de la materia grasa, a la que se habrá añadido  $\alpha$ -colestanol como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico; a continuación, extracción del insaponificable con éter etílico. Separación de la fracción de esteroleos del insaponificable extraído mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica; los esteroleos recuperados del gel de sílice se transforman en trimetisililéteres y se analizan mediante cromatografía de gases con columna capilar.

#### **3. MATERIAL**

- 3.1. Matraz de 250 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
- 3.2. Embudos de separación de 500 ml.
- 3.3. Matraces de 250 ml.
- 3.4. Equipo completo de cromatografía en capa fina, utilizando placas de vidrio de 20 x 20 cm.
- 3.5. Lámpara ultravioleta de una longitud de onda de 366 o 254 nm.
- 3.6. Microjeringa de 100  $\mu$ l y 500  $\mu$ l.
- 3.7. Embudo cilíndrico filtrante con filtro poroso G3  $\mu$ m (porosidad 15-40  $\mu$ m), de 2 cm de diámetro y 5 cm de altura, aproximadamente, con un dispositivo adecuado para la filtración en vacío y una junta esmerilada macho 12/21.

- 3.8 Matraz cónico para vacío de 50 ml, con junta esmerilada hembra 12/21 acoplable al embudo filtrante (3.7.).
- 3.9. Probeta de 10 ml de fondo cónico con tapón hermético.
- 3.10. Equipo de cromatografía de gases que pueda funcionar con columna capilar, formado por:
  - 3.10.1. Horno para la columna, que pueda mantener la temperatura deseada con precisión de  $\pm 1^{\circ}$  C.
  - 3.10.2. Inyector termorregulable con insert en vidrio persilanizado y divisor.
  - 3.10.3. Detector de ionización de llama y electrómetro.
  - 3.10.4. Registrador-integrador que pueda funcionar con el convertidor-amplificador (3.10.3), con un tiempo de respuesta no superior a 1 segundo y con velocidad de papel variable..
- 3.11 Columna capilar de vidrio o sílice fundida, de 20 a 30 m de longitud y de 0,25 a 0,32 mm de diámetro interno, recubierta interiormente de fase estacionaria SE 52 ó SE 54 o equivalente, con un espesor uniforme que oscile entre 0,10 y 0,30  $\mu$ m.
- 3.12 Microjeringa de 10  $\mu$ l para cromatografía de gases, con aguja endurecida.

#### **4. REACTIVOS**

- 4.1. Hidróxido potásico, solución etanólica 2N aproximadamente: disolver, enfriando al mismo tiempo, 130 g de hidróxido potásico (valoración mínima del 85%) en 200 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol. Conservar la solución en botellas de vidrio oscuro bien cerradas (etanol 95 % v/v).
- 4.2. Eter etílico de calidad para análisis.
- 4.3. Sulfato sódico anhidro de calidad para análisis.
- 4.4. Placas de vidrio recubiertas con gel de sílice, sin indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor (disponibles en el comercio ya preparados para el uso).
- 4.5. Hidróxido potásico, solución etanólica 0,2 N: disolver 13 g de hidróxido potásico en 20 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol.
- 4.6. Tolueno para cromatografía (5.2.2.).
- 4.7. Acetona para cromatografía (5.2.2.).
- 4.8. Hexano para cromatografía (5.2.2.).

- 4.9. Eter etílico para cromatografía (5.2.2).
- 4.10. Cloroformo de calidad para análisis (5.2.2).
- 4.11. Solución patrón para la cromatografía en capa fina: colesterol o fitosteroles, solución al 5% en el cloroformo.
- 4.12. Solución de 2:7-diclorofluoresceína al 0,2% en etanol. Para hacerla ligeramente básica se añaden algunas gotas de solución alcohólica 2N de hidróxido potásico.
- 4.13. Piridina anhidra para cromatografía.
- 4.14. Hexametildisilazano.
- 4.15. Trimetilclorosilano.
- 4.16. Solución patrón de los trimetilsililéteres de esteroides: preparar en el momento del uso a partir de esteroides obtenidos de aceites que los contengan.
- 4.17. Colestanol, disolución al 0,2% (m/V) en cloroformo (patrón interno).
- 4.18. Gas portador: hidrógeno o helio de calidad para cromatografía de gases.
- 4.19. Gas auxiliar: hidrógeno o helio de calidad para cromatografía de gases.

## 5. PROCEDIMIENTO

### 5.1. Preparación del insaponificable.

- 5.1.1. Con la microjeringa de 500  $\mu$ l introducir en el matraz de 250 ml un volumen de disolución de  $\alpha$ -colestanol al 0,2% en cloroformo (4.17) que contenga una cantidad de  $\alpha$ -colestanol correspondiente al 10% aproximadamente del contenido en esteroides de la alícuota de la muestra para la determinación. Por ejemplo, para 5 g de muestra, añadir 500 mg de la solución de  $\alpha$ -colestanol al 0,2%, si se trata de una muestra de aceite de oliva, y 1500  $\mu$ l, si se trata de aceite de semillas o de aceite de orujo de oliva.

Evaporar en corriente de nitrógeno hasta desecación y, a continuación, pesar con precisión, en el mismo matraz, 5 g de muestra seca y filtrada.

En el caso de aceites y grasas animales o vegetales con un alto contenido de colesterol puede producirse un pico cuyo tiempo de retención sea idéntico al del colestanol. En tal caso, el análisis de la fracción de esteroides debe realizarse dos veces: con patrón interno y sin él.

5.1.2. Añadir 50 ml de solución etanólica de hidróxido potásico 2N, poner en marcha el refrigerante de reflujo y calentar al baño María con ligera ebullición, agitando enérgica e ininterrumpidamente hasta que se produzca la saponificación (la solución se vuelve límpida). Calentar durante 20 minutos más y, a continuación, añadir 50 ml de agua destilada por la parte superior del refrigerante; separar el refrigerante y enfriar el matraz a 30°C aproximadamente.

5.1.3. Transvasar cuantitativamente el contenido del matraz a un embudo de separación de 500 ml, mediante varios lavados con un total aproximado de 50 ml de agua destilada. Agregar 80 ml aproximadamente de éter etílico, agitar enérgicamente durante unos 30 segundos y dejar reposar hasta la separación de las fases (nota 1).

Separar la fase acuosa inferior pasándola a un segundo embudo de separación. Efectuar otras dos extracciones de la fase hidroalcohólica por el mismo procedimiento, utilizando cada vez de 60 a 70 ml de éter etílico.

Nota 1: Las posibles emulsiones podrán eliminarse añadiendo pequeñas cantidades de alcohol etílico o metílico con un pulverizador.

5.1.4. Reunir las fracciones etéreas en un mismo embudo de separación y lavarlas con agua destilada (50 ml cada vez ) hasta que el agua de lavado presente reacción neutra.

Una vez eliminada el agua de lavado, secar con sulfato sódico anhidro y filtrar sobre sulfato sódico anhidro a un matraz de 250 ml previamente pesado, lavando el embudo y el filtro con pequeñas cantidades de éter etílico.

5.1.5. Destilar el éter hasta que queden unos pocos ml, a continuación, secar con un vacío ligero o en una corriente de nitrógeno, completando el secado en una estufa a 100° C durante unos 15 minutos aproximadamente, dejar enfriar en un desecador y pesar.

## 5.2. Separación de la fracción de esteroides.

5.2.1. Preparación de las placas básicas: sumergir completamente las placas con gel de sílice (4.4.) en la solución etanólica 0,2N de hidróxido potásico (4.5.) durante 10 segundos; dejar secar las placas en campana durante dos horas y, por último, mantenerlas en una estufa a 100° C durante una hora.

Sacarlas de la estufa y conservarlas en el desecador de cloruro de calcio hasta el momento del uso (las placas sometidas a este tratamiento deberán utilizarse en un plazo de quince días como máximo).

Nota 2: Si se utilizan placas básicas de gel de sílice para la separación de la fracción de esteroides, ya no es necesario tratar el insaponificable con alúmina. De este modo, todos los compuestos de naturaleza ácida (ácidos grasos y otros) quedan retenidos en la línea de aplicación, y la banda de los esteroides aparece perfectamente diferenciada de la banda de los alcoholes alifáticos y terpénicos.

5.2.2. Introducir en la cubeta de desarrollo de las placas la mezcla de tolueno y acetona hasta una altura de 1 cm aproximadamente. Puede utilizarse como alternativa una mezcla de hexano y éter etílico 55/35 (V/V). Cerrar la cubeta con su correspondiente tapa y dejar transcurrir media hora como mínimo, de forma que se alcance el equilibrio líquido vapor. En las caras interiores de la cubeta pueden colocarse tiras de papel de filtro que se sumerjan en el eluyente: de esta manera el tiempo de migración se reduce casi un tercio y se obtiene una elución más uniforme y regular de los componentes.

Nota 3: Para que las condiciones de elución sean perfectamente reproducibles, la mezcla de desarrollo deberá cambiarse en cada prueba.

5.2.3. Preparar una solución de insaponificable (5.1.5.) en cloroformo al 5% aproximadamente y, con la microjeringa de 100 µl, depositar 0,3 ml de dicha solución en la placa cromatográfica (5.2.1.) a unos 2 cm de uno de los bordes, formando una línea continua más fina y uniforme posible. A la altura de la línea de aplicación se depositan, en uno de los extremos de la placa, de 2 a 3 µl de la solución de referencia de esteroides (4.11.) para poder identificar la banda de esteroides después del desarrollo.

5.2.4. Introducir la placa en la cubeta de desarrollo, preparada como se indica en el punto 5.2.2. Deberá mantenerse una temperatura ambiente entre 15 y 20° C. Tapar inmediatamente la cubeta y dejar que se produzca la elución hasta que el frente del disolvente se sitúe a 1 cm aproximadamente del borde superior de la placa. Sacar la placa de la cubeta y evaporar el disolvente en una corriente de aire caliente o dejando la placa bajo una campana unos minutos.

5.2.5. Pulverizar la placa ligera y uniformemente con la solución 2,7-diclorofluoresceína. Identificar la banda de los esteroides mediante comparación con la mancha obtenida a partir de la solución de referencia; marcar con lápiz negro los límites de la banda a lo largo de los márgenes de fluorescencia.

5.2.6. Raspar con una espátula metálica el gel de sílice contenido en el área delimitada. Introducir el material obtenido, finamente triturado, en el embudo filtrante (3.7.); añadir 10 ml de cloroformo caliente, mezclar cuidadosamente con la espátula metálica y filtrar en vacío, recogiendo el filtrado en el matraz cónico (3.8) acoplado al embudo filtrante.

Lavar el residuo en el embudo tres veces con éter etílico (empleando cada vez unos 10 ml), recogiendo cada vez el filtrado en el mismo matraz cónico acoplado al embudo. Evaporar el filtrado hasta obtener un volumen de 4 a 5 ml, transvasar la solución residual al tubo de ensayo de 10 ml (3.9.) previamente pesado, evaporar hasta sequedad mediante calentamiento suave en corriente ligera de nitrógeno, recoger con algunas gotas de acetona, evaporar de nuevo hasta sequedad, introducir en una estufa a 105 °C durante unos 10 minutos, dejar enfriar en el desecador y pesar.

El residuo que queda en el tubo de ensayo está formado por la fracción de esteroides.

### 5.3. Preparación de los trimetilsililéteres.

5.3.1. Agregar al tubo que contiene la fracción de esteroides el reactivo de sililación formado por una mezcla de piridina-hexametildisilazano-trimetilclorosilano 9/3/1 (v/v/v) (nota 4), a razón de 50 µl por miligramo de esteroides, evitando toda absorción de humedad (nota 5).

Nota 4: Existen soluciones comerciales listas para el uso. Además, también existen otros reactivos de silanización, como el bis-trimetilsilacetamina + 1% de trimetilclorosilano, que se diluye en el mismo volumen de piridina anhidra.

5.3.2. Tapar el tubo y agitar cuidadosamente (sin invertir) hasta la completa disolución de los esteroides. Dejar reposar un cuarto de hora, como mínimo, a temperatura ambiente y centrifugar durante algunos minutos; la solución límpida queda lista para el análisis mediante cromatografía de gases.

Nota 5: La formación de una ligera opalescencia es normal y no ocasiona anomalía. La formación de una floculación blanca o la aparición de una coloración rosa son indicios de presencia de humedad o de alteración del reactivo. En este caso deberá repetirse la prueba.

### 5.4. Análisis por cromatografía de gases.

5.4.1. Operaciones preliminares: acondicionamiento de la columna.

5.4.1.1. Colocar la columna en el cromatógrafo uniendo la extremidad de entrada al inyector y la extremidad de salida al detector.

Efectuar los controles generales del sistema de cromatografía de gases (estanqueidad de los circuitos de gases, eficacia del detector, eficacia del sistema de separación de flujo y del sistema de registro, etc.).

5.4.1.2. Si la columna se utiliza por vez primera, es conveniente acondicionarla previamente. Hacer pasar un ligero flujo de gas a través de la columna, poner en marcha el aparato e iniciar un calentamiento gradual hasta una temperatura al menos 20° C superior a la de trabajo (nota 6). Mantener esta temperatura durante 2 horas como mínimo; a continuación, poner en todo el equipo condiciones de funcionamiento (regulación de flujo de gases, ignición de la llama, conexión con el registrador electrónico, regulación de la temperatura del horno del detector y del inyector, etc) y registrar la señal con una sensibilidad al menos dos veces superior a la prevista para el análisis. El trazado de la línea de base obtenida debe ser lineal, exento de picos de cualquier tipo y no debe presentar deriva.

Una deriva rectilínea negativa indica que las conexiones de la columna no son totalmente estancas; una deriva positiva indica que el acondicionamiento de la columna es insuficiente.

Nota 6: La temperatura de acondicionamiento deberá ser siempre, como mínimo, 20° C inferior a la temperatura máxima prevista para la fase estacionaria utilizada.

#### 5.4.2. Elección de las condiciones de trabajo.

##### 5.4.2.1. Las condiciones de trabajo exigidas son las siguientes:

- temperatura de la columna:  $260^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ,
- temperatura del inyector:  $280^{\circ}\text{C}$ ,
- temperatura del detector:  $290^{\circ}\text{C}$ ,
- velocidad lineal del gas vector: helio 20 a 35 cm/s; hidrógeno, 30 a 50 cm/s,
- relación de división de 1/50 a 1/100,
- sensibilidad del instrumento: de 4 a 16 veces la atenuación mínima,
- sensibilidad de registro: 1 a 2 mV a plena escala.
- velocidad del papel: 30 a 60 cm/hora,
- cantidad de sustancia inyectada: 0,5 a 1  $\mu\text{l}$  de solución de TMSE.

Estas condiciones pueden modificarse en función de las características de la columna y del cromatógrafo, de modo que se obtengan cromatogramas que cumplan los siguientes requisitos:

- el tiempo de retención del  $\beta$ -sitosterol debe ser de  $20 \pm 5$  minutos,
- el pico del campesterol debe ser: para el aceite de oliva (contenido medio del 3%),  $15 + 5\%$  de la escala del registrador; para el aceite de soja (contenido medio del + 20%),  $80 + 10\%$  de la escala,
- se deben separar todos los esteroides presentes; es necesario que los picos no sólo se separen sino que se resuelvan completamente, es decir, que el trazo del pico llegue a la línea de base antes de que se inicie el pico siguiente. No obstante, podrá tolerarse una resolución incompleta a condición, sin embargo, de que sea cuantificable.

#### 5.4.3. Realización del análisis.

5.4.3.1. Con la microjeringa de 10  $\mu\text{l}$  tomar 1  $\mu\text{l}$  de hexano, aspirar 0,5  $\mu\text{l}$  de aire y, a continuación, entre 0,5 y 1  $\mu\text{l}$  de la solución de la muestra; elevar el émbolo de la jeringa de modo que la aguja quede vacía. Introducir la aguja a través de la membrana del inyector y, después de 1 ó 2 segundos, inyectar rápidamente; transcurridos unos 5 segundos, extraer la aguja lentamente.

5.4.3.2. Continuar el registro hasta la completa elución de los TMSE de los esteroides presentes. La línea de base debe ajustarse en todo momento a las condiciones exigidas (5.4.1.2.).

5.4.4. Identificación de los picos.

Para la identificación de los diferentes picos se utilizan los tiempos de retención y la comparación con mezclas de TMSE de los esteroides analizados en las mismas condiciones.

La elución de los esteroides se efectúa en el orden siguiente: colesterol, brassicasterol, 24-metilcolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol,  $\Delta$ -7campesterol,  $\Delta$ -5,23-estigmastadienol, clerosterol,  $\beta$ -sitosterol, sitostanol,  $\Delta$ -5-avenasterol,  $\Delta$ -5,24-estigmastadienol,  $\Delta$ -7-estigmastenol,  $\Delta$ -7-avenasterol.

En el cuadro 1 figuran los tiempos de retención correspondientes al  $\beta$ -sitosterol para las columnas SE 52 y SE 54.

Las figuras 1 y 2 ilustran los cromatogramas típicos de algunos aceites.

5.4.5. Determinación cuantitativa.

5.4.5.1. Calcular las áreas de los picos del  $\alpha$ -colestanol y de los esteroides utilizando el integrador. No se tomarán en cuenta los picos de aquellos componentes que no figuren en el cuadro I. El coeficiente de respuesta (CPG) para el  $\alpha$ -colestanol debe considerarse como 1.

5.4.5.2. Calcular del modo siguiente el contenido de cada uno de los esteroides, expresado en mg/kg de materia grasa:

$$\text{esterol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

siendo:

$A_x$ : área del pico del esteroide x, en milímetros cuadrados,

$A_s$ : área del pico del  $\alpha$ -colestanol, en milímetros cuadrados.

$m_s$ : peso de  $\alpha$ -colestanol añadido, en miligramos,

$m$ : peso de la muestra tomada para la determinación en gramos.

## 6. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

- 6.1. Se registra el contenido de cada uno de los esteroides en mg/kg de materia grasa y, su suma como "esteroides totales"
- 6.2. El porcentaje de cada uno de los esteroides simples es la razón entre el área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de los esteroides.

$$\% \text{ del esteroil X} = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 1000$$

siendo:

$A_x$ : área del pico de x,  
 $\Sigma A$ : suma de las áreas de todos los picos.

## APÉNDICE

### Determinación de la velocidad lineal del gas

Inyectar en el cromatógrafo, preparado para trabajar en condiciones normales, de 1 a 3µl. de metano (o propano) y medir el tiempo que tarda el gas en recorrer la columna, desde el momento de la inyección hasta el momento en que aparece el pico ( $t_M$ ).

La velocidad lineal en cm/s viene dada por  $L/t_M$ , siendo L la longitud de la columna en cm y  $t_M$  el tiempo, expresado en segundos.

**CUADRO 1**

**TIEMPOS DE RETENCIÓN RELATIVOS DE LOS ESTEROLES**

Pico	Identificación		Tiempo de retención	
			Columna SE 54	Columna SE 52
1	colesterol	$\Delta$ -5-colesten-3 $\beta$ -ol	0,67	0,63
2	colestanol	5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol	0,68	0,64
3	brasicasterol	(24S)-24-metil- $\Delta$ -5,22-colestadien-3 $\beta$ -ol	0,73	0,71
4	24-metilencolesterol	24-metilen- $\Delta$ -5,24-colestadien-3 $\beta$ -ol	0,82	0,80
5	campesterol	(24R)-24-metil- $\Delta$ -5-colestan-3 $\beta$ -ol	0,83	0,81
6	campestanol	(24R)-24-metil-colestan-3 $\beta$ -ol	0,85	0,82
7	estigmasterol	(24S)-24-etil- $\Delta$ -5,22-colestadien-3 $\beta$ -ol	0,88	0,87
8	$\Delta$ -7-campesterol	(24R)-24-metil- $\Delta$ -7-colesten-3 $\beta$ -ol	0,93	0,92
9	$\Delta$ -5,23-estigmastadienol	(24R,S)-24-etil- $\Delta$ -5,23-colestadien-3 $\beta$ -ol	0,95	0,95
10	clerosterol	(24S)-24-etil- $\Delta$ -5,25-colestadien-3 $\beta$ -ol	0,96	0,96
11	$\beta$ -sitosterol	(24R)-24-etil- $\Delta$ -5-colesten-3 $\beta$ -ol	1,00	1,00
12	sitostanol	24-etil-colestan-3 $\beta$ -ol	1,02	1,02
13	$\Delta$ -5-avenasterol	(24Z)-24-etiliden- $\Delta$ -5-colesten-3 $\beta$ -ol	1,03	1,03
14	$\Delta$ -5-24-estigmastadienol	(24R,S)-24-etil- $\Delta$ -5,24-colestadien-3 $\beta$ -ol	1,08	1,08
15	$\Delta$ -7-estigmastenol	(24R,S)-24-etil- $\Delta$ -7-colesten-3 $\beta$ -ol	1,12	1,12
16	$\Delta$ -7-avenasterol	(24Z)-24-etiliden- $\Delta$ -7-colesten-3 $\beta$ -ol	1,16	1,16

**FIGURA 1**  
**CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LA FRACCIÓN ESTERÓLICA DE UN ACEITE**  
**DE OLIVA CRUDO**  
(con ayuda de patrón interno)

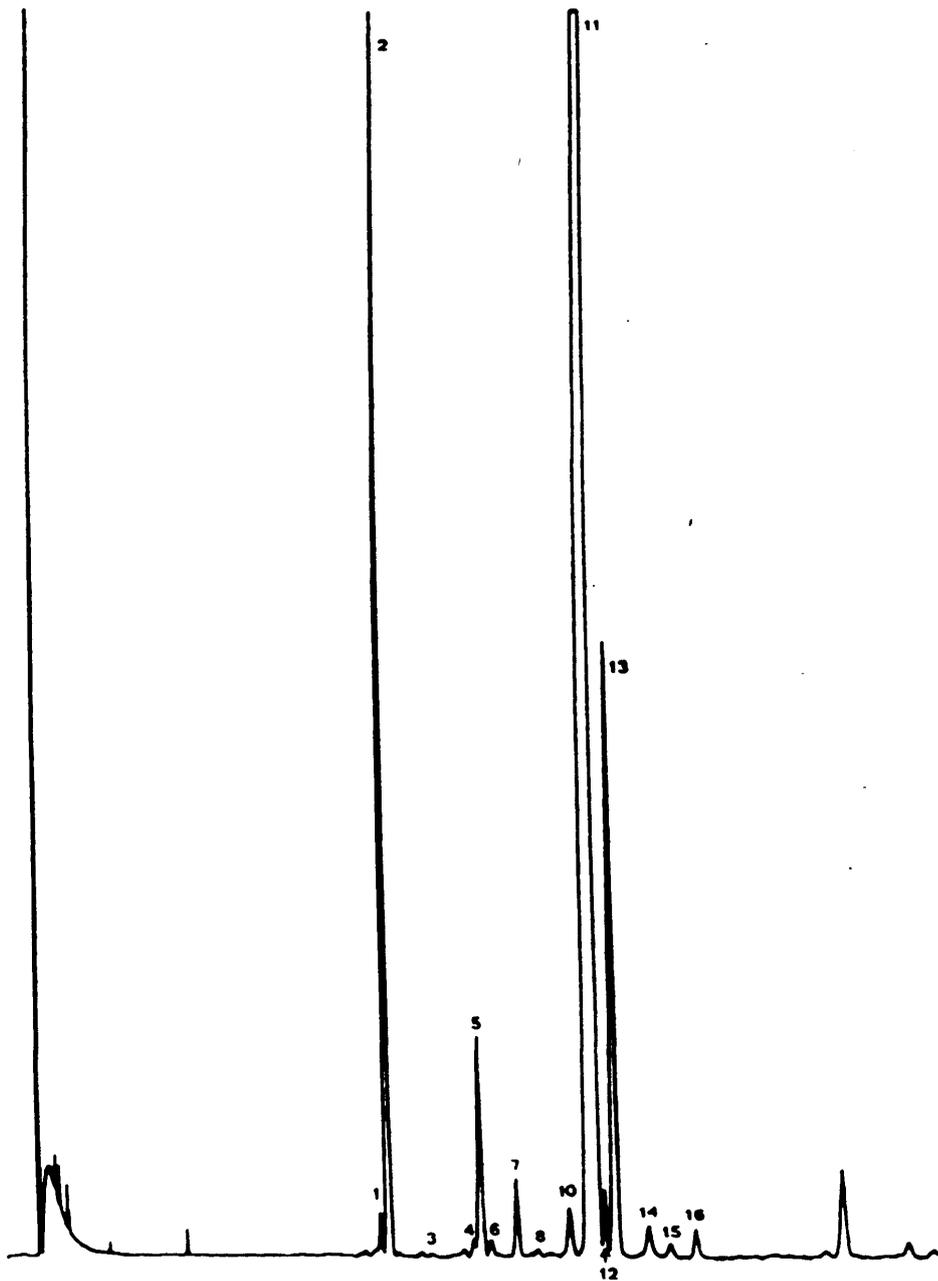
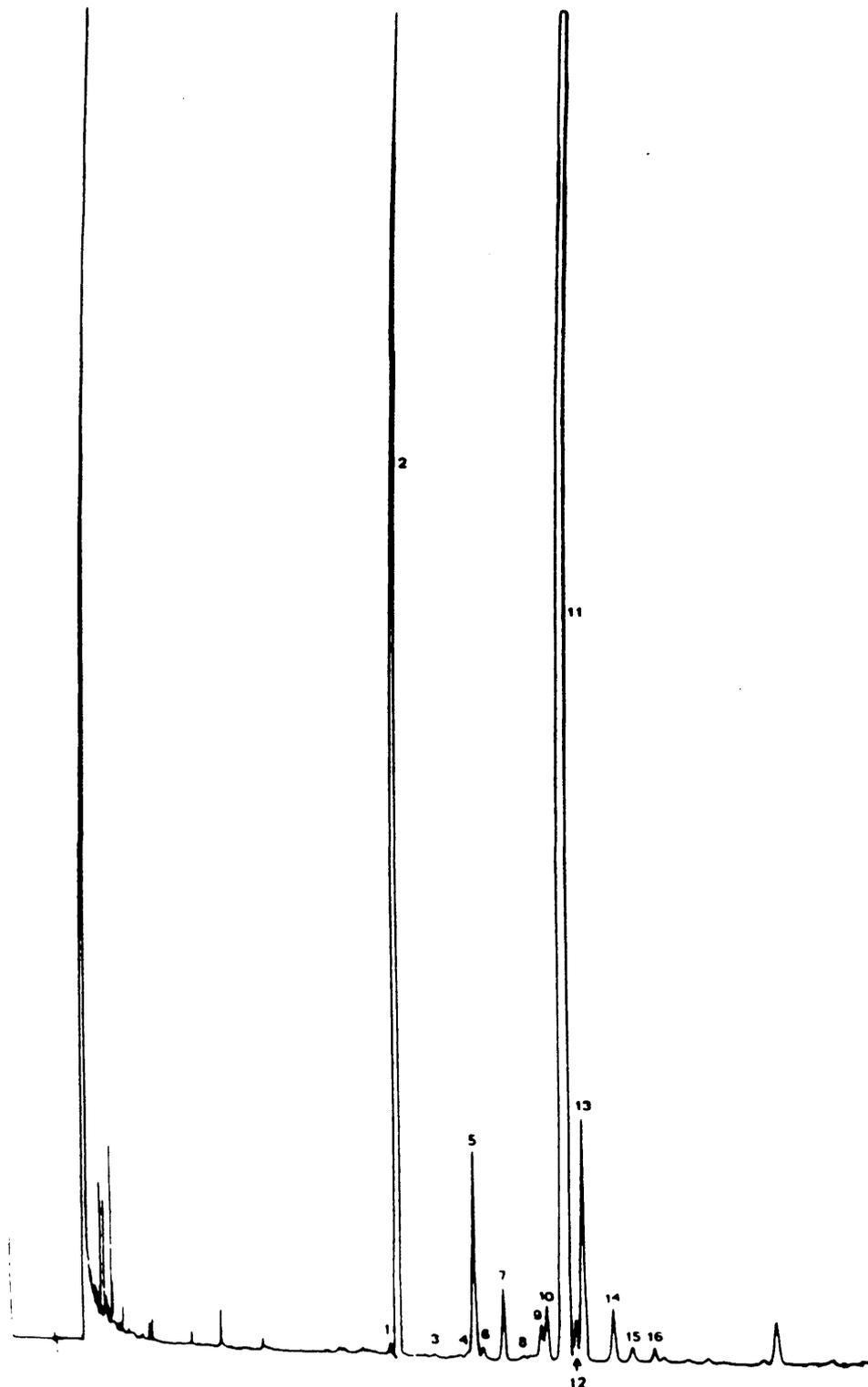


FIGURA 2

**CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LA FRACCIÓN ESTERÓLICA DE UN  
ACEITE DE OLIVA REFINADO**

(con ayuda de patrón interno)



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

### Contenido en esteroides totales (mg/kg)

	A	B	C	D	E
<b>n</b>	19	19	19	19	19
<b>outliers</b>	5	3	4	5	3
<b>mean</b>	1547	1720	1618	1498	1578
<b>r</b>	85.59	75.06	57.00	52.32	60.83
<b>S<sub>r</sub></b>	30.57	26.81	20.35	18.68	21.72
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	1.98	1.56	1.26	1.25	1.38
<b>R</b>	95.45	181.85	156.85	164.25	155.08
<b>S<sub>R</sub></b>	34.09	64.94	56.02	58.66	55.38
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	2.20	3.78	3.46	3.92	3.51

### Composición de esteroides (%) - Colesterol

	A	B	C	D	E
<b>n</b>	17	17	17	17	17
<b>outliers</b>	2	2	4	5	3
<b>mean</b>	0.18	0.19	0.16	0.14	0.16
<b>r</b>	0.09	0.09	0.04	0.06	0.04
<b>S<sub>r</sub></b>	0.03	0.03	0.01	0.02	0.01
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	19.41	17.43	11.11	17.55	10.53
<b>R</b>	0.21	0.23	0.13	0.13	0.15
<b>S<sub>R</sub></b>	0.07	0.08	0.05	0.04	0.05
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	43.43	42.94	31.82	35.28	34.15

**- Brasicasterol**

	A	B	C	D	E
<b>n</b>	17	17	17	17	17
<b>outliers</b>	4	1	0	1	2
<b>mean</b>	0	0.01	0.01	0.02	0.02
<b>r</b>	-	0.01	0.02	0.03	0.01
<b>S<sub>r</sub></b>	-	0.00	0.01	0.01	0
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	-	75.59 <sub>(not sig.)</sub>	83.24 <sub>(not sig.)</sub>	73.17 <sub>(not sig.)</sub>	30.79 <sub>(not sig.)</sub>
<b>R</b>	-	0.05	0.05	0.05	0.06
<b>S<sub>R</sub></b>	-	0.01	0.01	0.01	0.02
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	-	209.76 <sub>(not sig.)</sub>	166.95 <sub>(not sig.)</sub>	115.48 <sub>(not sig.)</sub>	116.35 <sub>(not sig.)</sub>

**- Campesterol**

	A	B	C	D	E
<b>n</b>	15	15	15	15	15
<b>outliers</b>	0	0	0	0	0
<b>mean</b>	4.05	4.95	3.99	3.95	4.29
<b>r</b>	0.14	0.20	0.20	0.15	0.12
<b>S<sub>r</sub></b>	0.05	0.07	0.07	0.05	0.04
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	1.29	1.45	1.82	1.43	1.03
<b>R</b>	0.26	0.34	0.27	0.19	0.29
<b>S<sub>R</sub></b>	0.09	0.12	0.09	0.07	0.10
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	2.30	2.51	2.49	1.79	2.42

**- Estigmasterol**

	A	B	C	D	E
<b>n</b>	15	15	15	15	15
<b>outliers</b>	1	0	0	1	0
<b>mean</b>	1.03	2.27	1.06	1.39	2.35
<b>r</b>	0.05	0.12	0.09	0.08	0.15
<b>S<sub>r</sub></b>	0.02	0.04	0.03	0.03	0.05
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	1.90	1.94	30.6	2.16	2.32
<b>R</b>	0.11	0.19	0.13	0.11	0.20
<b>S<sub>R</sub></b>	0.04	0.07	0.04	0.04	0.07
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	3.87	3.13	4.64	2.93	3.12

**- delta- 7- estigmastenol**

	A	B	C	D	E
<b>n</b>	15	15	15	15	15
<b>outliers</b>	0	0	0	1	0
<b>mean</b>	0.14	2.25	0.19	0.51	0.56
<b>r</b>	0.09	0.16	0.08	0.09	0.08
<b>S<sub>r</sub></b>	0.03	0.06	0.02	0.03	0.03
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	24.67	2.69	15.30	6.37	5.32
<b>R</b>	0.12	0.26	0.11	0.11	0.13
<b>S<sub>R</sub></b>	0.04	0.09	0.04	0.04	0.04
<b>RSD<sub>R</sub>(%)</b>	30.66	4.25	22.57	7.89	8.48

**- Beta-sitosterol aparente**

	A	B	C	D	E
<b>n</b>	15	15	15	15	15
<b>outliers</b>	0	1	0	0	0
<b>mean</b>	93.88	88.7	93.93	93.23	91.63
<b>r</b>	0.27	0.38	0.36	0.29	0.33
<b>S<sub>r</sub></b>	0.10	0.13	0.13	0.10	0.12
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	0.11	0.15	0.14	0.11	0.13
<b>R</b>	0.87	0.91	0.70	0.90	0.89
<b>S<sub>R</sub></b>	0.31	0.32	0.25	0.32	0.32
<b>RSD<sub>R</sub>(%)</b>	0.33	0.37	0.27	0.35	0.35

## 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