



MÉTODO DE ANÁLISIS

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CERAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON COLUMNA CAPILAR

1. OBJETO

El presente método permite la determinación del contenido en ceras de los aceites de oliva. Las distintas ceras se separan en función del número de átomos de carbono. Este método se aconseja como un medio apto para diferenciar el aceite de oliva de presión del obtenido a partir del orujo de oliva (aceite de orujo).

2. PRINCIPIO

La grasa, a la que se habrá añadido el oportuno patrón interno, se fracciona mediante cromatografía con columna de gel de sílice hidratado. La fracción eluida en las condiciones del ensayo (con menor polaridad que la de los triglicéridos) se recupera y analiza directamente mediante cromatografía de gases con columna capilar.

3. APARATOS

3.1. Matraz de 25 ml.

3.2. Columna de cristal para cromatografía líquida (diámetro interior de 15,0 mm y altura de 30-40 cm) con el grifo correspondiente.

3.3. Cromatógrafo de gases apto para funcionar con columna capilar, provisto de un sistema de introducción directa en la columna constituido por:

- 3.3.1. Cámara termostática para las columnas con programador de temperatura.**
- 3.3.2. Inyector en frío** para la introducción directa en la columna.
- 3.3.3. Detector de ionización de llama y conversor-amplificador.**
- 3.3.4. Registrador-integrador** (*Nota 1*) apto para funcionar con el conversor-amplificador (3.3.3.) con tiempo de respuesta no superior a 1 segundo y con velocidad del papel variable.
- 3.3.5. Columna capilar de cristal o de sílice fundido**, de 8 a 12 m de largo, diámetro interno de 0,25 a 0,32 mm, recubierta por dentro con líquido de repartición (*Nota 2*) de espesor uniforme comprendido entre 0,10 y 0,30 μm .
- 3.4. Microjeringa** para inyección directa en la columna de 10 μm con aguja endurecida.
- 3.5. Agitador eléctrico.**
- 3.6. Evaporador rotatorio.**
- 3.7. Horno de mufla.**
- 3.8. Balanza analítica** con una precisión de medición de $\pm 0,1$ mg.
- 3.9. Cristalería normal de laboratorio**

4. REACTIVOS

4.1. Gel de sílice con granulometría comprendida entre 60 y 200 μm . Meter el gel de sílice en el horno de mufla a 500 °C durante al menos 4 horas. Una vez enfriado, añadir el 2% de agua referido a la cantidad de gel de sílice empleada. Agitar bien para homogeneizar la masa y mantener protegido de la luz durante un mínimo de 12 horas antes de usarlo.

4.2. n-Hexano para cromatografía

ADVERTENCIA: Los vapores pueden incendiarse. Mantener alejado de fuentes de calor, chispas y llamas desnudas. Mantener en recipientes bien cerrados y utilizar con la ventilación adecuada. Evitar la acumulación de vapores y eliminar cualquier posible causa de incendio, como calentadores o aparatos eléctricos que no hayan sido fabricados con material antiinflamable. Nocivo si es inhalado ya que puede dañar las células del sistema nervioso. Evitar respirar los vapores, utilizando si fuera necesario un aparato respirador adecuado. Evitar el contacto con los ojos y la piel.

Nota 1: También es posible utilizar sistemas informatizados con los que pueden obtenerse los datos cromatográficos a través del ordenador personal.

Nota 2: Los líquidos de repartición adecuados a tal fin que pueden encontrarse en el mercado son el SE52 y el SE54.

4.3. **Éter etílico** para cromatografía

ADVERTENCIA: Altamente inflamable. Moderadamente tóxico. Irrita la piel. Nocivo si es inhalado. Puede dañar los ojos. Puede tener efectos retardados. Puede formar peróxidos explosivos. Los vapores son inflamables. Mantener alejado de fuentes de calor, chispas o llamas desnudas. Mantener en recipientes bien cerrados. Utilizar con la ventilación adecuada. Evitar la acumulación de vapores y eliminar cualquier posible causa de incendio, como calentadores o aparatos eléctricos que no estén fabricados con material antiinflamable. No evaporar hasta sequedad o cuasi-sequedad. La adición de agua o de un agente reductor puede reducir la formación de peróxidos. No ingerir. Evitar respirar los vapores. Evitar el contacto prolongado o repetido con la piel.

4.4. **n-Heptano** para cromatografía

ADVERTENCIA: Es inflamable. Nocivo si es inhalado. Mantener alejado de fuentes de calor, chispas o llamas desnudas. Mantener en recipientes bien cerrados. Utilizar con la ventilación adecuada. Evitar respirar prolongadamente los vapores. Evitar el contacto prolongado o repetido con la piel.

4.5. **Solución de araquidato** de laurilo (*Nota 3*), al 0,1% (m/V) en hexano (patrón interno).

4.5.1. **Sudán I (1-fenilazo-2-naftol)**

4.6. **Gas portador:** hidrógeno o helio puro para cromatografía de gases

ADVERTENCIA:

Hidrógeno. Altamente inflamable, bajo presión. Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llamas desnudas o aparatos eléctricos que no hayan sido fabricados con material antiinflamable. Asegurarse de que la válvula de la bombona esté cerrada cuando no esté en uso. Utilizar siempre con un reductor de presión. Destensar el muelle del reductor antes de abrir la válvula de la bombona. No colocarse delante del orificio de salida de la bombona al abrir la válvula. Utilizar con la ventilación adecuada. No transferir el hidrógeno de una bombona a otra. No mezclar gases en la bombona. Asegurarse de que las bombonas no puedan caerse. Mantenerlas alejadas del sol y de fuentes de calor. No almacenar en un ambiente corrosivo. No utilizar bombonas dañadas o sin etiquetar.

Helio. Gas comprimido a alta presión. Reduce el oxígeno disponible para la respiración. Mantener cerrado el contenedor. Usar con la ventilación adecuada. No entrar en los locales de conservación si no están adecuadamente ventilados. Utilizar siempre un reductor de presión. Destensar el muelle del reductor antes de abrir la válvula de la bombona. No transferir el gas de una bombona a otra. Asegurarse de que las bombonas no puedan caerse. No colocarse delante del orificio de salida de la bombona al abrir la válvula. Mantener las bombonas alejadas del sol y de fuentes de calor. No almacenar en un ambiente corrosivo. No utilizar bombonas dañadas o sin etiquetar. No utilizar para ser inhalado y emplearlo sólo para usos técnicos.

Nota 3: También es posible utilizar palmitil palmitato o miristil estearato

4.7. Gases auxiliares:

- hidrógeno puro para cromatografía;
- aire puro para cromatografía.

ADVERTENCIA:

Aire. Gas comprimido a alta presión. Utilizar con precaución en presencia de sustancias combustibles ya que la temperatura de auto-ignición de la mayoría de los compuestos orgánicos en el aire se reduce considerablemente a alta presión. Tener siempre bien cerrada la válvula de la bombona cuando esté fuera de uso. Utilizar siempre un reductor de presión. Destensar el muelle del reductor antes de abrir la válvula de la bombona. No colocarse delante del orificio de salida de la bombona al abrir la válvula. No transferir el gas de una bombona a otra. No mezclar gases en la bombona. Asegurarse de que las bombonas no puedan caerse. Mantenerlas alejadas del sol y de fuentes de calor. No almacenar en un ambiente corrosivo. No utilizar bombonas dañadas o sin etiquetar. El aire destinado a usos técnicos no debe utilizarse para ser inhalado o en aparatos respiradores.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Preparación de la columna cromatográfica

Poner en suspensión 15 g de gel de sílice (4.1.) en n-hexano (4.2.) e introducirlo en la columna (3.2.). Una vez que se ha producido la sedimentación, completarla con ayuda de un agitador eléctrico (3.5.) para que el lecho cromatográfico se vuelva más homogéneo. Hacer pasar 30 ml de n-hexano para eliminar las posibles impurezas. Pesar con exactitud en el matraz de 25 ml (3.1.) 500 mg de la muestra con la balanza de precisión (3.8.), añadir la adecuada cantidad de patrón interno (4.5.) en función del supuesto contenido en ceras. Por ejemplo, añadir 0,1 mg de araquidato de laurilo en el caso del aceite de oliva, y de 0,25 a 0,50 mg si se trata de aceite de orujo de oliva.

Transferir la muestra preparada como antecede en la columna cromatográfica con ayuda de dos porciones de 2 ml cada una de n-hexano) (4.2.).

Dejar fluir el solvente hasta que se sitúe a 1 mm por encima del nivel superior del absorbente. A continuación, hacer pasar otros 70 ml de n-hexano para eliminar los n-alcanos presentes de forma natural e iniciar la elución cromatográfica recogiendo 180 ml de la mezcla (*Nota 4 y Nota 5*) n-hexano/éter etílico en una proporción de 99:1, con un flujo de unas 15 gotas cada 10 segundos. La temperatura ambiente a la que debe efectuarse la elución de la muestra será de 22°C_{±4}.

Evaporar la fracción resultante mediante evaporador rotatorio (3.6.) hasta la práctica eliminación del solvente, eliminar los últimos 2 ml mediante una corriente débil de nitrógeno y añadir 2-4 ml de n-heptano.

Nota 4: La mezcla n-hexano/éter etílico (99:1) debe prepararse a diario.

Nota 5: Para controlar visualmente la correcta elución de las ceras, puede añadirse a la mezcla de elución 100 µl de Sudán I al 1%. El colorante tiene una retención intermedia entre las ceras y los triglicéridos; por lo tanto, cuando la coloración alcanza el fondo de la columna cromatográfica hay que suspender la elución, al haberse eluido todas las ceras.

5.2. Análisis por cromatografía de gases

5.2.1. Operaciones preliminares

Instalar la columna en el cromatógrafo de gases (3.3.), conectando el terminal de entrada al sistema en columna y el terminal de salida al detector. Comprobar el funcionamiento general del cromatógrafo de gases (funcionamiento de los circuitos de los gases, eficacia del detector y del registrador, etc.).

Si es la primera vez que se utiliza la columna, es conveniente acondicionarla. Pasar una corriente ligera de gas a través de la columna; a continuación, encender el cromatógrafo de gases y calentar gradualmente hasta alcanzar, pasadas unas 4 horas, una temperatura de 350°C.

Mantener dicha temperatura durante al menos 2 horas. A continuación, ajustar el aparato a las condiciones de ensayo (regulación del flujo de gas, encendido de la llama, conexión con el registrador electrónico (3.3.4.), regulación de la temperatura de la cámara para la columna, regulación del detector, etc.) y registrar la señal con una sensibilidad al menos dos veces superior a la exigida para la ejecución del análisis. El trazado de la línea de base deberá ser lineal, sin picos de ninguna clase, y no deberá presentar deriva.

Una deriva rectilínea negativa indica que las conexiones de la columna no son correctas; una deriva positiva indica que la columna no ha sido acondicionada adecuadamente.

5.2.2. Elección de las condiciones operativas (*nota 6*)

Las condiciones operativas son, en términos generales, las siguientes:

- Temperatura de la columna:

Inicio 80 °C (1') $\xrightarrow{20\text{ °C/min}}$ 240 °C $\xrightarrow{5\text{ °C/min}}$ 325 °C (6') $\xrightarrow{20\text{ °C/min}}$ 340 °C (10')

- Temperatura del detector: 350°C.
- Cantidad de sustancia inyectada: 1 µl de la solución (2-4 ml) de n-heptano.
- Gas portador: helio e hidrógeno a la velocidad lineal óptima para el gas elegido (Ver Apéndice A).
- Sensibilidad instrumental: apta para satisfacer las mencionadas condiciones.

Dichas condiciones pueden modificarse en función de las características de la columna y del cromatógrafo de gases a fin de obtener lo siguiente: separación de todas las ceras y satisfactoria resolución de los picos (ver Figura 1), retención del patrón interno de 18 ± 3 minutos y pico más representativo de las ceras con una altura superior al 60% desde el fondo de la escala.

Los parámetros de integración de los picos deben determinarse de forma que se obtenga una correcta evaluación de las áreas de los picos considerados.

Nota 6: Dada la elevada temperatura inicial se admite una deriva positiva no superior al 10% desde el fondo de la escala.

5.3. Ejecución del análisis

Tomar 1 µm de solución con la microjeringa de 10 µl. Sacar el émbolo de la microjeringa hasta que la aguja esté vacía. Introducir la aguja en el dispositivo de inyección e inyectar rápidamente después de 1-2 segundos. A los 5 segundos aproximadamente extraer lentamente la aguja. Efectuar los registros hasta la total elución de las ceras. La línea de base debe cumplir en todo momento los requisitos exigidos.

5.4. Identificación de los picos

La identificación de cada uno de los picos ha de efectuarse en función de los tiempos de retención y por comparación con mezclas de ceras analizadas en las mismas condiciones, de las que se conoce sus tiempos de retención.

En la Figura 1 se presenta un cromatograma de las ceras de un aceite de oliva virgen.

5.5. Análisis cuantitativo

Determinar con ayuda del integrador las áreas de los picos del patrón interno y de los ésteres alifáticos de C40 a C46.

El contenido de cada uno de los ésteres, expresado en mg/kg de materia grasa, se calcula como sigue:

$$\text{éster, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

siendo:

A_x = área del pico de cada uno de los ésteres, en milímetros cuadrados;

A_s = área del pico del patrón interno, en milímetros cuadrados;

m_s = peso del patrón interno añadido, en miligramos;

m = peso de la muestra tomada para la determinación, en gramos.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Expresar la suma de los contenidos de las distintas ceras de C40 a C46 (nota 7) en miligramos por kilogramo de materia grasa (ppm).

Los resultados se expresan con un decimal.

Nota 7: *Los componentes a cuantificar son los correspondientes a los picos con número de carbono par comprendidos entre los ésteres C40 y C46, como se muestra en el cromatograma de las ceras del aceite de oliva presentado en la Figura 1. Cuando el éster C46 esté desdoblado se aconseja, para poder identificarlo, analizar la fracción de ceras de un aceite de orujo de oliva, en la que el pico C46 resulte identificable al ser claramente mayoritario.*

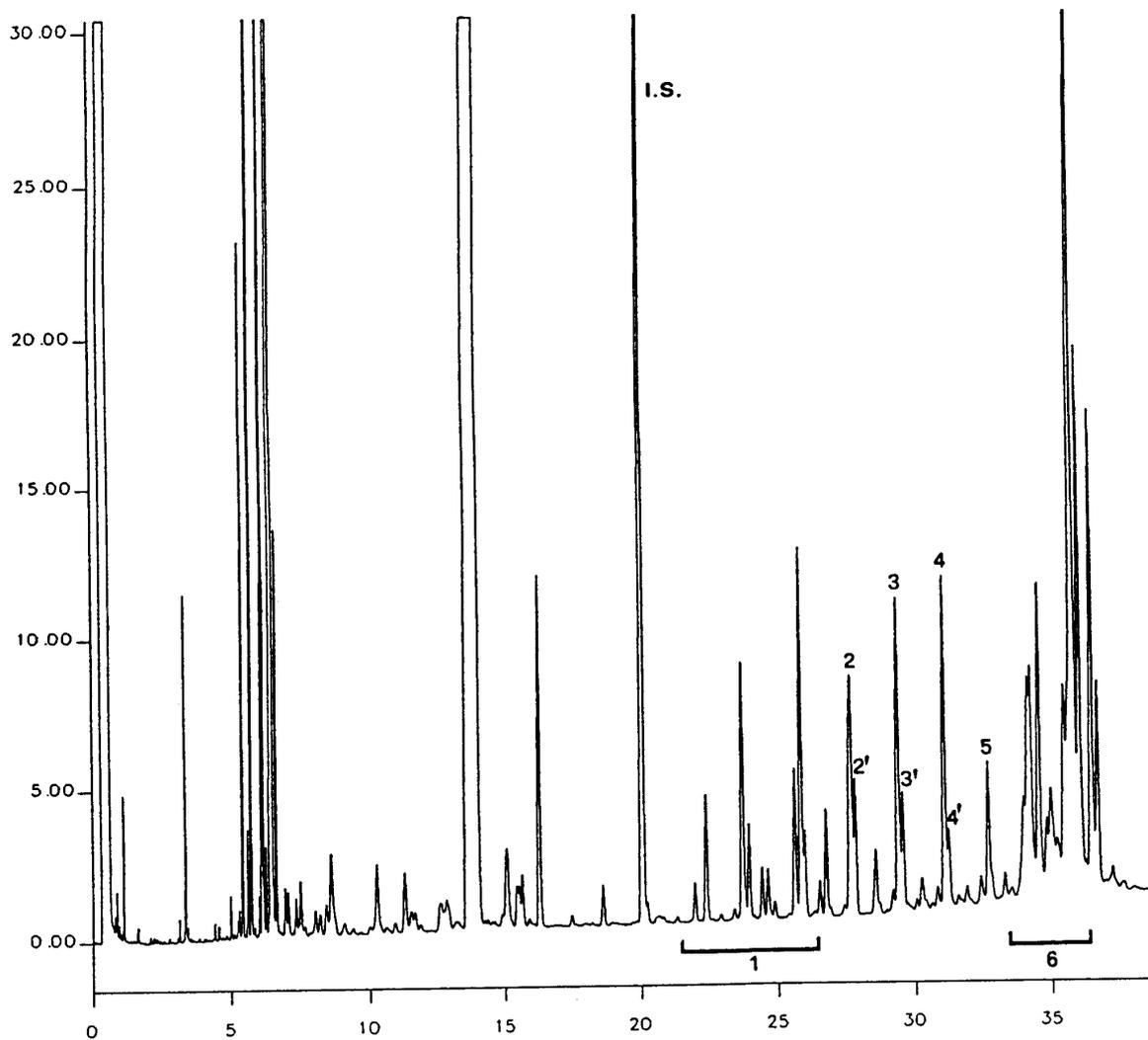


FIGURA: Ejemplo de cromatograma de la fracción de ceras de un aceite de oliva (*)

- P.I. = Araquidato de laurilo
- 1 = Ésteres diterpénicos
- 2+2' = Ésteres C40
- 3+3' = Ésteres C42
- 4+4' = Ésteres C44
- 5 = Ésteres C46
- 6 = Ésteres esterólicos y alcoholes triterpénicos

(*) Tras la elución de los ésteres de los esteroides, el trazado cromatográfico no debe presentar picos significativos (triglicéridos).

APÉNDICE

Determinación de la velocidad lineal del gas

Inyectar 1:3 µl de metano (o propano) en el cromatógrafo de gases ajustado a las condiciones operativas normales y cronometrar el tiempo que tarda el gas en recorrer la columna, desde el momento de la inyección hasta que sale el pico (t_M).

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

—

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 y sus replicados (a y b):

- A: aceite de oliva virgen extra
- B: aceite de oliva virgen + lampante
- C: aceite de oliva refinado
- D: aceite de oliva refinado + aceite reesterificado (90 : 10)
- E: aceite de oliva refinado + aceite reesterificado (80 : 20)

El análisis estadístico de los resultados del ensayo colaborativo 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 (%)	Coefficiente de variación de repetibilidad (S _r x 100 / 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 ceras (mg/kg)

	¡Error! Marcador no definido. D	E	A	B	C
n	19	19	19	19	19
outliers	5	5	4	3	5
mean	120.32	123.14	222.41	174.1	345.93
r	9.51	12.56	10.51	12.22	14.91
S_r	3.39	4.48	3.75	4.72	5.32
RSD_r (%)	2.82	3.64	1.69	2.71	1.54
R	38.83	48.89	58.93	25.65	44.39
S_R	13.86	17.46	21.04	9.16	15.85
RSD_R(%)	11.53	14.18	9.46	5.26	4.58

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
