



## **MÉTODO DE ANÁLISIS**

### **DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE GASES CON COLUMNA CAPILAR**

#### **1. OBJETO**

El presente método describe un procedimiento para la determinación del contenido de alcoholes alifáticos en las materias grasas, expresado como contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos analizados y como contenido total.

#### **2. PRINCIPIO**

Saponificación de la materia grasa, a la que se habrá añadido 1-eicosanol como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico; a continuación, extracción del insaponificable con éter etílico. Separación de la fracción alcohólica del insaponificable mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica; los alcoholes recuperados del gel de sílice se transforman en trimetilsililéteres y se analizan mediante cromatografía de gases con columna capilar.

#### **3. EQUIPO**

- 3.1. Matraz de 250 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas
- 3.2. Embudos de decantación de 500 ml.
- 3.3. Matraces de 250 ml
- 3.4. Equipo completo de cromatografía en capa fina (fase sólida), con placas de vidrio de 20 × 20 cm
- 3.5. Lámpara ultravioleta de una longitud de onda de 366 o 254 nm
- 3.6. Microjeringas de 100 y 500 µl
- 3.7. Embudo cilíndrico filtrante con filtro poroso G3 (porosidad 15-40 µm), 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. Tubo de 10 ml de fondo cónico con tapón hermético
- 3.10. Cromatógrafo de gases que pueda funcionar con columnas capilares, provisto de:
  - 3.10.1. Horno termostático para la columna, que pueda mantener la temperatura deseada con precisión aproximada de 1 °C
  - 3.10.2. Inyector termorregulable de tipo divisor de flujo (“split”) con elemento vaporizador de vidrio persilanizado, o de tipo “on-column”
  - 3.10.3. Detector de ionización de llama y convertidor-amplificador
  - 3.10.4. Registrador-integrador que pueda funcionar con un 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 interior, recubierta interiormente de líquido SE-52, SE-54 o equivalente, con un espesor uniforme que oscile entre 0,10 y 0,30  $\mu\text{m}$
- 3.12. Microjeringa de 10  $\mu\text{l}$  para cromatografía de gases, con aguja endurecida.
- 3.13. Balanza de precisión con sensibilidad de 1 mg e indicación de 0,1 mg.

#### **4. REACTIVOS**

- 4.1. Hidróxido potásico en solución etanólica aproximadamente 2 N: disolver, enfriando al mismo tiempo, 130 g de hidróxido potásico (título mínimo del 85 %) en 200 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol. Conservar la solución en botellas de vidrio opaco bien cerradas.
- 4.2. Éter 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 preparadas para el uso)
- 4.5. Hidróxido potásico en 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. Benceno para cromatografía (5.2.2)
- 4.7. Acetona para cromatografía (5.2.2)

- 4.8. Hexano para cromatografía (5.2.2)
- 4.9. Éter etílico para cromatografía (5.2.2)
- 4.10. Cloroformo de calidad para análisis.
- 4.11 Solución de referencia para cromatografía en capa fina: solución al 0,5% en cloroformo de 1-eicosanol, o de una fracción de alcoholes obtenida como se indica en 5.2 a partir del insaponificable de un aceite de orujo de oliva.
- 4.12. Solución de 2,7-diclorofluoresceína al 0,2 % en etanol; para hacerla ligeramente básica se añaden algunas gotas de solución alcohólica 2 N de hidróxido potásico
- 4.13 Piridina anhidra para cromatografía
- 4.14 Hexametildisilazano
- 4.15 Trimetilclorosilano
- 4.16 Solución patrón de trimetilsililéteres de los alcoholes alifáticos de C<sub>20</sub> a C<sub>28</sub>; debe prepararse en el momento de utilización a partir de mezclas de alcoholes puros
- 4.17 1-eicosanol, solución al 0,1 % (m/v) en cloroformo (patrón interno)
- 4.18 Gas portador: hidrógeno o helio puro, de calidad para cromatografía de gases
- 4.19 Gas auxiliar: nitrógeno puro, de calidad para cromatografía de gases.

## 5. PROCEDIMIENTO

### 5.1. Preparación del insaponificable

- 5.1.1 Con la microjeringa de 500 µl, introducir en el matraz de 250 ml un volumen de solución de 1-eicosanol al 0,1 % en cloroformo (4.17) que contenga una cantidad de 1-eicosanol correspondiente al 10 % aproximadamente del contenido de alcoholes alifáticos en la alícuota de la muestra para la determinación. Por ejemplo, para 5 g de muestra, añadir 250 µl de la solución de 1-eicosanol al 0,1 %, si se trata de aceite de oliva, y 1 500 µl si se trata de aceite de orujo de oliva.

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

- 5.1.2. Añadir 50 ml de solución etanólica de hidróxido potásico 2 N, poner en funcionamiento 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 éste y enfriar el matraz a 30 °C aproximadamente.

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

Separar la fase acuosa inferior pasándola a una segunda ampolla de decantación. Efectuar otras dos extracciones de la fase acuosa por el mismo procedimiento, utilizando cada vez de 60 a 70 ml de éter etílico.

Nota 1: Las posibles emulsiones pueden eliminarse añadiendo una pequeña cantidad de alcohol etílico o metílico con un pulverizador.

- 5.1.4. Reunir las fracciones etéreas en una misma ampolla de decantación 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, desecar con sulfato sódico anhidro y filtrar sobre sulfato sódico anhidro a un matraz de 250 ml previamente pesado, lavando la ampolla y el filtro con pequeñas cantidades de éter etílico.

- 5.1.5. Destilar el éter hasta que quede una pequeña cantidad; a continuación, secar en vacío ligero o en corriente de nitrógeno y completar el secado en estufa a 100 °C durante 15 minutos aproximadamente; dejar enfriar en un desecador y pesar.

## **5.2. Separación de la fracción alcohólica**

- 5.2.1. Preparación de las placas básicas: sumergir completamente las placas con gel de sílice (4.4) en la solución etanólica 0,2 N de hidróxido potásico (4.5) durante 10 segundos; dejarlas en reposo; secarlas bien bajo campana de aspiración durante dos horas y, por último, ponerlas en estufa a 100 °C durante una hora (nota 2).

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

Nota 2: Si se utilizan placas básicas de gel de sílice para la separación de la fracción alcohólica, ya no es necesario tratar el insaponificable con alúmina. De esta manera, se retienen en la línea de aplicación todos los componentes de naturaleza ácida (ácidos grasos y otros). Así se obtiene la banda de alcoholes alifáticos y terpénicos netamente separada de la banda de esteroides.

- 5.2.2. Introducir en la cubeta de desarrollo de las placas una mezcla de hexano-éter etílico 65:35 (v/v) hasta una altura de 1 cm aproximadamente (\*).

(\*) En ciertos casos particulares, para obtener una buena separación de las bandas es necesario emplear como eluyente la mezcla benceno-acetona 95/5 (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 desarrollo se reduce casi un tercio y se obtiene una elución más uniforme y regular de los componentes (nota 3).

Nota 3: A fin de que las condiciones de elución sean perfectamente reproducibles, la mezcla debe cambiarse para cada prueba.

- 5.2.3. Preparar una solución de insaponificable (5.1.5) en cloroformo al 5% aproximadamente y, con la microjeringa de 100  $\mu$ l, 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 lo más fina y uniforme posible. A la altura de la línea de aplicación se depositan, en un extremo de la placa, de 2 a 3  $\mu$ l de la solución de referencia de alcoholes alifáticos (4.11) para poder identificar la banda de alcoholes alifáticos en el revelado.
- 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 de entre 15 y 20 °C. Tapar inmediatamente la cubeta con su tapa 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 bien dejando la placa bajo campana de aspiración un breve momento.
- 5.2.5. Pulverizar la placa ligera y uniformemente con la solución de 2,7-diclorofluoresceína. Identificar la banda de alcoholes alifáticos mediante comparación con la mancha obtenida con la solución de referencia; marcar con lápiz negro el conjunto de la banda de alcoholes alifáticos y de la banda inmediatamente superior correspondiente a los alcoholes triterpénicos (nota 4).

Nota 4: La prescripción de recoger el conjunto de la banda de alcoholes alifáticos y de la banda de alcoholes terpénicos responde al hecho de que ésta, en las condiciones del método, incluye cantidades significativas de alcoholes alifáticos.

- 5.2.6. Rascar con una espátula metálica el gel de sílice contenido en el área delimitada. Introducir el material obtenido, finamente pulverizado, 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 aproximado de 4 a 5 ml, transvasar la solución residual al tubo 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 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 alcohólica.

### 5.3. Preparación de los trimetilsililéteres

- 5.3.1. Agregar al tubo que contiene la fracción de alcoholes el reactivo de silanización formado por una mezcla de piridina, hexametildisilazano y trimetilclorosilano 9:3:1 (V/V/V) (nota 5), a razón de 50 µl por miligramo de alcoholes evitando toda absorción de humedad (nota 6).

Nota 5: Existen soluciones comerciales listas para el uso. Además, también existen otros reactivos de silanización, como la bis-trimetilsililtrifluoroacetamida + 1 % de trimetilclorosilano, que se diluye en el mismo volumen de piridina anhidra.

Nota 6: La eventual formación de una ligera opalescencia es normal y no ocasiona ninguna interferencia. La formación de una floculación blanca o la aparición de una coloración rosa son indicios de presencia de humedad o de deterioro del reactivo. En este caso deberá repetirse la prueba.

- 5.3.2. Tapar el tubo y agitar cuidadosamente (sin invertir) hasta la total disolución de los alcoholes. Dejar reposar al menos un cuarto de hora a temperatura ambiente y centrifugar durante algunos minutos; la solución límpida queda lista para el análisis mediante cromatografía de gases.

### 5.4. Cromatografía de gases

- 5.4.1. Operaciones preliminares: acondicionamiento de la columna

5.4.1.1. Colocar la columna en el cromatógrafo de gases, uniendo el extremo de entrada al inyector conectado al sistema de fraccionamiento y el extremo de salida al detector. Efectuar los controles generales del equipo de cromatografía de gases (estanqueidad de los circuitos de gases, eficacia del detector, eficacia del sistema de fraccionamiento 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, encender después el equipo de cromatografía de gases e iniciar un calentamiento gradual hasta alcanzar una temperatura superior al menos en 20 °C a la temperatura de trabajo (nota 7). Mantener dicha temperatura durante 2 horas como mínimo; a continuación, poner el equipo completo en condiciones de funcionamiento (regulación del flujo de gases y del fraccionamiento (*split*), encendido 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 debe ser lineal, estar 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 7: La temperatura de acondicionamiento debe ser siempre inferior en, como mínimo, 20 °C 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 sugeridas para un sistema cromatográfico con inyector de tipo divisor de flujo (“split”) son las siguientes:

- temperatura de la columna: inicialmente isoterma durante 8 minutos a 180 °C; a continuación, programar un incremento de 5 °C/minuto hasta alcanzar los 260 °C y mantener después 15 minutos a 260 °C
- temperatura del inyector: 280 °C
- temperatura del detector: 290 °C
- velocidad lineal del gas portador: helio 20 a 35 cm/s, hidrógeno 30 a 50 cm/s
- relación de fraccionamiento (*split*): de 1/50 a 1/100,
- sensibilidad del instrumento: de 4 a 16 veces la atenuación mínima,
- sensibilidad de registro: 1 a 2 mV f.e.,
- velocidad del papel: 30 a 60 cm/hora,
- cantidad de sustancia inyectada: 0,5 a 1 µl 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 alcohol C<sub>26</sub> debe ser de 18 ± 5 minutos
- el pico del alcohol C<sub>22</sub> debe alcanzar el 80 ± 20 % del fondo de escala en el caso del aceite de oliva y el 40 ± 20 % del fondo de escala en el caso del aceite de orujo.

##### 5.4.2.2. Para comprobar los requisitos citados, efectuar varias inyecciones de mezclas problema de TMSE de alcoholes y ajustar las condiciones de trabajo para obtener los mejores resultados.

##### 5.4.2.3. Los parámetros de integración de los picos deben establecerse de modo que se obtenga una evaluación correcta de las áreas de los picos tomados en consideración.

#### 5.4.3. Realización del análisis

##### 5.4.3.1. Con la microjeringa de 10 µl tomar 1 µl de hexano, aspirar 0,5 µl de aire y, a continuación, entre 0,5 y 1 µl de la solución problema; elevar el émbolo de la jeringa de modo que la aguja quede vacía. Introducir la aguja a través de la

membrana del complejo de inyección y, después de 1 o 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 alcoholes 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 la mezcla de TMSE de los alcoholes alifáticos, analizada en las mismas condiciones.

La figura 1 muestra un cromatograma de la fracción alcohólica de un aceite de oliva virgen.

5.4.5. Determinación cuantitativa

5.4.5.1. Calcular las áreas de los picos del 1-eicosanol y de los alcoholes alifáticos C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub> y C<sub>28</sub> utilizando el integrador.

5.4.5.2. Calcular del modo siguiente el contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos, expresado en miligramos por 1 000 gramos de materia grasa:

$$\text{Alcohol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

donde:

$A_x$  = área del pico del alcohol x

$A_s$  = área del pico del 1-eicosanol

$m_s$  = peso de 1-eicosanol añadido, en miligramos

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

## 6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se expresa el contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos en miligramos por 1 000 gramos de materia grasa y su suma como «alcoholes alifáticos totales».

## APÉNDICE

### Determinación de la velocidad lineal del gas

Inyectar en el cromatógrafo de gases, preparado para trabajar en condiciones normales, de 1 a 3 µl 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 (tM).

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

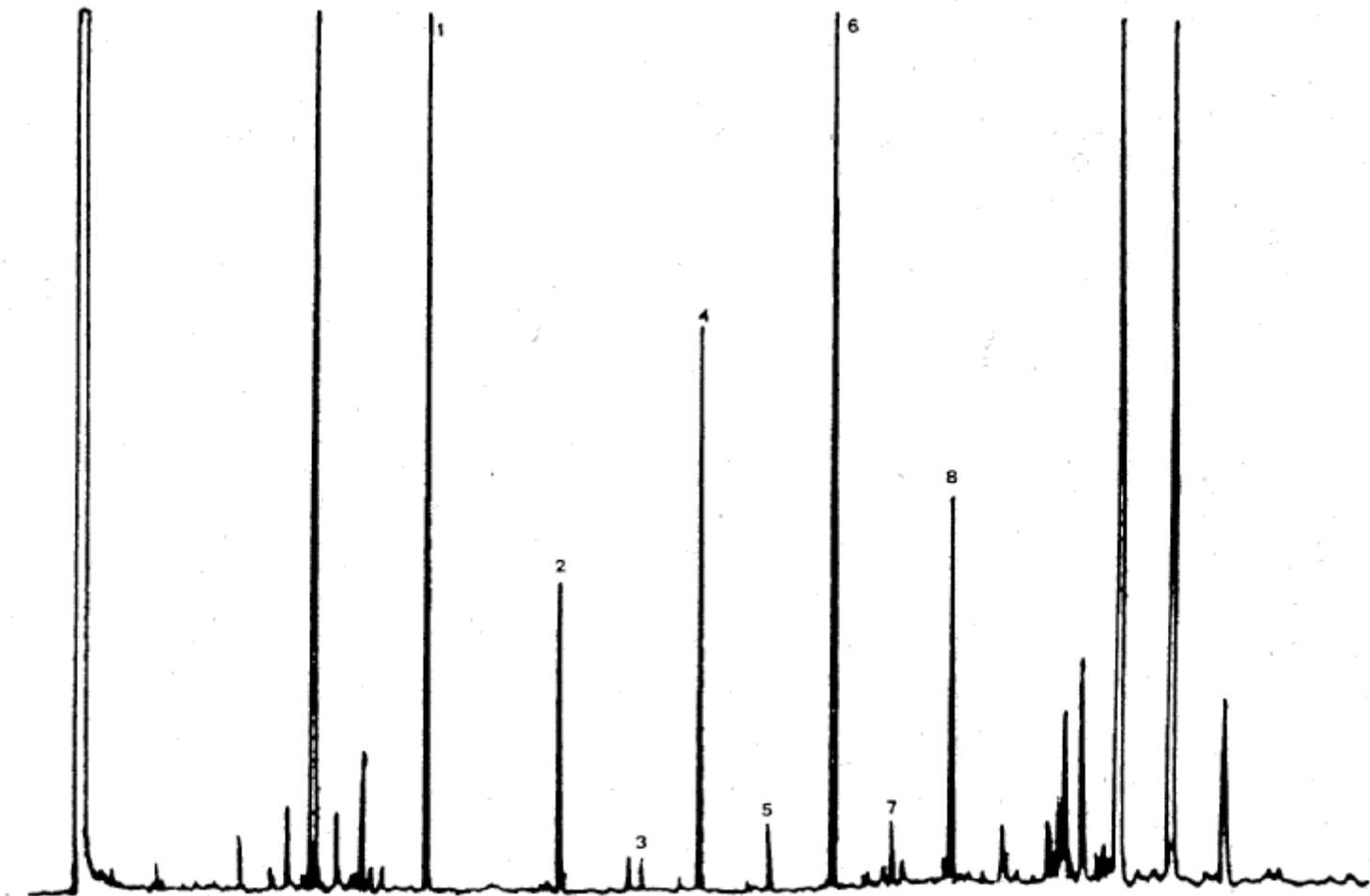


Figura 1 - Cromatograma de la fracción alcohólica de un aceite de oliva virgen

- |                  |                  |
|------------------|------------------|
| 1 = Eicosanol    | 5 = Pentacosanol |
| 2 = Docosanol    | 6 = Hexacosanol  |
| 3 = Tricosanol   | 7 = Heptacosanol |
| 4 = Tetracosanol | 8 = Octacosanol  |

## 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.

Participaron en el ensayo colaborativo organizado por la Secretaría Ejecutiva en mayo-junio de 2003, coordinado por D. Arturo Cert (Instituto de la Grasa –Sevilla) 15 laboratorios de 7 países que contaban con el reconocimiento del Consejo Oleícola Internacional, en la fecha del ensayo.

El ensayo se hizo con cinco muestras de aceite de oliva virgen lampante (AOVL), aceite de orujo de oliva crudo obtenido a partir de la centrifugación del orujo procedente del decánter de 2 fases (AOOC) y la mezcla de ambos.

- A: 100 % AOVL
- B: 85% AOVL + 15% AOOC
- C: 75% AOVL + 25% AOOC
- D: 60% AOVL + 40% AOOC
- E: 100% AOOC.

El análisis estadístico de los resultados del ensayo colaborativo, realizado por el coordinador, se efectuó según los requisitos establecidos en el “*Collaborative Study Guidelines*” de *J. of AOAC International* 78, 143A-160A, 1995. 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>	Coficiente de variación de repetibilidad (S <sub>r</sub> 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<sub>R</sub>** Desviación estándar de reproducibilidad
- RSD<sub>R</sub> (%)** Coeficiente de variación de reproducibilidad ( $S_R \times 100 / \text{mean}$ )
- HoR** Horowitz ratio  $[\frac{RSD_{R\text{exp}}}{RSD_{R\text{teor}}}]$  where  $RSD_{R\text{teor}} = 2^{(1-0.5\log C)}$  and C is the concentration of the compound expressed to the power 10.

Contenido total en alcoholes alifáticos C22 + C24 + C26 + C28 (mg/kg)

	A	B	C	D	E
<b>n</b>	15	15	15	15	15
<b>outliers</b>	3	1	1	1	1
<b>mean</b>	245	363	440	541	997
<b>r</b>	16	28	29	36	54
<b>S<sub>r</sub></b>	5.8	10	10	13	19
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	2.4	2.8	2.3	2.4	1.9
<b>R</b>	47	78	161	150	198
<b>S<sub>R</sub></b>	17	28	58	54	71
<b>RSD<sub>R</sub>(%)</b>	6.9	7.6	13.1	9.9	7.1
<b>HoR</b>	0.35	0.41	0.72	0.56	0.44