



## **MÉTODO DE ANÁLISIS**

### **DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y DEL CONTENIDO DE ESTEROLES Y DIALCOHOLES TRITERPÉNICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON COLUMNA CAPILAR**

#### **1. ÁMBITO DE APLICACIÓN**

El método describe un procedimiento para determinar el contenido individual y total de esteroides y de dialcoholes triterpénicos de los aceites de oliva y de orujo.

#### **2. PRINCIPIO**

Los aceites, con  $\alpha$ -colestanol añadido como patrón interno, están saponificados con hidróxido de potasio en solución etanólica y la materia insaponificable se extrae entonces con éter de etilo.

La fracción de esteroides y de dialcoholes triterpénicos se separa de la materia insaponificable mediante cromatografía en capa fina con una placa de gel de sílice básico. Las fracciones recuperadas del gel de sílice se transforman en éteres de trimetilsilil y se analizan entonces con cromatografía de gases con columna capilar.

#### **3. APARATOS**

El equipo de laboratorio habitual y, en particular, lo siguiente:

- 3.1. Matraz de 250 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
- 3.2. Ampolla de decantación de 500 ml.
- 3.3. Matraces de 250 ml.
- 3.4. Aparato completo para análisis mediante cromatografía en capa fina usando placas de vidrio de 20 x 20 cm.
- 3.5. Lámpara ultravioleta con longitud de onda de 366 ó 254 nm.
- 3.6. Microjeringas de 100  $\mu$ l y 500  $\mu$ l.

- 3.7. Embudo cilíndrico filtrante con filtro poroso G3 (porosidad de 15-40  $\mu\text{m}$ ) con un diámetro aproximado de 2 cm y una profundidad de 5 cm, apropiado para filtraciones al vacío, con junta esmerilada macho.
- 3.8. Matraz cónico de vacío de 50 ml con junta esmerilada hembra acoplable al embudo filtrante (3.7).
- 3.9. Tubo de ensayo de 10 ml con fondo cónico y tapón de vidrio de cierre hermético.
- 3.10. Cromatógrafo de gases adecuado para su uso en columna capilar con inyector del tipo divisor de flujo (“split”) separado formado por:
  - 3.10.1. Un cámara para columnas capaz de mantener la temperatura deseada con una precisión de  $\pm 1$  °C.
  - 3.10.2. Inyector termorregulable con elemento vaporizador de vidrio persilanizado y divisor.
  - 3.10.3. Detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés).
  - 3.10.4. Sistema de captura de datos para uso con el detector FID (3.10.3), capaz de integrarse manualmente.
- 3.11. Columna capilar de sílice fundida, de 20 a 30 m de longitud y de 0,25 a 0,32 mm de diámetro interno, recubierta con difenil (5%) y dimetilpolisiloxano (95%) (en fase estacionaria SE 52 ó SE 54 o equivalente), con un espesor uniforme que oscile entre 0,10 y 0,30  $\mu\text{m}$ .
- 3.12. Microjeringa, de 10  $\mu\text{l}$  de capacidad, para cromatografía de gases, con aguja fija apropiada para inyección tipo “split”.
- 3.13. Desecador de dicloruro de calcio.

#### **4. REACTIVOS**

- 4.1. Hidróxido potásico (valoración mínima del 85%)
- 4.2. Hidróxido potásico, solución etanólica 2 N, aproximadamente:

disolver, enfriando al mismo tiempo, 130 g de hidróxido potásico (4.1) en 200 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol (4.10). Conservar la solución en botellas de vidrio oscuro bien cerradas y almacenarla un máximo de 2 días.
- 4.3. Éter etílico de calidad para análisis.
- 4.4. Hidróxido potásico, solución etanólica 0,2 N, aproximadamente:

disolver 13 g de hidróxido potásico (4.1) en 20 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol (4.10).

- 4.5. Sulfato sódico anhidro, de calidad para análisis.
- 4.6. Placas de vidrio recubiertas con gel de sílice, sin indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor (disponibles comercialmente lista para usar)
- 4.7. Tolueno, de calidad para cromatografía.
- 4.8. Acetona, de calidad para cromatografía.
- 4.9. n-Hexano, de calidad para cromatografía.
- 4.10. Éter etílico, de calidad para cromatografía.
- 4.11. Etanol, de calidad para análisis.
- 4.12. Acetato de etilo, de calidad para análisis.
- 4.13. Solución de referencia para cromatografía en capa fina: colesterol o fitoesteroles, y solución de eritrodiol al 5% en acetato de etilo (4.11).
- 4.14. 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 (4.2).
- 4.15. Piridina anhidra para cromatografía (véase nota 5).
- 4.16. Hexametildisilazano, de calidad para análisis.
- 4.17. Trimetilclorosilano, de calidad para análisis.
- 4.18. Solución patrón de los trimetilsililéteres de esteroides: preparar en el momento del uso a partir de esteroides y eritrodiol obtenidos de aceites que los contengan.
- 4.19.  $\alpha$ -Colesterol, de pureza superior al 99% (hay que comprobar la pureza mediante cromatografía de gases).
- 4.20.  $\alpha$ -Colesterol, disolución al 0,2 % (m/V) como patrón interno en acetato de etilo (4.11).
- 4.21. Solución de fenolftaleína, 10 g/L en etano (4.10).
- 4.22. Gas portador: hidrógeno o helio puro, de calidad para cromatografía de gases.
- 4.23. Gases auxiliares: Hidrógeno, helio, nitrógeno y aire, de calidad para cromatografía de gases.
- 4.24. Mezcla de n-Hexano (4.9)/éter etílico (4.10) 65:35 (V/V).
- 4.25. Reactivo de sililación, consiste en una mezcla 9:3:1 (V/V/V) de piridina/hexametildisilazano/trimetilclorosilano.

## 5. PROCEDIMIENTO

### 5.1. Preparación del insaponificable

5.1.1. Con una microjeringa de 500  $\mu$ l (3.6) introducir en el matraz de 250 ml (3.1) un volumen de solución de patrón interno de  $\alpha$ -colestanol (4.20) que contenga una cantidad de colesterol correspondiente a aproximadamente el 10 % del contenido de esterol de la muestra. Por ejemplo, para una muestra de aceite de oliva de 5 g añadir 500  $\mu$ l de la solución de  $\alpha$ -colestanol (4.20) y 1500  $\mu$ l para el aceite de orujo. Evaporar hasta secar mediante una ligera corriente de nitrógeno en un baño de agua templado y, después de enfriar el matraz, poner  $5 \pm 0,01$  g de muestra filtrada seca en el mismo matraz.

Nota 1: 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 2 N (4.2) y algo de piedra pómez, ajustar el condensador de reflujo y calentar hasta ebullición suave hasta tenga lugar la saponificación (la solución se vuelve incolora). Calentar durante 20 minutos más y, a continuación, añadir 50 ml de agua destilada por la parte superior del condensador; separar el condensador y enfriar el matraz a 30°C aproximadamente.

5.1.3. Pasar los contenidos del matraz cuantitativamente a una ampolla de decantación de 500 ml (3.2) usando varias fracciones de agua destilada (50 ml). Añadir aproximadamente 80 ml de éter etílico (4.10) y agitar con fuerza aproximadamente durante 60 segundos, liberando periódicamente la presión invirtiendo la ampolla de decantación y abriendo la llave. Dejarla en reposo hasta que se produzca una completa separación en dos fases (nota 2).

Retire entonces la solución de jabón lo más exhaustivamente posible y pásela a una segunda ampolla de decantación. Efectuar otras dos extracciones de la fase hidroalcohólica por el mismo procedimiento, utilizando cada vez de 60 a 70 ml de éter etílico en cada ocasión (4.10).

Nota 2: Las emulsiones pueden eliminarse añadiendo pequeñas cantidades de etanol (4.11).

5.1.4. Combinar las tres extracciones de éter en una ampolla de decantación que contenga 50 mL de agua. Continuar el enjuague con agua (50 mL) hasta que el agua de lavado no adquiera un color rosa al añadirle una gota de solución de fenolftaleína (4.21).

Una vez eliminada el agua de lavado, filtrar con sulfato sódico anhidro (4.5) 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 (4.10).

5.1.5. Evaporar el disolvente mediante su destilación en un rotavapor a 30 °C al vacío. Añadir 5 mL de acetona y eliminar totalmente el disolvente volátil con una ligera corriente de aire. Secar el residuo en el horno a  $103 \pm 2$  °C durante 15 min. Enfriar en desecadores y pesar lo más cercano a 0,1 mg.

5.2. Separación de la fracción de esterol y dialcoholes triterpénicos (eritrodiol + uvaol)

5.2.1. Preparación de placas para cromatografía en capa fina básica. Sumergir las placas con gel de sílice (4.6) unos 4 cm en la solución etanólica 0,2 N de hidróxido potásico (4.5) durante 10 segundos; dejar secar las placas en una campana durante dos horas y, por último, mantenerlas en un horno a 100 °C durante una hora.

Sacarlas del horno y conservarlas en un desecador (3.13) 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 3: 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 terpenoides.

5.2.2. Colocar la mezcla de hexano y éter etílico (4.24) (nota 4) en la cubeta de desarrollo a una profundidad aproximada de 1 cm. Cerrar la cubeta con la tapa adecuada y dejarla así durante al menos media hora, en un lugar frío, de manera que se establezca el equilibrio líquido-vapor; se pueden colocar tiras de papel de filtro que se sumerjan en el eluyente en las caras interiores de la cubeta. 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 4: A fin de que las condiciones de elución sean perfectamente reproducibles, la mezcla de desarrollo debe cambiarse en cada prueba. Alternativamente, se puede utilizar una mezcla de n-hexano/éter etílico 50:50 (V/V).

5.2.3. Preparar una solución de insaponificable (5.1.5) en acetato de etilo al 5% aproximadamente (4.12) y, utilizando una microjeringa de 100 µl, depositar 0,3 ml de solución sobre una línea fina e uniforme en el extremo inferior (2 cm) de la placa cromatográfica (5.2.1). Paralela a esta línea, coloque de 2 a 3 µl de la solución de referencia (4.13), de manera que pueda identificarse la banda de esterol y de dialcoholes triterpénicos 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 a una temperatura ambiente entre 15 y 20 °C (nota 5). 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.

Nota 5: Una temperatura más alta podría perjudicar la separación.

5.2.5. Pulverizar la placa ligera y uniformemente con la solución de 2,7-diclorofluoresceína (4.14) y dejarla secar. Identificar la banda de esteroides y dialcoholes triterpénicos mediante comparación con la mancha obtenida a partir de la solución de referencia mediante luz ultravioleta (4.13). Marcar con lápiz negro los límites de la banda a lo largo de los márgenes de fluorescencia (véase la placa de la figura 3).

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 al vacío, recogiendo el filtrado en el matraz cónico (3.8) conectado al embudo filtrante.

Lavar el residuo en el embudo tres veces con éter etílico (4.3) (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 secar mediante calentamiento suave en corriente ligera de nitrógeno, recoger con algunas gotas de acetona, evaporar de nuevo hasta secar.

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

### 5.3. Preparación de los trimetilsililéteres

5.3.1. Añadir al tubo que contiene la fracción de esteroides y triterpénicos el reactivo de sililación (4.25) (nota 6) a razón de 50 ml por miligramo de esteroides y de dialcoholes triterpénicos, evitando toda absorción de humedad (nota 7).

Nota 6: Existen soluciones de venta comercial listas para usar. Además, también existen otros reactivos de sililación disponibles, como la bis-trimetilsilil-trifluoro-acetamida + trimetilclorosilano al 1%, que se diluye en el mismo volumen de piridina anhidra. La piridina se puede sustituir por la misma cantidad de acetonitrilo.

5.3.2. Tapar el tubo y agitar cuidadosamente (sin invertir) hasta la completa disolución de los esteroides y dialcoholes triterpénicos. Dejarlo en reposo durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente y, entonces, centrifugar durante unos minutos. La solución incolora está preparada para el análisis mediante cromatografía de gases.

Nota 7: 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 deterioro del reactivo. En este caso deberá repetirse la prueba (solo cuando se utilice hexametildisilazano/trimetilclorosilano).

### 5.4. Análisis mediante cromatografía de gases

5.4.1. Operaciones preliminares: acondicionamiento de la columna capilar.

5.4.1.1. Colocar la columna (3.11) en el cromatógrafo conectando la entrada al inyector y la 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: pasar un ligero flujo de gas a través de la columna, poner en marcha el cromatógrafo e iniciar un calentamiento gradual hasta una temperatura al menos 20 °C superior a la de trabajo (nota 8). Mantener esta temperatura durante 2 horas como mínimo; a continuación, poner el equipo en modo de funcionamiento (ajuste del flujo y división de gases, ignición de la llama, conexión al sistema informático, temperatura 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 8: 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 operativas serán las siguientes:

- Temperatura de la columna:  $260 \pm 5$  °C;
- Temperatura del inyector: 280-300 °C;
- Temperatura del detector: 280-300 °C;
- Velocidad lineal del gas portador: 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: de 1 a 2 mV a plena escala;
- 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  $\beta$ -sitosterol debe ser de  $20 \pm 5$  minutos;
- El pico del campesterol debe ser: para el aceite de oliva (contenido medio del 3 %),  $20 \pm 5$  % de toda la escala; para el aceite de soja (contenido medio del  $\pm 20$  %),  $80 \pm 10$  % de toda 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. Sin embargo, puede tolerarse una resolución incompleta siempre que pueda cuantificarse el pico RRT 1.02 (sistostanol) por la perpendicular.

#### 5.4.3. Procedimiento analítico

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 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.

También se puede utilizar un inyector automático.

5.4.3.2. Realizar el registro hasta que el TMSE de los dialcoholes triterpénicos estén completamente eluidos. La línea de base debe ajustarse en todo momento a las condiciones exigidas (5.4.1.2.).

#### 5.4.4. Identificación de picos

La identificación de los diferentes picos se realiza en función de los tiempos de retención y por comparación con las mezclas de TMSE de los esteroides y dialcoholes triterpénicos analizados en las mismas condiciones.

La elución de los esteroides y dialcoholes triterpénicos se efectúa en el siguiente orden: colesterol, brasicasterol, ergosterol, 24-metilen-colesterol, campesterol, campestenol, estigmasterol, Δ7-campesterol, Δ5,23-estigmastadienol, clerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol, Δ5,24-estigmastadienol, Δ7-estigmastenol, Δ7-avenasterol, eritrodiol y uvaol.

En la tabla 1, se muestran los tiempos de retención correspondientes al β-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 de α-colestanol y de los picos de los esteroides y dialcoholes triterpénicos mediante un equipo informático. No se tendrán en cuenta los picos de aquellos componentes que no aparezcan en la tabla 1. El coeficiente de respuesta para el α-colestanol debe considerarse como 1.

5.4.5.2 Calcular del siguiente modo 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 para el esteroide x, en los recuentos del sistema informático.

$A_s$  = área del pico del α-colestanol, en los recuentos del sistema informático.

$m_s$  = masa del α-colestanol añadido, en miligramos;

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

## 6. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- 6.1. Se informa sobre las concentraciones de esteroles individual en mg/kg de materia grasa y, sobre su suma como “esteroles totales”.

La composición de cada esteroles individual y del eritrodiol y uvaol se deberán expresar con decimales.

La composición total de esteroides se expresará sin decimales.

- 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.

$$\text{esteroles } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \cdot 100$$

siendo:

$A_x$  = área del pico de x

$\Sigma A$  = suma de las áreas de todos los picos

- 6.3. b-Sitosterol aparente: 5-23-estigmastadienol + clerosterol +  $\beta$ -sitosterol + sitostanol +  $\Delta^5$ -avenasterol +  $\Delta^5$ -24-estigmastadienol.

- 6.4. Calcular el porcentaje de eritrodiol y uvaol:

$$\text{Eritrodiol + uvaol} = \frac{Er. + Uv.}{Er. + Uv. + \Sigma A} \cdot 100$$

siendo:

$\Sigma A$  = área de suma de esteroides en los recuentos del sistema informático.

Er = área del eritrodiol en los recuentos del sistema informático.

Uv = área del uvaol en los recuentos del sistema informático.

**APÉNDICE**

*Determinación de la velocidad lineal del gas*

Inyectar en el cromatógrafo, preparado para trabajar en condiciones normales, de 1 a 3  $\mu$ l 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).

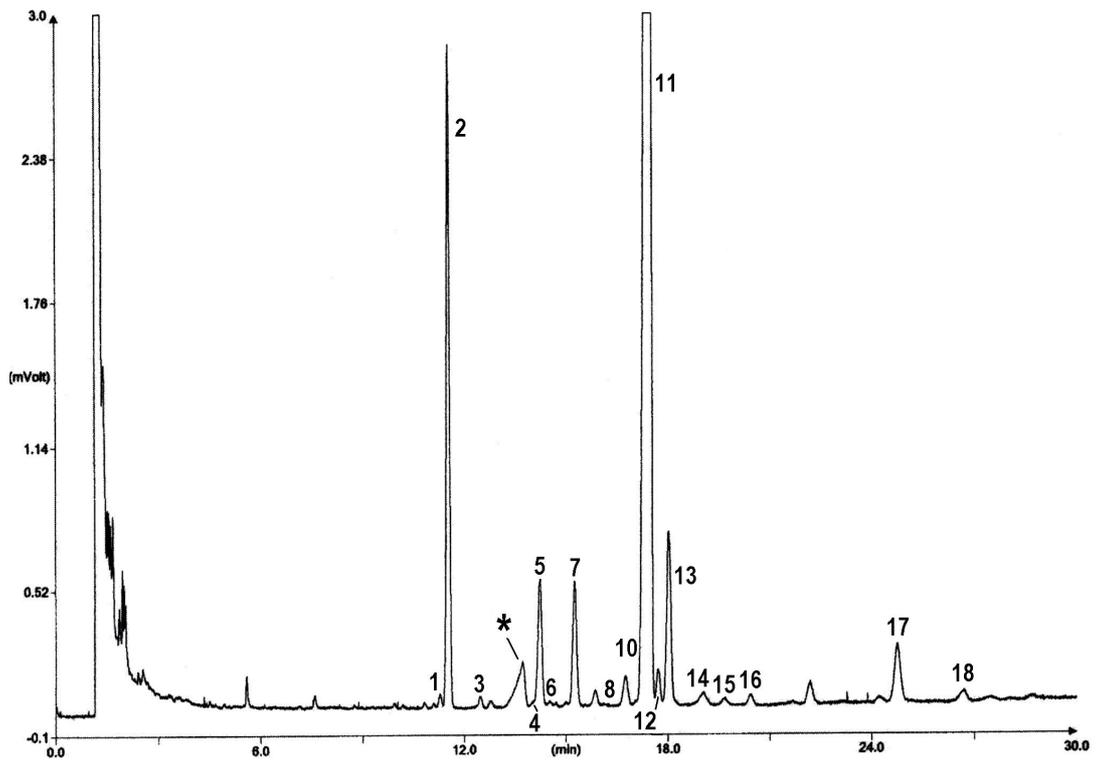
La velocidad lineal en cm/s viene dada por L/tM, siendo L la longitud de la columna en centímetros y tM el tiempo, expresado en segundos.

**TABLA 1**  
**TIEMPOS DE RETENCIÓN RELATIVOS DE LOS ESTEROLES**

Pico	Identificación		Tiempo de retención relativos	
			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
*	Ergosterol	[24S] 24 meti $\Delta$ 5-7-22 colestatrien 3 $\beta$ ol	0,78	0,76
4	24-metilene-colesterol	24-metilene- $\Delta$ -5,24-colestadien-3 $\beta$ -ol	0,82	0,80
5	Campesterol	(24R)-24-metil- $\Delta$ -5-colesten-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-etilidene- $\Delta$ -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-etilidene- $\Delta$ -7-colesten-3 $\beta$ -ol	1,16	1,16
17	Eritrodiol	5 $\alpha$ olean-12en-3 $\beta$ 28 diol	1,41	1,41
18	Uvaol	$\Delta$ 12-ursen-3 $\beta$ 28 diol	1,52	1,52

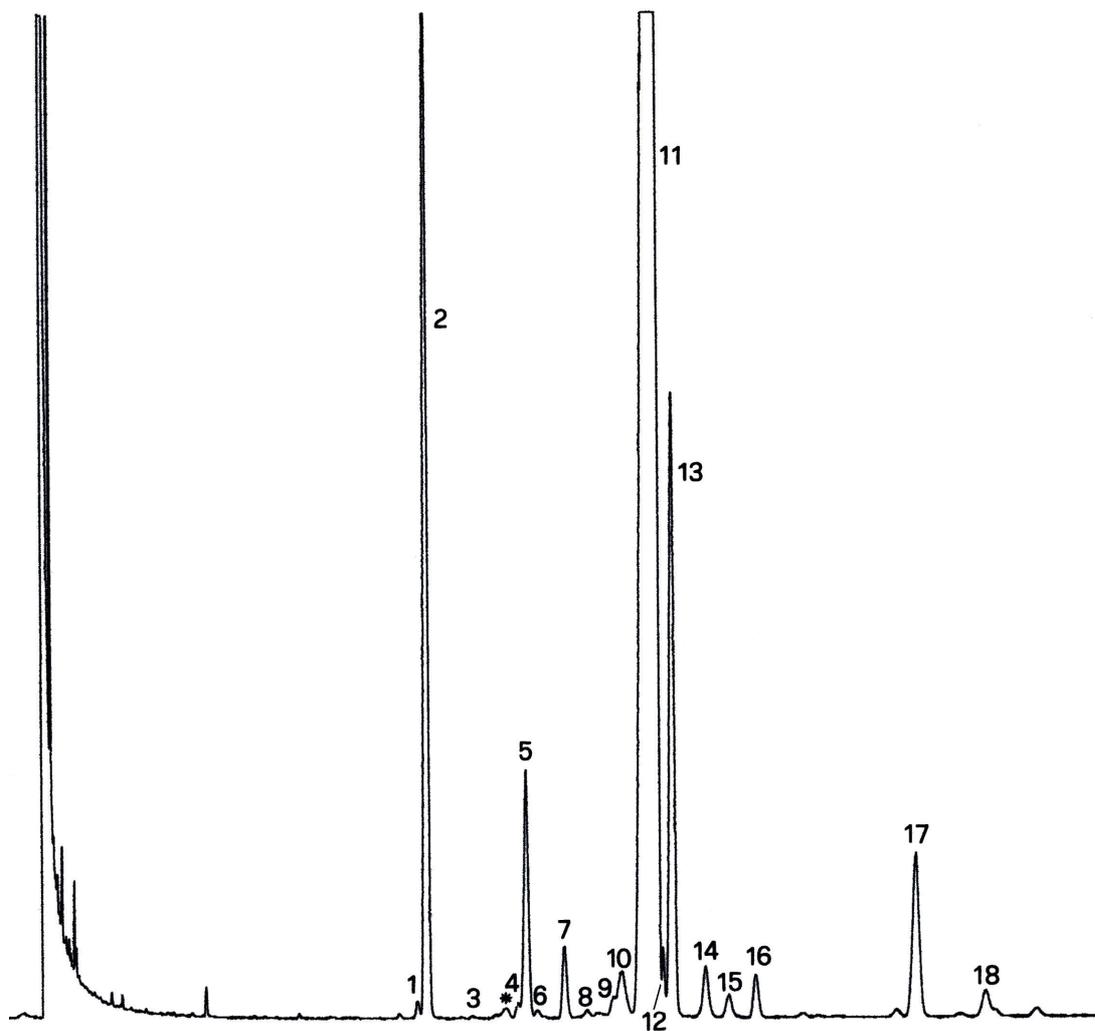
**FIGURA 1**

**CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LA FRACCIÓN DE ESTEROL Y DE DIALCOHOLES  
TRITERPÉNICOS DE ACEITE DE OLIVO LAMPANTE  
(con ayuda de patrón interno)**



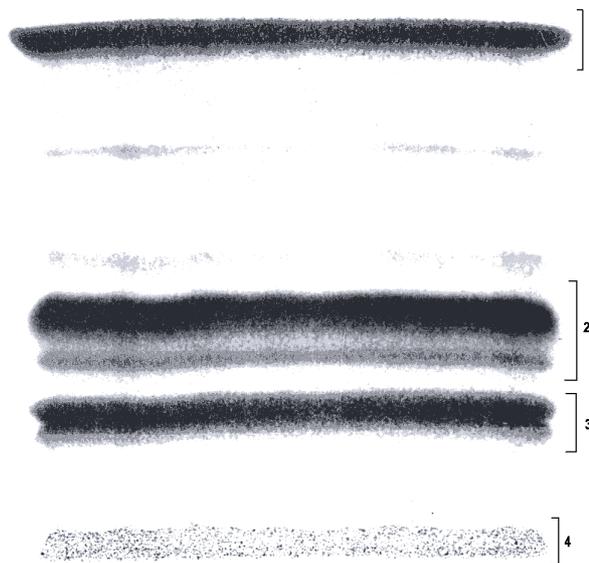
**FIGURA 2**

**CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LA FRACCIÓN DE ESTEROL Y DE DIALCOHOLES  
TRITERPÉNICOS DE ACEITE DE OLIVO REFINADO**  
(con ayuda de patrón interno)



**Figura 3**

**Placa cromatográfica del aceite de orujo donde se observa el área que debería rasparse para calcular el contenido de esteroides y dialcoholes triterpénicos.**



**Leyenda:**

- 1 – Escualeno
- 2 – Alcoholes triterpénicos y alifáticos
- 3 – Esteroides y alcoholes triterpénicos
- 4 – Inicio y ácidos grasos libres

## MÁRGENES DE PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA LOS ESTEROLES

### 1. Análisis de los resultados del ensayo colaborativo

Los márgenes de precisión del método se presentan en la tabla que se presente a continuación.

Diecinueve laboratorios participaron en el ensayo colaborativo organizado por la Secretaría Ejecutiva en 2009.

El ensayo se realizó con cinco muestras:

- ST-1 Aceite de orujo crudo.
- ST-2 Aceite de orujo refinado.
- ST-3 Aceite de oliva virgen extra.
- ST-4 Mezcla con 20 % de aceite de girasol con alto contenido oleico, 70 % de aceite de oliva virgen extra y 10 % de aceite de colza.
- ST-5 Mezcla con 15 % de aceite de soja y 85 % de aceite de oliva.

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 **Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición**. 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.

La tabla contiene los siguientes elementos:

<b><math>n_p</math></b>	Número de laboratorios participantes en el ensayo
<b>res. aberr.</b>	Número de laboratorios con resultados aberrantes
<b>media</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 dos resultados del ensayo individuales e independientes, obtenidos aplicando el mismo método a una muestra idéntica, en el mismo laboratorio con el mismo operador, utilizando los mismos aparatos y a intervalos cortos de tiempo
<b><math>S_r</math></b>	Desviación estándar de repetibilidad
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	Coficiente de variación de repetibilidad ( $S_r \times 100/\text{media}$ )
<b>R</b>	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 aplicando el mismo método a una muestra idéntica, en laboratorios diferentes, con operadores diferentes y utilizando aparatos diferentes
<b><math>S_R</math></b>	Desviación estándar de reproducibilidad
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	Coficiente de variación de reproducibilidad ( $S_R \times 100/\text{media}$ )

## Composición de esteroles

### Colesterol

Muestra	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nº. de laboratorios participantes, $n_p$	19	19	19	19	19
Nº. de laboratorios después de eliminar los resultados aberrantes, $n_p$	19	14	16	18	18
Nº. de ensayos en todos los laboratorios, $n_t$	38	28	32	36	36
Media (%)	0,13	0,13	0,13	0,16	0,21
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$	0,024	0,018	0,016	0,025	0,015
Coefficiente de variación de repetibilidad, $CV(r)$ , %	18,8	14,0	12,3	15,1	7,2
Límite de repetibilidad, $r$	0,07	0,05	0,04	0,07	0,04
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$	0,041	0,023	0,038	0,047	0,058
Coefficiente de variación de reproductibilidad, $CV(R)$ , %	31,9	17,8	29,5	29,1	27,7
Límite de reproductibilidad, $R$	0,12	0,07	0,11	0,13	0,16

### Brasicasterol

Muestra	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nº. de laboratorios participantes, $n_p$	19	19	19	19	19
Nº. de laboratorios después de eliminar los resultados aberrantes, $n_p$	19	15	17	19	18
Nº. de ensayos en todos los laboratorios, $n_t$	38	30	34	38	36
Media (%)	0,05	0,02	0,000	1,46	0,02
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$	0,013	0,004	----	0,039	0,007
Coefficiente de variación de repetibilidad, $CV(r)$ , %	25,9	21,1	----	2,7	32,7
Límite de repetibilidad, $r$	0,04	0,01	----	0,11	0,02
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$	0,039	0,020	----	0,052	0,024
Coefficiente de variación de reproductibilidad, $CV(R)$ , %	75,1	115,2	----	3,6	107,2
Límite de reproductibilidad, $R$	0,11	0,06	----	0,15	0,07

### Campesterol

Muestra	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nº. de laboratorios participantes, $n_p$	19	19	19	19	19
Nº. de laboratorios después de eliminar los resultados aberrantes, $n_p$	18	18	17	18	18
Nº. de ensayos en todos los laboratorios, $n_t$	36	36	34	36	36
Media (%)	3,22	3,13	2,98	10,74	6,99
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$	0,044	0,045	0,029	0,100	0,061
Coefficiente de variación de repetibilidad, $CV(r)$ , %	1,3	1,4	1,0	1,0	0,9
Límite de repetibilidad, $r$	0,12	0,13	0,08	0,28	0,17
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$	0,085	0,087	0,086	0,259	0,167
Coefficiente de variación de reproductibilidad, $CV(R)$ , %	2,6	2,8	2,9	2,4	2,4
Límite de reproductibilidad, $R$	0,24	0,24	0,24	0,73	0,47

### Estigmasterol

Muestra	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nº. de laboratorios participantes, $n_p$	19	19	19	19	19
Nº. de laboratorios después de eliminar los resultados aberrantes, $n_p$	17	16	18	18	19
Nº. de ensayos en todos los laboratorios, $n_t$	34	32	36	36	38
Media (%)	1,23	1,05	0,41	2,83	5,40
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$	0,027	0,040	0,046	0,043	0,087
Coefficiente de variación de repetibilidad, $CV(r)$ , %	2,2	3,8	11,1	1,5	1,6
Límite de repetibilidad, $r$	0,08	0,11	0,13	0,12	0,24
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$	0,039	0,059	0,064	0,111	0,158
Coefficiente de variación de reproductibilidad, $CV(R)$ , %	3,2	5,7	15,6	3,9	2,9
Límite de reproductibilidad, $R$	0,11	0,17	0,18	0,31	0,44

**b-Sistosterol aparente:**

Muestra	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nº. de laboratorios participantes, $n_p$	19	19	19	19	19
Nº. de laboratorios después de eliminar los resultados aberrantes, $n_p$	16	17	17	18	17
Nº. de ensayos en todos los laboratorios, $n_t$	32	34	34	36	34
Media (%)	93,9	93,8	95,2	78,6	84,8
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$	0,141	0,223	0,091	0,195	0,220
Coficiente de variación de repetibilidad, $CV(r)$ , %	0,15	0,24	0,10	0,25	0,26
Límite de repetibilidad, $r$	0,4	0,6	0,3	0,6	0,6
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$	0,355	0,471	0,340	1,372	0,819
Coficiente de variación de reproductibilidad, $CV(R)$ , %	0,38	0,50	0,36	1,75	1,00
Límite de reproductibilidad, $R$	1,0	1,3	1,0	4,0	2,2

**$\Delta 7$ -Estigmastenol**

Muestra	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nº. de laboratorios participantes, $n_p$	19	19	19	19	19
Nº. de laboratorios después de eliminar los resultados aberrantes, $n_p$	18	19	19	17	18
Nº. de ensayos en todos los laboratorios, $n_t$	36	38	38	34	36
Media (%)	0,70	0,94	0,27	3,52	1,10
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$	0,028	0,056	0,025	0,090	0,040
Coficiente de variación de repetibilidad, $CV(r)$ , %	4,1	6,0	9,5	2,6	3,6
Límite de repetibilidad, $r$	0,08	0,16	0,07	0,25	0,11
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$	0,086	0,084	0,067	0,171	0,087
Coficiente de variación de reproductibilidad, $CV(R)$ , %	12,3	8,9	25,3	4,9	7,9
Límite de reproductibilidad, $R$	0,24	0,24	0,19	0,48	0,24

**Dialcoholes triterpénicos (eritrodiol + uvaol)**

Muestra	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nº. de laboratorios participantes, $n_p$	19	19	19	19	19
Nº. de laboratorios después de eliminar los resultados aberrantes, $n_p$	17	15	19	18	15
Nº. de ensayos en todos los laboratorios, $n_t$	34	30	38	36	30
Media (mg/kg)	22,38	27,17	1,80	1,06	2,9
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$	0,214	0,333	0,215	0,162	0,108
Coefficiente de variación de repetibilidad, $CV(r)$ , %	1,0	1,2	11,9	15,3	3,8
Límite de repetibilidad, $r$	0,60	0,93	0,60	0,46	0,30
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$	1,028	1,257	0,450	0,342	0,210
Coefficiente de variación de reproductibilidad, $CV(R)$ , %	4,6	4,6	25,0	32,2	7,3
Límite de reproductibilidad, $R$	2,88	3,52	1,26	0,96	0,59

**Contenido total de esteroides**

Muestra	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nº. de laboratorios participantes, $n_p$	18	18	18	18	18
Nº. de laboratorios después de eliminar los resultados aberrantes, $n_p$	17	18	18	17	17
Nº. de ensayos en todos los laboratorios, $n_t$	34	36	36	34	34
Media (mg/kg)	4487,0	3169,8	1359,8	2066,5	1552,1
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$	71,76	49,15	45,19	30,14	31,75
Coefficiente de variación de repetibilidad, $CV(r)$ , %	1,6	1,6	3,3	1,5	2,1
Límite de repetibilidad, $r$	200,9	137,6	126,5	84,4	88,9
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$	378,89	234,65	82,93	131,47	89,54
Coefficiente de variación de reproductibilidad, $CV(R)$ , %	8,4	7,4	6,1	6,4	5,8
Límite de reproductibilidad, $R$	1060,9	657,0	232,2	368,1	250,7

## 2. Referencias

- ISO 5725-1:1994 Exactitud (veracidad y precisión) de los resultados y métodos de medición (parte 1): principios generales y definiciones
- ISO 5725-2:1994 Exactitud (veracidad y precisión) de los resultados y métodos de medición (parte 2): método básico para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad de un método de medición normalizado
- ISO 5725-5:1994 Exactitud (veracidad y precisión) de los resultados y métodos de medición (parte 5): métodos alternativos para determinar la precisión de un método de medición normalizado
- ISO 5725-6:1994 Exactitud (veracidad y precisión) de los resultados y métodos de medición (parte 6): utilización en la práctica de los valores de exactitud.
-