

ANALITICOS EN ALIMENTARIA

METODOS OFICIALES DE ANALISIS

**Aceites
y grasas**

PANREAC QUIMICA, S.A. ha publicado desde hace años la colección de Métodos Analíticos en Alimentaria, que creemos ha sido de gran utilidad por la gran acogida que han tenido por parte de nuestros clientes.

MÉTODOS ANALÍTICOS EN ALIMENTARIA

Durante todo este tiempo se han producido modificaciones tanto en los métodos propuestos en la legislación, como en la oferta de nuevos productos fabricados y distribuidos por Panreac. Las nuevas ediciones de los Métodos Analíticos en Alimentaria irán recogiendo todas estas modificaciones y se irán actualizando de manera acorde.

La incorporación de España en la Unión Europea y la transposición de las Directivas Comunitarias en la Legislación Española hace que, cada vez más, se utilicen los métodos de las Normativas Comunitarias en el trabajo habitual. Por tanto, las nuevas ediciones se realizarán con los métodos establecidos en las Directivas. Este principio se ha introducido en la nueva edición del folleto "Aceites y Grasas" y se irá implementando en las nuevas ediciones actualizadas de los distintos métodos.

Los títulos de las 6 monografías son:

Aceites y grasas

**Aguas potables
de consumo público
y aguas de bebida envasadas**

Carne y productos cárnicos

**Cereales, derivados de cereales
y cerveza**

Leche y productos lácteos

**Productos derivados de la uva,
aguardientes y sidras**

Obviamente esta edición ha sido actualizada con las disposiciones publicadas hasta el momento, que establecen nuevos procedimientos o que modifican notablemente características anteriormente establecidas.

Por último, comentarles que están a su disposición además de esta colección, nuestros:

Catálogo General de Reactivos PANREAC

Catálogo ADITIO de Aditivos Alimentarios

Manual Básico de Microbiología CULTIMED.

C O N T E N I D O

Aceites y grasas

Recoge una transcripción íntegra de los métodos oficiales de análisis publicados en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas:

- NºL248/1 de 5.9.91 Reglamento (CEE) Nº2568/91 de la Comisión de 11 de julio de 1991 actualizados con las siguientes modificaciones hasta la fecha: (Mayo 1999).

- NºL150/17 de 2.6.92 Reglamento (CEE) Nº1429/92 de la Comisión de 26 de mayo de 1992

- NºL258/49 de 28.10.95 Reglamento (CE) Nº2527/95 de la Comisión de 27 de octubre de 1995

- L341/25 de 12.12.97 Reglamento (CE) Nº2472/97 de la Comisión de 11 de diciembre de 1997

- L28/5 de 4.2.98 Reglamento (CE) Nº282/98 de la Comisión de 3 de febrero de 1998

- L85/3 de 20.3.98 Reglamento (CE) Nº623/98 de la Comisión de 19 de marzo de 1998

A continuación de los métodos de análisis se indican los reactivos Panreac recomendados.

Aceites

Anexo I: Características de los aceites de oliva 12

Anexo II: Determinación del grado de acidez

1. Objeto	14
1.1 Principio.....	14
1.2 Reactivos.....	14
1.3 Material.....	15
1.4 Procedimiento.....	15
1.5 Expresión.....	15

Anexo III: Determinación del índice de peróxidos

1. Objeto	15
2. Ambito de aplicación	15
3. Definición	15
4. Principio	15
5. Aparatos	15
6. Reactivos	16
7. Muestra	16
8. Procedimiento.....	16
9. Expresión de los resultados	16

Anexo IV: Determinación del contenido de ceras mediante cromatografía de gases con columna capilar

1. Objeto.....	17
2. Principio	17
3. Aparatos	17
4. Reactivos	17
5. Procedimiento	18
6. Expresión de los resultados	19
Apéndice	19

Anexo V: Determinación de la composición y del contenido de esteroides mediante cromatografía de gases con columna capilar

1. Objeto	20
2. Principio	20
3. Material	20
4. Reactivos	20
5. Procedimiento	21
6. Expresión de los resultados	24
Apéndice	24

Anexo VI: Determinación del contenido en eritrodio y uvaol

Introducción	27
1. Objeto	27
2. Principio	27
3. Material y aparatos	27
4. Reactivos	27
5. Procedimiento	27
6. Expresión de los resultados	28

Anexo VII: Determinación de los ácidos grasos situados en la posición 2 de los triglicéridos de aceites y grasas

1. Objeto.....	28
2. Campo de aplicación	28
3. Principio.....	28
4. Equipo	28
5. Reactivos.....	29
6. Preparación de la muestra	30
7. Preparación de las placas cromatográficas	30
8. Procedimiento.....	30
9. Expresión de los resultados	31
10. Notas.....	31

Anexo VIII: Determinación del porcentaje de trilinoleína

1. Objeto.....	31
2. Campo de aplicación	31
3. Principio.....	32
4. Aparatos.....	32
5. Reactivos.....	32
6. Preparación de las muestras.....	32
7. Procedimiento.....	32
8. Cálculo y expresión de los resultados	32

Anexo IX: Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta

Introducción	35
1. Objeto.....	35
2. Principio.....	35
3. Material y aparatos.....	35
4. Reactivos.....	35
5. Procedimiento.....	35
6. Expresión de los resultados	36
Apéndice I: Preparación de la alúmina y control de su actividad	36
Apéndice II: Ajuste del espectrofotómetro.....	36

Anexo X "A": Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases

1. Objeto.....	37
2. Reactivos.....	37
3. Aparatos.....	37
4. Procedimiento.....	38
5. Expresión de los resultados	41
6. Caso especial de determinación de los isómeros trans	42
7. Caso especial de utilización de un catarómetro (funcionamiento basado en el principio de los cambios de conductividad térmica).....	44
8. Informe del análisis.....	44

Anexo X "B": Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de conformidad con los puntos I y II del anexo VI del Reglamento (CEE) N° 72/77

Introducción	44
1. Objeto.....	45
Procedimiento A	
2. Principio del método.....	45
3. Material y aparatos.....	45
4. Reactivos.....	45
5. Procedimiento.....	45
Procedimiento B	
2. Principio del método.....	46
3. Material y aparatos.....	46
4. Reactivos.....	46
5. Procedimiento.....	46
Procedimiento C	
2. Principio del método.....	46
3. Material y aparatos.....	46
4. Reactivos.....	46
5. Procedimiento.....	47
Procedimiento D	
2. Principio del método.....	47
3. Material y aparatos.....	47
4. Reactivos.....	47
5. Procedimiento.....	47
Procedimiento E	
2. Principio del método.....	48
3. Material y aparatos.....	48
4. Reactivos.....	48
5. Procedimiento.....	48

Anexo XI: Determinación del contenido en solventes halogenados volátiles en el aceite de oliva

1. Principio del método	48
-------------------------------	----

2. Equipo.....	48
3. Reactivos.....	49
4. Procedimiento de análisis.....	49

Anexo XIII:

1. Neutralización y decoloración del aceite de oliva en laboratorio.....	49
1.1 Neutralización del aceite	49
1.1.1 Equipo.....	49
1.1.2 Reactivos	49
1.1.3 Modo de operar	50
1.2 Decoloración del aceite neutro.....	50
1.2.1 Equipo.....	50
1.2.2 Modo de operar	50

Anexo XIV: Notas complementarias 2, 3 y 4 del capítulo 15 de la nomenclatura combinada

1. Nota 2A	50
Nota 2B.....	51
Nota 2C.....	52
Nota 2D.....	52
Nota 2E	52
2. Nota 3	52
3. Nota 4	52

Anexo XV:

1. Contenido en aceite de los orujos de aceituna	
1.1 Material.....	52
1.2 Reactivo	53
2. Modo de operar.....	53
3. Expresión de los resultados	54

Anexo XVI: Determinación del índice de yodo

1. Objeto.....	54
2. Definición.....	54
3. Principio.....	54
4. Reactivos.....	54
5. Material.....	55
6. Preparación de la muestra	55
7. Procedimiento.....	55
8. Expresión de los resultados	55

Anexo XVII: Método para la determinación de estigmastadienos en los aceites vegetales

1. Objetivos.....	56
2. Aplicación	56

3. Fundamento	56
4. Instrumental	56
5. Reactivos	56
6. Metodología.....	57

Anexo XVIII: Determinación del contenido de triglicéridos con ECN42 (diferencia entre el contenido teórico y los datos obtenidos por HPLC)

1. Objeto.....	60
2. Campo de aplicación	60
3. Principio.....	60
4. Método.....	60
5. Evaluación de los resultados	65
6. Ejemplo.....	66

Relación de reactivos y productos auxiliares Panreac que se utilizan en los métodos de Análisis de Aceites y Grasas..... 72

Relación de aditivos y coadyuvantes tecnológicos para uso alimentario industrial..... 74

REGLAMENTO (CEE) N° 2568/91 DE LA COMISIÓN de 11 de julio de 1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea.

Visto el Reglamento n° 136/66/CEE del Consejo, de 22 de septiembre de 1966, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de las materias grasas ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) n° 3577/90 ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 35 bis,

Considerando que en el Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE se establecen las denominaciones y definiciones de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva comercializados dentro de cada Estado miembro, así como en los intercambios intracomunitarios y con terceros países;

Considerando que, para poder distinguir los diferentes tipos de aceite, procede definir las características fisicoquímicas de cada uno de ellos, así como las características organolépticas de los aceites vírgenes, a fin de garantizar así la pureza y calidad de estos productos, sin perjuicio de otras disposiciones existentes en la materia;

Considerando que conviene determinar de manera uniforme en toda la Comunidad la presencia de las características de los diferentes tipos de aceite; que, para ello, procede establecer los métodos comunitarios de análisis químico y de valoración organoléptica; que conviene, sin embargo, permitir que durante un período transitorio se utilicen otros métodos de análisis que sean aplicados en los Estados miembros, estableciendo al mismo tiempo que en caso de presentarse resultados divergentes prevalezcan los obtenidos a través del método común;

Considerando que la definición de las características fisicoquímicas de los aceites de oliva y de sus métodos de análisis comporta la adaptación de las notas complementarias del capítulo 15 de la nomenclatura combinada;

Considerando que el método de valoración de las características organolépticas de los aceites vírgenes requiere la creación de unos paneles de catadores seleccionados y especialmente adiestrados; que conviene, por lo tanto, prever el plazo necesario para instaurar una estructura de este tipo; que, dadas las dificultades a las que se enfren-

tarán determinados Estados miembros para crear dichos paneles, procede autorizar que se recurra a paneles existentes en otros Estados miembros;

Considerando que, para garantizar el correcto funcionamiento del sistema de las exacciones reguladoras aplicables a la importación de orujo de oliva, es conveniente prever un método único para la determinación del contenido en aceite de estos productos;

Considerando que, para no perjudicar el comercio, resulta oportuno prever un período limitado para la salida al mercado del aceite que haya sido envasado antes de la entrada en vigor del presente Reglamento;

Considerando que procede derogar el Reglamento (CEE) n° 1058/77 de la Comisión ⁽³⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) n° 1858/88 ⁽⁴⁾;

Considerando que el Comité de gestión de las materias grasas no ha emitido dictamen alguno en el plazo establecido por su presidente,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

1. Se considerarán aceites de oliva vírgenes, a que se refieren las letras a), b), y c) del punto 1 del Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, los aceites cuyas características se ajusten a las indicadas, respectivamente, en los puntos 1, 2 y 3 del Anexo I del presente Reglamento.

2. Se considerará aceite de oliva virgen lampante, a que se refiere la letra d) del punto 1 del Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 4 del Anexo I del presente Reglamento.

3. Se considerará aceite de oliva refinado, a que se refiere el punto 2 del Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 5 del Anexo I del presente Reglamento.

4. Se considerará aceite de oliva, a que se refiere el punto 3 del Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 6 del Anexo I del presente Reglamento.

5. Se considerará aceite de orujo de oliva crudo, a que se refiere el punto 4 del Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 7 del Anexo I del presente Reglamento.

⁽¹⁾ DO n° 172 de 30. 9. 1966, p. 3025/66.

⁽²⁾ DO n° L 353 de 17. 12. 1990, p. 23.

⁽³⁾ DO n° L 128 de 24. 5. 1977, p. 6.

⁽⁴⁾ DO n° L 166 de 1. 7. 1988, p. 10.

6. Se considerará aceite de orujo de oliva refinado, a que se refiere el punto 5 del Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 8 del Anexo I del presente Reglamento.

7. Se considerará aceite de orujo de oliva, a que se refiere el punto 6 del Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 9 del Anexo I del presente Reglamento.

Artículo 2

1. Las características de los aceites, previstas en el Anexo I, se determinarán empleando los métodos de análisis siguientes:

– para determinar los ácidos grasos libres, expresados en porcentaje de ácido oleico, el método recogido en el Anexo II,

– para determinar el índice de peróxidos, el método recogido en el Anexo III,

– para determinar los alcoholes alifáticos, el método recogido en el Anexo IV,

– para determinar el contenido de esteroides, el método recogido en el Anexo V,

– para determinar el eritrodil + uvaol, el método recogido en el Anexo VI,

– para determinar los ácidos grasos saturados en la posición 2 del triglicérido, el método recogido en el Anexo VII,

– para determinar el contenido de trilinoleína, el método recogido en el Anexo VIII,

– para el análisis espectrofotométrico, el método recogido en el Anexo IX,

– para determinar la composición de ácidos grasos, el método recogido en los Anexos X «A» y X «B»,

– para determinar los solventes halogenados volátiles, el método recogido en el Anexo XI,

– para la valoración de las características organolépticas de los aceites de oliva vírgenes, el método recogido en el Anexo XII, que se aplicará de conformidad con el apartado 2,

– para la prueba de la refinación, el método recogido en el Anexo XIII.

– para determinar los estigmastadienos, el método recogido en el Anexo XVII. (Modificado por el Reglamento 656/95)

– para determinar la composición de los triglicéridos de ECN42, el método que figura en el Anexo XVIII. (Modificado por el Reglamento 2472/97)

2. El analista, asistido en su caso por expertos, llevará a cabo la valoración de las características organolépticas con arreglo al procedimiento descrito en la ficha de degustación contemplada en el Anexo XII. En caso de que el análisis determine características organolépticas distintas de las resultantes de la denominación del producto, el analista someterá la muestra al examen de un panel de catadores, con arreglo a las disposiciones del Anexo XII.*

El análisis contradictorio será realizado por el panel de catadores de conformidad con las disposiciones citadas anteriormente.

Para la valoración de las características organolépticas con ocasión de operaciones relacionadas con el régimen de intervención, el panel de catadores procederá a aquella con arreglo a las disposiciones del Anexo XII.

*Nota: Al no considerarse la valoración organoléptica un análisis químico, se ha omitido el anexo XII.

Si está interesado en él, no dude en solicitarlo.

Artículo 3

Hasta el 28 de febrero de 1993 (modificado por el Reglamento 183/93), la introducción de los métodos de análisis previstos en el artículo 2 no será óbice para que los Estados miembros empleen otros métodos comprobados y científicamente válidos, siempre que con ello no se obstaculice la libre circulación de los productos reconocidos conformes a la normativa en aplicación de los métodos comunitarios. Los Estados miembros interesados comunicarán a la Comisión dichos otros métodos antes de utilizarlos.

En caso de que alguno de estos otros métodos dé un resultado diferente del alcanzado por el método común, se considerará válido el resultado obtenido en aplicación del método común.

Artículo 4

1. A fin de apreciar las características organolépticas, los Estados miembros constituirán paneles de catadores seleccionados y entrenados de acuerdo con las normas previstas en el método descrito en el Anexo XII.

2. En caso de que un Estado miembro tenga dificultades para constituir un panel en su territorio podrá recurrir a un panel que se halle establecido en otro Estado miembro.

Artículo 5

Las notas complementarias 2, 3 y 4 del capítulo 15 de la nomenclatura combinada que figura en el Anexo I del Reglamento (CEE) no 2658/87 del Consejo (*) serán sustituidas por el texto que figura en el Anexo XIV del presente Reglamento. (Modificado por el Reglamento 183/93)

Artículo 6

1. El contenido en aceite de orujo de aceituna y demás residuos de la extracción del aceite de oliva (códigos NC 2306 90 11 y 2306 90 19) se determinará con arreglo al método recogido en el Anexo XV.

(*) Do n° L 256 de 7. 9. 1987, p. 1.

2. El contenido de aceite mencionado en el apartado 1 se expresará como porcentaje del extracto seco en peso.

Artículo 7

Serán aplicables las disposiciones comunitarias sobre la presencia de sustancias extrañas distintas de las mencionadas en el Anexo XI.

Artículo 8

1. Cada Estado miembro comunicará a la Comisión las medidas adoptadas en aplicación del presente Reglamento.

2. Cada Estado miembro comunicará a la Comisión, al inicio de cada semestre una recapitulación de los datos analíticos de las determinaciones efectuadas durante el semestre precedente.

Estos resultados serán examinados por el Comité de gestión de las materias grasas con arreglo al procedimiento previsto en el artículo 39 del Reglamento n° 136/66/CEE.

Artículo 9

Queda derogado el Reglamento (CEE) n° 1058/77.

Artículo 10

1. El presente Reglamento entrará en vigor el tercer día siguiente al de su publicación en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

No obstante, el método que figura en el Anexo XII se aplicará a partir del 1 de enero de 1992, excepto en lo que se refiere a las operaciones relacionadas con la intervención.

El presente Reglamento no se aplicará a los aceites de oliva y de orujo de oliva envasados antes de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento y comercializados hasta el 31 de octubre de 1992.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 11 de julio de 1991.

Por la Comisión

RAY MAC SHARRY

Miembro de la Comisión

ANEXOS

Índice

- Anexo I: Características de los aceites de oliva
- Anexo II: Determinación del grado de acidez
- Anexo III: Determinación del índice de peróxidos
- Anexo IV: Determinación del contenido de ceras mediante cromatografía de gases con columna capilar (Modificado por el Reglamento 183/93)
- Anexo V: Determinación de la composición y del contenido de esteroides mediante cromatografía de gases en columna capilar
- Anexo VI: Determinación del eritrodil y uvaol
- Anexo VII: Determinación de los ácidos grasos saturados en la posición 2 de los triglicéridos de aceites y grasas
- Anexo VIII: Determinación del porcentaje de trioleína
- Anexo IX: Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta
- Anexo X "A": Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases
- Anexo X "B": Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos
- Anexo XI: Determinación del contenido en solventes halogenados volátiles en el aceite de oliva
- Anexo XII: Valoración organoléptica del aceite de oliva virgen
- Anexo XIII: Neutralización y decoloración del aceite de oliva en laboratorio (Modificado por el Reglamento 183/93)
- Anexo XIV: Notas complementarias 2, 3 y 4 del capítulo 15 de la nomenclatura combinada
- Anexo XV: Contenido de aceite de los orujos de aceituna
- Anexo XVI: Determinación del índice de yodo
- Anexo XVII: Método para la determinación de estigmastadienos en los aceites vegetales (Modificado por el Reglamento 656/95)
- Anexo XVIII: Método para la determinación de la composición de los triglicéridos de ECN42 (Modificado por el Reglamento 2472/97)

ANEXO I

(modificado por el Reglamento (CE) N° 2472/97)

CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

Categoría	Acidez (%) (¹)	Índice de peróxidos meq O ₂ /kg (¹)	Disolventes halogenados mg/kg (¹)	Ceras mg/kg	Ácidos grasos saturados en posición 2 de los triglicéridos (%)	Estigmastadienos (2) mg/kg	Diferencia entre ECN42 y HPLC y ECN42 cálculo teórico	K ₂₃₂ (¹)	K ₂₇₀ (¹)	K ₂₇₀ después de pasar por alumina (3)	Δ-K (¹)	Panel test (¹)
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 1,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,01	≥ 6,5
2. Aceite de oliva virgen	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	≥ 5,5
3. Aceite de oliva virgen corriente	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	≥ 3,5
4. Aceite de oliva virgen lampante	> 3,3	> 20	> 0,20	≤ 350	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	> 0,25	≤ 0,11	-	< 3,5
5. Aceite de oliva refinado	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	-	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	-	≤ 0,16	-
6. Aceite de oliva	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	-	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	-	≤ 0,13	-
7. Aceite de orujo de oliva crudo	> 0,5	-	-	-	≤ 1,8	-	≤ 0,6	-	-	-	-	-
8. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	-	≤ 2,0	-	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	-	≤ 0,25	-
9. Aceite de orujo de oliva	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	-	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	-	≤ 0,20	-

(1) Límite máximo total de compuestos halogenados detectados mediante captura de electrones.

Para cada uno de los componentes el límite máximo es de 0,10 mg/kg.

(2) Suma de isómeros que podrían (o no podrían) separarse mediante una columna capilar.

(3) Para la verificación de aceite refinado, cuando el K₂₇₀ sobrepase el límite de la categoría correspondiente, deberá procederse a la determinación del K₂₇₀ después de ser tratado con alumina.

Notas:

Los resultados de los análisis deberán expresarse con el mismo número de decimales que los previstos para cada característica.

La última cifra deberá aumentarse en una unidad si la cifra siguiente es superior a 4.

Para cambiar de categoría a un aceite o declararlo no conforme a su pureza bastará con que una sola de las características no se ajuste a los límites fijados.

Las características indicadas con asterisco (*), relativas a la calidad del aceite, implican lo siguiente:

- en el caso del aceite de oliva virgen lampante, los límites (excepto el de K₂₃₂) no deberán respetarse simultáneamente;

- en el caso de los demás aceites de oliva vírgenes, el incumplimiento de uno de los límites supondrá un cambio de categoría, aunque seguirán clasificados dentro de una de las categorías de los aceites de oliva vírgenes.

Categoría	Contenido de ácidos						Sumas de los isómeros transoleicos (%)	Sumas de los isómeros translinoleicos y translinolenicos (%)	Colesterol (%)	Brasi-casterol (%)	Cam-pestero (%)	Estig-masterol (%)	Beta-sifosterol (1) (%)	Delta-7-Estigmas-tenol (%)	Esteroles totales (mg/kg)	Eritrodio y luval (%)
	Miris-tico (%)	Lino-lénico (%)	Araqui-lénico (%)	Eicose-noico (%)	Behé-nico (%)	Ligno-cérico (%)										
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
2. Aceite de oliva virgen	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
3. Aceite de oliva virgen corriente	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
4. Aceite de oliva virgen lampante	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
5. Aceite de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
6. Aceite de oliva	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
7. Aceite de orujo de oliva crudo	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2500	≥ 12
8. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1800	≥ 12
9. Aceite de orujo de oliva	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1600	> 4,5

(1) Suma de: Delta-5,23-Estigmastadienol + Clerosterol + Sitosterol + Sitostanol + Delta-5-Avenasterol + Delta-5,24-Estigmastadienol.

Nota:

Los resultados de los análisis deberán expresarse con el mismo número de decimales que los previstos para cada característica.

La última cifra deberá aumentarse en una unidad si la cifra siguiente es superior a 4.

Para cambiar de categoría a un aceite o declararlo no conforme a su pureza bastará con que una sola de las características no se ajuste a los límites fijados.

ANEXO II

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ACIDEZ

1. OBJETO

Determinar los ácidos libres en los aceites de oliva. El contenido en ácidos grasos libres se expresa mediante la acidez calculada según el método convencional.

1.1. Principio

Disolución de la muestra en una mezcla de disolventes y valoración de los ácidos grasos libres mediante una solución etanólica de hidróxido potásico.

1.2. Reactivos

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica reconocida y el agua utilizada debe ser agua destilada o de una pureza equivalente.

1.2.1. Mezcla de **éter dietílico** y **etanol de 95% (V/V)**, en proporción de volumen 1:1.

Nota: El éter dietílico es muy inflamable y puede formar peróxidos explosivos. Debe utilizarse tomando especiales precauciones.

Debe neutralizarse exactamente en el momento de su utilización con la solución de hidróxido potásico (1.2.2) en presencia de 0,3 ml de la solución de fenoltaleína (1.2.3) por cada 100 ml de mezcla.

Nota: Si no es posible utilizar éter dietílico, puede sustituirse por una mezcla de disolventes formada por **etanol** y **tolueno**. Si fuera necesario, el etanol podría sustituirse, a su vez, por **2-propanol**.

1.2.2. **Solución etanólica valorada de hidróxido potásico**, = **0,1M** o, en caso necesario, = **0,5M**.

Nota 1.

Debe conocerse, y comprobarse inmediatamente antes de su utilización, la concentración exacta de la solución etanólica de hidróxido potásico. Debe utilizarse una solución que haya sido preparada por lo menos cinco días antes y decantada en un frasco de vidrio marrón cerrado con tapón de goma. La solución debe ser incolora o de color amarillo paja.

Nota: Se puede preparar una solución incolora y estable de hidróxido potásico de la manera siguiente: Llevar a ebullición, y mantener ésta a reflujo durante una hora, 1000 ml de etanol con 8 g de **hidróxido potásico** y 0,5 g de **virutas de aluminio**. Destilar inmediatamente. Disolver en el destilado la cantidad requerida de hidróxido potásico. Dejar reposar durante varios días y decantar el líquido claro sobrenadante, separándolo del precipitado de carbonato potásico.

La solución también puede prepararse de la manera siguiente sin efectuar la destilación: añadir 4 ml de butilato de aluminio a 1000 ml de **etanol** y dejar reposar la mezcla durante algunos días. Decantar el líquido sobrenadante y disolver en él la cantidad necesaria de **hidróxido potásico**. La solución está lista para ser utilizada.

1.2.3. **Solución de 10 g/l de fenoltaleína en etanol de 95-96% (V/V)** o solución de 20 g/l de azul alcalino (en caso de aceites de oliva muy coloreados) en **etanol de 95-96% (V/V)**.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Etanol de 95 % (V/V) Etanol Etanol de 95-96% (V/V)	121085	Etanol 96% v/v PA
Éter dietílico	132770	Eter Dietílico estabilizado con ~6 ppm de BHT PA-ACS-ISO
Hidróxido potásico	121515	Potasio Hidróxido 85% lentejas PA
2-Propanol	131090	2-Propanol PA-ACS-ISO
Solución de 10 g/l de fenoltaleína en etanol de 95-96% (V/V)	281327	Fenoltaleína solución 1% RV
Solución etanólica valorada de hidróxido potásico, = 0,1 M	182146	Potasio Hidróxido 0,1 mol/l (0,1N) etanólica SV
Solución etanólica valorada de hidróxido potásico, = 0,5 M	181519	Potasio Hidróxido 0,5 mol/l (0,5N) etanólica SV
Tolueno	131745	Tolueno PA-ACS-ISO
Virutas de aluminio	A13805	Aluminio, virutas, 99+%

1.3. Material

Material habitual de laboratorio, y en particular:

1.3.1. Balanza analítica

1.3.2. Matraz erlenmeyer de 250 ml de capacidad

1.3.3. Bureta de 10 ml de capacidad, con graduación de 0,05 ml

1.4. Procedimiento

1.4.1. Preparación de la muestra para la prueba

La determinación se efectuará en una muestra filtrada. Si el contenido global de humedad e impurezas es inferior al 1%, se utilizará la muestra tal cual.

1.4.2. Muestra para la prueba

Tomar la muestra, según el grado de acidez previsto, de acuerdo con el cuadro siguiente:

Grado de acidez previsto	Peso de la muestra (en g)	Precisión de la pesada de la muestra (en g)
< 1	20	0,05
1 a 4	10	0,02
4 a 15	2,5	0,01
15 a 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Pesar la muestra en el matraz erlenmeyer (1.3.2)

1.4.3. Determinación

Disolver la muestra (1.4.2) en 50 a 150 ml de la mezcla de éter dietílico y etanol (1.2.1), previamente neutralizada.

Valorar, agitando, con la solución de hidróxido potásico de 0,1M (1.2.2) (véase nota 2) hasta el viraje del indicador (la coloración rosa de la fenolftaleína debe permanecer al menos durante 10 segundos).

Nota 1: La solución etanólica valorada de hidróxido potásico (1.2.2) puede sustituirse por una solución acuosa de hidróxido potásico o sódico siempre que el volumen de agua añadido no provoque una separación de las fases.

Nota 2: Si la cantidad necesaria de la solución de hidróxido potásico de 0,1M supera los 10 ml, debe utilizarse una solución de 0,5M.

Nota 3: Si la solución se enturbia durante la valoración, añadir una cantidad suficiente de la mezcla de disolventes (1.2.1) para que la solución se aclare.

1.5 Expresión de la acidez en porcentaje de ácido oleico

La acidez, expresada en porcentaje de ácido oleico es igual a:

$$V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{P} = \frac{V \times c \times M}{10 \times P}$$

siendo:

V: volumen en ml de la solución valorada de hidróxido potásico utilizada.

c: concentración exacta, en moles por litro, de la solución de hidróxido potásico utilizada.

M: peso molecular del ácido en que se expresa el resultado (ácido oleico = 282).

P: peso en gramos de la muestra utilizada.

Se tomará como resultado la media aritmética de dos determinaciones.

ANEXO III

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS

1. OBJETO

La presente norma describe un método para la determinación del índice de peróxidos de los aceites y grasas.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

La presente norma es aplicable a los aceites y grasas animales y vegetales.

3. DEFINICIÓN

El índice de peróxidos es la cantidad (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones de trabajo descritas.

4. PRINCIPIO

La muestra problema, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con solución de yoduro potásico. El yodo liberado se valora con solución valorada de tiosulfato sódico.

5. APARATOS

Todo el material utilizado estará exento de sustancias reductoras u oxidantes.

Nota: No engrasar las superficies esmeriladas.

5.1. Navecilla de vidrio de 3 ml

5.2. Matraces con cuello y tapón esmerilados, de 250 ml de capacidad aproximadamente, previamente secados y llenos de gas inerte puro y seco (nitrógeno o, preferiblemente, dióxido de carbono).

5.3. Bureta de 25 o 50 ml, graduada en 0,1 ml.

6. REACTIVOS

6.1. **Cloroformo para análisis**, exento de oxígeno por borboteo de una corriente de gas inerte puro y seco.

6.2. **Ácido acético glacial para análisis**, exento de oxígeno por borboteo de una corriente de gas inerte puro y seco.

6.3. Solución acuosa saturada de **yoduro potásico**, recién preparada, exenta de yodo y yodatos.

6.4. **Solución acuosa de tiosulfato sódico 0,01N o 0,002N** valorada exactamente; la valoración se efectuará inmediatamente antes del uso.

6.5. **Solución de almidón, en solución acuosa de 10 g/l**, recién preparada con almidón soluble.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Ácido acético glacial para análisis	131008	Acido Acético glacial PA-ACS-ISO
Almidón soluble	121096	Almidón de Patata soluble PA
Cloroformo para análisis	131252	Triclorometano estabilizado con etanol PA-ACS-ISO
Solución acuosa de tiosulfato sódico 0,01 N	181723	Prepararlo a partir de Sodio Tiosulfato 0,1 mol/l (0,1N) SV diluido convenientemente con agua
Solución acuosa de tiosulfato sódico 0,002 N	181723	Prepararlo a partir de Sodio Tiosulfato 0,1 mol/l (0,1N) SV diluido convenientemente con agua
Solución de almidón, en solución acuosa de 10 g/l	283146	Almidón solución 1% RV
Yoduro potásico	131542	Potasio Yoduro PA-ACS-ISO

7. MUESTRA

La muestra se tomará y almacenará al abrigo de la luz, y se mantendrá refrigerada dentro de envases de vidrio totalmente llenos y herméticamente cerrados con tapones de vidrio esmerilado o de corcho.

8. PROCEDIMIENTO

El ensayo se realizará con luz natural difusa o con luz artificial. Pesar con precisión de 0,001 g en una navecilla de vidrio (5.1) o, en su defecto, en un matraz (5.2) una cantidad de muestra en función del índice de peróxidos que se presuponga, con arreglo al cuadro siguiente:

Índice de peróxidos que se supone (meq de O ₂ /kg)	Peso de la muestra problema (en g)
de 0 a 12	de 5,0 a 2,0
de 12 a 20	de 2,0 a 1,2
de 20 a 30	de 1,2 a 0,8
de 30 a 50	de 0,8 a 0,5
de 50 a 90	de 0,5 a 0,3

Abrir un matraz (5.2) e introducir la navecilla de vidrio que contenga la muestra problema. Añadir

10 ml de cloroformo (6.1). Disolver rápidamente la muestra problema mediante agitación. Añadir 15 ml de ácido acético (6.2) y, a continuación, 1 ml de solución de yoduro potásico (6.3). Cerrar rápidamente el matraz, agitar durante 1 minuto y mantenerlo en la oscuridad durante 5 minutos exactamente, a una temperatura comprendida entre 15 y 25°C.

Añadir 75 ml aproximadamente de agua destilada. Valorar (agitando al mismo tiempo vigorosamente) el yodo liberado con la solución de tiosulfato sódico (6.4) (solución 0,002N si se presuponen valores inferiores a 12 y solución 0,01N si se presuponen valores superiores a 12), utilizando la solución de almidón (6.5) como indicador.

Efectuar dos determinaciones por muestra.

Realizar simultáneamente un ensayo en blanco. Si el resultado del ensayo en blanco sobrepasa 0,05 ml de la solución de tiosulfato sódico 0,01N (6.4), sustituir los reactivos.

9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El índice de peróxidos (I.P.), expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$IP = \frac{V \times N \times 1000}{P}$$

siendo:

V: ml de solución valorada de tiosulfato sódico (6.4) empleados en el ensayo, convenientemente corregidos para tener en cuenta el ensayo en blanco.

N: normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico (6.4) empleada.

P: peso, en gramos de la muestra problema.

El resultado será la media aritmética de las dos determinaciones efectuadas.

ANEXO IV

(Modificado por los Reglamentos (CEE)
Nº 183/93 y 177/94)

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CERAS MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE GASES CON COLUMNA CAPILAR

1. OBJETO

El presente método describe un procedimiento para la determinación del contenido de ceras en determinados aceites y grasas en las condiciones de ensayo.

Puede utilizarse, en particular, para distinguir el aceite de oliva obtenido mediante extracción (aceite de orujo de oliva).

2. PRINCIPIO

Fraccionamiento de la grasa o aceite, a los que se habrá añadido un patrón interno adecuado, mediante cromatografía en columna de gel de sílice hidratado. Recuperación de la fracción eluida en las condiciones de ensayo (cuya polaridad es inferior a la de los triglicéridos) y, a continuación, análisis directo mediante cromatografía de gases columna capilar.

3. APARATOS

3.1. Matraz Erlenmeyer de 25 ml.

3.2. Columna de vidrio para cromatografía de 15 mm de diámetro interior y 30-40 cm de longitud.

Recomendación Panreac: **727401** Columna para cromatografía "flash" con adaptador y válvula de teflón. 20 mm ID x 400 mm longitud.

3.3. Cromatógrafo de gases adecuado con columna capilar, dotado de un sistema de introducción directa en la columna, que incluya los siguientes elementos:

3.3.1. Horno termostático para las columnas, que pueda mantener la temperatura deseada con una oscilación máxima de 1°C.

3.3.2. Inyector en frío para introducción directa en la columna.

3.3.3. Detector de ionización de llama y convertidor-amplificador.

3.3.4. Registrador-integrador que pueda funcionar con el convertidor-amplificador (3.3.3), con un tiempo de respuesta inferior o igual a un segundo y velocidad del papel variable.

3.3.5. Columna capilar de vidrio o sílice fundida, de 10-15 m⁽⁶⁾ de longitud y 0,25-0,32 mm de diámetro interior, con un recubrimiento interno de SE-52 o SE-54 líquido, o equivalente, de un espesor que oscile entre 0,10 y 0,30 µm.

Recomendación Panreac: **723310.10** Columna capilar para GC PERMABOND[®] SE-52 de 10 m de longitud, 0,32 mm de ID y 0,25 µm de espesor de capa.

3.4. Microjeringa para inyección en columna, de 10 µl de capacidad, provista de una aguja cementada.

4. REACTIVOS

4.1. Gel de sílice 70-230 mesh, artículo 7754 Merck.

Mantener el gel en el horno durante cuatro horas a una temperatura de 500°C. Dejar enfriar y añadir un 2% de agua. Agitar bien para homogeneizar la mezcla. Mantener al abrigo de la luz durante al menos 12 horas antes de su uso.

Recomendación Panreac: **711037.1000** POLYGOPREP[®] 60-130, tamaño partícula 63-200 µm

4.2. **n-Hexano, de calidad para cromatografía.**

4.3. **Éter etílico, de calidad para cromatografía.**

4.4. **n-Heptano, de calidad para cromatografía.**

4.5. Solución patrón de laurilaraquitado al 0,1 % (m/v) en hexano (patrón interno).

4.6. Gas portador: hidrógeno puro, de calidad para cromatografía de gases.

4.7. Gases auxiliares:

– hidrógeno puro, de calidad para cromatografía de gases,

– aire puro, de calidad para cromatografía de gases.

⁽⁶⁾ En la Directiva consta erróneamente como mm

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Éter etílico para cromatografía	362551	Éter Dietílico estabilizado con etanol (UV-IR-HPLC) PAI
n-Heptano, de calidad para cromatografía	362062	n-Heptano (UV-IR-HPLC-HPLC preparativa) PAI
n-Hexano, de calidad para cromatografía	362063	n-Hexano (UV-IR-HPLC) PAI

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Separación de la fracción de las ceras

5.1.1. Preparación de la columna cromatográfica.

Suspender en n-hexano anhidro 15 g de gel de sílice hidratado al 2% e introducir en la columna.

Dejar sedimentar espontáneamente. Completar la sedimentación con ayuda de un vibrador eléctrico, a fin de obtener una banda cromatográfica más homogénea. Hacer pasar 30 ml de n-hexano para eliminar las posibles impurezas.

5.1.2. Cromatografía en columna.

Pesar con exactitud 500 mg de la muestra en un matraz de 25 ml; añadir una cantidad de patrón interno apropiada, en función del contenido de ceras que se presuma; por ejemplo, añadir 0,1 mg de laurilaraquidato si se trata de aceite de oliva y 0,25-0,50 mg si se trata de aceite de orujo de oliva.

Transferir la muestra preparada a la columna cromatográfica, que se habrá acondicionado como se indica en el punto 5.1.1 con ayuda de dos porciones de 2 ml de n-hexano.

Dejar fluir el disolvente hasta que se sitúe a 1 mm por encima del nivel superior del absorbente. A continuación, iniciar la elución cromatográfica; recoger 140 ml de la mezcla de n-hexano y éter etílico en la proporción de 99:1 a un ritmo de 15 gotas aproximadamente cada diez segundos (2,1 ml/minuto).

Secar la fracción resultante en un evaporador rotatorio hasta que se haya eliminado casi todo el disolvente. Eliminar los últimos 2 o 3 ml mediante una corriente débil de nitrógeno y añadir a continuación 10 ml de n-heptano.

5.2. Análisis por cromatografía de gases

5.2.1. Operaciones preliminares y acondicionamiento de la columna.

5.2.1.1. Instalar la columna en el cromatógrafo de gases, 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 gas, eficacia del detector y del registrador, etc.).

5.2.1.2. Si la columna se utiliza por vez primera, es conveniente acondicionarla. Hacer pasar a través de la columna una corriente ligera de gas y, a continuación, encender el cromatógrafo de gases. Calentar gradualmente hasta alcanzar una temperatura de

ensayo (véase la nota). Mantener esta temperatura durante al menos dos horas y, a continuación, ajustar el aparato a las condiciones de ensayo (regulación del flujo del gas, encendido de la llama, conexión con el registrador electrónico, regulación de la temperatura del horno para la columna, regulación del detector, etc.). Registrar la señal con una sensibilidad al menos dos veces superior a la exigida para efectuar el análisis. La línea de base deberá ser lineal, sin picos de ningún tipo, 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.

Nota: La temperatura de acondicionamiento deberá ser en todo momento al menos 20°C inferior a la temperatura máxima especificada para el eluyente que se utilice.

5.2.2. Elección de las condiciones de ensayo

5.2.2.1. Las condiciones de ensayo son generalmente las siguientes:

- temperatura de la columna: se parte de una temperatura inicial de 80°C que se incrementa a razón de 30°C/minuto hasta los 120°C, y que, a continuación, se programa para que aumente 5°C/minuto hasta alcanzar los 340°C;
- temperatura del detector: 350°C;
- velocidad lineal del gas portador: hidrógeno, 20-35 cm/segundo,
- sensibilidad instrumental: 4-16 veces la atenuación mínima,
- sensibilidad del registrador: 1-2 mV desde el fondo de la escala,
- velocidad del papel: 30 cm/hora,
- cantidad inyectada: 0,5-1 µl de solución.

Estas condiciones pueden modificarse en función de las características de la columna y del cromatógrafo de gases (a fin de obtener cromatogramas que reúnan las siguientes condiciones: el tiempo de retención del patrón interno C32 debe ser de 25 ± 2 minutos y el pico más representativo de las ceras debe estar comprendido entre el 60 y el 100% desde el fondo de la escala).

5.2.2.2. Determinar los parámetros de integración de los picos de manera que se obtenga una evaluación correcta de las áreas de los picos considerados.

5.2.3. Realización del análisis

5.2.3.1. Tomar 1 µl de solución con la microjeringa de 10 µl; sacar el émbolo hasta que la aguja esté vacía. Introducir la aguja en el sistema de inyección e inyectar rápidamente después de 1 o 2 segundos. Después de 5 segundos aproximadamente, extraer lentamente la aguja.

5.2.3.2. Llevar a cabo el registro hasta que las ceras se hayan eluido completamente.

La línea de base debe satisfacer siempre las condiciones exigidas (5.2.1.2).

5.2.4. Identificación de los picos

Identificar los picos sobre la base de los tiempos de retención, comparándolos con mezclas de ceras analizadas en las mismas condiciones y cuyos tiempos de retención sean conocidos.

La figura 1 presenta un cromatograma de las ceras de un aceite de oliva virgen.

5.2.5. Análisis cuantitativo

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

5.2.5.2. Determinar el contenido de cada uno de los ésteres en mg/kg de materia grasa, aplicando la siguiente fórmula:

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

siendo:

A_x : área del pico de cada uno de los ésteres;

A_s : área del pico del laurilaraquidato;

m_s : peso, en miligramos, del laurilaraquidato añadido;

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

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Expresar los contenidos de las distintas ceras y la suma de esos contenidos en mg/kg de materia grasa.

APÉNDICE

Determinación de la velocidad lineal del gas

Inyectar de 1 a 3 µl de metano (propano) en el cromatógrafo de gases, después de haberlo ajustado a las condiciones de ensayo normales. Medir el tiempo que tarda el gas en recorrer la columna, desde el momento de su inyección hasta la aparición del pico (t_M).

La velocidad lineal en cm/segundo viene dada por la fórmula L/t_M , siendo L la longitud de la columna expresada en cm y t_M el tiempo medido en segundos.

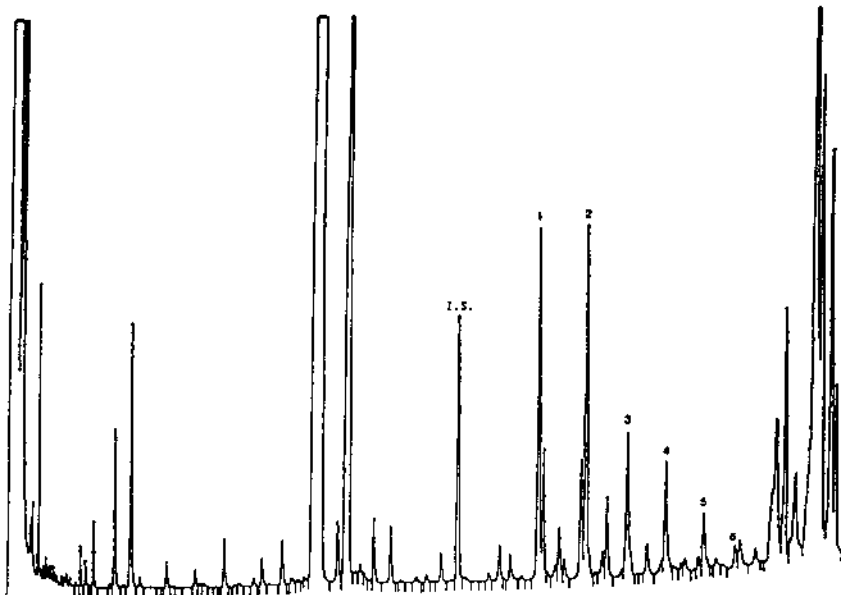


FIGURA 1: Cromatograma de las ceras de un aceite de oliva virgen

I.S. = Patrón interno del éster C32

1 = ésteres C36

2 = ésteres C38

3 = ésteres C40

4 = ésteres C42

5 = ésteres C44

6 = ésteres C46

ANEXO V

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

1. OBJETO

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

2. PRINCIPIO

Saponificación de la materia grasa, a la que se habrá añadido α -colestanol como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico; a continuación, extracción del insaponificable con éter etílico.

Separación de la fracción de esteroides del insaponificable extraído mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica; los esteroides recuperados del gel de sílice se transforman en trimetilsililéteres 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 20x20 cm.

Recomendación Panreac: **809013** Placa TLC. Sílice gel standard. Vidrio. SIL G-25, 0,25 mm espesor, 20x20 cm.

704050 Cubeta de desarrollo ranurada con tapa 20x20 cm.

704054 Spray pulverizador.

3.5. Lámpara ultravioleta de una longitud de onda de 366 o 254 nm.

Recomendación Panreac: **704048** Cabina de visualización UV.

3.6. Microjeringa de 100 μ l y 500 μ l.

3.7. Embudo cilíndrico filtrante con filtro poroso G3 (porosidad 15-40 μ 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, provisto de un sistema de división de flujo formado por:

3.10.1. Horno para la columna, que pueda mantener la temperatura deseada con precisión de $\pm 1^\circ\text{C}$.

3.10.2. Inyector con elemento vaporizador de vidrio tratado con persilano.

3.10.3. Detector de ionización de llama y convertidor-amplificador.

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 líquido SE-52, SE-54 o equivalente, con un espesor uniforme que oscile entre 0,10 y 0,30 μ m.

Recomendación Panreac: **733056.25** Columna capilar de sílice fundida (fase no enlazada químicamente) FS-SE-54 de 25 m de longitud, 0,25 mm de ID y 0,25 μ m de espesor de capa

3.12. Microjeringa de 10 μ 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.

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).

Recomendación Panreac: **809013** Placa TLC. Sílice gel standard. Vidrio. SIL G-25, 0,25 mm espesor, 20x20cm

4.5. Hidróxido potásico, solución etanólica 0,2N: disolver 13 g de **hidróxido potásico** en 20 ml de agua destilada y completar hasta un litro con **etanol**.

4.6. **Benceno para cromatografía.**

4.7. **Acetona para cromatografía.** (Véase 5.2.2).

4.8. **Hexano para cromatografía.** (Véase 5.2.2).

4.9. **Éter etílico para cromatografía.** (Véase 5.2.2).

4.10. **Clorofórmico de calidad para análisis.**

4.11. Solución patrón para cromatografía en capa fina: **colesterol** o fitosteroides, solución al 2% en cloroformo. (Modificado por el Reglamento (CE) 183/93)

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 problema de trimetilsililéteres de los esteroides: preparar en el momento del uso a partir de esteroides puros o de mezclas de esteroides

obtenidos de aceites que los contengan.

4.17. α -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. Gases auxiliares:

– hidrógeno de calidad para cromatografía de gases,

– aire de calidad para cromatografía de gases.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Acetona para cromatografía	361007	Acetona (UV-IR-HPLC) PAI
Benceno para cromatografía	361192	Benceno (UV-IR-HPLC) PAI
Cloroformo de calidad para análisis	131252	Triclorometano estabilizado con etanol PA-ACS-ISO
Colesterol	A11470	Colesterol, 99+%
2,7-diclorofluoresceína	133606	2',7'-Diclorofluoresceína PA-ACS
Etanol	121085	Etanol 96% v/v PA
Éter etílico de calidad para análisis	132770	Eter Dietílico estabilizado con ~6 ppm de BHT PA-ACS-ISO
Éter etílico para cromatografía	362551	Eter Dietílico estabilizado con etanol (UV-IR-HPLC) PAI
Hexametildisilazano	A15139	1,1,1,3,3,3-Hexametildisilazano, 98+%
Hexano para cromatografía	362063	n-Hexano (UV-IR-HPLC) PAI
Hidróxido potásico	121515	Potasio Hidróxido 85% lentejas PA
Piridina anhidra para cromatografía	481457	Piridina seca (máx. 0,01% de agua) DS-ACS
Sulfato sódico anhidro de calidad para análisis	131716	Sodio Sulfato anhidro PA-ACS-ISO
Trimetilclorosilano	A13651	Trimetilclorosilano, 98+%

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Preparación del insaponificable.

5.1.1. Con la microjeringa de 500 μ l introducir en el matraz de 250 ml un volumen de disolución de α -colestanol al 0,2% en cloroformo (4.17) que contenga una cantidad de α -colestanol correspondiente al 10% aproximadamente del contenido de esteroides en la alícuota de la muestra para la determinación. Por ejemplo, para 5 g de muestra añadir 500 μ l de la solución de α -colestanol al 0,2%, si se trata de aceite de oliva, y 1500 μ l, si se trata de aceite de orujo de oliva. (Modificado por el Reglamento (CE) 183/93)

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

En el caso de aceites 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, o hay que utilizar betulinol en lugar de colestanol. (Modificado por el Reglamento (CE) 183/93)

5.1.2. Añadir 50 ml de solución etanólica de hidróxido potásico 2N, adaptar el refrigerante de reflujo y calentar en 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 acuosa 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 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 regulada a 100°C durante una hora. Sacarlas de la estufa y conservarlas en un 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 triterpénicos.

5.2.2. Introducir en la cubeta de desarrollo de las placas una mezcla de benceno-acetona 95:5 (v/v) hasta una altura de 1 cm aproximadamente. Puede utilizarse como alternativa una mezcla de hexano y éter etílico 65:35 (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 desarrollo 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 µl de dicha solución en una placa cromatográfica (5.2.1) a unos 2 cm de uno de los bordes, formando una línea 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 µl de la solución de referencia de esteroides (4.11) para poder identificar la banda de esteroides una vez efectuado el 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 de 2,7-diclorofluoresceína. Al examinar la placa a la luz ultravioleta puede identificarse 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. Rascar 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 silanización 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-trimetilsililacetamida + 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 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.

5.4. Cromatografía de gases.

5.4.1. Operaciones preliminares: acondicionamiento de la columna.

5.4.1.1. Colocar la columna en el cromatógrafo uniendo uno de los extremos de la columna al inyector y el otro al detector.

Efectuar los controles generales del equipo para cromatografía de gases (estanqueidad de los circuitos de gases, eficacia del detector, eficacia del sistema de división 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, encender el equipo de cromatografía de gases e iniciar un calentamiento gradual hasta alcanzar una temperatura al menos 20°C superior a la temperatura de trabajo (nota 6). Mantener dicha temperatura durante 2 horas como mínimo; a continuación, poner el equipo completo en condiciones de funcionamiento (regulación del flujo de gases y de la relación de «split», 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 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°C \pm 5°C,
- temperatura del evaporador: 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 «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 μ 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 β -sitosterol debe ser de 20 \pm 5 minutos,
- el pico del campesterol debe ser: para el aceite de oliva (contenido medio del 3%), 15 \pm 5% del fondo de escala; para el aceite de soja (contenido medio del 20%), 80 \pm 10% del fondo de 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 admitirse una resolución incompleta si el pico a TRR 1,02 puede cuantificarse utilizando la perpendicular.

5.4.3. Realización del análisis.

5.4.3.1. Con la microjeringa de 10 μ l tomar 1 μ l de hexano, aspirar 0,5 μ l de aire y, a continuación, entre 0,5 y 1 μ l de la solución problema; elevar el émbolo de la jeringa de modo que la aguja quede vacía. Introducir la aguja a través del septum 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 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 analizadas en las mismas condiciones.

La elución de los esteroides se efectúa en el orden siguiente: colesterol, brasicasterol, 24-metilcolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, Δ -7-campesterol, Δ -5,23-estigmastadienol, clerosterol, b-sitosterol, sitostanol, Δ -5-avenasterol, Δ -5,24-estigmastadienol, Δ -7-estigmastanol, Δ -7-avenasterol.

En el cuadro I figuran 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 del α -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 factor de respuesta para el α -colestanol debe considerarse como 1.

5.4.5.2. Calcular del modo siguiente el contenido de cada uno de los esteroides, expresado en

mg/100 g de materia grasa:

$$\text{esterol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m}$$

siendo:

A_x : área del pico del esteroles x ,

A_s : área del pico del α -colestanoles,

m_s : peso de α -colestanoles añaaado, en miligramos,

m : peso de la muestra tomado para la determinación, en gramos.

(Modificado por el Reglamento (CE) 183/93)

$$\% \text{ del esteroles } X = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

siendo:

A_x : área del pico de x ,

$\sum A$: 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 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 (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.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1. Se registran el contenido de cada uno de los esteroleles en $\text{mg}/100$ g de materia grasa y, como «esteroleles totales», su suma.

6.2. El porcentaje de cada uno de los esteroleles simples es la razón entre el área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de los esteroleles.

Cuadro I
Tiempos de retención relativos de los esteroleles

Pico	Identificación		Tiempo de retención	
			Columna SE 54	Columna SE52
1	Colesterol	Δ -5-colesten-3- β -ol	0,67	0,63
2	Colestanol	5-a-colestan-3- β -ol	0,68	0,64
3	Brasicasterol	[24S]-24-metil- Δ -5,22-colestadien-3- β -ol	0,73	0,71
4	24-metilcolesterol	24-metilen- Δ -5,24-colestadien-3- β -ol	0,82	0,80
5	Campesterol	[24R]-24-metil- Δ -5-colesten-3- β -ol	0,83	0,81
6	Campestanol	[24R]-24-metil-colestan-3- β -ol	0,85	0,82
7	Estigmasterol	[24S]-24-etil- Δ -5,22-colestadien-3- β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-campesterol	[24R]-24-metil- Δ -7-colesten-3- β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-estigmastadienol	[24R,S]-24-etil- Δ -5,23-colestadien-3- β -ol	0,95	0,95
10	Clerosterol	[24S]-24-etil- Δ -5,25-colestadien-3- β -ol	0,96	0,96
11	β -sitosterol	[24R]-24-etil- Δ -5-colesten-3- β -ol	1	1
12	Sitostanol	24-etil-colestan-3- β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasterol	[24Z]-24-etiliden- Δ -5-colesten-3- β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5,24-estigmastadienol	[24R,S]-24-etil- Δ -5,24-colestadien-3- β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-estigmastenol	[24R,S]-24-etil- Δ -7,24-colesten-3- β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterol	[24Z]-24-etiliden- Δ -7-3- β -ol	1,16	1,16

Figura 1
Cromatograma de la fracción de esteroides de un aceite de oliva bruto

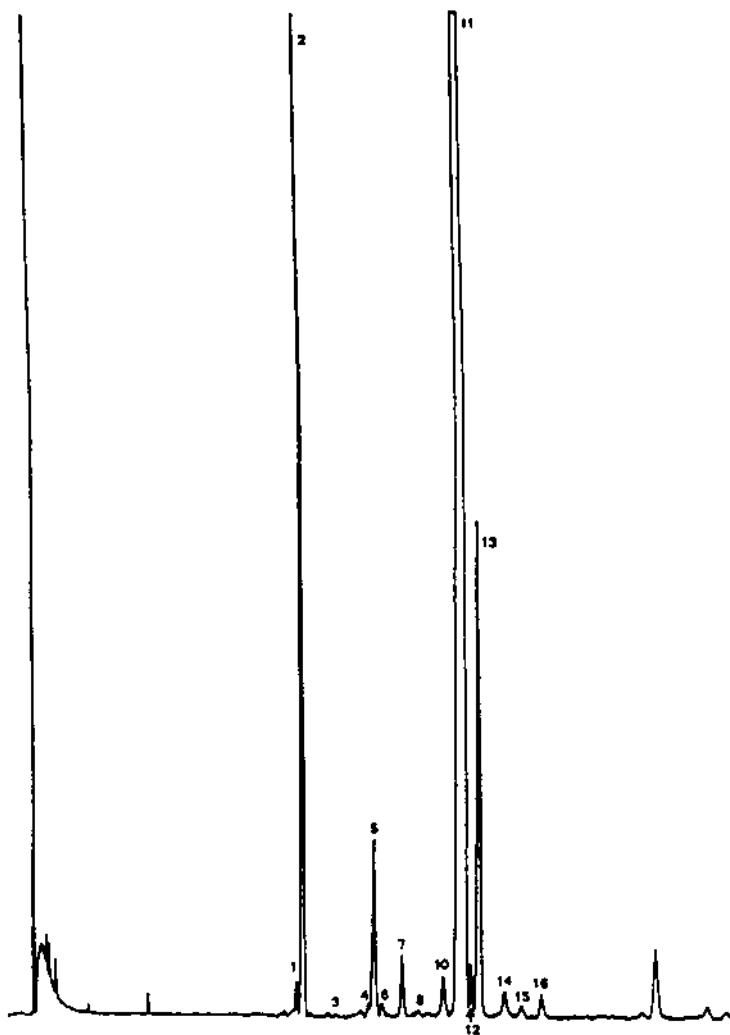
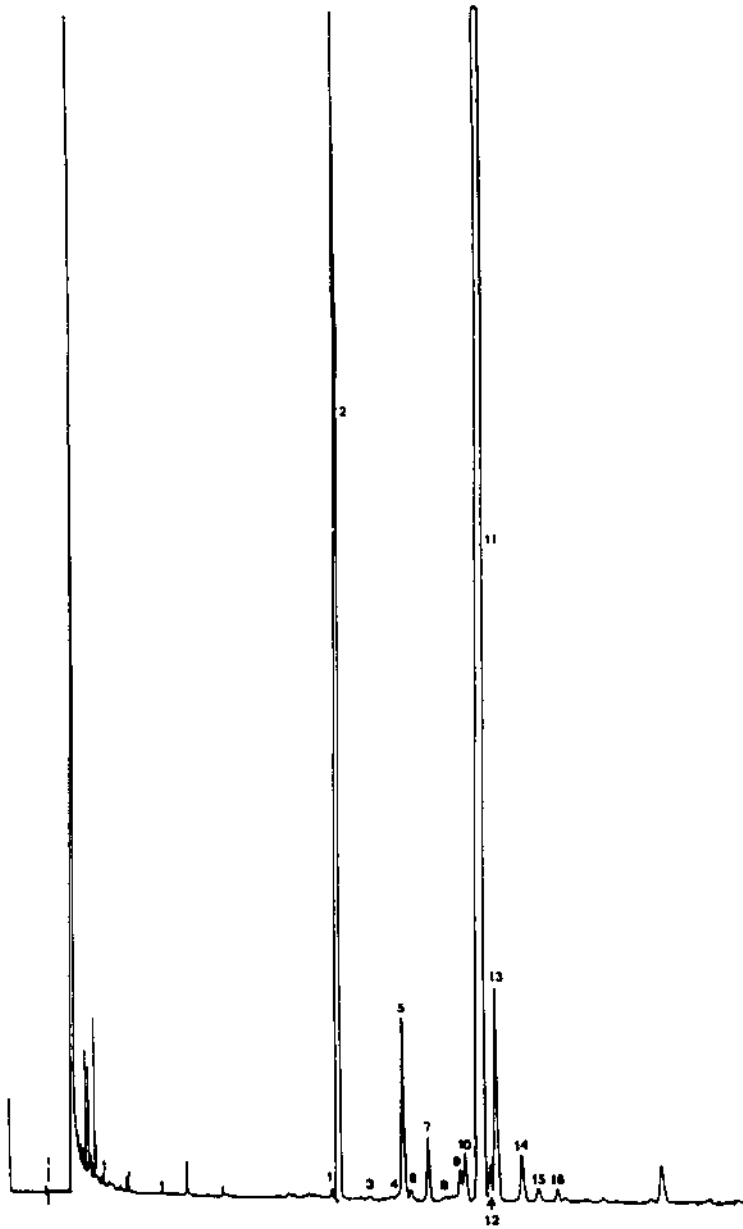


Figura 2
Cromatograma de la fracción de esteroides de un aceite de oliva refinado



ANEXO VI**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ERITRODIOL Y UVAOL****INTRODUCCIÓN**

El eritrodiol, entendido corrientemente como conjunto de los dioles eritrodiol y uvaol, es un componente del insaponificable, característico de algunos tipos de materias grasas. Su concentración es mucho más elevada en los aceites de oliva obtenidos mediante extracción que en los obtenidos mediante presión o en el aceite de pepita de uva y, por lo tanto, su determinación puede servir para comprobar la existencia de aceite de oliva obtenido mediante extracción.

1. OBJETO

El presente método describe un procedimiento para determinar el eritrodiol en las materias grasas.

2. PRINCIPIO

La materia grasa se saponifica con una solución etanólica de hidróxido potásico; a continuación se extrae el insaponificable con éter etílico y se purifica pasándolo por una columna de alúmina.

El fraccionamiento del insaponificable se realiza mediante cromatografía en capa fina en placa de gel de sílice y se aíslan la banda de la fracción esteroídica y la del eritrodiol.

Los esteroides y el eritrodiol recuperados de la placa se transforman en trimetilsililéteres y seguidamente se analiza la mezcla mediante cromatografía de gases.

El resultado se expresa en porcentaje de eritrodiol respecto del conjunto de eritrodiol + esteroides.

3. MATERIAL Y APARATOS

3.1. El mismo material que el indicado para el método del Anexo V (Determinación del contenido de esteroides).

4. REACTIVOS

4.1. Los mismos reactivos que los indicados para el método del Anexo V (Determinación del contenido de esteroides).

4.2. Solución patrón de eritrodiol al 0,5% en cloroformo.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Preparación del insaponificable

Se realiza tal como se indica en el apartado 5.1.2 del método del Anexo V

5.2. Separación del eritrodiol y los esteroides

5.2.1. Véase el apartado 5.2.1 del método del Anexo V.

5.2.2. Véase el apartado 5.2.2 del método mencionado.

5.2.3. Preparar una solución del insaponificable al 5% en cloroformo.

Con una microjeringa de 0,1 ml depositar 0,3 ml de esta solución en una placa cromatográfica a aproximadamente 1,5 cm del borde inferior de la placa, formando una banda lo más fina y uniforme posible. Depositar en un extremo de la placa, como referencia, algunos microlitros de las soluciones de colesterol y eritrodiol.

5.2.4. Introducir la placa en la cubeta de desarrollo, preparada como se indica en el apartado 5.2.1. La temperatura ambiente debe ser de unos 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 ésta de la cubeta de desarrollo y evaporar el disolvente en una corriente de aire caliente.

5.2.5. Pulverizar la placa uniformemente con la solución alcohólica de 2',7'-diclorofluoresceína. Al examinar la placa a la luz ultravioleta pueden identificarse las bandas de los esteroides y del eritrodiol mediante comparación con las referencias; delimitar las bandas con una punta ligeramente por el exterior de los márgenes de fluorescencia.

5.2.6. Rascar con una espátula metálica el gel de sílice contenido en las áreas delimitadas. Reunir el material obtenido en un matraz cónico de 50 ml; añadir 15 ml de cloroformo caliente, agitar bien y filtrar en el embudo de filtro poroso vertiendo el gel de sílice sobre el propio filtro. Lavar tres veces con 10 ml de cloroformo caliente cada vez, recogiendo el filtrado en un matraz esférico de 100 ml. Evaporar hasta obtener un volumen de 4 a 5 ml, transvasar al tubo de centrifugado de fondo cónico de 10 ml previamente tarado, evaporar hasta sequedad mediante calentamiento suave en corriente de nitrógeno y pesar.

5.3. Preparación de los trimetilsililéteres

Se realiza tal como se indica en el apartado 5.3 del método del Anexo V.

5.4. Cromatografía de gases

Se realiza tal como se indica en el apartado 5.4 del método citado. Las condiciones operativas de la cromatografía de gases deben cumplir los requisitos necesarios para analizar los esteroides y, además, permitir la separación de los TMSE del eritrodiol y del uvaol.

Una vez inyectada la muestra, dejar que se desarrolle el proceso hasta que se produzca la elución de los esteroides presentes, el eritrodiol y el uvaol; identificar los picos (el eritrodiol y el uvaol tienen tiempos de retención relativos, respecto al β -sitosterol, de alrededor de 1,45 y 1,55, respectivamente) y

calcular sus áreas de la misma forma que para los esteroides.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

$$\text{Eritrodiol, \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{esteroides}}} \times 100$$

siendo:

A_1 : área del pico del eritrodiol,

A_2 : área del pico del uvaol,

$\sum A_{\text{esteroides}}$: suma de las áreas de los esteroides presentes.

Los resultados deben expresarse con una cifra decimal.

(Modificado por el Reglamento (CE) 183/93)

ANEXO VII

DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS SITUADOS EN LA POSICIÓN 2 DE LOS TRIGLICÉRIDOS DE ACEITES Y GRASAS

1. OBJETO

La presente norma describe un método para la determinación de la composición porcentual de ácidos grasos que se encuentran esterificados en la posición 2 (posición interna) de los triglicéridos.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

La presente norma es aplicable a los aceites y grasas cuyo punto de fusión se sitúa por debajo de los 45°C, debido a las características especiales de la acción de la lipasa pancreática.

No es aplicable sin reservas a los aceites y grasas que contengan cantidades importantes de ácidos grasos con 12 átomos de carbono o menos (aceites de coco y de palmiste, materias grasas butíricas), de ácidos grasos altamente insaturados (con más de cuatro enlaces dobles) que tengan 20 átomos de carbono o más (aceites de pescado y de mamíferos marinos) o de ácidos grasos que tengan grupos con funciones oxigenadas, además del grupo ácido.

3. PRINCIPIO

Neutralización de los aceites y grasas si fuera necesario. Purificación mediante tratamiento en columna de alúmina. Hidrólisis parcial de los triglicé-

ridos bajo la acción de la lipasa pancreática durante un tiempo determinado. Separación de los monoglicéridos resultantes mediante cromatografía en capa fina y metanólisis de estos monoglicéridos. Análisis de los ésteres metílicos mediante cromatografía gas-líquido.

4. EQUIPO

- 4.1. Matraz de fondo redondo de 100 ml.
- 4.2. Matraz de fondo redondo de 25 ml con boca esmerilada.
- 4.3. Refrigerante de aire de 1 m de longitud, adaptable al matraz 4.2.
- 4.4. Matraz erlenmeyer de 250 ml.
- 4.5. Vaso de precipitados de 50 ml.
- 4.6. Embudo de separación de 500 ml.
- 4.7. Columna para cromatografía, de vidrio, con diámetro interior de 13 mm y longitud de 400 mm, provista de un disco de vidrio poroso y de una llave.
Recomendación Panreac: **727401** Columna para cromatografía "flash" con adaptador y válvula de teflón. 20 mm ID x 400 mm longitud.
- 4.8. Tubo de centrifuga de 10 ml con tapón de vidrio esmerilado.
- 4.9. Bureta de 5 ml graduada en 0,05 ml.
- 4.10. Jeringa hipodérmica de 1 ml provista de una aguja fina.
- 4.11. Microjeringa que pueda dispensar gotas de 3-4 µl.
- 4.12. Aplicador para cromatografía en capa fina.
- 4.13. Placas de vidrio de 20 x 20 cm para cromatografía en capa fina.
Recomendación Panreac: **809013** Placa TLC. Sílica gel standard. Vidrio. SIL G-25, 0,25 mm espesor, 20x20 cm.
- 4.14. Cubeta de desarrollo para cromatografía en capa fina, de vidrio, provista de una tapa de vidrio esmerilado, adecuada para las placas de 20 x 20 cm.
Recomendación Panreac: **704050** Cubeta de desarrollo ranurada con tapa 20x20 cm.
- 4.15. Pulverizador para cromatografía en capa fina.
Recomendación Panreac: **704054** Spray pulverizador.
- 4.16. Estufa regulada a 103 ±2°C.
- 4.17. Termostato regulable a una temperatura comprendida entre 30 y 45°C con precisión de 0,5°C.
- 4.18. Evaporador rotatorio.
- 4.19. Vibrador eléctrico, con el que pueda agitarse vigorosamente el tubo de centrifuga.
- 4.20. Lámpara ultravioleta para examinar las placas de capa fina.
Recomendación Panreac: **704048** Cabina de visualización UV.

Para el control de la actividad lipásica:

4.21. pH-metro.

Recomendación Panreac: **923 501** pHmetro digital pH 300.

4.22. Agitador espiral.

4.23. Bureta de 5 ml.

4.24. Cronómetro.

Para la eventual preparación de la lipasa:

4.25. Agitador de laboratorio, adecuado para dispersar y mezclar materiales heterogéneos.

5. REACTIVOS

5.1. **n-Hexano** o, en su defecto, **éter de petróleo (punto de ebullición 30-50°C)**, de calidad para cromatografía.

5.2. **2-Propanol**, o **etanol, 95% (v/v)** de calidad para análisis.

5.3. **2-Propanol**, o **etanol**, solución acuosa 1/1.

5.4. **Éter dietílico, exento de peróxidos**.

5.5. **Acetona**.

5.6. **Ácido fórmico, al menos de 98% (p/p)**.

5.7. Solvente de desarrollo: una mezcla de **n-hexano** (5.1), **éter dietílico** (5.4) y **ácido fórmico** (5.6) en las proporciones 70/30/1 (v/v/v).

5.8. Alúmina activada para cromatografía, neutra, actividad I según Brockmann.

5.9. Gel de sílice con aglutinante, de calidad para cromatografía en capa fina.

5.10. Lipasa pancreática de calidad adecuada (véanse las notas 1 y 2).

5.11. **Hidróxido sódico** en solución acuosa de 120 g/l.

5.12. **Ácido clorhídrico**, solución acuosa 6N.

5.13. Solución acuosa de 220 g/l de **cloruro de calcio (CaCl₂)**.

5.14. Solución acuosa de 1 g/l de **colato sódico** (de calidad enzimática).

5.15. Solución tampón: solución acuosa de **tris-hidroximetil-aminometano** 1M, ajustada a pH = 8 con ácido clorhídrico (5.12) (controlar con un potenciómetro).

5.16. **Solución de 10 g/l de fenoltaleína en etanol al 95% (v/v)**.

5.17. Solución de 2 g/l de **2',7'-diclorofluoresceína** en **etanol al 95% (v/v)**; alcalinizar ligeramente añadiendo 1 gota de solución de **hidróxido sódico 1N** por 100 ml.

Para el control de la actividad lipásica:

5.18. Aceite neutralizado.

5.19. **Solución acuosa de hidróxido sódico 0,1N**.

5.20. Solución acuosa de 200 g/l de **colato sódico** (de calidad enzimática).

5.21. Solución acuosa de 100 g/l de **goma arábiga**.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Acetona	131007	Acetona PA-ACS-ISO
Ácido clorhídrico	131019	Acido Clorhídrico 35% PA-ISO
Ácido fórmico, al menos de 98% (p/p)	131030	Ácido Fórmico 98% PA-ACS
Cloruro de calcio	121221	Calcio Cloruro anhidro, polvo PA
	121215	Calcio Cloruro 2-hidrato escoriforme PA
Colato sódico	A17074	Ácido cólico, sal sódica, 99%
2,7-diclorofluoresceína	133606	2',7'-Diclorofluoresceína PA-ACS
Etanol, 95% (v/v) de calidad para análisis Etanol al 95% (v/v)	121085	Etanol 96% v/v PA
Éter de petróleo (punto de ebullición 30-50°C), de calidad para cromatografía	361315	Éter de Petróleo 40-60°C (UV) PAI
Éter dietílico, exento de peróxidos	132770	Eter Dietílico estabilizado con ~6 ppm de BHT PA-ACS-ISO
Goma arábiga	142061	Goma Arábiga polvo PRS
Hidróxido sódico	131687	Sodio Hidróxido lentejas PA-ACS-ISO
Hidróxido sódico 1N	182415	Sodio Hidróxido 1 mol/l (1N) SV
n-Hexano de calidad para cromatografía	362063	n-Hexano (UV-IR-HPLC) PAI
2-Propanol de calidad para análisis	131090	2-Propanol PA-ACS-ISO
Solución acuosa de hidróxido sódico 0,1N	181694	Sodio Hidróxido 0,1 mol/l (0,1N) SV
Solución de 10 g/l de fenoltaleína en etanol al 95% (v/v)	281327	Fenoltaleína solución 1% RV
Tris-hidroximetil-aminometano	131940	Tris (Hidroximetil) Aminometano PA-ACS

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Si la acidez de la muestra, determinada con arreglo al método del Anexo II es inferior al 3%, se efectuará directamente la purificación en columna de alúmina como se describe en el punto 6.2.

Si la acidez de la muestra, determinada con arreglo al método del Anexo II, es superior al 3%, se efectuará una neutralización alcalina en presencia de un solvente, como se describe en el punto 6.1, y a continuación se realizará la purificación en columna de alúmina descrita en el punto 6.2.

6.1. Neutralización alcalina en presencia de un solvente.

Introducir en el embudo de separación (4.6) aproximadamente 10 g de aceite crudo y añadir 100 ml de hexano (5.1), 50 ml de 2-propanol (5.2), algunas gotas de solución de fenoltaleína (5.16) y el volumen de solución de hidróxido sódico (5.11) correspondiente a la acidez libre del aceite más un 0,3 % de exceso. Agitar enérgicamente durante 1 minuto, añadir 50 ml de agua destilada, agitar de nuevo y dejar reposar.

Una vez que se haya producido la separación, separar la capa inferior que contiene los jabones. Separar, asimismo, todas las capas intermedias (mucílago, materias insolubles). Lavar la solución de hexano del aceite neutralizado con porciones sucesivas de 25-30 ml de la solución de 2-propanol (5.3), hasta que desaparezca el color rosa de la fenoltaleína.

Eliminar la mayor parte del hexano mediante destilación en vacío en el evaporador rotatorio (4.18); desecar el aceite en vacío a 30-40°C mediante una corriente de nitrógeno puro hasta la completa eliminación del hexano.

6.2. Purificación con alúmina.

Preparar una suspensión de 15 g de alúmina activada (5.8) en 50 ml de hexano (5.1) y verterla en la columna cromatográfica (4.7), removiendo al mismo tiempo. Dejar que la alúmina se asiente uniformemente y esperar a que el nivel del solvente descienda a 1-2 mm por encima del absorbente. Verter cuidadosamente en la columna 5 g de aceite disueltos en 25 ml de hexano (5.1); recoger todo el eluyente de la columna en un matraz de fondo redondo (4.1).

7. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS CROMATOGRÁFICAS

Limpiar perfectamente las placas de vidrio (4.13) con etanol, éter de petróleo y acetona para eliminar cualquier rastro de materia grasa.

Introducir en un matraz erlenmeyer (4.4) 30 g de polvo de sílice (5.9). Añadir 60 ml de agua destilada. Tapar y agitar enérgicamente durante 1 minuto.

Transferir inmediatamente al aplicador la mezcla semifluida (4.12) y recubrir las placas limpias con una capa de 0,25 mm de espesor.

Secar las placas al aire durante 15 minutos y a continuación en la estufa (4.16) a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 1 hora. Antes del uso, enfriar las placas en un desecador a temperatura ambiente. En el comercio pueden adquirirse placas preparadas.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Hidrólisis con lipasa pancreática.

Pesar en el tubo de centrifuga (4.8) 0,1 g aproximadamente de la muestra preparada; si la muestra es aceite líquido, proceder como se indica a continuación; si es una grasa sólida, disolverla en 0,2 ml de hexano (5.1), aplicando, si es necesario, un ligero calentamiento.

Añadir 20 mg de lipasa (5.10) y 2 ml de solución tampón (5.15). Agitar bien, pero con cuidado, y añadir a continuación 0,5 ml de la solución de colato sódico (5.14) y 0,2 ml de la solución de cloruro de calcio (5.13). Cerrar el tubo con el tapón esmerilado, agitar cuidadosamente (evitando humedecer el tapón) e introducir el tubo inmediatamente en el termostato (4.17) a $40 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y agitar manualmente durante 1 minuto exacto.

Sacar el tubo del termostato y agitar enérgicamente con el vibrador eléctrico (4.19) durante 2 minutos exactos.

Enfriar de inmediato en agua corriente; añadir 1 ml de ácido clorhídrico (5.12) y 1 ml de éter dietílico (5.4). Tapar y mezclar enérgicamente con el vibrador eléctrico. Dejar en reposo y extraer la capa orgánica con la jeringa (4.10), tras centrifugar si fuese necesario.

8.2. Separación de los monoglicéridos por cromatografía en capa fina.

Con ayuda de la microjeringa (4.11) colocar el extracto a 1,5 cm aproximadamente del borde inferior de la placa cromatográfica, depositándolo de manera que forme una línea fina, uniforme y lo más estrecha posible. Introducir la placa en una cubeta de desarrollo (4.14) bien saturada y desarrollar con el solvente de desarrollo (5.7) a unos 20°C hasta 1 cm aproximadamente del borde superior de la placa.

Secar la placa al aire a la temperatura de la cubeta y pulverizarla con la solución de 2',7'-diclorofluoresceína (5.17). Identificar la banda de los monoglicéridos (R_f aproximadamente 0,035) con luz ultravioleta (4.20).

8.3. Análisis de los monoglicéridos por cromatografía gas-líquido.

Raspar con una espátula la banda citada en el punto 8.2 (procurando no raspar los componentes que permanezcan en la línea de base) y pasarla al

matraz de metilación (4.2). Tratar directamente la sílice recogida como se indica en el Anexo X-B, de modo que los monoglicéridos se transformen en ésteres metílicos, y, a continuación, examinar los ésteres mediante cromatografía en fase gaseosa, como se describe en el Anexo X-A.

9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Calcular la composición de los ácidos grasos situados en la posición y expresar el resultado con una cifra decimal (nota 3).

10. NOTAS

Nota 1: Control de la actividad lipásica

Preparar una emulsión oleosa como sigue: agitar en un mezclador adecuado una mezcla constituida por 165 ml de solución de goma arábiga (5.21), 15 g de hielo picado y 20 ml de aceite neutralizado (5.18).

En un vaso de precipitados (4.5) introducir 10 ml de esta emulsión, 0,3 ml de solución de colato sódico (5.20) y 20 ml de agua destilada.

Colocar el vaso en un termostato a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (nota 4) e introducir los electrodos del pH-metro (4.21) y un agitador espiral (4.22); después, añadir gota a gota con una bureta (4.23) solución de hidróxido sódico (5.19) hasta obtener un pH de 8,5.

Añadir una suspensión acuosa de la lipasa (véase a continuación) en cantidad suficiente. Se mide el pH y, tan pronto como alcance el valor de 8,3, se pone en marcha un cronómetro y se va añadiendo la disolución de hidróxido sódico (5.19) gota a gota, con la velocidad necesaria para mantener constante el pH de 8,3; anotar cada minuto el volumen de solución alcalina consumido.

Llevar los datos obtenidos a un sistema de ejes de coordenadas, indicando en abscisas los tiempos y en ordenadas los mililitros de solución alcalina necesarios para mantener constante el pH. Deberá obtenerse una gráfica lineal.

La suspensión de lipasa mencionada es una suspensión en agua al 1/1000 (p/p). Deberá emplearse en cada ensayo una cantidad suficiente de esta suspensión, de modo que en 4 o 5 minutos se consuma 1 ml de solución alcalina aproximadamente. Normalmente se necesitan de 1 a 5 mg de polvo.

La unidad lipásica se define como la cantidad de enzima que libera $10 \mu\text{eq}$ de ácido por minuto. La actividad A del polvo utilizado, medida en unidades lipásicas por mg, se calcula mediante esta fórmula:

$$A = \frac{V \times 10}{P}$$

siendo:

V : volumen de solución de hidróxido sódico (5.19) consumido por minuto (calculado a partir de la gráfica),

P : peso, en mg, de la muestra problema de polvo.

Nota 2: Preparación de la lipasa

En el comercio pueden encontrarse lipasas de actividad lipásica satisfactoria. También es posible prepararlas en laboratorio de la manera siguiente: tomar 5 kg de páncreas fresco de cerdo, refrigerado a 0°C ; eliminar la grasa sólida y el tejido conjuntivo que lo rodean, y triturar en un molino de cuchillas hasta obtener una pasta fluida. Con un agitador (4.25) agitar la pasta junto con 2,5 l de acetona anhidra, durante 4-6 horas y después centrifugar. Efectuar tres extracciones más del residuo con el mismo volumen de acetona anhidra, dos extracciones con una mezcla de acetona y éter etílico 1:1 (V/V), y dos extracciones con éter etílico, en este orden.

Desecar el residuo al vacío durante 48 horas para obtener un polvo estable, que debe almacenarse en un refrigerador.

Nota 3: Es aconsejable en todos los casos determinar la composición de los ácidos grasos totales de la misma muestra, ya que la comparación con la de los ácidos situados en la posición 2 facilitará la interpretación de las cifras obtenidas.

Nota 4: Por tratarse de un aceite líquido, la hidrólisis se efectúa a 37°C . No obstante, en el caso de la muestra problema se efectuará a 40°C a fin de que puedan examinarse las grasas con puntos de fusión de hasta 45°C .

ANEXO VIII

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE TRILINOLEÍNA

1. OBJETO

Determinación de la composición de los triglicéridos de los aceites líquidos vegetales expresada en su número equivalente de carbonos mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

La presente norma describe un método para efectuar la separación y determinación de la composición de los triglicéridos de los aceites vegetales según su peso molecular y grado de insaturación en función de su número equivalente de carbonos (véase la nota 1).

2. CAMPO DE APLICACIÓN

La presente norma es aplicable a todos los aceites vegetales que contengan triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga. Este método es especial-

mente adecuado para detectar la presencia de pequeñas cantidades de aceites semisecantes (ricos en ácido linoleico) en aceites vegetales cuyo principal ácido graso insaturado sea el ácido oleico, como es el caso de los aceites de oliva.

3. PRINCIPIO

Separación de los triglicéridos en función de su número equivalente de carbonos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa e interpretación de los cromatogramas.

4. APARATOS

4.1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con control termostático de la temperatura de la columna.

4.2. Sistema de inyección con un volumen de 10 µl.

4.3. Detector: refractómetro diferencial. La sensibilidad en toda la escala deberá ser como mínimo de 10⁻⁴ unidades de índice de refracción.

4.4. Columna de acero inoxidable de 250 mm de longitud y 4,5 mm de diámetro interior, rellena de par-

tículas de sílice de 5 mm de diámetro con un 22-23% de carbono en forma de octadecilsilano (nota 2).

4.5. Registrador y/o integrador.

5. REACTIVOS

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

5.1. **Cloroformo.**

5.2. **Acetona.**

5.3. **Acetonitrilo.**

5.4. Fase móvil: acetonitrilo + acetona (las proporciones se ajustarán para obtener la separación deseada; comenzar con una mezcla 50:50).

5.5. Disolvente de solubilización: acetona o mezcla de acetona-cloroformo 1:1.

5.6. Triglicéridos de referencia: pueden utilizarse bien triglicéridos comerciales (**tripalmitina**, trioleína, etc.), en cuyo caso se reflejarán en un gráfico los tiempos de retención frente al número equivalente de carbonos, alternativamente un cromatograma de referencia del aceite de soja (véanse las notas 3 y 4 y las figuras 1 y 2).

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Acetona	131007	Acetona PA-ACS-ISO
Cloroformo	131252	Triclorometano estabilizado con etanol PA-ACS-ISO
Acetonitrilo	131881	Acetonitrilo PA-ACS
Tripalmitina	A10922	Glicerol tripalmitato, 98%

6. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Preparar del siguiente modo una solución al 5% de las muestras que vayan a analizarse: pesar 0,5 ±0,001 g de la muestra en un matraz aforado de 10 ml y enrasar hasta 10 ml con el disolvente de solubilización (5.5).

7. PROCEDIMIENTO

7.1. Instalar el sistema cromatográfico. Bombear fase móvil (5.4) a razón de 1,5 ml/mm para purgar el sistema completo. Esperar hasta que se obtenga una línea de base estable. Inyectar 10 µl de la muestra preparada como se indica en el punto 6.

8. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Utilícese el método de normalización interna, es decir, considérese que la suma de las áreas de los picos de los diferentes triglicéridos es igual a 100%.

Calcular el porcentaje relativo de cada triglicérido mediante esta fórmula:

$$\% \text{ del triglicérido} = \frac{\text{área del pico}}{\sum \text{áreas de los picos}} \times 100$$

donde:

\sum áreas de los picos: suma de las áreas de los picos

El resultado se expresa con un decimal.

Nota 1: El orden de elución puede determinarse calculando el número equivalente de carbonos, que a menudo viene dado por la relación $NEC = NC - 2n$, siendo NC el número de carbonos y n el número de enlaces dobles; es posible calcularlo con una precisión mucho mayor tomando en consideración el origen del enlace doble. Si n_o , n_i y n_{in} son el número de enlaces dobles atribuible a los ácidos oleico, linoleico y linolénico, respectivamente, el número equivalente de carbonos puede calcularse mediante la relación siguiente:

$$NEC = NC - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

Los coeficientes d_o , d_l y d_{ln} pueden calcularse mediante los triglicéridos de referencia.

En las condiciones que se especifican en el presente método, la relación que se obtenga será similar a la siguiente:

$$NEC = NC - [2,60 n_o] - [2,35 n_l] - [2,17 n_{ln}]$$

Nota 2: Ejemplos: Lichrosorb (Merck) RP 18 Art 50333;

Lichrosphere (Merck) 100 CH 18 Art 50377 o similares.

Recomendación Panreac: **728032.46** Columna para HPLC, cartucho ChromCart®, CC250/4.6 Lichrospher 100 RP18,5 μ m.

Nota 3: Algunos triglicéridos de referencia también permiten calcular la resolución respecto a la trioleína:

$$\alpha = TR' / TR'_{oleína}$$

utilizando el tiempo de retención corregido $TR' = TR - TR_{disolvente}$.

La representación gráfica del log α frente a f (número de enlaces dobles) permite determinar los valores de retención de todos los triglicéridos de los ácidos grasos contenidos en los triglicéridos de referencia (véase la figura 2).

Nota 4: La eficacia de la columna debe permitir separar claramente el pico de la LLL (trilinoleína) de los triglicéridos con tiempo de retención próximo.

Nota 5: En el caso de los aceites vírgenes lampantes y de los aceites de orujo de oliva brutos, para obtener una buena separación del pico de la trilinoleína de los picos adyacentes o de posibles sustancias interferentes, se debe purificar previamente el aceite según la metodología siguiente:

Se lleva a cabo la absorción de 200 μ l de aceite sin diluir en una columnita de sílice sólida para extracción de líquido (tipo SEP PAK sílica cartridge-waters part. n° 51900).

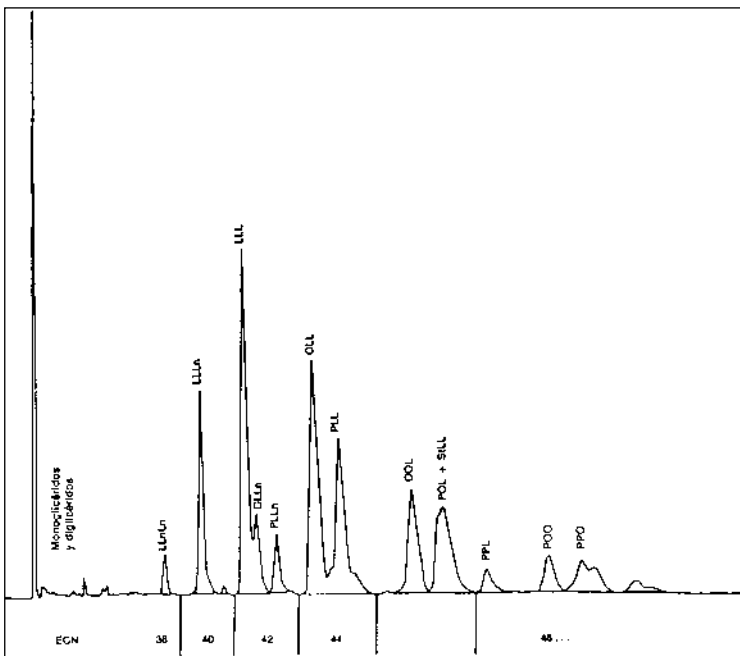
Recomendación Panreac: **731829** Cartucho SPE, Sílica gel, CHROMAFIX® 400-SiOH, 400 mg

La elución de los triglicéridos se efectúa con 20 ml de hexano anhidro para HPLC en un tiempo máximo de 20 segundos.

El producto eluido se seca en una corriente de nitrógeno y se recoge con isopropanol o acetona (5 ml). Se inyectan entre 10 y 20 μ l en HPLC. Es necesario comprobar que la composición de ácidos grasos del aceite sea la misma antes y después de la purificación, dentro de los límites de error del método analítico adoptado.

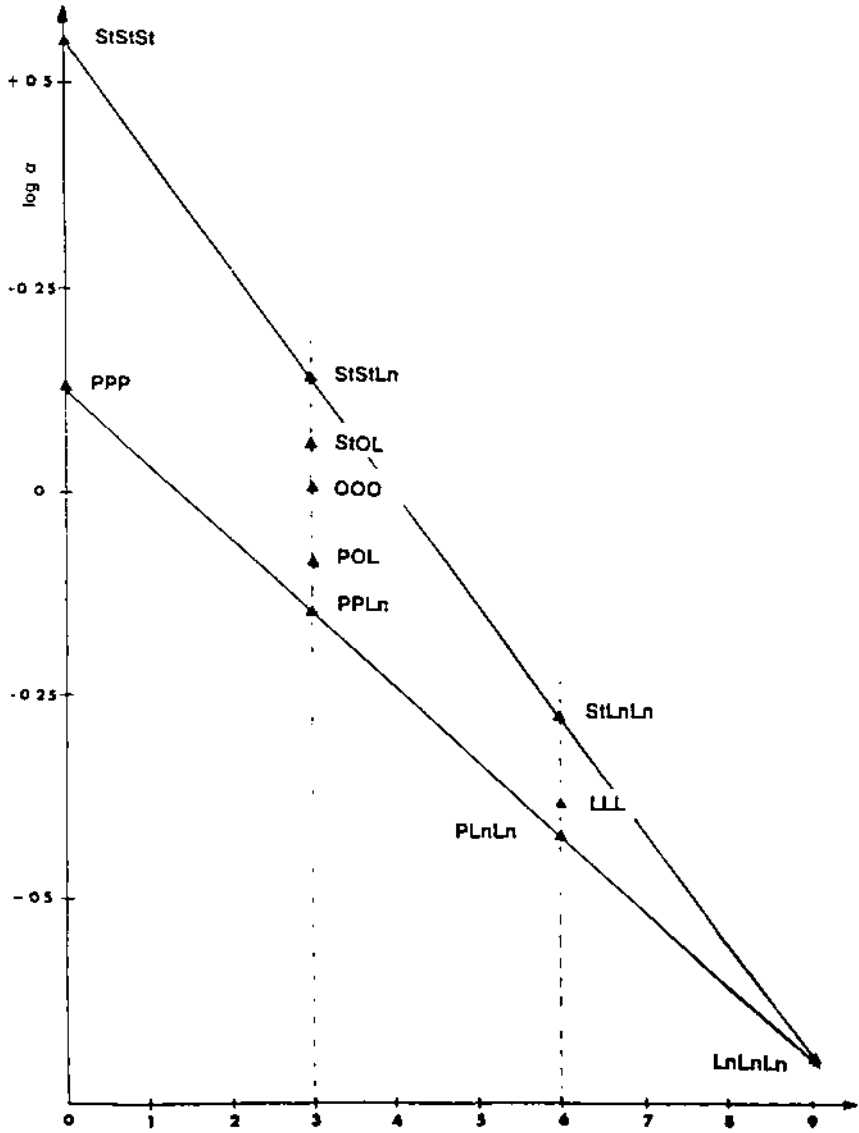
Figura 1

Cromatograma de una muestra de aceite de soja



Nota: P: ácido palmítico;
St: ácido esteárico;
O: ácido oleico;
L: ácido linoleico;
Ln: ácido linolénico.

Figura 2
 Representación gráfica del log alfa frente a f (número de enlaces dobles)



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

ANEXO IX

PRUEBA ESPECTROFOTOMÉTRICA EN EL ULTRAVIOLETA

INTRODUCCIÓN

La prueba espectrofotométrica en el ultravioleta puede proporcionar indicaciones sobre la calidad de una materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos.

Las absorciones en las longitudes de onda indicadas en el método se deben a la presencia de sistemas diénicos y triénicos conjugados. Los valores de estas absorciones se expresan en extinción específica E1%,1cm (extinción de una solución de la materia grasa al 1% en el disolvente determinado, en un espesor de 1 cm) que se expresará convencionalmente como K, también denominado coeficiente de extinción.

1. OBJETO

El método describe el procedimiento de ejecución de la prueba espectrofotométrica en el ultravioleta de las materias grasas.

2. PRINCIPIO

La materia grasa se disuelve en el disolvente requerido y se determina la extinción de la solución a las longitudes de onda prescritas, respecto al disolvente puro. A partir de los valores espectrofotométricos se calculan las extinciones específicas.

3. MATERIAL Y APARATOS

3.1. Espectrofotómetro para medidas de extinción en el ultravioleta entre 220 y 360 nm, con posibilidad de lectura para cada unidad nanométrica.

3.2. Cubetas de cuarzo, con tapadera, con paso óptico de 1 cm. Las cubetas, llenas de agua o de otro disolvente adecuado, no deben presentar entre ellas diferencias superiores a 0,01 unidades de extinción.

3.3. Matraces aforados de 25 ml.

3.4. Columna de cromatografía, de 270 mm de longitud y 35 mm de diámetro en la parte superior: de 270 mm de longitud y 10 mm de diámetro en la parte inferior.

(Modificado por el Reglamento (CE) 183/93)

4. REACTIVOS

4.1. **Isooctano (2,2,4-trimetilpentano) de calidad para espectrofotometría:** debe tener, respecto al agua destilada, una transmitancia del 60% como mínimo a 220 nm y del 95% como mínimo a 250 nm; o

– **ciclohexano de calidad para espectrofotometría:** debe tener, respecto al agua destilada, una transmitancia del 40% como mínimo a 220 nm y del 95% como mínimo a 250 nm. (Modificado por el Reglamento (CE) 183/93)

4.2. **Alúmina básica para cromatografía en columna,** preparada y controlada como se describe en el apéndice I.

4.3. **n-Hexano para cromatografía.**

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Alúmina básica para cromatografía en columna	121100	Aluminio Óxido Básico PA
Ciclohexano de calidad para espectrofotometría	361250	Ciclohexano (UV-IR-HPLC) PAI
Isooctano de calidad para espectrofotometría	362064	Iso-Octano (UV-IR-HPLC) PAI
n-Hexano para cromatografía	362063	n-Hexano (UV-IR-HPLC) PAI

5. PROCEDIMIENTO

5.1. La muestra debe ser perfectamente homogénea y estar exenta de impurezas en suspensión. Los aceites líquidos a temperatura ambiente se filtran con papel de filtro a una temperatura aproximada de 30°C, las grasas sólidas se homogeneizan y se filtran a una temperatura superior en 10°C como máximo a su temperatura de fusión.

5.2. Se pesan con precisión 0,25 g aproximadamente de la muestra preparada y se colocan en

un matraz aforado de 25 ml, se completa con el disolvente adecuado y se homogeneiza. La solución resultante debe estar perfectamente clara. Si presenta opalescencia o turbidez, se filtrará rápidamente con papel de filtro.

5.3. Se llena una cubeta con la solución obtenida y se miden las extinciones, usando como referencia el disolvente empleado, a las longitudes de onda comprendidas entre 232 y 276 nm. Los valores de extinción obtenidos deben estar comprendidos en el intervalo entre 0,1 y 0,8; en caso contrario

es necesario repetir la medida utilizando soluciones más concentradas o más diluidas según el caso.

5.4. Cuando se quiera determinar la extinción específica después del tratamiento con alúmina se procederá del siguiente modo: en la columna para cromatografía se introducen 30 g de alúmina básica en suspensión en hexano; después de asentarse el absorbente se elimina el exceso de hexano, hasta 1 cm aproximadamente sobre el nivel superior de la alúmina.

Se disuelven 10 g de materia grasa, homogeneizada y filtrada tal como se describe en el punto 5.1, en 100 ml de hexano y se vierte esta solución en la columna. Se recoge el líquido eluido y se evapora totalmente el disolvente en vacío a una temperatura inferior a 25°C.

Con la materia grasa así obtenida se procede inmediatamente tal como se indica en el punto 5.2.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1. Se expresan las extinciones específicas o coeficientes de extinción a las diversas longitudes de onda, calculadas como sigue:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot e}$$

siendo:

K_{λ} : extinción específica a la longitud de onda λ ,

E_{λ} : extinción medida a la longitud de onda λ ,

c : concentración de la disolución en g por 100 ml,

e : espesor de la cubeta en cm.

Los resultados deben expresarse con dos cifras decimales.

6.2. La prueba espectrofotométrica del aceite de oliva según el método oficial de los Reglamentos de la CEE requiere la determinación de la extinción específica, en solución en isoocetano, a las longitudes de onda de 232 y 270 nm, y la determinación de ΔK definido como:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

donde K_m es la extinción específica a la longitud de onda m , longitud de onda de máxima absorción alrededor de 270 nm.

APÉNDICE I

Preparación de la alúmina y control de su actividad

A.1.1. Preparación de la alúmina

En un recipiente que pueda cerrarse herméticamente se echa la alúmina previamente desecada en horno a 380-400°C durante tres horas, se añade agua destilada en una proporción de 5 ml por 100 g de alúmina, se cierra rápidamente el recipiente, se agita repetidas veces y se deja reposar durante 12 horas como mínimo antes del uso.

A.1.2. Control de la actividad de la alúmina

Se prepara una columna para cromatografía con 30 g de alúmina. Se opera tal como se describe en el apartado 5.4. Se hace pasar a través de la columna una mezcla formada por:

- 95% de aceite de oliva virgen, con extinción específica a 268 nm menor que 0,18,

- 5% de aceite de cacahuete tratado con tierras decolorantes en el proceso de refinado, con una extinción específica a 268 nm mayor o igual que 4.

Si, después del paso por la columna, la mezcla presenta una extinción específica a 268 nm mayor que 0,11, la alúmina es aceptable; en otro caso se debe aumentar el porcentaje de hidratación.

APÉNDICE II

Ajuste del espectrofotómetro

A.2. El aparato debe revisarse periódicamente (por lo menos cada seis meses) tanto en lo que se refiere a la conformidad de la longitud de onda como a la exactitud de la respuesta.

A.2.1. El control de la respuesta de la longitud de onda puede hacerse mediante una lámpara de vapor de mercurio o mediante filtros adecuados.

A.2.2. Para controlar la célula fotoeléctrica y el fotomultiplicador se procede como sigue: se pesan 0,2 g de **Cromato potásico** de calidad para espectrofotometría, se disuelven, en un matraz aforado de 1000 ml, en una solución de **hidróxido potásico 0,05N** y se completa hasta el enrase. De la solución obtenida se toman exactamente 25 ml, se transvasan a un matraz aforado de 500 ml y se completa hasta el enrase con la misma solución de hidróxido potásico.

Se mide la extinción a 275 nm de la solución así obtenida, utilizando la solución de hidróxido potásico como referencia. La extinción medida en cubeta de 1 cm deberá ser de $0,200 \pm 0,005$.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Cromato potásico	121497	Potasio Cromato PA
Hidróxido potásico 0,05N	181517	Prepararlo a partir de Potasio Hidróxido 1 mol/l (1N) SV diluido convenientemente con agua

ANEXO X «A»

ANÁLISIS DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES

1. OBJETO

El presente método internacional proporciona orientaciones generales para determinar, mediante cromatografía de gases con columna de relleno o capilar, la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos con arreglo al Anexo X B.

El método no es aplicable a los ácidos grasos polimerizados.

2. REACTIVOS

2.1. Gas portador

Gas inerte (nitrógeno, helio, argón, hidrógeno, etc.), perfectamente desecado y que contenga menos de 10 mg/kg de oxígeno.

Nota 1: El hidrógeno, que sólo se emplea como gas portador en las columnas capilares, puede duplicar la velocidad del análisis, pero es peligroso. Existen dispositivos de seguridad.

2.2. Gases auxiliares

2.2.1. Hidrógeno (pureza $\geq 99,9\%$) exento de impurezas orgánicas.

2.2.2. Aire u oxígeno, exento de impurezas orgánicas.

2.3. Patrón de referencia

Una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos puros, o los ésteres metílicos de una grasa de composición conocida y, preferentemente, similar a la de la materia grasa objeto de análisis.

Deberá evitarse la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados.

3. APARATOS

Las normas que figuran a continuación se refieren al equipo ordinario para cromatografía de gases, utilizando columnas de relleno y/o capilares y un detector de ionización de llama. Podrá utilizarse cualquier aparato cuya eficacia y resolución se ajusten a lo dispuesto en el punto 4.1.2.

3.1. Cromatógrafo de gases

El cromatógrafo de gases constará de los siguientes elementos:

3.1.1. Sistema de inyección

Utilizar un sistema de inyección:

a) con columnas de relleno, con un espacio muerto lo más pequeño posible (en este caso, el sistema de inyección podrá calentarse a una temperatura que sea entre 20 y 50°C superior a la de la columna); o

b) con columnas capilares; en este caso, el sistema de inyección estará especialmente diseñado para poder operar con esa clase de columnas; podrá utilizarse un inyector con división de flujo o un inyector "on column".

Nota 2: En ausencia de ácidos grasos con menos de 16 átomos de carbono, podrá utilizarse un inyector de aguja móvil.

3.1.2. Horno

El horno podrá calentar la columna a 260°C como mínimo y mantener dicha temperatura con una oscilación máxima de 1°C, si se emplea una columna de relleno, y de 0,1°C, si se emplea una columna capilar. Este último requisito es especialmente importante si se utiliza una columna de sílice fundida.

Se recomienda emplear en todos los casos un sistema de calentamiento programado, sobre todo en el caso de ácidos grasos con menos de 16 átomos de carbono.

3.1.3. Columna de relleno

3.1.3.1. Columna de un material inerte a las sustancias que vayan a analizarse (es decir, vidrio o acero inoxidable) y de las dimensiones siguientes:

a) Longitud: de 1 a 3 m. Con ácidos grasos de cadena larga (más de C_{20}) es conveniente utilizar una columna relativamente corta. Para el análisis de ácidos con 4 o 6 átomos de carbono se recomienda una columna de 2 m.

b) Diámetro interior: de 2 a 4 mm.

Nota 3: Si hay componentes poliinsaturados con más de tres enlaces dobles, pueden descomponerse en una columna de acero inoxidable.

Nota 4: Puede utilizarse un sistema con doble columna de relleno.

Recomendación Panreac: **710006** Columna de acero inoxidable con relleno standard, 6' long., 1/8" OD, 2 mm ID.

3.1.3.2. Relleno, que incluya los siguientes elementos:

a) Soporte: tierra de diatomeas lavada con ácido y silanizada, u otro soporte inerte adecuado, con un margen estrecho de tamaño de grano (margen de 25 μm , entre 125 y 200 μm); el tamaño medio de grano estará en función del diámetro interior y de la longitud de la columna.

b) Fase estacionaria: líquido polar de tipo poliéster (por ejemplo: polisuccinato de dietilenglicol, polisuccinato de butanodiol, poliadipato de etilenglicol, etc.), cianosiliconas o cualquier otro líquido que permita efectuar la separación cromatográfica exigida (véase el punto 4). La fase estacionaria deberá constituir del 5% (m/m) al 20% (m/m) del relleno. Para algunas separaciones podrá utilizarse una fase fija no polar.

Recomendación Panreac: **705103** Chromosorb recubierto con fase estacionaria Dietilenglicol succinato / 10% en Chromosorb W-AW.

3.1.3.3. Acondicionamiento de la columna

Estando la columna desconectada del detector, si es posible, calentar el horno gradualmente hasta 185°C y hacer pasar a través de la columna recién preparada una corriente de gas inerte a razón de 20-60 ml/min durante 16 horas como mínimo a la temperatura citada y, a continuación, a la temperatura de 195°C durante 2 horas más.

3.1.4. Columna capilar

Recomendación Panreac: **733060.25** Columna capilar FS-CW 20 M, 25 m long., 0,25 mm ID, 0,25 μm espesor.

3.1.4.1. Tubo de un material inerte a las sustancias que vayan a analizarse (generalmente, vidrio o sílice fundida). El diámetro interior estará comprendido entre 0,2 y 0,8 mm. La superficie interior se someterá a un tratamiento adecuado (por ejemplo, preparación de la superficie, inactivación) antes de introducir el recubrimiento de fase fija. En la mayoría de casos, es suficiente una longitud de 25 m⁽³⁾.

3.1.4.2. Fase estacionaria de tipo poliglicol [poli(etilenglicol) 20 000], poliéster (polisuccinato de butanodiol) o polisiloxano polar (cianosiliconas), generalmente. Son apropiadas las columnas de fase químicamente ligada.

Nota 5: Existe el riesgo de que los polisiloxanos polares dificulten la identificación y separación del ácido linoléico y de los ácidos C₂₀.

El espesor de la fase estará comprendido entre 0,1 y 0,2 μm .

3.1.4.3. Montaje y acondicionamiento de la columna.

Observar las precauciones normales de montaje de columnas capilares (es decir, instalación de la columna en el horno, elección y montaje de las juntas (estanqueidad), conexión de los extremos de la columna al inyector y al detector (reducción de los espacios muertos). Colocar la columna bajo un flujo

de gas portador [por ejemplo, 0,3 bar (30 kPa) para una columna de 25 mm de longitud y 0,3 mm de diámetro interior].

Acondicionar la columna programando el gradiente de temperatura del horno a 3°C/min a partir de la temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura 10°C inferior al límite de descomposición de la fase estacionaria. Mantener el horno a esa temperatura durante 1 hora hasta que se estabilice la línea de base. Restablecer la temperatura de 180°C para trabajar en condiciones isotérmicas.

Nota 6: En el comercio pueden obtenerse columnas adecuadas previamente acondicionadas.

3.1.5. Detector que puede calentarse a una temperatura superior a la de la columna.

3.2. Jeringa

Tendrá una capacidad máxima de 10 μl y estará graduada en 0,1 μl .

3.3. Registrador

Si se emplea la curva del registrador para calcular la composición de la mezcla analizada, se necesita un registrador electrónico de alta precisión compatible con los aparatos utilizados. El registrador deberá tener las siguientes características:

a) tiempo de repuesta inferior a 1,5 s y, preferiblemente, inferior a 1 s (el tiempo de repuesta es el tiempo que tarda la pluma registradora en pasar de 0 a 90% después de la introducción instantánea de una señal del 100%);

b) ancho del papel: 20 cm como mínimo;

c) velocidad del papel: ajustable a valores comprendidos entre 0,4 cm/min y 2,5 cm/min.

3.4. Integrador

La utilización de un integrador electrónico permite efectuar cálculos rápidos y precisos. Debe proporcionar una respuesta lineal de sensibilidad adecuada y la corrección de la desviación de la línea de base debe ser satisfactoria.

4. PROCEDIMIENTO

Las operaciones descritas en los puntos 4.1 a 4.3 sólo son válidas si se emplea un detector de ionización de llama.

Como alternativa puede emplearse un cromatógrafo de gases con catarómetro (cuyo funcionamiento se basa en el principio de los cambios de conductividad térmica). En ese caso, las condiciones de ensayo deberán modificarse como se indica en el punto 6.

4.1. Condiciones de ensayo

4.1.1. Determinación de las condiciones operativas óptimas

4.1.1.1. Columna de relleno

Al establecer las condiciones de ensayo deberán tenerse en cuenta las variables siguientes:

(3) En la Directiva consta erróneamente como mm

- a) longitud y diámetro de la columna;
- b) composición y cantidad de la fase estacionaria;
- c) temperatura de la columna;
- d) flujo del gas portador;
- e) resolución exigida;
- f) tamaño de la muestra problema, determinado de modo que el conjunto del detector y el electrómetro dé una respuesta lineal;
- g) duración del análisis.

Como norma general, las cifras de las tablas 1 y 2 permitirán obtener los resultados deseados, es decir, al menos 2000 platos teóricos por metro de longitud de columna en el caso del estearato de metilo, y su elución en 15 minutos aproximadamente.

Cuando el aparato lo permita, la temperatura del inyector deberá ser de 200°C aproximadamente y la del detector deberá ser igual o superior a la de la columna.

Por lo general, la razón entre la velocidad de flujo del hidrógeno suministrado al detector de ionización de llama y la del gas portador oscila entre 1:2 y 1:1, en función del diámetro de la columna. El flujo del oxígeno es de 5 a 10 veces superior al del hidrógeno.

Tabla 1

Diámetro interior de la columna mm	Flujo del gas portador ml/min
2	15 a 25
3	20 a 40
4	40 a 60

Tabla 2

Concentración de la fase fija % (m/m)	Temperatura de la columna °C
5	175
10	180
15	185
20	185

4.1.1.2. Columna capilar

Las propiedades de eficacia y permeabilidad de las columnas capilares implican que la separación de los constituyentes y la duración del análisis dependen considerablemente del flujo del gas portador en la columna. Por lo tanto, para optimizar las condiciones operativas será necesario manipular este parámetro (o, lo que es más sencillo, la presión en cabeza de columna) según se desee mejorar las separaciones o efectuar un análisis rápido.

4.1.2. Determinación del número de platos teóricos (eficacia) y de la resolución (figura 1)

Efectuar el análisis de una mezcla de estearato de metilo y de oleato de metilo (por ejemplo, ésteres

metílicos de manteca de cacao) en proporciones aproximadamente equivalentes.

Escoger la temperatura de la columna y el flujo del gas portador de manera que el máximo del pico del estearato de metilo se registre aproximadamente 15 minutos después del pico del disolvente. Utilizar una cantidad suficiente de la mezcla de ésteres metílicos, de manera que el pico del estearato de metilo se eleve a tres cuartos aproximadamente de la escala completa.

Calcular el número «n» de platos teóricos (eficacia) mediante la siguiente fórmula:

$$n = 16 \left[\frac{d_{r1}}{a_1} \right]^2$$

la resolución «R» mediante la siguiente fórmula:

$$R = \frac{2\Delta}{a_1 + a_2}$$

siendo:

d_{r1} : distancia en mm, desde el inicio del cromatograma hasta el máximo del pico del estearato de metilo,

a_1 y a_2 : anchura, en mm, de los picos del estearato de metilo y del oleato de metilo, respectivamente, medida entre los puntos de intersección de las tangentes en los puntos de inflexión de la curva con la línea de base,

Δ : distancia, en mm, entre los dos máximos de los picos del estearato de metilo y del oleato de metilo.

y el índice de resolución "Ir" mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{a}{b}$$

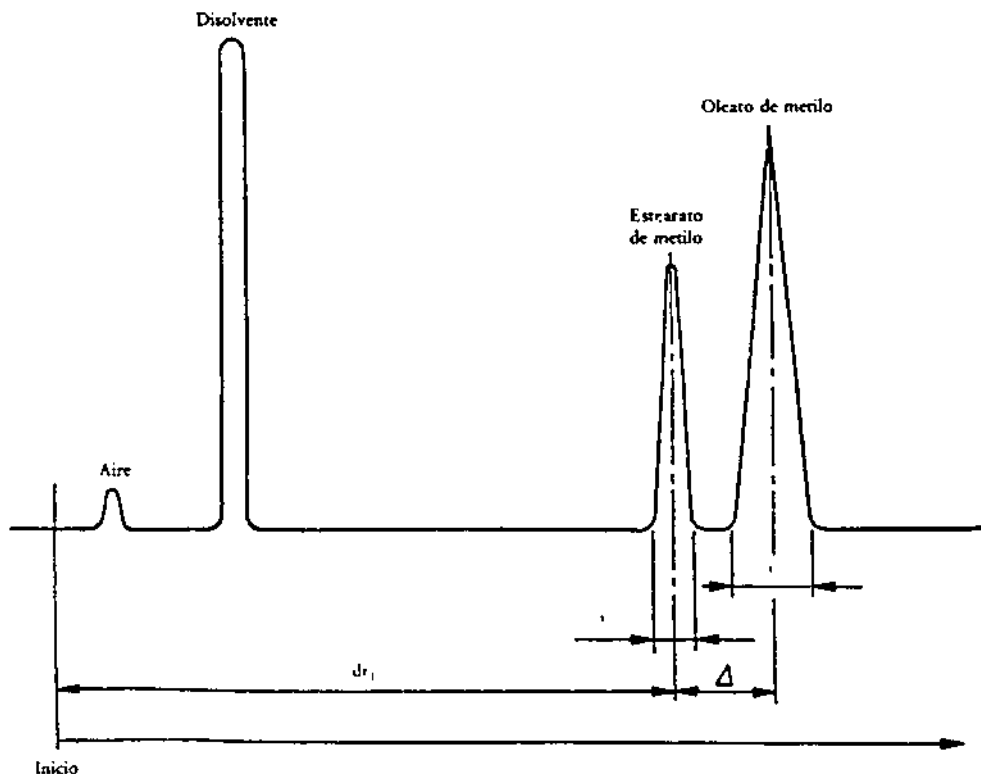
siendo:

a : altura del pico más pequeño, medida a partir de la línea de base;

b : altura del punto más bajo del valle comprendido entre los dos picos adyacentes, medida a partir de la línea de base.

(Modificado por el Reglamento (CEE) Nº 1429/92)

Figura 1
Cromatograma para determinar el número de platos teóricos (eficacia) y la resolución



Se establecerán unas condiciones de análisis que permitan obtener al menos 2 000 platos teóricos por metro de longitud de columna para el estearato de metilo y una resolución de 1,25 como mínimo.

4.2. Muestra problema

Tomar con la jeringa (3.2) de 0,1 μ l a 2 μ l de la solución de ésteres metílicos preparados con arreglo al Anexo X B e inyectarlos en la columna.

En el caso de ésteres no disueltos, preparar una solución de 100 mg/ml aproximadamente en heptano de calidad para cromatografía e inyectar de 0,1 μ l a 1 μ l de esta solución.

Si sólo se desean detectar los componentes presentes en cantidades muy pequeñas, se podrá aumentar el tamaño de la muestra (hasta 10 veces).

4.3. Análisis

Como norma general, las condiciones de ensayo son las que se especifican en el punto 4.1.1.

No obstante, cuando se determinan ácidos con menos de 12 átomos de carbono es posible operar

a menor temperatura de columna, mientras que cuando se determinan ácidos grasos con más de 20 átomos de carbono es posible operar a una temperatura mayor. A veces se puede utilizar en los dos casos anteriores un sistema de programación de temperatura. Por ejemplo, si la muestra contiene ésteres metílicos de ácidos grasos con menos de 12 átomos de carbono, inyectar la muestra a 100°C (o a 50 – 60°C si hay ácido butírico) y elevar inmediatamente la temperatura a razón de 4 – 8 °C/min hasta alcanzar el nivel deseado. En algunos casos es posible combinar ambos procedimientos.

Tras el calentamiento programado, se continúa la elución a temperatura constante hasta que todos los componentes se hayan eluido. Si el instrumento no puede efectuar un calentamiento programado, se opera a dos temperaturas fijas comprendidas entre 100 y 195°C.

Si es necesario, se recomienda que se efectúe un análisis con dos fases fijas de diferente polaridad para comprobar la ausencia de picos «ocultos», por ejemplo en caso de presencia simultánea de $C_{18:3}$ y $C_{20:0}$ o $C_{18:3}$ y $C_{18:2}$ conjugados.

4.4. Preparación del cromatograma y las gráficas de referencia

Analizar la mezcla patrón de referencia (2.3) aplicando las mismas condiciones de ensayo que a la muestra y medir los tiempos o las distancias de retención de los ácidos grasos que la componen. Representar gráficamente en papel semilogarítmico, para cualquier grado de insaturación, el logaritmo del tiempo o de la distancia de retención en función del número de átomos de carbono. En condiciones isotérmicas, las gráficas de los ésteres de cadena lineal con el mismo grado de insaturación deben formar líneas rectas. Dichas líneas rectas deben ser aproximadamente paralelas.

Deben evitarse las condiciones que propicien la existencia de «picos ocultos», es decir, una resolución insuficiente para separar dos componentes.

5. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

5.1. Análisis cualitativo

Identificar los picos del estearato de metilo de la muestra a partir de los gráficos citados en el punto 4.4, si es necesario por interpolación.

5.2. Análisis cuantitativo

5.2.1. Determinación de la composición

Salvo en casos excepcionales, utilizar el método de normalización interna, es decir, partir del principio de que todos los componentes de la muestra están representados en el cromatograma, de manera que el total de las áreas situadas debajo de cada pico representa el 100% de los constituyentes (elución total).

Si el equipo incluye un integrador, utilizar las cifras que éste proporcione. En caso contrario, determinar el área situada debajo de cada pico multiplicando la altura del pico por el ancho a la mitad de la altura y, cuando sea necesario, tomar en consideración las atenuaciones utilizadas durante el registro.

5.2.2. Método de cálculo

5.2.2.1. Caso general

Calcular el contenido de un componente dado (i) (expresado como porcentaje en masa de ésteres metílicos), mediante la determinación del porcentaje que representa el área de su pico en relación con la suma de las áreas de todos los picos, aplicando la fórmula siguiente:

$$\frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

siendo:

A_i : área del pico correspondiente al componente i.

$\sum A$: suma de las áreas de todos los picos.

Expresar el resultado con una cifra decimal.

Nota 7: En este caso general se considera que el resultado del cálculo basado en las áreas relativas representa el porcentaje en peso. Para los casos en que no es válida esta consideración, véase el punto 5.2.2.2.

5.2.2.2. Utilización de factores de corrección

En algunos casos, por ejemplo en presencia de ácidos grasos con menos de 8 átomos de carbono o de ácidos con grupos secundarios, si se utilizan detectores de conductividad térmica o si es necesario alcanzar mayor nivel de exactitud, deben aplicarse factores de corrección para convertir los porcentajes de las áreas de los picos en porcentajes en peso de los componentes.

Determinar los factores de corrección con un cromatograma obtenido del análisis de una mezcla de referencia de ésteres metílicos de composición conocida en condiciones de ensayo idénticas a las empleadas para el análisis de la muestra.

La fórmula que se aplicará a la muestra de referencia para obtener el porcentaje en peso del componente i es la siguiente:

$$\frac{m_i}{\sum m} \times 100$$

siendo:

m_i : peso del componente i de la muestra de referencia,

$\sum m$: suma de los pesos de los diversos componentes de la muestra de referencia.

A partir del cromatograma de la muestra de referencia (4.4) calcular el porcentaje (área/área) del componente i del siguiente modo:

$$\frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

siendo:

A_i : área del pico correspondiente al componente i,

$\sum A$: suma de las áreas de todos los picos.

El factor de corrección se calcula del siguiente modo:

$$K_i = \frac{m_i \times \sum A}{A_i \times \sum m}$$

Por lo general, los factores de corrección se expresan con relación a K_{C16} , de modo que los factores relativos se convierten en lo siguiente:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

En la muestra, el contenido de cada componente i , expresado como porcentaje en peso de los ésteres metílicos, es el siguiente:

$$\frac{K'_i \times A_i}{\sum(K'_i \times A_i)} \times 100$$

Expresar los resultados con una cifra decimal.

5.2.2.3. Utilización de patrón interno

En algunos análisis (por ejemplo, cuando no se cuantifican todos los ácidos grasos por estar presentes simultáneamente ácidos de 4 y 6 átomos de carbono y ácidos de 16 y 18 átomos de carbono, o cuando es necesario determinar la cantidad absoluta de un ácido graso en la muestra) es preciso utilizar un patrón interno. Se emplean con frecuencia ácidos grasos de 5, 15 o 17 átomos de carbono. Debe determinarse, si es necesario, el factor de corrección del patrón interno.

El porcentaje en peso del componente i , expresado como ésteres metílicos, se calcula mediante esta fórmula:

$$\frac{m_p \times K'_i \times A_i}{m \times K'_p \times A_p} \times 100$$

siendo:

A_i : área del pico correspondiente al componente i .

A_p : área del pico correspondiente al patrón interno.

K'_i : factor de corrección del componente i (con relación a $K_{C_{16}}$).

K'_p : factor de corrección del patrón interno (con relación a $K_{C_{16}}$).

m : peso, en mg, de la muestra.

m_p : peso, en mg, del patrón interno.

Expresar los resultados con una cifra decimal.

6. CASO ESPECIAL DE DETERMINACIÓN DE LOS ISÓMEROS TRANS

(Reglamento (CEE) N° 1429/92)

Es posible determinar el contenido de isómeros trans de los ácidos grasos con un número de átomos de carbono comprendido entre 10 y 24 por separación de los ésteres metílicos, utilizando columnas cromatográficas capilares con una polaridad especial.

6.1. Columna capilar de silicio de un diámetro interno comprendido entre 0,25 mm y 0,32 mm y de 50 m de longitud, recubierta de una capa de cianopropilsilicona de un espesor comprendido entre

0,1 y 0,3 μm (tipo SP 2340, tipo SP 2380, C.P. sil 88, Silor 10 o similar).

Recomendación Panreac: **726089.60** Columna capilar para GC, OPTIMA® 240, 60 m long., 0,25 mm ID, 0,25 μm espesor.

6.2. Los ésteres metílicos se preparan según el procedimiento B descrito en el Anexo X "B". Las materias grasas con una acidez libre superior al 3% deben neutralizarse previamente con arreglo al punto 6.1 del Anexo VII.

6.3. Las condiciones generales de trabajo para la cromatografía en fase gaseosa son las siguientes:

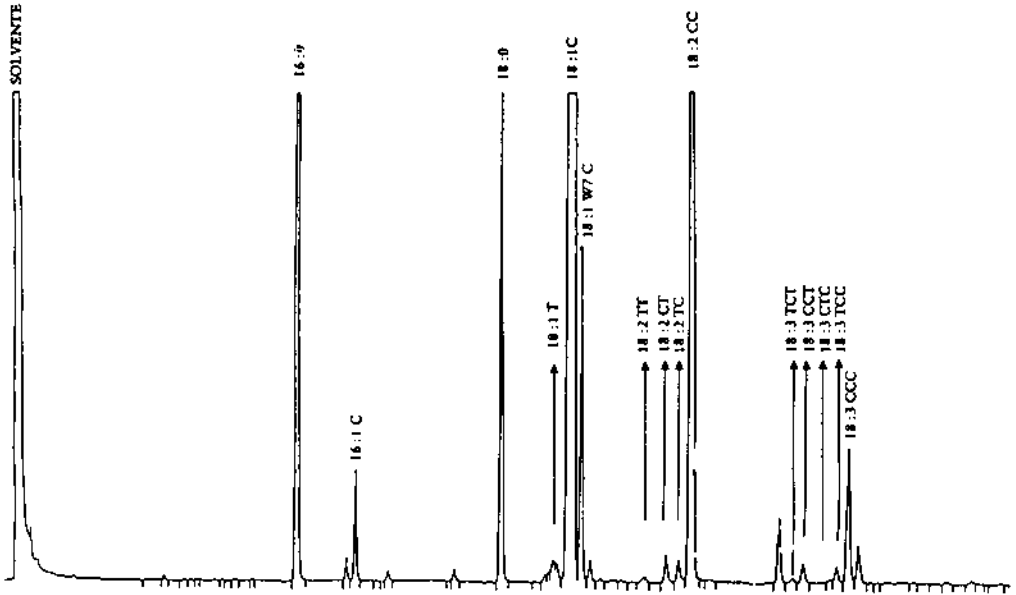
- temperatura de la columna programada de 150° a 230°C (por ejemplo, 165°C durante 15 minutos y a continuación un aumento de 5°C por minuto hasta alcanzar 200°C),
- temperatura del inyector: 250°C si se utiliza el sistema de inyector divisor o la temperatura inicial de la columna si se emplea el sistema "on column",
- temperatura del detector: 260°C,
- flujo del gas vector (helio e hidrógeno): 1,2 ml/minuto.

La cantidad inyectada debe ser tal que, en las condiciones de sensibilidad empleadas, la altura del pico correspondiente al éster metílico del ácido araquídico sea igual o superior al 20% del fondo de escala.

6.4. La identificación de los diversos ésteres metílicos se efectúa comparando los tiempos de retención con los de las mezclas de referencia (tal y como se indica en el punto 2.3).

Los ésteres de los ácidos grasos trans son eluidos antes que los isómeros cis correspondientes. En la figura 2 se presenta un ejemplo de cromatograma.

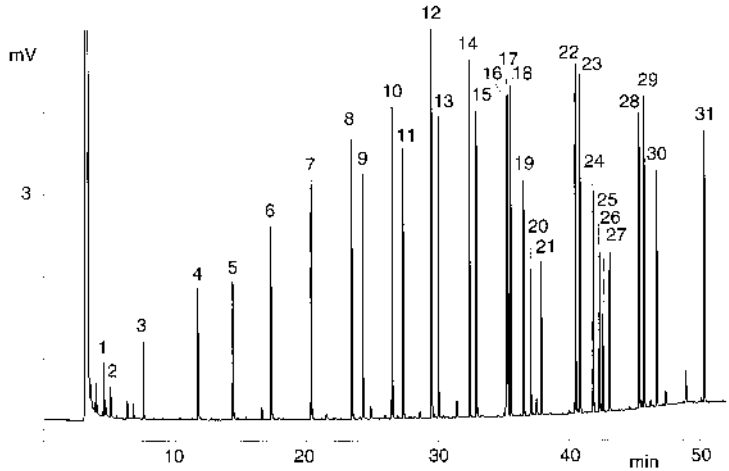
Figura 2
Cromatograma de gases tipo relativo a la determinación de los isómeros trans de los ácidos grasos con columna capilar



Cromatograma de gases tipo relativo a la determinación de los isómeros trans de los ácidos grasos con la columna capilar 726089.60 (recomendación Panreac)

Picos:

- 1. C 4:0
- 2. C 5:0
- 3. C 8:0
- 4. C 10:0
- 5. C 11:0
- 6. C 12:0
- 7. C 13:0
- 8. C 14:0
- 9. C 14:1
- 10. C 15:0
- 11. C 15:1
- 12. C 16:0
- 13. C 16:1
- 14. C 17:0
- 15. C 17:1
- 16. C 18:0
- 17. trans-C 18:1
- 18. cis-C 18:1
- 19. C 18:2
- 20. C 18:3
- 21. C 18:3
- 22. C 20:0
- 23. C 20:1
- 24. C 20:2
- 25. C 20:3
- 26. C 20:4
- 27. C 20:3
- 28. C 22:0
- 29. C 22:1
- 30. C 22:3
- 31. C 24:1



6.5. La eficacia de la columna determinada con arreglo al punto 4.1.2 deberá permitir una separación, con un índice de resolución superior a 2, de determinadas parejas críticas, como la formada por el grupo de los ácidos transoleicos y el pico del ácido oleico (trans C18:1/cis C18:1).

6.6. La proporción de los diversos ácidos grasos trans se calcula estableciendo la relación entre la superficie del pico correspondiente y la suma de las superficies de todos los picos presentes.

Se toman en consideración los porcentajes de los ácidos:

- trans octadecenoicos (T 18:1), que en el Anexo I del presente Reglamento figuran como tal de isómeros transoleicos,
- cis-trans y trans-cis octadecadienoicos [(CT/TC) 8:2], que en el Anexo I del presente Reglamento figuran como tal de isómeros translinoleicos,
- trans-cis-trans, cis-cis-trans, cis-trans-cis, trans-cis-cis octadecatrienoicos [(TCT+CCT+CTC+TCC) 18:3], que en el Anexo I del presente Reglamento figuran como total de isómeros translinolénicos.

Nota 8: Teniendo en cuenta las características particulares de este método, los resultados deben darse con dos decimales.

7. CASO ESPECIAL DE UTILIZACIÓN DE UN CATARÓMETRO (FUNCIONAMIENTO BASADO EN EL PRINCIPIO DE LOS CAMBIOS DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA)

Para la determinación de la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos también podrá utilizarse un cromatógrafo de gases provisto de un detector cuyo funcionamiento se base en el principio de los cambios de conductividad térmica (catarómetro). En ese caso, las condiciones establecidas en los puntos 3 y 4 deberán modificarse como se indica en la tabla 3.

Para el análisis cuantitativo, utilizar los factores de corrección definidos en el punto 5.2.2.2.

Tabla 3

Variable	Valor / condición
Columna	Longitud: 2 a 4 m Diámetro interior: 4 mm
Soporte	Tamaño de grano entre 160 y 200 µm
Concentración de la fase estacionaria	De 15% a 25% (m/m)
Gas portador	Helio o, en su defecto, hidrógeno, con el menor contenido de oxígeno posible
Gases auxiliares	Ninguno
Temperatura del inyector	De 40 a 60°C más que la de la columna
Flujo del gas portador	Normalmente entre 60 y 80ml/min
Tamaño de la muestra problema inyectada	Normalmente entre 0,5 y 2 µl

8. INFORME DEL ANÁLISIS

En el informe del análisis se expondrán los métodos utilizados para la preparación de los ésteres metílicos y para la realización del análisis mediante cromatografía de gases, así como los resultados obtenidos. Se mencionarán, asimismo, cualesquiera procedimientos de trabajo que no se especifiquen en la presente norma internacional o que se consideren facultativos, así como toda circunstancia que pueda haber influido en los resultados.

El informe del análisis incluirá todos los datos necesarios para la completa identificación de la muestra.

ANEXO X "B"

PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍlicos DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CONFORMIDAD CON LOS PUNTOS I Y II DEL ANEXO VI DEL REGLAMENTO (CEE) N° 72/77 O SEGÚN EL MÉTODO QUE SE DESCRIBE A CONTINUACIÓN

INTRODUCCIÓN

La elección del procedimiento a utilizar deberá hacerse en función de la composición de los ácidos y de la acidez de la materia grasa que haya que examinar y del análisis mediante cromatografía de gases que deba efectuarse.

En particular:

– cuando se trate de materias grasas que contengan ácidos grasos inferior a C_{12} , sólo podrán utilizarse los procedimientos en tubo cerrado o con dimetilico,

– cuando se trate de materias grasas con una acidez superior al 3%, sólo podrán utilizarse los procedimientos con mezcla de metanol y ácido clorhídrico o con sulfato dimetilico,

– en la determinación mediante cromatografía de gases de los isómeros trans, sólo podrán utilizarse los procedimientos con metilato sódico o con sulfato dimetilico,

– el procedimiento con mezcla de metanol, hexano y ácido sulfúrico deberá utilizarse en la preparación de los ésteres metílicos de pequeñas cantidades de materias grasas por separación mediante cromatografía en capa fina.

No se tendrá en cuenta el insaponificable cuando no supere el 3%; en caso contrario, los ésteres metílicos deberán prepararse a partir de los ácidos grasos.

1. OBJETO

A continuación se describen cinco procedimientos para la preparación de los ésteres metílicos de las materias grasas:

- con metilato sódico;
- con metilato sódico en tubo cerrado;
- con mezcla de metanol y ácido clorhídrico en tubo cerrado;
- con sulfato dimetilico;

e) con mezcla de metanol, hexano y ácido sulfúrico.

Procedimiento A

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La materia grasa objeto de análisis se calienta a reflujo con alcohol metílico y metilato sódico. Los ésteres metílicos que se obtengan se extraen con éter etílico.

3. MATERIAL Y APARATOS

- Matraz redondo de 100 ml con refrigerante de reflujo, provisto en su extremidad superior de un tubo para cal sódica, con junta esmerilada.
- Probetas de 50 ml.
- Pipeta de 5 ml graduada en divisiones de 0,1 ml.
- Embudos de separación de 250 ml.
- Matraz redondo de 200 ml.

4. REACTIVOS

- Metanol anhidro.**
- Solución de metilato sódico en metanol al 1% aproximadamente. Se prepara disolviendo 0,34 g de **sodio metal** en 100 ml de **metanol anhidro**.
- Éter etílico.**
- Solución de **cloruro sódico** al 10%.
- Éter de petróleo 40°-60°C.**

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Cloruro sódico	131659	Sodio Cloruro PA-ACS-ISO
Éter de petróleo 40°-60°C	131315	Eter de Petróleo 40-60°C PA-ISO
Éter etílico	132770	Eter Dietílico estabilizado con ~6 ppm de BHT PA-ACS-ISO
Metanol anhidro	481091	Metanol seco (máx. 0,01% de agua) DS-ACS-ISO
Sodio metal	131699	Sodio metal, barras PA-ACS

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Introducir en el matraz de 100 ml 2 g de grasa previamente deshidratada en sulfato sódico y filtrada. Añadir 35 ml de metanol, acoplar el refrigerante y llevar a ebullición manteniéndola a reflujo durante algunos minutos.

5.2. Interrumpir el calentamiento, separar el refrigerante y añadir rápidamente 3,5 ml de la solución de metilato sódico; acoplar nuevamente el refrigerante y hervir a reflujo durante 3 horas como

mínimo. La metilación se habrá completado cuando toda la materia grasa se haya disuelto y la mezcla de reacción esté perfectamente transparente a temperatura ambiente.

5.3. Enfriar y verter la mezcla de reacción en una ampolla de separación de 250 ml, añadir 35 o 40 ml de éter etílico, 100 ml de agua y 5 o 6 ml de la solución de cloruro sódico al 10%. Agitar y esperar a que se produzca la separación de las capas; transferir la fase acuosa a una segunda ampolla de separación y extraerla de nuevo con 25 ml de éter etílico.

Añadir a los extractos etéreos reunidos 50 ml de éter de petróleo 40-60°C, lo que provocará la separación del agua que debe eliminarse.

Lavar la fase etérea tres veces con 10 o 15 ml de agua cada vez, desecar sobre sulfato sódico y pasar filtrando a través de papel a un matraz redondo de 200 ml.

Concentrar la solución al baño María hasta unos 20 ml mientras se hace pasar una corriente de nitrógeno puro.

Procedimiento B

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La materia grasa objeto de análisis es tratada con metilato sódico en solución metanólica, en recipiente cerrado, a 85° – 90°C.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Metanol anhidro	481091	Metanol seco (máx. 0,01% de agua) DS-ACS-ISO
Sodio metal	131699	Sodio metal, barras PA-ACS

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Introducir en el tubo de vidrio 2 g de materia grasa previamente deshidratada en sulfato sódico y filtrada. Añadir 0,3 g (unos 0,4 ml) de la solución de metilato sódico y cerrar el tubo a la llama.

5.2. Mantener el tubo durante dos horas al baño María a una temperatura entre 85° y 90°C agitando de vez en cuando. La esterificación se habrá conseguido cuando se vuelva transparente el contenido del frasco tras la sedimentación de la glicerina y de los residuos de los reactivos.

5.3. Enfriar a temperatura ambiente. Abrir el tubo cuando se vayan a utilizar los ésteres metílicos. Éstos no necesitan de ninguna otra manipulación antes de ser analizados.

3. MATERIAL Y APARATOS

3.1. Tubo de vidrio de paredes gruesas, de unos 5 ml (altura: 40-45 mm, diámetro: 14-16 mm).

3.2. Pipeta de 1 ml graduada en divisiones de 0,1 ml.

4. REACTIVOS

4.1. Solución de metilato sódico en metanol al 1,5% aproximadamente. Se prepara disolviendo 0,50 g de **sodio metal** en 100 ml de **metanol anhidro**.

Procedimiento C

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La materia grasa objeto de análisis es tratada con una mezcla de metanol y ácido clorhídrico, en tubo cerrado, a 100°C.

3. MATERIAL Y APARATOS

3.1. Tubo de vidrio de paredes gruesas, de unos 5 ml (altura: 40-45 mm, diámetro: 14-16 mm).

3.2. Pipetas aforadas de 1 y 2 ml.

4. REACTIVOS

4.1. Solución de ácido clorhídrico en metanol al 2%. Se prepara con ácido clorhídrico gaseoso y **metanol anhidro** (nota 1).

4.2. **Hexano de calidad adecuada para cromatografía**.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Hexano de calidad adecuada para cromatografía	362063	n-Hexano (UV-IR-HPLC) PAI
Metanol anhidro	481091	Metanol seco (máx. 0,01% de agua) DS-ACS-ISO

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Introducir en el tubo de vidrio 0,2 g de materia grasa, previamente deshidratada en sulfato sódico y filtrada, y 2 ml de la solución de ácido clorhídrico en metanol. Cerrar el tubo a la llama.

5.2. Mantener el tubo durante 40 minutos al baño María a 100°C.

5.3. Enfriar el tubo en agua corriente, abrirlo, añadir 2 ml de agua destilada y 1 ml de hexano. Centrifugar y extraer la fase del hexano que estará lista para ser utilizada.

Procedimiento D

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La materia grasa objeto de análisis se saponifica con una solución en alcohol metílico de hidróxido potásico, y después se trata con sulfato dimetílico. Tras añadir ácido clorhídrico, los ésteres metílicos formados se separan espontáneamente. Mediante el tratamiento posterior con alúmina, se obtienen ésteres metílicos de elevada pureza.

3. MATERIAL Y APARATOS

3.1. Tubo de ensayo de vidrio de paredes gruesas, de 20 ml aproximadamente de capacidad, con tapón esmerilado 10/19 y enganches de seguridad.

3.2. Refrigerante de reflujo de cinco ampollas con junta esmerilada 10/19.

3.3. Filtros de vidrio de fondo poroso, de graduación G 2 y diámetro de 20 mm.

3.4. Tubos de ensayo de vidrio de fondo cónico, de unos 10 ml de capacidad.

3.5. Jeringas de 1 y 5 ml.

4. REACTIVOS

4.1. Solución al 10% de hidróxido potásico en alcohol metílico de calidad adecuada para cromatografía.

4.2. Solución al 0,05% del indicador verde de bromocresol en alcohol metílico.

4.3. Sulfato dimetílico (d = 1,335 a 15°C).

4.4. Ácido clorhídrico concentrado (d = 1,19) diluido 1:1 con alcohol metílico de calidad cromatográfica.

4.5. Óxido de aluminio normalizado según el método Brockmann para cromatografía de adsorción.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Ácido clorhídrico concentrado (d = 1,19)	131020	Ácido Clorhídrico 37% PA-ACS-ISO
Alcohol metílico de calidad adecuada para cromatografía	361091	Metanol (UV-IR-HPLC-HPLC preparativa) PAI
Hidróxido potásico	121515	Potasio Hidróxido 85% lentejas PA
Óxido de aluminio	121100	Aluminio Óxido Básico PA
Solución al 0,05% del indicador verde de bromocresol en alcohol metílico	281760	Verde de Bromocresol solución 0,04% RV
Sulfato dimetílico (d = 1,335 a 15°C)	162714	Dimetilo Sulfato PS

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Introducir en el tubo de ensayo de 20 ml unos 2,2 ml de materia grasa previamente deshidratada en sulfato sódico y filtrada; añadir 5 ml de la solución de hidróxido potásico y algunos granos de piedra pómez para regular la ebullición. Acoplar el refrigerante de reflujo y calentar agitando sobre llama pequeña durante 5 minutos. Para que la saponificación sea completa, la solución deberá volverse transparente. Por último, enfriar en agua corriente y separar el refrigerante.

5.2. Añadir dos gotas del indicador y, lentamente, con la ayuda de una jeringa, 1 ml de sulfato dimetílico. Cerrar herméticamente el tubo de ensayo y agitar durante dos o tres minutos, introduciendo con frecuencia el fondo del tubo en agua hirvien-

do: la reacción será completa cuando el indicador pase del azul al amarillo. Al final, enfriar el tubo en agua corriente, abrirlo y añadir 5 ml de la solución metanólica de ácido clorhídrico.

5.3. Tras agitar durante unos segundos, inclinar el tubo y darle ligeras sacudidas que faciliten la aparición de los ésteres metílicos en forma de masa oleosa (nota A).

Retirar los ésteres metílicos con una jeringa, introducirlos en un tubo de fondo cónico, añadir un volumen de alúmina equivalente a un cuarto del volumen de los ésteres metílicos, agitar y filtrar con papel de filtro.

Nota A: En caso de que no se produzca espontáneamente la separación de los ésteres metílicos, añadir al tubo 5 ml de agua y agitar.

Procedimiento E

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La materia grasa objeto de análisis se calienta a reflujo con metanol, hexano y ácido sulfúrico. Los ésteres metílicos que se obtengan se extraerán con éter de petróleo.

3. MATERIAL Y APARATOS

3.1. Tubo de ensayo de unos 20 ml de capacidad, con refrigerante de reflujo de aire, de 1 m aproximadamente de longitud, con junta esmerilada.

- 3.2. Pipeta aforada 5 ml.
- 3.3. Ampolla de separación de 50 ml.
- 3.4. Probetas de 10 y 25 ml.
- 3.5. Tubo de fondo cónico de 15 ml.

4. REACTIVOS

- 4.1. Reactivo de metilación: **metanol anhidro, hexano y ácido sulfúrico concentrado** ($d = 1,84$) en la siguiente proporción: 75:25:1 (V/V/V).
- 4.2. **Éter de petróleo 40-60°C.**
- 4.3. **Sulfato sódico anhidro.**

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Ácido sulfúrico concentrado	131058	Acido Sulfúrico 96% PA-ISO
Éter de petróleo 40-60°C	131315	Eter de Petróleo 40-60°C PA-ISO
Hexano	132063	n-Hexano PA-ACS
Metanol anhidro	481091	Metanol seco (máx. 0,01% de agua) DS-ACS-ISO
Sulfato sódico anhidro	131716	Sodio Sulfato anhidro PA-ACS-ISO

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Introducir en el tubo de 20 ml el material recuperado de la placa y añadir 5 ml de reactivo de metilación.

5.2. Acoplar el refrigerante de reflujo y calentar al baño María en ebullición durante 30 minutos (nota 2).

5.3. Transferir cuantitativamente la mezcla a una ampolla de separación de 50 ml con la ayuda de 10 ml de agua destilada y 10 ml de éter de petróleo. Agitar enérgicamente y esperar a que se produzca la separación de las fases, extraer la capa acuosa y lavar la capa etérea dos veces con 20 ml de agua destilada. Añadir a la ampolla de separación una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro, agitar, dejar reposar unos minutos y pasar filtrando a un tubo de fondo cónico de 15 ml.

Evaporar el disolvente al baño María haciendo pasar una corriente de nitrógeno.

Nota 1: En el laboratorio pueden prepararse fácilmente pequeñas cantidades de ácido clorhídrico gaseoso por simple desplazamiento de la solución comercial ($p = 1,18$), añadiendo algunas gotas de ácido sulfúrico concentrado ($p = 1,84$). El gas liberado se deseca fácilmente por borboteo a través de ácido sulfúrico concentrado. Dado que el ácido clorhídrico es absorbido por el metanol con mucha rapidez, se aconseja que se adopten las precauciones necesarias al disolverlo (es decir, introducir el gas a través de un embudo pequeño invertido cuyo borde roce la superficie del líquido). Pueden prepa-

rarse con antelación cantidades grandes de solución metanólica de ácido clorhídrico, ya que se conserva en perfectas condiciones en la oscuridad dentro de botellas con tapones de vidrio.

Nota 2: Para controlar la ebullición, introducir una varita de vidrio en el tubo y limitar la temperatura del baño María a 90°C.

ANEXO XI

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN SOLVENTES HALOGENADOS VOLÁTILES EN EL ACEITE DE OLIVA

1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Análisis por cromatografía en fase gaseosa según la técnica del espacio de cabeza (head space).

2. EQUIPO

2.1. Cromatografía de gases con detector de captura de electrones (ECD).

2.2. Equipo para espacio de cabeza (head space).

2.3. Columna de cromatografía en fase gaseosa de vidrio de 2 metros de largo y 2 mm de diámetro, fase estacionaria.

OV 101 al 10% impregnado en cromosorb W-AW-DMCS (tierra de diatomeas calcinada lavada con ácido y silanizado (80-100 Mesh).

Recomendación Panreac: **726785.50** Columna capilar OPTIMA® 624, 50 m long., 0,25 mm ID, 1,40 µm espesor.

2.4. Gas portador y gas auxiliar: nitrógeno para cromatografía de gases de pureza adecuada para la detección por captura de electrones.

2.5. Frascos de cristal de 10 a 15 ml provistos de septum de teflón y con una cápsula de aluminio con un orificio para toma de muestras con jeringa.

Recomendación Panreac: **70205.36** Vial encapsulable N 20-10 DIN, incoloro.

70234 Cápsula de aluminio con disco N 20 TB/oA color aluminio.

2.6. Pinzas capsuladoras para cerrar herméticamente.

Recomendación Panreac: **735120** Encapsuladora manual, N 20 para tapones encapsulables de 20 mm ID.

2.7. Jeringa para gases de 0,5 y 2 ml.

3. REACTIVOS

Solventes halogenados con una pureza apropiada para su uso en cromatografía en la fase gaseosa.

4. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

4.1. Pesar con exactitud unos 3 g de aceite en un frasco de cristal (no reutilizable), tapar el frasco de manera que quede cerrado herméticamente. Introducir el frasco en un baño con termostato a 70°C durante 1 hora. Extraer con precisión, por medio de una jeringa, un volumen de 0,2 a 0,5 ml del espacio de cabeza. Inyectarlo en la columna del cromatógrafo de gases con las siguientes condiciones:

temperatura inyector: 150°C

temperatura columna: 70-80°C

temperatura detector: 200-250°C

Podrán utilizarse otras temperaturas siempre que los resultados sean equivalentes.

La inyección se puede realizar con el equipo para espacio de cabeza.

4.2. Soluciones de referencia. Preparar solucio-

nes patrón utilizando aceite de oliva refinado sin trazas de solventes con concentraciones en hidrocarburos halogenados de 0,05 a 1 ppm (mg/kg) según el contenido supuesto de la muestra. Para preparar la solución de referencia, si es necesario diluir previamente el hidrocarburo halogenado patrón, puede utilizarse **pentano**.

Recomendación Panreac: **362006** n-Pentano (UV-IR-HPLC) PAI

4.3. Cuantificación. Se efectúa por cálculo mediante la relación de áreas o alturas del pico de la muestra y de la solución patrón cuya concentración sea la más próxima a la de la muestra. Si la desviación es superior al 10%, será necesario volver a hacer el análisis, comparándolo con una nueva solución patrón de concentración tal que se ajuste a la desviación relativa antes mencionada. El contenido se establecerá efectuando la media de varias inyecciones.

4.4. Expresión de los resultados. Los resultados se expresarán en ppm (mg/kg). El límite de detección del método es de 0,01 mg/kg.

ANEXO XIII

1. NEUTRALIZACIÓN Y DECOLORACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA EN LABORATORIO. (Modificado por el Reglamento (CE) 183/93)

1.1. Neutralización del aceite

1.1.1. Equipo

– vaso de 300 ml de forma alta,

– centrífuga con tubos de 100 ml,

– vaso de 250 ml,

– matraces de 100 ml,

– ampolla de decantación de 1 litro.

1.1.2. Reactivos

– solución acuosa de **hidróxido de sodio** al 12 %,

– **solución etanólica al 1 % de fenoltaleína**,

– **hexano para análisis**,

– **alcohol isopropílico puro para análisis**.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Alcohol isopropílico puro para análisis	131090	2-Propanol PA-ACS-ISO
Hexano para análisis	132063	n-Hexano PA-ACS
Hidróxido de sodio	131687	Sodio Hidróxido lentejas PA-ACS-ISO
Solución etanólica al 1 % de fenoltaleína	281327	Fenoltaleína solución 1% RV

1.1.3. Modo de operar

a) Aceites de acidez expresada en ácido oleico inferior al 30%

Introducir en un vaso de 300 ml de forma alta, 50 g de aceite bruto y calentar a 65°C al baño María. Agitar lentamente, y añadir una cantidad de solución de hidróxido de sodio al 12% que corresponda a la acidez libre del aceite con un exceso del 5%. Continuar agitando durante cinco minutos, manteniendo la temperatura a 65°C.

Trasladar el total a unos tubos de centrifuga de 100 ml, separar la masa jabonosa por centrifugación. Verter el aceite decantado en un vaso de 250 ml y lavar con 50-60 ml de agua destilada hirviendo eliminando durante este proceso la capa acuosa con la ayuda de un sifón. Repetir los lavados hasta eliminar completamente los restos de jabón residual (desaparición de la coloración rosa en la fenoltaleína).

Centrifugar el aceite para eliminar las pequeñas cantidades de agua residual.

b) Aceites de acidez expresada en ácido oleico superior al 30%

Introducir en una ampolla de decantación de un litro, 50 g de aceite bruto, 200 ml de hexano, 100 ml de alcohol isopropílico y una cantidad de solución de hidróxido de sodio al 12% que corresponda a la acidez libre del aceite, con un exceso del 0,3%. Agitar enérgicamente durante un minuto. Añadir 100 ml de agua destilada, agitar de nuevo y dejar reposar.

Después de la separación de las capas, dejar salir la capa inferior que contiene los jabones. Entre ambas capas (aceitosa por encima y acuosa por debajo) se forma frecuentemente una capa intermedia constituida por mucilagos y sustancias insolubles que deberá eliminarse igualmente.

Proceder a continuación al lavado de la solución hexánica de aceite neutro con porciones de 50-60 ml de una solución de alcohol isopropílico/agua destilada 1/1 (v/v) hasta la desaparición de la coloración rosa en la fenoltaleína. Proceder a continuación a la eliminación completa del hexano por destilación en vacío (por ejemplo, en el rotavapor).

1.2. Decoloración del aceite neutro

1.2.1. Equipo

– matraz de 250 ml con 3 bocas que permitan la inserción de:

a) un termómetro graduado en grados que permita hacer lecturas hasta 90°C,

b) un agitador mecánico que gire a 250-300 vueltas por minuto equipado para el funcionamiento en vacío,

c) un rácor hacia la bomba de vacío,

– bomba de vacío, provista de un manómetro, capaz de lograr presiones residuales de 15-30 milibares.

1.2.2. Modo de operar

Pesar en el matraz de 3 bocas cerca de 100 g del aceite neutralizado. Insertar el termómetro y el agitador, volver a unir a la bomba de vacío y calentar hasta 90°C agitándolo.

Mantener dicha temperatura, siempre bajo agitación, hasta que el aceite que deba analizarse esté completamente liberado de su humedad (treinta minutos aproximadamente).

Interrumpir entonces el vacío y añadirle 2 a 3 g de tierra activada. Restablecer el vacío hasta obtener una presión residual de 15-30 milibares y, siempre con una temperatura de 90°C, agitar durante 30 minutos a 250 vueltas por minuto aproximadamente.

Filtrar a continuación en caliente en un baño termostático (50-60°C).

ANEXO XIV

NOTAS COMPLEMENTARIAS 2, 3 Y 4 DEL CAPÍTULO 15 DE LA NOMENCLATURA COMBINADA

(Modificado por los Reglamentos (CE) N° 183/93, (CE) N° 174/94, (CE) 656/95, (CE) N° 2472/97 y (CE) N° 2248/98)

1. Nota 2A: Sólo pertenecerán a las partidas nos 1509 y 1510 aceites que procederán exclusivamente del tratamiento de las aceitunas y cuyas características analíticas relativas al contenido de ácidos grasos y esteroides, establecidas mediante los métodos que figuran en los anexos V, X A y X B del Reglamento (CEE) n° 2568/91, sean las siguientes:

Ácidos grasos	Porcentajes
Ácido mirístico	≤ 0,05
Ácido linoléico (1)	≤ 0,9
Ácido araquídico	≤ 0,6
Ácido eicosenoico	≤ 0,4
Ácido behénico (2)	≤ 0,3
Ácido lignocérico	≤ 0,2

(1) ≤ 1,0 para los aceites de oliva virgen de las subpartidas 1509 10 10 y 1509 10 90 originarios de Marruecos hasta el 31 de octubre de 2001.

(2) ≤ 0,2 para los aceites del n° 1509

Cuadro II

Contenido de esteroides en porcentaje del total de esteroides

Esteroides	Porcentajes
Colesterol	≤ 0,5
Brasicasterol (1)	≤ 0,1
Campesterol	≤ 4,0
Estigmasterol (2)	< Campesterol
Beta-sitosterol (3)	≥ 93,0
Delta-7-estigmasterol	≤ 0,5

- (1) ≤ 0,2 para los aceites de los códigos NC 1510
 (2) Condición no válida para el aceite de oliva virgen lampante (subpartida 1509 10 10) ni para el aceite de orujo de oliva en bruto (subpartida 1510 00 10).
 (3) Delta-5,23-estigmastadienol + clerosterol + Beta-sitosterol + sitostanol + Delta-5-avenasterol + Delta-5,24-estigmastadienol.

No pertenecerán a las partidas 1509 y 1510 los aceites de oliva modificados químicamente (en particular, los aceites reesterificados) ni las mezclas de aceite de oliva con aceite de otro tipo. La presencia de aceite de oliva reesterificado o de aceites de otro tipo se determinará mediante el método indicado en el anexo VII del Reglamento (CEE) n° 2568/91.

Nota 2B: Sólo pertenecerán a la subpartida 1509 10 los aceites de oliva definidos en los puntos I y II siguientes, obtenidos únicamente por procedimientos mecánicos o por otros procedimientos físicos, en condiciones, especialmente térmicas, que no alteren el aceite, y que no hayan sido sometidos a más tratamiento que el lavado, la decantación, el centrifugado y la filtración. Los aceites obtenidos a partir de la oliva mediante solventes pertenecerán a la partida 1510.

I. Se considerará «aceite de oliva virgen lampante», tal como figura en la subpartida 1509 10 10 y cualquiera que sea su acidez, el aceite que presente:

- un contenido de ceras no superior a 350 mg/kg;
 - un contenido de eritrodíol + uvaol no superior a 4,5%;
 - un contenido de ácidos grasos saturados en la posición 2 de los triglicéridos no superior a un 1,3%;
 - la suma de isómeros transoleicos no superior a un 0,10% y la suma de isómeros translinoleicos + translinolénicos no superior a un 0,10%;
 - un contenido de estigmastadieno no superior a 0,50 mg/kg;
 - una diferencia entre la composición según la HPLC y la composición teórica de los triglicéridos de ECN42 no superior a 0,3;
- y
- una o varias de las siguientes características:

1) un índice de peróxido igual o superior a 20 meq de oxígeno activo/kg;

2) un contenido de disolventes halogenados volátiles totales superior a 0,20 mg/kg o por lo menos uno de ellos, superior a 0,10 mg/kg;

3) un coeficiente de extinción K_{270} superior a 0,25 y, tras el tratamiento del aceite con alúmina activada, no superior a 0,11; en efecto, algunos aceites con un contenido de ácidos grasos libres, expresado en ácido oleico, superior a 3,3 g por 100 g podrán tener, tras el paso por alúmina activada, con arreglo al método indicado en el Anexo IX del Reglamento (CEE) N° 2568/91, un coeficiente de extinción K_{270} superior a 0,10; en ese caso, tras la neutralización y decoloración efectuadas en laboratorio con arreglo al método indicado en el Anexo XIII del Reglamento antes mencionado, deberán tener las siguientes características:

- un coeficiente de extinción K_{270} no superior a 1,20,
- una variación (ΔK) del coeficiente de extinción alrededor de 270 nm superior a 0,01 pero no a 0,16, es decir:

$$\Delta K = K_m - 0,5 (K_{m-4} + K_{m+4})$$

K_m = es el coeficiente de extinción a la longitud de onda del vértice máximo de la curva de absorción alrededor de 270 nm,

K_{m-4} y K_{m+4} = son los coeficientes de extinción a las longitudes de onda inferiores y superiores en 4 nm a la de K_m ;

4) características organolépticas que revelen defectos perceptibles con una intensidad superior al límite de aceptabilidad y con un resultado de análisis sensorial inferior a 3,5 con arreglo a la puntuación contemplada en el anexo XII del Reglamento (CEE) n° 2568/91.

II. Se considerará "otro aceite de oliva virgen", tal como figura en la subpartida 1509 10 90, el aceite de oliva que presente las siguientes características:

- una acidez, expresada en ácido oleico, no superior a 3,3 g/100 g;
- un índice de peróxidos no superior a 20 meq de oxígeno activo/kg;
- un contenido de ceras no superior a 250 mg/kg;
- un contenido de solventes halogenados volátiles totales no superior a 0,20 mg/kg y cada uno de ellos con un contenido no superior a 0,10 mg/kg;
- un coeficiente de extinción K_{270} no superior a 0,25 y, tras el paso del aceite por alúmina activada no superior a 0,10;
- una variación del coeficiente de extinción (ΔK) en la zona de 270 nm no superior a 0,01;
- características organolépticas que revelen defectos perceptibles con una intensidad inferior al límite de aceptabilidad, con un resultado de análisis

sensorial igual o superior a 3,5, con arreglo a lo dispuesto en el anexo XII del Reglamento (CEE) n° 2568/91;

h) un contenido de eritrodol + uvaol no superior a 4,5%;

ij) un contenido de ácidos grasos saturados en la posición 2 de los triglicéridos no superior a un 1,3%;

k) la suma de isómeros transoleicos no superior a un 0,05% y la suma de isómeros translinoleicos + translinolénicos no superior a un 0,05%;

l) un contenido de estigmastadienos no superior a 0,15 mg/kg;

m) una diferencia entre la composición según la HPLC y la composición teórica de los triglicéridos de ECN42 no superior a 0,2.

Nota 2C: Pertenece a la subpartida 1509 90 el aceite de oliva obtenido por tratamiento de los aceites de las subpartidas 1509 10 10 y/o 1509 10 90, incluso con adición de aceite de oliva virgen, que presente las características siguientes:

a) una acidez, expresada en ácido oleico, no superior a 1,5 g/100 g;

b) un contenido de ceras no superior a 350 mg/kg;

c) un coeficiente de extinción K_{270} no superior a 1,0;

d) una variación del coeficiente de extinción (ΔK) en la zona de 270 nm no superior a 0,13;

e) un contenido de eritrodol + uvaol no superior a 4,5%;

f) un contenido de ácidos grasos saturados en la posición 2 de los triglicéridos no superior a un 1,5%;

g) la suma de los isómeros transoleicos no superior a un 0,20% y la suma de isómeros translinoleicos + translinolénicos no superior a un 0,30%;

h) una diferencia entre la composición según la HPLC y la composición teórica de los triglicéridos de ECN42 no superior a 0,3.

Nota 2D: Se considerarán "aceites crudos", tal como figuran en la subpartida 1510 00 10, los aceites, principalmente los aceites de orujo de oliva, que presenten las siguientes características:

a) una acidez, expresada en ácido oleico, superior a 0,5 g/100 g;

b) un contenido de eritrodol + uvaol igual o superior a un 12%;

c) un contenido de ácidos grasos saturados en la posición 2 de los triglicéridos no superior a un 1,8%;

d) la suma de los isómeros transoleicos no superior a un 0,20% y la suma de los isómeros translinoleicos + translinolénicos no superior a un 0,10%.

e) una diferencia entre la composición según la HPLC y la composición teórica de los triglicéridos de ECN42 no superior a 0,6.

Nota 2E: Pertenece a la subpartida 1510 00 90 los aceites obtenidos por tratamiento de los aceites de la subpartida 1510 00 10, incluso con adición de aceites de oliva virgen, y los que no presenten las características de los aceites contemplados en las notas complementarias 2 B, 2 C y 2 D. Los aceites de la presente subpartida deben tener un contenido de ácidos grasos saturados en la posición 2 de los triglicéridos no superior a un 2,0%, la suma de isómeros transoleicos inferior a un 0,40% y la de los isómeros translinoleicos + translinolénicos inferior a un 0,35% y una diferencia entre la composición según la HPLC y la composición teórica de los triglicéridos de ECN42 no superior a 0,5.

2. Nota 3: Se excluirán de las subpartidas 1522 00 31 y 1522 00 39:

a) los residuos procedentes del tratamiento de grasas que contengan aceite cuyo índice de yodo, determinado por el método que figura en el anexo XVI del Reglamento (CEE) n° 2568/91, sea inferior a 70 o superior a 100;

b) los residuos procedentes del tratamiento de grasas que contengan aceite cuyo índice de yodo esté comprendido entre 70 y 100, pero en los que la superficie del pico correspondiente al tiempo de retención de beta-sitosterol (1), determinada con arreglo a lo dispuesto en el anexo V del Reglamento (CEE) n° 2568/91, presenta menos del 93,0% de la superficie total de los picos de los esteroides.

3. Nota 4: Los métodos que deberán aplicarse para determinar las características de los productos antes mencionados son los contemplados en los anexos del Reglamento (CEE) n° 2568/91. A tal fin, también habrá que tener en cuenta las notas a pie de página del anexo I del citado Reglamento.

(1) Delta-5,23-estigmastadienol + clerosterol + Beta-sitosterol + sitostanol + Delta-5-avenasterol + Delta-5,24-estigmastadienol.».

ANEXO XV

1. CONTENIDO EN ACEITE DE LOS ORUJOS DE ACEITUNA

1.1. Material

- aparato de extracción apropiado tipo soxhlet, provisto de un matraz de 200 a 250 ml,
- baño por calefacción eléctrica (baño de arena, baño de agua, etc.) o placa calefactora,
- balanza analítica,
- estufa regulada a 80°C como máximo,
- estufa de calefacción eléctrica provista de un dispositivo de termorregulación regulada a 103°C $\pm 2^\circ\text{C}$ y que permita realizar una insuflación de aire o una presión reducida,

- triturador mecánico fácil de limpiar y que permita el triturado del orujo sin calentamiento y sin disminución sensible de su contenido en agua y en aceite,

- cartucho de extracción y algodón hidrófilo o papel filtro, exentos de productos extraíbles por el hexano,

(Consultar Tarifa Panreac. Filtración-Cartuchos de extracción)

- desecador,

- criba con agujeros de 1 mm de diámetro,
- piedra pómez en pequeños granos, previamente secada.

Recomendación Panreac: **211835 Piedra Pómez gránulos QP.**

1.2. Reactivo

n-hexano técnico cuyo residuo en evaporación completa deberá ser inferior a 0,002 g para 100 ml.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
n-hexano técnico	132063	n-Hexano PA-ACS

2. MODO DE OPERAR

2.1. Preparación de la muestra para ensayo

Triturar la muestra para laboratorio, si fuera necesario, en el triturador mecánico, previamente bien limpio, para reducirla a partículas que puedan atravesar completamente la criba.

Utilizar aproximadamente una vigésima parte de la muestra para completar la limpieza del triturador, tirar dicha mezcla, triturar el resto, recogerlo, mezclarlo con cuidado y analizarlo sin demora.

2.2. Toma de muestra

Pesar inmediatamente después del triturado, alrededor de 10 g de la muestra para ensayo con una aproximación de 0,01 g.

2.3. Preparación del cartucho de extracción

Colocar la toma de muestra en el cartucho y taparlo con el tampón de algodón hidrófilo. En caso de haber utilizado papel de filtro, envolver la muestra molida en dicho papel.

2.4. Presecado

Quando el orujo esté muy húmedo (contenido en agua y en materias volátiles superior al 10%), efectuar un presecado colocando durante un tiempo conveniente el cartucho lleno (o el papel de filtro) en la estufa calentada a 80°C como máximo, para llevar el contenido en agua y en materias volátiles por debajo del 10%.

2.5. Preparación del matraz

Pesar con aproximación de 1 g el matraz que contenga 1 a 2 granos de piedra pómez, previamente secado en la estufa a 103°C ±2°C y después enfriado durante al menos una hora en el desecador.

2.6. Primera extracción

Colocar en el aparato de extracción el cartucho (o el papel de filtro) que contenga la muestra. Verter en el matraz la cantidad necesaria de hexano. Adaptar el matraz al aparato de extracción y colocarlo todo sobre la placa calefactora. Llevar la calefacción a tal estado que el caudal de reflujo sea al

menos de tres gotas por segundo (ebullición moderada, no tumultuosa).

Después de cuatro horas de extracción, dejar enfriar. Quitar el cartucho del aparato de extracción y colocarlo en una corriente de aire para eliminar la mayor parte del disolvente que lo impregna.

2.7. Segunda extracción

Vaciar el cartucho en el microtriturador y triturar tan finamente como sea posible. Colocar de nuevo cuantitativamente la mezcla en el cartucho y ésta en el aparato de extracción.

Empezar de nuevo la extracción durante dos horas más, utilizando el mismo matraz conteniendo la primera extracción.

La solución obtenida en el matraz de extracción deberá ser límpida. Si no fuere así, filtrarla sobre un papel de filtro lavando varias veces el primer matraz y el papel de filtro con hexano. Recoger el filtrado y el disolvente en un segundo matraz previamente secado y tarado aproximadamente a 1 mg.

2.8. Eliminación del disolvente y pesada del extracto

Eliminar en el equipo de extracción la mayor parte del disolvente. Eliminar los últimos restos de éste calentando el matraz en la estufa a 103°C ±2°C durante 20 minutos. Facilitar dicha eliminación, ya sea insuflando aire de vez en cuando o preferiblemente un gas inerte, o actuando bajo una presión reducida.

Dejar enfriar el matraz en un desecador durante al menos una hora, y pesarlo con una precisión de 1 mg aproximadamente.

Calentar de nuevo 10 minutos en las mismas condiciones, dejar enfriar en el desecador y pesar.

La diferencia entre los resultados de estas dos pesadas deberá ser inferior o igual a 10 mg, si no, calentar de nuevo durante periodos de diez minutos seguidos de enfriamiento y pesada, hasta que la diferencia de peso sea, a lo sumo, de 10 mg. Seleccionar la última pesada del matraz.

Efectuar dos determinaciones.

3. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1. Modo de cálculo y fórmula

a) El extracto expresado en peso del producto tal cual será igual a:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0}$$

donde: S es el porcentaje en peso del extracto del producto tal cual,
 m_0 es el peso, en gramos, de la muestra,
 m_1 es el peso, en gramos, del extracto seco.

Tomar como resultado la media aritmética de las dos determinaciones, si las condiciones de repetitividad se cumplen.

Expresar el resultado con un solo decimal.

b) El extracto se relacionará con la materia seca utilizando la siguiente fórmula:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \% \text{ grasa sobre extracto seco}$$

donde: S es el porcentaje en peso de extracto del producto tal cual ver a),
U es su contenido en agua y en materias volátiles.

3.2. Repetitividad

La diferencia entre los resultados de las dos determinaciones, efectuadas simultáneamente o rápidamente la una a continuación de la otra mediante el mismo análisis, no deberá ser superior a 0,2 g de extracto de hexano por cada 100 g de muestra.

En caso contrario, repetir sobre otras dos tomas de muestra. Si esta vez la diferencia es de nuevo superior a 0,2 g tomar como resultado la media aritmética de las cuatro determinaciones efectuadas.

ANEXO XVI

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE YODO

1. OBJETO

La presente norma internacional especifica un método para la determinación del índice de yodo de las grasas y aceites animales y vegetales, en lo sucesivo denominados grasas.

2. DEFINICIÓN

A los fines de la presente norma internacional, se aplicará la definición siguiente:

2.1 Índice de yodo: el peso de yodo absorbido por la muestra en las condiciones de trabajo que se especifican en la presente norma internacional.

El índice de yodo se expresa en gramos de yodo por 100 g de muestra.

3. PRINCIPIO

Disolución de la muestra problema y adición de reactivo de Wijs. Una vez transcurrido el tiempo que se especifica, adición de solución acuosa de yoduro potásico y valoración del yodo liberado con solución de tiosulfato sódico.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos serán de calidad analítica reconocida.

4.1. **Yoduro potásico, solución de 100 g/l**, exento de yodatos o de yodo libre.

4.2. **Engrudo de almidón**.

Mezclar 5 g de **almidón soluble** con 30 ml de agua, añadir esta mezcla a 1 000 ml de agua en ebullición, hervir durante 3 minutos y dejar enfriar.

4.3. **Solución volumétrica patrón de tiosulfato sódico**.

$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, valorada como máximo 7 días antes de su uso.

4.4. Disolvente, preparado mezclando volúmenes iguales de **ciclohexano** y **ácido acético**.

4.5. **Reactivo de Wijs**, que contenga monoclورو de yodo en ácido acético. Se utilizará reactivo de Wijs comercializado.

Nota: El reactivo contiene 9 g de ICl_3 + 9 g de I en ácido acético.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Ácido acético	131008	Ácido Acético glacial PA-ACS-ISO
Almidón soluble	121096	Almidón de Patata soluble PA
Ciclohexano	131250	Ciclohexano PA-ACS-ISO
Engrudo de almidón	283146	Almidón solución 1% RV
Solución volumétrica patrón de tiosulfato sódico	181723	Sodio Tiosulfato 0,1 mol/l (0,1N) SV
Yoduro potásico, solución de 100 g/l	171543	Potasio Yoduro solución 10% p/v RE
Reactivo de Wijs	281590	Reactivo de Wijs 0,1 mol/l (0,2N) RV

5. MATERIAL

Material ordinario de laboratorio y, en particular, lo siguiente:

5.1. Navecillas de vidrio, apropiadas para la muestra problema y que puedan introducirse en los matraces (5.2).

5.2. Matraces erlenmeyer de 500 ml de capacidad con boca esmerilada, provistos de sus correspondientes tapones de vidrio y perfectamente secos.

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA QUE DEBERÁ ANALIZARSE.

Secar la muestra homogeneizada con sulfato sódico y filtrarla.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. Tamaño de la muestra

El peso de la muestra varía en función del índice de yodo previsto, como se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1

Índice de yodo previsto	Peso de la muestra problema
menos de 5	3,00 g
5 - 20	1,00 g
21 - 50	0,40 g
51 - 100	0,20 g
101 - 150	0,13 g
151 - 200	0,10 g

Pesar la muestra problema con precisión de 0,1 mg en una navecilla cápsula de pesadas de vidrio 5.1.

7.2. Determinación

Introducir la muestra problema en un matraz de 500 ml (5.2). Añadir 20 ml del disolvente (4.4) para disolver la grasa. Agregar exactamente 25 ml del reactivo de Wijs (4.5), tapar el matraz, agitar el contenido y colocar el matraz al abrigo de la luz. No

deberá utilizarse la boca para pipetear el reactivo de Wijs.

Preparar del mismo modo un ensayo en blanco con el disolvente y el reactivo, pero sin la muestra problema.

Para las muestras con un índice de yodo inferior a 150, mantener los matraces en la oscuridad durante 1 hora; para las muestras con un índice de yodo superior a 150, así como en el caso de productos polimerizados o considerablemente oxidados, mantener en la oscuridad durante 2 horas.

Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, agregar a cada uno de los matraces 20 ml de solución de yoduro potásico (4.1) y 150 ml de agua.

Valorar con la disolución de tiosulfato sódico (4.3) hasta que haya desaparecido casi totalmente el color amarillo producido por el yodo. Añadir unas gotas de engrudo de almidón (4.2) y continuar la valoración hasta el momento preciso en que desaparezca el color azul después de una agitación muy intensa.

Nota: Se permite la determinación potenciométrica del punto final.

7.3. Número de determinaciones

Efectuar 2 determinaciones de la muestra problema.

8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El índice de yodo se expresa del siguiente modo:

$$\frac{12,69 \text{ c } (V_1 - V_2)}{p}$$

siendo:

c : valor numérico de la concentración exacta, expresada en moles por litro, de la solución volumétrica patrón de tiosulfato sódico (4.3) utilizada;

V₁: valor numérico del volumen, expresado en mililitros, de la solución de tiosulfato sódico (4.3) utilizada para el ensayo en blanco;

V₂: valor numérico del volumen, expresado en mililitros, de la solución de tiosulfato sódico

(4.3) utilizada para la determinación; p: valor numérico del peso, expresado en gramos, de la muestra problema (7.1).

Se tomará como resultado la media aritmética de las dos determinaciones, siempre que se cumpla el requisito establecido con respecto a la repetibilidad.

ANEXO XVII

MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTIGMASTADIENOS EN LOS ACEITES VEGETALES

1. OBJETIVOS

Determinación de estigmastadienos en los aceites vegetales que presentan bajas concentraciones de dichos hidrocarburos, particularmente en el aceite de oliva virgen y en el aceite de orujo de oliva sin refinar.

2. APLICACIÓN

Se trata de una norma aplicable a cualquier aceite de origen vegetal, teniendo en cuenta que únicamente se obtendrán medidas fiables cuando el contenido de estos hidrocarburos se halle incluido en un margen de 0,01 a 4,0 mg/kg. El método resulta especialmente adecuado para detectar la presencia de aceites vegetales refinados (aceites de oliva, orujo de oliva, girasol, palma, etc.) en el aceite de oliva virgen, dado que los aceites refinados contienen estigmastadienos y los aceites vírgenes no.

3. FUNDAMENTO

Aislamiento de la materia insaponificable. Separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos mediante cromatografía en columna de gel de sílice y análisis mediante cromatografía de gases en columna capilar.

4. INSTRUMENTAL

- 4.1. Matraces de 250 ml aptos para colocarlos un refrigerante de reflujo.
- 4.2. Embudos de decantación con capacidad para 500 ml.
- 4.3. Matraces de fondo redondo de 100 ml.
- 4.4. Rotavapor.
- 4.5. Columna de vidrio para cromatografía (1,5-2,0 cm de diámetro interno por 50 cm de longitud) provista de una llave de teflón y con una torunda de lana de vidrio o un disco de vidrio unterizado en el fondo. Para preparar la columna de gel de sílice se vierte hexano en la columna de cromatografía hasta

que alcance una altura de aproximadamente 5 cm, llenándose a continuación con una papilla de gel de sílice en hexano (15 g en 40 ml) mediante la ayuda de varias porciones de hexano. Se deja sedimentar la mezcla en reposo, completándose la sedimentación aplicando una ligera vibración. Añadir sulfato sódico anhidro hasta una altura de aproximadamente 0,5 cm y finalmente eluir el exceso de hexano.

Recomendación Panreac: **727401** Columna para cromatografía "flash" con adaptador y válvula de teflón. 20 mm ID x 400 mm longitud. **718002** Fibra de vidrio silanizada.

4.6. Cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de llama, inyector con división de flujo o "cold on-column" y horno programable con precisión de $\pm 1^\circ\text{C}$.

4.7. Columna capilar de sílice fundida (0,25 o 0,32 mm de diámetro interno x 25 m de longitud), recubierta con una película de 0,25 μm de espesor de la fase 5%-fenilmetilsilicona.

Nota 1.

Pueden utilizarse otras columnas con polaridades similares o inferiores.

Recomendación Panreac: **726022.25** Columna capilar para GC, OPTIMA® 17, 25 m long., 0,25 mm ID, 0,25 μm espesor

4.8. Integrador-registrador con capacidad para modo de integración valle-valle.

4.9. Microjeringa de 5-10 μl para cromatografía de gases con aguja fija.

4.10. Calentador de tipo manta o placa eléctrica.

5. REACTIVOS

Salvo indicación en sentido contrario, únicamente se utilizarán reactivos de calidad para análisis. Debe emplearse agua destilada o de pureza al menos equivalente.

5.1. **Hexano** o una mezcla de alcanos con un intervalo de ebullición de 65-70°C, destilados en columna rectificadora.

Nota 2.

El disolvente debe destilarse para eliminar impurezas.

5.2. **Etanol de 96 v/v.**

5.3. **Sulfato sódico anhidro.**

5.4. Solución alcohólica de hidróxido potásico al 10%. Añadir 10 ml de agua a 50 g de **hidróxido potásico**, agitar y diluir seguidamente la mezcla en **etanol** hasta un volumen de 500 ml.

Nota 3.

La potasa alcohólica toma color marrón con el tiempo. Debe prepararse diariamente y se almacenará en botellas de vidrio oscuro cerradas herméticamente.

5.5 Gel de sílice 60 para columna de cromatografía, de 70-230 mallas (referencia 7734 de Merck o similar).

Recomendación Panreac: **815330** Adsorbente de sílice 60, 0,063-0,2 mm.

Nota 4.

Por lo general, el gel de sílice puede utilizarse directamente a partir del envase sin necesidad de tratamiento. Sin embargo, algunos lotes de sílice pueden presentar baja actividad produciendo separaciones cromatográficas inadecuadas. Cuando ello ocurra debe tratarse el gel de sílice de la siguiente manera: activar el gel calentándolo a 550°C durante un mínimo de cuatro horas. Tras el calentamiento poner el gel de sílice a enfriar en un desecador y trasvasarlo a continuación a un matraz con cierre hermético. Se añade seguidamente un 2% de agua agitando hasta que dejen de verse grumos y el polvo fluya libremente.

Si algún lote de gel de sílice origina cromatogramas con picos que interfieran, dicho gel será sometido al tratamiento anteriormente mencionado. Puede considerarse como alternativa la utilización de gel de sílice 60 extrapuro (referencia 7754 de Merck).

Recomendación Panreac: **711037.1000** POLY-GOPREP® 60-130, tamaño part.63-200 µm

5.6. Solución madre (200 ppm) de colest-3,5-dieno (Sigma, 99 % de pureza) en **hexano** (10 mg en 50 ml).

5.7. Solución patrón de colest-3,5-dieno en hexano con una concentración de 20 ppm, que se obtiene diluyendo la solución anterior.

Nota 5.

Si se mantiene la temperatura por debajo de 4°C, las soluciones 5.6 y 5.7 permanecerán inalteradas durante un mínimo de 4 meses.

5.8. Solución de n-nonacosano en hexano con una concentración aproximada de 100 ppm.

5.9. Gas portador para cromatografía: helio o hidrógeno de 99,9990 % de pureza.

5.10. Gases auxiliares para el detector de ionización de llama: aire purificado e hidrógeno de 99,9990 % de pureza.

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Etanol de 96 v/v Etanol	121085	Etanol 96% v/v PA
Hexano	132063	n-Hexano PA-ACS
Hidróxido potásico	121515	Potasio Hidróxido 85% lentejas PA
Sulfato sódico anhidro	131716	Sodio Sulfato anhidro PA-ACS-ISO

6. METODOLOGÍA

6.1. Preparación de la materia insaponificable:

6.1.1. Pesar $20 \pm 0,1$ g de aceite en un matraz de 250 ml (4.1), añadir 1 ml de solución patrón de colest-3,5-dieno (20 µg) y 75 ml de potasa alcohólica al 10%, colocar un refrigerante de reflujo y calentar a ebullición suave durante 30 minutos. Retirar de la fuente de calor el matraz con la muestra y dejar enfriar ligeramente la solución (el enfriamiento no debe ser total para evitar la decantación de la muestra). Añadir 100 ml de agua y pasar la solución a un embudo de decantación (4.2) con ayuda de 100 ml de hexano. Agitar enérgicamente durante 30 segundos y dejar decantar.

Nota 6.

Si se produce emulsión, que no desaparece rápidamente, añadir pequeñas cantidades de etanol.

6.1.2. Pasar la fase acuosa inferior a un segundo embudo de decantación y someterla nuevamente a extracción con 100 ml de hexano. Separar nuevamente la fase inferior y lavar los extractos de hexano (mezclándolos en otro embudo de decantación) con tres porciones de 100 ml cada una de una

mezcla de agua y etanol (1:1) hasta obtener un pH neutro.

6.1.3. Pasar la solución de hexano a través de sulfato sódico anhidro (50 g), lavar con 20 ml de hexano y evaporar a 30°C y presión reducida en un rotavapor hasta sequedad.

6.2. Separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos:

6.2.1. Introducir el residuo en la columna de fraccionamiento con ayuda de dos porciones de 1 ml de hexano, distribuir la muestra en la columna dejando que el nivel de solución descienda hasta la parte superior del sulfato de sodio y comenzar la elución cromatográfica con hexano a un flujo aproximado de 1 ml/min. Desechar los primeros 25-30 ml de eluido y recoger la fracción siguiente de 40 ml. Después, pasar esta fracción a un matraz de fondo redondo de 100 ml (4.3).

Nota 7.

La primera fracción contiene los hidrocarburos saturados (Figura 1a) y la segunda fracción los esteroideos. Al proseguir con la elución se obtiene escualeno y otros compuestos relacionados. Para poder obtener una buena separación entre los hidrocarburos saturados y los esteroideos, es nece-

sario optimizar los volúmenes de las fracciones. A tal efecto se debe ajustar el volumen de la primera fracción de tal manera que cuando se analice la segunda, los picos correspondientes a los hidrocarburos saturados sean bajos (Figura 1c); cuando estos no aparezcan pero la intensidad del pico correspondiente al patrón sea reducida, debe disminuirse el volumen. De todas formas, puesto que no se produce solapamiento de los picos durante la cromatografía de gases, no es precisa una separación completa entre los componentes de la primera y segunda fracciones siempre que las condiciones de la CG estén ajustadas como se indica en 6.3.1. Por lo general no es necesario optimizar el volumen de la segunda fracción, puesto que existe una buena separación con los componentes que eluyen posteriormente. Sin embargo, la presencia de un pico importante a 1,5 min, aproximadamente, por debajo del tiempo de retención del patrón se debe al escualeno y revela una mala separación.

6.2.2. Evaporar la segunda fracción en rotavapor a 30°C y presión reducida hasta sequedad. Disolver inmediatamente el residuo en 0,2 ml de hexano y mantener la solución en el refrigerador hasta el momento de su análisis.

Nota 8.

Los residuos 6.1.3 y 6.2.2 no deben mantenerse en seco a temperatura ambiente. Una vez obtenidos, es necesario añadirles disolvente y almacenarlos en un refrigerador.

6.3. Cromatografía de gases

6.3.1. Condiciones de trabajo para inyección con división de flujo.

– temperatura del inyector: 300°C,

– temperatura del detector: 320°C.

– integrador-registrador: los parámetros de integración deben ser fijados de tal forma que la evaluación de las áreas sea correcta. La modalidad de integración valle-valle es la más recomendable,

– sensibilidad: aproximadamente 16 veces la atenuación mínima,

– cantidad de disolución inyectada: 1µl,

– programación de la temperatura del horno: temperatura inicial constante de 235°C durante 6 minutos, seguida de un aumento gradual de 2°C/min hasta alcanzar 285°C,

– inyección con una división de flujo de 1: 15,

– gas portador: helio o hidrógeno a 120 kPa de presión.

Dichas condiciones pueden modificarse en función de las características del cromatógrafo y de la columna con objeto de obtener cromatogramas que respondan a los siguientes requisitos: Pico del patrón interno situado con una aproximación de 5 minutos en torno al tiempo citado en 6.3.2; el pico del patrón interno alcanzará, como mínimo, un 80% de la escala total.

El sistema de cromatografía de gases deberá comprobarse inyectando una mezcla de la solución

madre de colestadieno (5.6) y de n-nonacosano (5.8). El pico del colest-3,5-dieno deberá aparecer antes que el del n-nonacosano (figura 1c); si esto no ocurre, pueden adoptarse dos soluciones: reducir la temperatura inicial del horno o sustituir la columna de cromatografía de gases por otra de polaridad inferior.

6.3.2. Identificación de picos

El pico del patrón interno aparece a un tiempo de retención de, aproximadamente, 19 minutos, y el del estigmasta-3,5-dieno lo hace a un tiempo de retención relativo de aproximadamente 1,29 (figura 1b). El estigmasta-3,5-dieno suele ir acompañado de pequeñas cantidades de un isómero y, por lo general, ambos originan un solo pico cromatográfico. No obstante, si la columna es demasiado polar, o tiene un gran poder de resolución, el isómero puede aparecer en forma de un pequeño pico justo antes y cerca del estigmasta-3,5-dieno (figura 2). En estos casos, es preciso sumar las áreas de los dos picos. Con el fin de estar seguro que los estigmastadienos eluyen como un solo pico se recomienda sustituir la columna por otra de menor polaridad o de mayor diámetro interior.

Nota 9.

Para obtener una referencia de los estigmastadienos puede utilizarse el análisis de cualquier aceite vegetal refinado empleando menor cantidad de muestra (de 1 a 2 g). Los estigmastadienos dan lugar a un pico importante de fácil identificación.

6.3.3. Análisis cuantitativo

El contenido de los estigmastadienos se determina aplicando la fórmula

$$\text{mg/kg de estigmastadienos} = \frac{A_b \times M_c}{A_c \times M_o}$$

en la cual:

A_b = área del pico de estigmastadienos (si el pico se halla dividido en dos picos, súmese el área de los dos picos.).

A_c = área del pico del patrón interno (colestadieno).

M_c = peso de patrón añadido, en microgramos.

M_o = peso de aceite empleado, en gramos.

Límite de detección: aproximadamente 0,01 mg/kg.

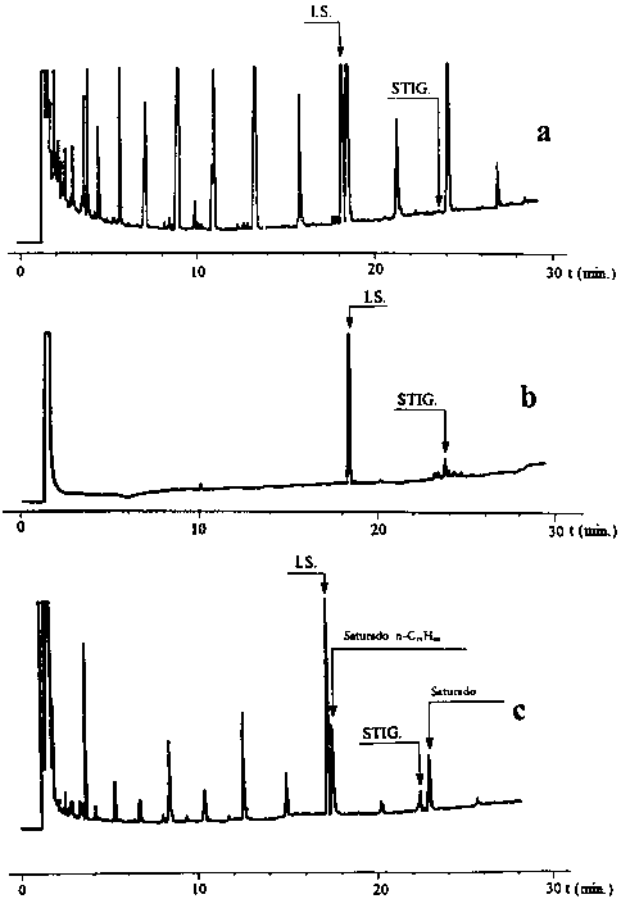


Figura 1

Cromatogramas procedentes del análisis de muestras de aceite de oliva en columna capilar de sílice fundida (0,25 mm de diámetro interno x 25 m) recubierta con una película de 0,25 mm de grosor de 5%-fenilmetilsilicona.

a) Primera fracción (30 ml) de un aceite virgen marcado con el patrón.

b) Segunda fracción (40 ml) de un aceite de oliva que contiene 0,10 mg/kg de estigmastadienos.

c) Segunda fracción (40 ml) que incluye una pequeña proporción de la primera.

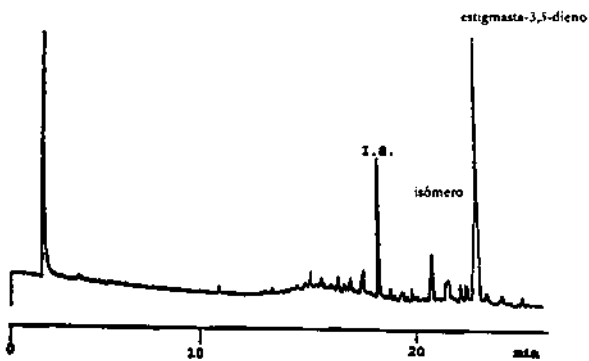


Figura 2

Cromatograma procedente del análisis de una muestra de aceite de oliva refinado en una columna DB-5, en el que se aprecia el isómero del estigma-3,5-dieno.

ANEXO XVIII

(Reglamento (CE) N° 2472/97, modificado por Reglamento (CE) N° 282/98)

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS CON ECN42 (DIFERENCIA ENTRE EL CONTENIDO TEÓRICO Y LOS DATOS OBTENIDOS POR HPLC)

1. OBJETO

Determinación de la composición de triglicéridos (TG) de los aceites de oliva, expresados en su número equivalente de carbonos (ECN) en función de las diferencias existentes entre el contenido teórico, calculado a partir de la composición de ácidos grasos, y los resultados analíticos obtenidos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

2. CAMPO DE APLICACIÓN

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

3. PRINCIPIO

El contenido teórico de triglicéridos con ECN42 (calculado sobre la base de la determinación de la composición de ácidos grasos mediante GLC) y el contenido de triglicéridos con ECN42 determinado mediante HPLC se corresponden dentro de unos límites en el caso de los aceites puros. Las diferencias superiores a los valores establecidos en el Reglamento respecto a cada tipo de aceite indican que el aceite contiene aceites de semillas.

4. MÉTODO

El método para calcular el contenido teórico de triglicéridos con ECN42 y su diferencia respecto a los datos obtenidos mediante HPLC consiste esencialmente en coordinar los datos analíticos obtenidos por otros métodos. Pueden distinguirse tres fases: determinación de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases en columna capilar, cálculo de la composición teórica de triglicéridos con ECN42, y determinación de los triglicéridos con ECN42 mediante HPLC.

4.1. Aparatos

4.1.1. Matraces redondos de 250 y 500 ml.

4.1.2. Vasos de precipitados de 100 ml.

4.1.3. Columna de cromatografía de vidrio, de 21 mm de diámetro interior y 450 mm de longitud, con grifo y cono (hembra) normalizado en el extremo superior.

4.1.4. Embudos de decantación de 250 ml, con cono (macho) normalizado en el extremo inferior, para conexión con el extremo superior de la columna.

4.1.5. Varilla de vidrio de 600 mm de longitud.

4.1.6. Embudo de vidrio de 80 mm de diámetro.

4.1.7. Matraces aforados de 50 ml.

4.1.8. Matraces aforados de 20 ml.

4.1.9. Evaporador de rotación.

4.1.10. Cromatografía de líquidos de alta resolución, con control termostático de la temperatura de la columna.

4.1.11. Sistema de inyección de volúmenes de 10 µl.

4.1.12. Detector: refractómetro diferencial. La sensibilidad de toda la escala deberá ser como mínimo de 10^{-4} unidades de índice de refracción.

4.1.13. Columna de acero inoxidable de 250 mm de longitud y 4,5 mm de diámetro interior, rellena de partículas de sílice de 5 µm de diámetro con un 22-23% de carbono en forma de octadecilsilano (nota 2).

Recomendación Panreac: **728032.46** Columna para HPLC, cartucho Chrom Cart®, CC250/4.6 Lichrospher 100 RP18,5 µm.

4.1.14. Registrador o integrador.

4.2. Reactivos

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

4.2.1. **Éter de petróleo, 40-60°C, grado cromatográfico.**

4.2.2. **Éter etílico**, libre de peróxidos, recién destilado.

4.2.3. Disolvente de elución para la purificación del aceite por cromatografía en columna: mezcla de éter de petróleo/éter etílico 87/13 (v/v).

4.2.4. **Gel de sílice, 70-230 mallas**, tipo Merck 7734, con contenido de agua normalizado al 5% (p/p).

4.2.5. **Lana de vidrio.**

4.2.6. **Acetona.**

4.2.7. **Acetonitrilo.**

4.2.8. Disolvente de elución para HPLC: **acetonitrilo + acetona** (las proporciones se ajustarán para obtener la separación deseada; comenzar con una mezcla de 50:50).

4.2.9. Disolvente de solubilización: **acetona.**

4.2.10. Triglicéridos de referencia: pueden utilizarse triglicéridos comerciales (**tripalmitina**, trioleína, etc.), en cuyo caso se reflejarán en un gráfico los tiempos de retención frente al número equivalente de carbonos, o bien cromatogramas de referencia correspondientes a aceite de soja, a una mezcla de aceite de soja y aceite de oliva 30:70 y a aceite puro de oliva (véanse las notas 3 y 4 y las figuras 1, 2, 3 y 4).

REACTIVO	RECOMENDACIÓN PANREAC	
	Código	Denominación
Acetona	361007	Acetona (UV-IR-HPLC) PAI
Acetonitrilo	261881	Acetonitrilo (HPLC-isocrático-preparativa) PAI
Éter de petróleo, 40-60°C, grado cromatográfico	361315	Éter de Petróleo 40-60°C (UV) PAI
Éter etílico	362551	Éter Dietílico estabilizado con etanol (UV-IR-HPLC) PAI
Gel de sílice, 70-230 mallas	815330	Adsorbente de sílica 60, 0,063-0,2 mm
Lana de vidrio	211376	Lana de Vidrio lavada QP
Tripalmitina	A10922	Glicerol tripalmitato, 98%

4.3. Preparación de la muestra

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

4.3.1. Preparación de la columna cromatográfica

Llenar la columna (4.1.3) con aproximadamente 30 ml de disolvente de elución (4.2.3); introducir un poco de lana de vidrio (4.2.5), empujándolo hasta el fondo de la columna con la varilla de vidrio (4.1.5). Preparar en un vaso de precipitados de 100 ml una suspensión con 25 g de gel de sílice (4.2.4) en 80 ml de la mezcla de elución (4.2.3) y transferirla a la columna con ayuda de un embudo de vidrio (4.1.6).

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

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

4.3.2. Cromatografía en columna

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

Introducir con una pipeta aforada 20 ml de solución en la columna preparada como se indica en 4.3.1, abrir el grifo y hacer eluir el disolvente hasta el nivel de la capa de gel de sílice.

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

Recoger el eluido en un matraz redondo de 250 ml

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

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

4.4. Análisis por HPLC

4.4.1. Preparación de las muestras para el análisis cromatográfico

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

4.4.2. Procedimiento

Instalar el sistema cromatográfico. Bombear el disolvente de elución (4.2.8) a un ritmo de 1,5 ml/mn para purgar todo el sistema. Esperar hasta que se obtenga una línea de base estable. Inyectar 10 μ l de la muestra preparada como se indica en el punto 4.3.

4.4.3. Cálculo y expresión de los resultados

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

$$\% \text{ de triglicérido} = \frac{\text{superficie del pico} \times 100}{\text{suma de las superficies de los picos}}$$

El resultado se expresa con, como mínimo, dos decimales.

Nota 1: El orden de elución puede determinarse mediante el cálculo del número equivalente de carbonos, que con frecuencia viene dado por la fórmula $ECN = CN - 2n$, siendo CN el número de carbonos y n el número de enlaces dobles; puede calcularse con mayor precisión teniendo en cuenta el origen

del enlace doble. Si n_o , n_l y n_{ln} son los números de enlaces dobles de los ácidos oleico, linoleico y linoléico, respectivamente, el número equivalente de carbonos puede calcularse mediante la fórmula siguiente:

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

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

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

Nota 2: Ejemplos: Lichrosorb (Merck) RP18

Art 50333

Lichrosphere (Merck) 100 CH18

Art 50377 o equivalente.

Recomendación Panreac: **728032.46** Columna para HPLC, cartucho Chrom Cart®, CC250/4.6 Lichrospher 100 RP18,5 μ m.

Nota 3: Con varios triglicéridos de referencia también es posible calcular la resolución con respecto a la trioleína:

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

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

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

referencia (figura 2).

Nota 4: La resolución de la columna debe permitir separar claramente el pico de la trilinoleína de los picos de los triglicéridos con un tiempo de retención próximo. La elución se prosigue hasta el pico de ECN52.

Nota 5: Para obtener un cromatograma que permita la medición correcta de las superficies de todos los picos de interés en la presente determinación, es necesario que el segundo pico correspondiente a ECN50 tenga una altura igual al 50% de la escala completa del registrador.

4.5. Cálculo de la composición de triglicéridos (% moles) a partir de los datos de GLC de ácidos grasos (% superficie)

4.5.1. Determinación de la composición de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos se determina con arreglo al método de cromatografía de gases de la CEE que figura en el Anexo X A del Reglamento (CEE) n° 2568/91, utilizando columna capilar. La preparación de los ésteres metílicos se realiza según el Anexo X B (solución alcohólica de metilato sódico).

4.5.2. Ácidos grasos considerados para el cálculo

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

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

4.5.3. Transformación del % superficie en moles para todos los ácidos grasos

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

4.5.4. Normalización al 100% de los ácidos grasos

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

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

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

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

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

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

4.5.5.1.

Ácidos grasos saturados en la posición 2 [P(2) y S(2)]

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

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

$$\% \text{ moles Po}(2) = \frac{\% \text{ moles Po}(1,2,3)}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P}(2) - \% \text{ moles S}(2)]$$

$$\% \text{ moles O}(2) = \frac{\% \text{ moles O}(1,2,3)}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P}(2) - \% \text{ moles S}(2)]$$

$$\% \text{ moles L}(2) = \frac{\% \text{ moles L}(1,2,3)}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P}(2) - \% \text{ moles S}(2)]$$

$$\% \text{ moles Ln}(2) = \frac{\% \text{ moles Ln}(1,2,3)}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P}(2) - \% \text{ moles S}(2)]$$

(5)

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

$$\% \text{ moles P}(1,3) = \frac{\% \text{ moles P}(1,2,3) - \% \text{ moles P}(2)}{2} + \% \text{ moles P}(1,2,3)$$

$$\% \text{ moles S}(1,3) = \frac{\% \text{ moles S}(1,2,3) - \% \text{ moles S}(2)}{2} + \% \text{ moles S}(1,2,3)$$

$$\% \text{ moles Po}(1,3) = \frac{\% \text{ moles Po}(1,2,3) - \% \text{ moles Po}(2)}{2} + \% \text{ moles Po}(1,2,3)$$

$$\% \text{ moles O}(1,3) = \frac{\% \text{ moles O}(1,2,3) - \% \text{ moles O}(2)}{2} + \% \text{ moles O}(1,2,3)$$

$$\% \text{ moles L}(1,3) = \frac{\% \text{ moles L}(1,2,3) - \% \text{ moles L}(2)}{2} + \% \text{ moles L}(1,2,3)$$

$$\% \text{ moles Ln}(1,3) = \frac{\% \text{ moles Ln}(1,2,3) - \% \text{ moles Ln}(2)}{2} + \% \text{ moles Ln}(1,2,3)$$

(6)

4.5.6. Cálculo de los triglicéridos

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

$$\% \text{ moles AAA} = \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles A(2)} * \% \text{ moles A(1,3)}}{10\ 000} \quad (7)$$

4.5.6.2.

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

$$\% \text{ moles AAB} = \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles A(2)} * \% \text{ moles B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\% \text{ moles ABA} = \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles B(2)} * \% \text{ moles A(1,3)}}{10\ 000}$$

(8)

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

$$\% \text{ moles ABC} = \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles B(2)} * \% \text{ moles C(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\% \text{ moles BCA} = \frac{\% \text{ moles B(1,3)} * \% \text{ moles C(2)} * \% \text{ moles A(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\% \text{ moles CAB} = \frac{\% \text{ moles C(1,3)} * \% \text{ moles A(2)} * \% \text{ moles B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

(9)

4.5.6.4. Triglicéridos con ECN42

Los triglicéridos siguientes con ECN42 se calculan según las ecuaciones 7, 8 y 9, por orden previsto de elución en HPLC (normalmente sólo tres picos).

LLL

PoLL e isómero de posición LPoL

OLLn e isómeros de posición OLnL y LnOL

PoPoL e isómero de posición PoLPo

PoOLn e isómeros de posición OPoLn y OLnPo

PLLn e isómeros de posición LLnP y LnPL

PoPoPo

SLnLn e isómero de posición LnSLn

PPOln e isómeros de posición PLnPo y PoPLn

Los triglicéridos con ECN42 se obtienen mediante la suma de los nueve triglicéridos, incluidos sus isómeros de posición. El resultado se expresa con, como mínimo, dos decimales.

5. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se comparan el contenido teórico calculado y el determinado por HPLC. Si la diferencia entre los datos de HPLC y los datos teóricos es superior al valor establecido para la categoría correspondiente de aceite en el Reglamento, la muestra contiene aceite de semillas.

Nota: Los resultados se expresan con una cifra decimal.

6. EJEMPLO (Los numeros hacen referencia a las secciones del texto del método)

(4.5.1.) Cálculo del porcentaje de moles de los ácidos grasos a partir de los datos obtenidos mediante GLC (% superficie)

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

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

(4.5.3.) Transformación del % superficie en moles para todos los ácidos grasos

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

Véase fórmula (1)

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

Véase fórmula (1)

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

Véase fórmula (1)

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

Véase fórmula (1)

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

Véase fórmula (1)

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

Véase fórmula (1)

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

(4.5.4) Normalización al 100% de los ácidos grasos

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

Véase fórmula (2)

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

Véase fórmula (2)

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

Véase fórmula (2)

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

Véase fórmula (2)

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

Véase fórmula (2)

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

Véase fórmula (2)

$$\text{Total \% moles} = 100,0 \%$$

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

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

Véase fórmula (3)

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

Véase fórmula (3)

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

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

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

Véase fórmula (4)

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

Véase fórmula (4)

(4.5.5.2.) Ácidos grasos insaturados en las posiciones 1 y 3 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) y Ln(1,3)]

$$\% \text{ moles Po}(2) = \frac{1,097\%}{86,169\%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 1,263 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (5)}$$

$$\% \text{ moles O}(2) = \frac{74,113\%}{86,169\%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 85,295 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (5)}$$

$$\% \text{ moles L}(2) = \frac{9,956\%}{86,169\%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 11,458\% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (5)}$$

$$\% \text{ moles Ln}(2) = \frac{1,003\%}{86,169\%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 1,154\% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (5)}$$

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

$$\% \text{ moles P}(1,3) = \frac{10,888 - 0,659}{2} + 10,888 = 16,005\% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

$$\% \text{ moles S}(1,3) = \frac{2,944 - 0,177}{2} + 2,944 = 4,327\% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

$$\% \text{ moles Po}(1,3) = \frac{1,097 - 1,263}{2} + 1,097 = 1,015\% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

$$\% \text{ moles O}(1,3) = \frac{74,113 - 85,295}{2} + 74,113 = 68,522\% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

$$\% \text{ moles L}(1,3) = \frac{9,956 - 11,458}{2} + 9,956 = 9,205\% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

$$\% \text{ moles Ln}(1,3) = \frac{1,003 - 1,154}{2} + 1,003 = 0,927\% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

(4.5.6) Cálculo de triglicéridos

A partir de la composición calculada de los ácidos grasos en las posiciones sn-2 y sn-1,3 (véase el siguiente cuadro):

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

Se calculan los triglicéridos siguientes:

LLL

PoPoPo

PoLL con un isómero de posición

SLnLn con un isómero de posición

PoPoL con un isómero de posición

PPoLn con dos isómeros de posición

OLLn con dos isómeros de posición

PLLn con dos isómeros de posición

PoOLn con dos isómeros de posición

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

Véase fórmula (7)

$$\% \text{ moles LLL} = \frac{9,205\% \cdot 11,458\% \cdot 9,205\%}{10\,000} = 0,09708 \text{ mol LLL}$$

$$\% \text{ moles PoPoPo} = \frac{1,015\% \cdot 1,263\% \cdot 1,015\%}{10\,000} = 0,00013 \text{ mol PoPoPo}$$

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

Véase fórmula (8)

$$\% \text{ moles PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015\% \cdot 11,458\% \cdot 9,205\% \cdot 2}{10\,000} = 0,02141$$

$$\% \text{ moles LPoL} = \frac{9,205\% \cdot 1,263\% \cdot 9,205\%}{10\,000} = 0,01070$$

0,03211 mol PoLL

$$\% \text{ moles SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,327\% \cdot 1,154\% \cdot 0,927\% \cdot 2}{10\,000} = 0,00093$$

$$\% \text{ moles LnSLn} = \frac{0,927\% \cdot 0,177\% \cdot 0,927\%}{10\,000} = 0,00002$$

0,00095 mol SLnLn

$$\% \text{ moles PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015\% \cdot 1,263\% \cdot 9,205\% \cdot 2}{10\,000} = 0,00236$$

$$\% \text{ moles PoLPo} = \frac{1,015\% \cdot 11,458\% \cdot 1,015\%}{10\,000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

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

Véase fórmula (9)

$$\% \text{ moles PPLn} = \frac{16,005\% \cdot 1,263\% \cdot 0,927\% \cdot 2}{10\,000} = 0,00375$$

$$\% \text{ moles LnPPo} = \frac{0,927\% \cdot 0,653\% \cdot 1,015\% \cdot 2}{10\,000} = 0,00012$$

$$\% \text{ moles PoLnP} = \frac{1,015\% * 1,154\% * 16,005\% * 2}{10\ 000} = 0,00375$$

0,00762 mol PPoln

$$\% \text{ moles OLLn} = \frac{68,522\% * 11,458\% * 0,927\% * 2}{10\ 000} = 0,14577$$

$$\% \text{ moles LnOL} = \frac{0,927\% * 85,295\% * 9,205\% * 2}{10\ 000} = 0,14577$$

$$\% \text{ moles LLnO} = \frac{9,205\% * 1,154\% * 68,522\% * 2}{10\ 000} = 0,14577$$

0,43671 mol OLLn

$$\% \text{ moles PLLn} = \frac{16,005\% * 11,458\% * 0,927\% * 2}{10\ 000} = 0,03400$$

$$\% \text{ moles LnPL} = \frac{0,927\% * 0,653\% * 9,205\% * 2}{10\ 000} = 0,00111$$

$$\% \text{ moles LLnP} = \frac{9,205\% * 1,154\% * 16,005\% * 2}{10\ 000} = 0,03400$$

0,06911 mol PLLn

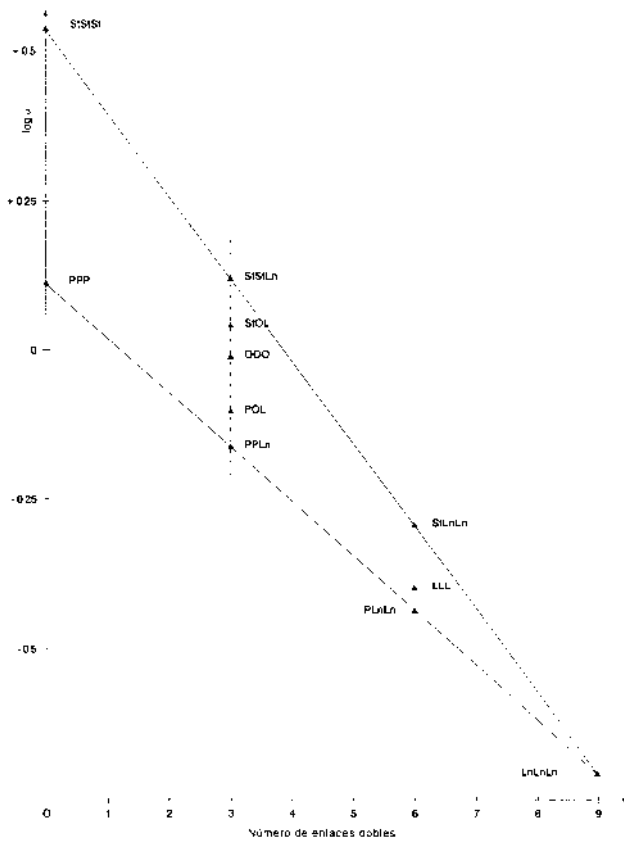
$$\% \text{ moles PoOLn} = \frac{1,015\% * 85,295\% * 0,927\% * 2}{10\ 000} = 0,01605$$

$$\% \text{ moles LnPoO} = \frac{0,927\% * 1,263\% * 68,522\% * 2}{10\ 000} = 0,01605$$

$$\% \text{ moles OLnPo} = \frac{68,522\% * 1,154\% * 1,015\% * 2}{10\ 000} = 0,01605$$

0,04815 mol PoOLn
ECN42 = 0,69540 mol TG»

Figura 1: Representación gráfica del log alfa frente a f (número de enlaces dobles)



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

Figura 2: aceite de soja

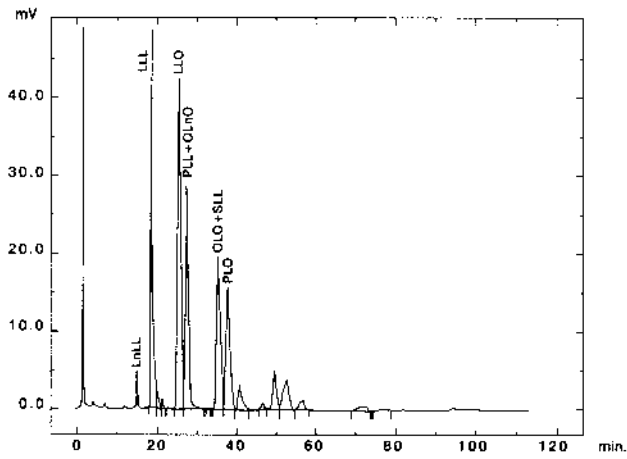


Figura 3: aceite de soja/aceite de oliva 30/70

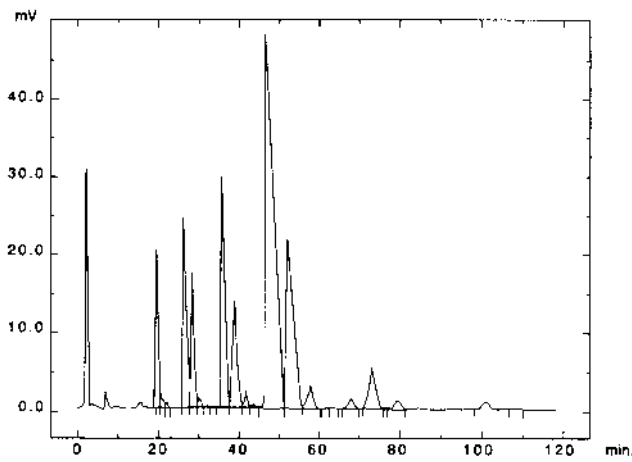
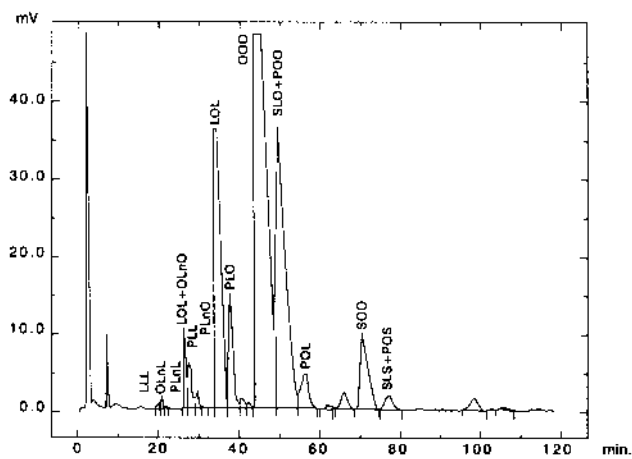


Figura 4 : aceite de oliva



Relación de reactivos
y productos auxiliares
Panreac que se utilizan
en los métodos de
Análisis de Aceites y
Grasas

361007	Acetona (UV-IR-HPLC) PAI	182415	Sodio Hidróxido 1 mol/l (1N) SV
131007	Acetona PA-ACS-ISO	131687	Sodio Hidróxido lentejas PA-ACS-ISO
261881	Acetonitrilo (HPLC-isocrático-preparativa) PAI	131699	Sodio metal, barras PA-ACS
131881	Acetonitrilo PA-ACS	131716	Sodio Sulfato anhidro PA-ACS-ISO
131008	Acido Acético glacial PA-ACS-ISO	181723	Sodio Tiosulfato 0,1 mol/l (0,1N) SV
131019	Acido Clorhídrico 35% PA-ISO	131745	Tolueno PA-ACS-ISO
131020	Ácido Clorhídrico 37% PA-ACS-ISO	131252	Triclorometano estabilizado con etanol PA-ACS-ISO
A17074	Ácido cólico, sal sódica, 99%	A13651	Trimetilclorosilano, 98+%
131030	Ácido Fórmico 98% PA-ACS	131940	Tris (Hidroximetil) Aminometano PA-ACS
131058	Acido Sulfúrico 96% PA-ISO	281760	Verde de Bromocresol solución 0,04% RV
121096	Almidón de Patata soluble PA		
283146	Almidón solución 1% RV	815330.1	Adsorbente de Sílica 60, 0,063 – 0,2 mm
121100	Aluminio Óxido Básico PA	704048	Cabina de visualización UV.
A13805	Aluminio, virutas, 99+%	70234	Cápsula de aluminio con disco N 20 TB/oA color aluminio.
361192	Benceno (UV-IR-HPLC) PAI	731829	Cartucho SPE, Sílica gel, CHROMAFIX® 400-SiOH, 400 mg
121221	Calcio Cloruro anhidro, polvo PA	728032.46	Columna para HPLC, cartucho Chrom-Cart®, CC250/4.6 Lichrospher 100 RP18,5 µm.
121215	Calcio Cloruro 2-hidrato escoriforme PA	733056.25	Columna capilar de sílica fundida (fase no enlazada químicamente) FS-SE-54 de 25 m de longitud, 0,25 mm de ID y 0,25 µm de espesor de capa
361250	Ciclohexano (UV-IR-HPLC) PAI	733060.25	Columna capilar FS-CW 20 M, 25 m long., 0,25 mm ID, 0,25 µm espesor.
131250	Ciclohexano PA-ACS-ISO	726022.25	Columna capilar para GC, OPTIMA® 17, 25 m long., 0,25 mm ID, 0,25 µm espesor
A11470	Colesterol, 99+%	726089.60	Columna capilar para GC, OPTIMA®240, 60 m long., 0,25 mm ID, 0,25 µm espesor.
133606	2',7'-Diclorofluoresceína PA-ACS	726785.50	Columna capilar OPTIMA® 624, 50 m long., 0,25 mm ID, 1,40 µm espesor.
162714	Dimetilo Sulfato PS	723310.10	Columna capilar para GC PERMABOND® SE-52 de 10 m de longitud, 0,32 mm de ID y 0,25 µm de espesor de capa.
121085	Etanol 96% v/v PA	710006	Columna de acero inoxidable con relleno standard, 6' long., 1/8" OD, 2 mm ID.
361315	Éter de Petróleo 40-60°C (UV) PAI	727401	Columna para cromatografía "flash" con adaptador y válvula de teflón. 20 mm ID x 400 mm longitud
131315	Eter de Petróleo 40-60°C PA-ISO	704050	Cubeta de desarrollo ranurada con tapa 20x20 cm.
132770	Eter Dietílico estabilizado con ~6 ppm de BHT PA-ACS-ISO	705103	Chromosorb recubierto con fase estacionaria Dietilenglicol succinato / 10% en Chromosorb W-AW.
362551	Eter Dietílico estabilizado con etanol (UV-IR-HPLC) PAI	735120	Encapsuladora manual, N 20 para tapones encapsulables de 20 mm ID.
281327	Fenolftaleína solución 1% RV	718002	Fibra de vidrio silanizada.
A10922	Glicerol tripalmitato, 98%	923 501	pHmetro digital pH 300.
142061	Goma Arábica polvo PRS	809013	Placa TLC. Sílica gel standard. Vidrio SIL G-25, 0,25 mm espesor, 20x20 cm.
A15139	1,1,1,3,3,3-Hexametildisilazano, 98+% n-Heptano (UV-IR-HPLC-HPLC preparativa) PAI	711037.1000	POLYGOPREP® 60-130, tamaño part.63-200 µm
362062	n-Hexano (UV-IR-HPLC) PAI	704054	Spray pulverizador.
362063	n-Hexano PA-ACS	70205.36	Vial encapsulable N 20-10 DIN, incoloro.
211376	Lana de Vidrio lavada QP		
361091	Metanol (UV-IR-HPLC-HPLC preparativa) PAI		
481091	Metanol seco (máx. 0,01% de agua) DS-ACS-ISO		
362064	iso-Octano (UV-IR-HPLC) PAI		
362006	n-Pentano (UV-IR-HPLC) PAI		
211835	Piedra Pómez gránulos QP		
481457	Piridina seca (máx. 0,01% de agua) DS-ACS		
121497	Potasio Cromato PA		
182146	Potasio Hidróxido 0,1 mol/l (0,1N) etanólica SV		
181519	Potasio Hidróxido 0,5 mol/l (0,5N) etanólica SV		
181517	Potasio Hidróxido 1 mol/l (1N) SV		
121515	Potasio Hidróxido 85% lentejas PA		
131542	Potasio Yoduro PA-ACS-ISO		
171543	Potasio Yoduro solución 10% p/v RE		
131090	2-Propanol PA-ACS-ISO		
281590	Reactivo de Wijs 0,1 mol/l (0,2N) RV		
131659	Sodio Cloruro PA-ACS-ISO		
181694	Sodio Hidróxido 0,1 mol/l (0,1N) SV		

aditio

Relación de aditivos y coadyuvantes tecnológicos para uso alimentario industrial

PANREAC QUIMICA, S.A., fabrica además de los reactivos para análisis PANREAC, una línea de aditivos y coadyuvantes tecnológicos para uso alimentario industrial, que cumplen las especificaciones de pureza prescritas por The Food Chemicals Codex IV ed., complementadas con las exigencias específicas prefijadas por la legislación española y comunitaria de la CEE.

En la relación que sigue se indica denominación del producto, fórmula y número de identificación. Para mayor información, solicite nuestro catálogo ADITIO 2000.

Código	Producto	Sinónimos	Fórmula	Nº de identificación
201003	Aceite de Vaselina			
204333	Acetofenona		C_8H_8O	
201007	Acetona		CH_3COCH_3	
201008	Acido Acético glacial		CH_3COOH	E-260
202342	Acido Adípico		$(CH_2CH_2COOH)_2$	E-355
201013	Acido L(+)-Ascórbico		$C_6H_8O_6$	E-300
202034	Acido L-Aspártico		$C_4H_7NO_4$	
202422	Acido DL-Aspártico		$C_4H_7NO_4$	
201014	Acido Benzoico		C_6H_5COOH	E-210
201808	Acido Cítrico anhidro		$C_6H_8O_7$	E-330
201018	Acido Cítrico 1-hidrato		$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	E-330
201020	Acido Clorhídrico 37%		HCl	E-507
201019	Acido Clorhídrico 35%		HCl	E-507
202785	Acido Decanoico		$C_{10}H_{20}O_2$	
202512	Acido Esteárico (mezcla de ácidos grasos)		$C_{18}H_{36}O_2$	
201669	Acido Etilendiaminotetraacético			
	Sal Disódica 2-hidrato		$Na_2H_2C_{10}H_{12}N_2O_8 \cdot 2H_2O$	
201030	Acido Fórmico 98%		HCOOH	E-236
201029	Acido Fórmico 85%		HCOOH	E-236
201032	Acido orto-Fosfórico 85%		H_3PO_4	E-338
202344	Acido Fumárico		HOOCCHCHCOOH	E-297
202042	Acido L-Glutámico		$C_5H_9NO_4$	E-620
201034	Acido L(+)-Láctico		$CH_3CHOHCOOH$	E-270
202368	Acido Láurico		$C_{12}H_{24}O_2$	
202051	Acido DL-Málico		$C_4H_6O_5$	E-296
202591	Acido Mirístico		$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	
203389	Acido Nicotínico		$C_6H_5NO_2$	E-375
202786	Acido Octanoico		$C_8H_{16}O_2$	
202345	Acido Palmítico		$C_{16}H_{32}O_2$	
201810	Acido Propiónico		CH_3CH_2COOH	E-280
201055	Acido Sórbico		$C_6H_8O_2$	E-200
201883	Acido Succínico		HOOCCH ₂ CH ₂ COOH	E-363
201058	Acido Sulfúrico 95-98%		H_2SO_4	E-513
201065	Acido Tánico			
201066	Acido L(+)-Tartárico		$(CHOH)_2(COOH)_2$	E-334
201792	Agar			E-406
202043	L-Alanina		$C_3H_7NO_2$	
202035	DL-Alanina		$C_3H_7NO_2$	
201081	Alcohol Bencílico		$C_6H_5CH_2OH$	
201102	Aluminio Amonio Sulfato 12-hidrato		$NH_4Al(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	E-523
201103	Aluminio Potasio Sulfato 12-hidrato		$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	E-522
201130	Amoniaco 30% (en NH_3)		NH_4OH	E-527
201129	Amoniaco 25% (en NH_3)		NH_4OH	E-527
201119	Amonio Carbonato		$\sim (NH_4)_3(CO_3)_2 H + NH_2COONH_4$	E-503i
201121	Amonio Cloruro		NH_4Cl	E-510
201116	Amonio Hidrógeno Carbonato	(Amonio Bicarbonato)	NH_4HCO_3	E-503ii
201127	di-Amonio Hidrógeno Fosfato		$(NH_4)_2HPO_4$	E-542ii
201126	Amonio di-Hidrógeno Fosfato		$NH_4H_2PO_4$	E-342i
202912	Amonio Hierro(III) Citrato pardo			E-381
202028	Amonio Hierro(III) Citrato verde			E-381
201140	Amonio Sulfato		$(NH_4)_2SO_4$	E-517
203464	L-Arginina		$C_6H_{14}N_4O_2$	
204653	L-Arginina mono-Clorhidrato		$C_6H_{15}ClN_4O_2$	

Código	Producto	Sinónimos	Fórmula	Nº de identificación
204109	L-Asparagina anhidra		$C_4H_8N_2O_3$	
202357	Benzoilo Peróxido humectado con ~25% de H_2O		$C_{14}H_{10}O_4$	
203977	D(+)-Biotina		$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	
201082	1-Butanol		$C_4H_{10}O$	
201089	iso-Butanol		$C_4H_{10}O$	
201429	Butanona	(Metiletilcetona)	C_4H_8O	
204233	2-ter-Butil-4-Metoxifenol	(BHA, Butilhidroxianisol)	$C_{11}H_{16}O_2$	E-320
201202	n-Butilo Acetato		$C_6H_{12}O_2$	
201211	Calcio Acetato x-hidrato		$Ca(CH_3COO)_2 \cdot xH_2O$	E-263
201212	Calcio Carbonato precipitado		$CaCO_3$	E-170i
201213	tri-Calcio di-Citrato 4-hidrato		$Ca_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 4H_2O$	E-333iii
201232	Calcio Cloruro 2-hidrato polvo		$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	E-509
201214	Calcio Cloruro 6-hidrato		$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	E-509
202824	Calcio Cloruro solución 45% p/p (en $CaCl_2 \cdot 2H_2O$)			E-509
201818	Calcio Estearato		$\sim Ca(C_{18}H_{35}O_2)_2$	E-470a
201224	Calcio Formiato		C_2H_2CaO	E-238
201228	tri-Calcio Fosfato		$\sim Ca_3(PO_4)_2$	E-341 iii
203290	Calcio D-Gluconato 1-hidrato		$C_{12}H_{22}CaO_{14} \cdot H_2O$	E-578
201225	Calcio bis-(di-Hidrógeno-Fosfato) 1-hidrato	(Calcio Difosfato)	$CaH_2(PO_4)_2 \cdot H_2O$	E341i
201227	Calcio Hidrógeno Fosfato anhidro		$CaHPO_4$	E-341 ii
201226	Calcio Hidrógeno Fosfato 2-hidrato		$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	E-341 ii
202400	Calcio Hidróxido, polvo		$Ca(OH)_2$	E-526
201230	Calcio Lactato 5-hidrato		$Ca(CH_2CHOHCOO)_2 \cdot 5H_2O$	E-327
203238	Calcio Propionato		$C_6H_{10}CaO_4$	E-282
201235	Calcio Sulfato 2-hidrato		$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	E-516
201237	Carbón Activo polvo			
202416	Carboximetilcelulosa			
	Sal Sódica baja viscosidad			E-466
204441	Carboximetilcelulosa			
	Sal Sódica media viscosidad			E-466
203922	Carboximetilcelulosa			
	Sal Sódica alta viscosidad			E-466
203645	L-Cistina		$C_6H_{12}N_2O_4S_2$	E-921
202825	2,6-Di-ter-Butil-4-Metilfenol	(BHT, Butilhidroxitoluol)	$C_{15}H_{24}O$	E-321
201286	1,2-Dicloroetano		$ClCH_2ClCH_2$	
201254	Diclorometano estabilizado con amileno		Cl_2CH_2	
201877	1-Dodecanol		$C_{12}H_{26}O$	
201303	Estaño(II) Cloruro 2-hidrato		$SnCl_2 \cdot 2H_2O$	E-512
201086	Etanol absoluto		CH_3CH_2OH	
201085	Etanol 96% v/v		CH_3CH_2OH	
202695	Etanol 70% v/v		CH_3CH_2OH	
201318	Etilo Acetato		$CH_3COOC_2H_5$	
201319	Etilo (S)-(-)-Lactato		$C_5H_{10}O_3$	
202047	L-Fenilalanina		$C_9H_9NO_2$	
202728	D(-)-Fructosa		$C_6H_{12}O_6$	
202060	Gelatina 80-100 Blooms			
204819	Gelatina 220-240 Blooms			
201339	Glicerina	(Glicerol)	$C_3H_8O_3$	E-422
202329	Glicerina 87%	(Glicerol)	$C_3H_8O_3$	E-422
201922	Glicerina tri-Acetato		$C_9H_{14}O_6$	E-1518
201340	Glicina		H_2NCH_2COOH	E-640

Código	Producto	Sinónimos	Fórmula	Nº de identificación
201341	D(+)-Glucosa		$C_6H_{12}O_6$	
203140	D(+)-Glucosa 1-hidrato		$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	
202061	Goma Arábiga polvo			E-414
201076	Hidrógeno Peróxido 30% p/v (100 vol.) estabilizado		H_2O_2	
202515	Hierro(III) Fosfato x-hidrato		$FePO_4 \cdot xH_2O$	
201362	Hierro(II) Sulfato 7-hidrato		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	
202045	L-Histidina		$C_6H_9N_3O_2$	
202198	L-Histidina mono-Clorhidrato 1-hidrato		$C_6H_{10}ClN_3O_2 \cdot H_2O$	
201375	Lactosa 1-hidrato		$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	
202046	L-Leucina		$C_6H_{13}NO_2$	
203385	D(+)-Limoneno		$C_{10}H_{16}$	
201396	Magnesio Cloruro 6-hidrato		$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	E-511
202029	Magnesio Estearato		$\sim Mg(C_{18}H_{35}O_2)_2$	E-470b
201399	tri-Magnesio di-Fosfato 5-hidrato	(Magnesio orto-Fosfato)	$Mg_3(PO_4)_2 \cdot 5H_2O$	
201927	Magnesio Hidrógeno Fosfato 3-hidrato		$MgHPO_4 \cdot 3H_2O$	E-343ii
201395	Magnesio Hidroxicarbonato 5-hidrato	(Magnesio Carbonato)	$C_4H_2Mg_5O_{14} \cdot 5H_2O$	E-504ii
201276	Magnesio Oxido		MgO	E-530
201404	Magnesio Sulfato 7-hidrato		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	E-518
201410	Manganeso(II) Cloruro 4-hidrato		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	
201413	Manganeso(II) Sulfato 1-hidrato		$MnSO_4 \cdot H_2O$	
202067	D(-)-Manita	(Manitol)	$C_6H_{14}O_6$	E-421
201091	Metanol		CH_3OH	
201949	Metilo Benzoato		$C_8H_8O_2$	
203332	Metilo-4-Hidroxibenzoato		$C_8H_8O_3$	E-218
201430	4-Metil-2-Pentanona	(Metil iso Butil Cetona)	$C_6H_{12}O$	
203209	Parafina P.F. 51-53°C en lentejas			
204621	Parafina P.F. 60-65°C			
201479	Potasio Acetato		CH_3COOK	E-261
201487	Potasio Bromato		$KBrO_3$	E-924
201490	Potasio Carbonato		K_2CO_3	E-501i
201492	tri-Potasio Citrato 1-hidrato		$K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$	E-332ii
201494	Potasio Cloruro		KCl	E-508
201522	Potasio Disulfito		$K_2S_2O_5$	E-224
201513	tri-Potasio Fosfato 1,5-hidrato		$K_3PO_4 \cdot 1 \frac{1}{2} H_2O$	E-340iii
201505	Potasio Hexacianoferrato(II) 3-hidrato	(Potasio Ferrocianuro)	$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$	E-536
201480	Potasio Hidrógeno Carbonato	(Potasio Bicarbonato)	$KHCO_3$	E-501ii
201512	di-Potasio Hidrógeno Fosfato anhidro	(di-Potasio orto-Fosfato)	K_2HPO_4	E-340ii
202333	di-Potasio Hidrógeno Fosfato 3-hidrato		$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	E-340ii
201509	Potasio di-Hidrógeno Fosfato	(mono-Potasio orto-Fosfato)	KH_2PO_4	E-340i
201486	Potasio Hidrógeno Tartrato		$(COO)_2KH(CHOH)_2$	E-336i
201515	Potasio Hidróxido 85% lentejas		KOH	E-525
201524	Potasio Nitrato		KNO_3	E-252
201855	Potasio Nitrito		KNO_2	E-249
204321	tetra-Potasio Pirofosfato anhidro		$K_4O_7P_2$	E-450v

Código	Producto	Sinónimos	Fórmula	Nº de identificación
201729	Potasio Sodio Tartrato 4-hidrato		$\text{NaK}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	E-337
201531	Potasio Sorbato		$\text{CH}_3(\text{CHCH}_3)_2\text{COOK}$	E-202
201532	Potasio Sulfato		K_2SO_4	E-515i
201533	Potasio Sulfito		K_2SO_3	
201537	Potasio Tartrato 1/2-hidrato		$\text{K}_2(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$	E-336ii
201540	Potasio Yodato		KIO_3	
201542	Potasio Yoduro		KI	
203646	L-Prolina		$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	
201545	1,2-Propanodiol		$\text{CH}_2\text{OHCH(OH)CH}_3$	
201090	2-Propanol		$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	
201962	Propilo Galato		$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5$	E-310
201633	Sodio Acetato anhidro		CH_3COONa	E-262i
201632	Sodio Acetato 3-hidrato		$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	E-262i
203865	Sodio L(+)-Ascorbato		$\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$	E-301
201637	Sodio Benzoato		$\text{C}_6\text{H}_5\text{COONa}$	E-211
201648	Sodio Carbonato anhidro		Na_2CO_3	E-500i
202032	Sodio Carbonato 1-hidrato		$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	E-500i
201647	Sodio Carbonato 10-hidrato		$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	E-500i
201655	tri-Sodio Citrato 2-hidrato		$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	E-331iii
201656	tri-Sodio Citrato 5 1/2-hidrato		$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$	E-331iii
201659	Sodio Cloruro		NaCl	
201698	Sodio Disulfito		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	E-223
202363	Sodio Dodecilo Sulfato	(Lauril Sulfato Sódico)	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaSO}_4$	
201681	tri-Sodio Fosfato 1-hidrato		$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	E-339iii
201680	tri-Sodio Fosfato 12-hidrato		$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	E-339iii
201697	Sodio Fosfinato 1-hidrato		$\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	
201683	Sodio L-Glutamato 1-hidrato		$\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	E-621
201665	Sodio Hidrógeno di-Acetato	(Sodio Diacetato)	$\text{CH}_3\text{COONaCH}_3\text{COOH}$	E-262ii
201638	Sodio Hidrógeno Carbonato	(Sodio Bicarbonato)	NaHCO_3	E-500ii
201654	di-Sodio Hidrógeno Citrato 1 1/2-hidrato		$\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$	E-331ii
201679	di-Sodio Hidrógeno Fosfato anhidro	(di-Sodio orto-Fosfato)	Na_2HPO_4	E-339ii
201678	di-Sodio Hidrógeno Fosfato 12-hidrato		$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	E-339ii
201965	Sodio di-Hidrógeno Fosfato 1-hidrato	(mono-Sodio orto-Fosfato)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	E-339i
201677	Sodio di-Hidrógeno Fosfato 2-hidrato		$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	E-339i
201709	di-Sodio di-Hidrógeno Pirofosfato		$\text{H}_2\text{Na}_2\text{O}_7\text{P}_2$	E-450i
201686	Sodio Hidróxido escamas		NaOH	E-524
201687	Sodio Hidróxido lentejas		NaOH	E-524
203307	Sodio Lactato solución 50% p/p		$\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$	E-325
201702	Sodio Nitrato		NaNO_3	E-251
201703	Sodio Nitrito		NaNO_2	E-250
201711	tetra-Sodio Pirofosfato anhidro	(tetra-Sodio Difosfato)	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	E-450iii
201710	tetra-Sodio Pirofosfato 10-hidrato	(tetra-Sodio Difosfato)	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	E-450iii
201684	Sodio Polifosfato		$(\text{NaPO}_3)_6$	E-452i
201716	Sodio Sulfato anhidro		Na_2SO_4	E-514i
201715	Sodio Sulfato 10-hidrato		$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	E-514i
201717	Sodio Sulfito anhidro		Na_2SO_3	E-221
201720	Sodio Tartrato anhidro		$\text{Na}_2(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2$	E-335ii
201719	Sodio Tartrato 2-hidrato		$\text{Na}_2(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	E-335ii

Código	Producto	Sinónimos	Fórmula	Nº de identificación
201721	Sodio Tiosulfato 5-hidrato		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	
203064	D(-)-Sorbita	(Sorbitol)	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	E-420i
201733	Talco lavado			E-553b
202475	Tierra Silícea purificada y calcinada			
202101	Titanio(IV) Oxido		TiO_2	E171
204644	DL- α -Tocoferol		$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$	E-307
202049	L-Triptófano		$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	
202048	Vainillina		$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	
201786	Zinc Oxido		ZnO	
201788	Zinc Sulfato 1-hidrato		$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	
201787	Zinc Sulfato 7-hidrato		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	

NOTAS

NOTAS

Editado por:
PANREAC QUIMICA, S.A.
[040] -15 - 1000 - 11/99.

Diseño:
Pere Duran

Impresión:
CENTRE TELEMÀTIC EDITORIAL SRL

Dep. Legal:
B-21.701-99