377R0072

15. 1. 77 Diario Oficial de las Comunidades Europeas Nº L 12/11

REGLAMENTO (CEE) Nº 72/77 DE LA COMISIÓN

de 13 de enero de 1977

por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 1470/68 relativo a la toma y reducción de muestras así como a la determinación del contenido en aceite, en impurezas y en humedad de las semillas oleaginosas

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Visto el Reglamento nº 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), modificado en último lugar por el Reglamento (CEE) nº 1707/73 (2) y, en particular, en apartado 3 de su artículo 26,

Considerando que, para poder determinar con precisión, para las semillas de colza y de nabina, su contenido en ácido erúcico es conveniente prever un método adecuado; que a este fin procede modificar el Reglamento (CEE) nº 1470/68 de la Comisión de 23 de septiembre de 1968 relativo a la toma y reducción de muestras así como a la determinación del contenido en aceite, en impurezas y en humedad de las semillas oleaginosas (3), modificado en último lugar por el Reglamento (CEE) nº 3025/75 (4);

Considerando que las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión de las materias grasas,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

Se añade al Reglamento (CEE) nº 1470/68 el artículo 2 *ter* siguiente:

«La determinación del contenido en ácido erúcico contemplada en el artículo 4 del Reglamento nº 282/67/CEE se efectuará según el método definido en el Anexo VI del presente Reglamento.

Se considerarán con el máximo contenido en ácido erúcico contemplado en el primer guión del apartado 2 del artículo 3 del Reglamento nº 282/67/CEE las semillas de colza y de nabina cuyo aceite extraído con arreglo al método que figura en el título I del Anexo VI contenga como máximo un 15,0 % de ácido erúcico C22 calculado según el método que figura en los títulos II y III del Anexo VI.»

Artículo 2

El Reglamento (CEE) nº 1470/68 se completa con el Anexo VI, cuyo texto figura en el Anexo del presente Reglamento.

Artículo 3

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

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

Hecho en Bruselas, el 13 de enero de 1977.

Por la Comisión

Finn GUNDELACH

Vicepresidente

(1) DO nº 172 de 30. 9. 1966, p. 3025/66.
(2) DO nº L 175 de 29. 6. 1973, p. 5.
(3) DO nº L 239 de 28. 9. 1968, p. 2.
(4) DO nº L 300 de 20. 11. 1975, p. 5.

ANEXO VI

MÉTODO DE ANÁLISIS COMUNITARIO QUE DEBERÁ UTILIZARSE PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ÁCIDO ERÚCICO, EN LO QUE SE REFIERE A LAS SEMILLAS DE LAS QUE SE HAYAN HECHO CARGO LOS ORGANISMOS DE INTERVENCIÓN

I. Preparación de las muestras.

II. Preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

III. Cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

I. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. La toma de las muestras de semillas, la reducción de las muestras para laboratorio en muestras para análisis, la determinación del contenido en aceite sobre el producto tal como esté, se efectuarán según los métodos definidos respectivamente en los Anexos I, II y V del Reglamento (CEE) nº 1470/68.

2. Preparación de la muestra de aceite extraída de las semillas que hayan sido objeto del muestreo.

2.1. La muestra es fluída y está perfectamente límpida:

antes de efectuar las tomas de muestras, se agitará la muestra como medida de precaución.

2.2. La muestra es fluída, pero turbia o contiene un poso:

colocar la muestra en una estufa a 50 °C. Cuando la muestra alcance dicha temperatura, agitarla vigorosamente; dejarla decantar. Filtrar sobre papel en la estufa manteniendo la temperatura a 30 °C.

2.3. La muestra está solidificada

colocarla en la estufa mantenida a una temperatura 10 °C superior a la de la zona de fusión supuesta. Actuar como en los puntos 2.1 (si la muestra fundida es límpida) y 2.2 (si la muestra fundida es turbia o contiene un poso).

II. PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS

1. PREÁMBULO

Los presentes métodos tienen por objeto la transformación de los cuerpos grasos de origen animal y vegetal, así como la de los ácidos grasos de cualquier origen, en ésteres metílicos de ácidos grasos.

Los ésteres metílicos así obtenidos podrán utilizarse en diversos métodos que exijan una transformación de este tipo: cromatografía en fase gaseosa, cromatografía de capa fina, espectro-fotometría infrarroja, etc.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Los métodos descritos se aplicarán a los cuerpos grasos de origen animal y vegetal. Los métodos descritos en el punto 3 son aplicables a la preparación de los ésteres metílicos en ácidos grasos que tengan 6 átomos de carbono y más. En presencia de ácidos grasos C_6 y C_8, y en el caso de la preparación de ésteres destinados a la cromatografía en fase gaseosa, no se deberá eliminar el disolvente de la solución de ésteres metílicos.

El método general 3.1 puede proporcionar resultados erróneos en caso de presencia:

— de compuestos de funciones oxigenadas secundarias (hidroxi, didroperoxi, ceto, epoxi),

— de compuestos de funciones ciclopropánica y ciclopropénica,

— de compuestos pliinsaturados conjugados y de los compuestos acetilénicos,

— de ceras,

y entonces será preferible utilizar uno de los métodos descritos en el punto 3.2. Sin embargo, los cuerpos grasos que contengan tales funciones en proporciones muy débiles (aceite de algodón por ejemplo) podrán ser analizados según el método 3.1.

Los fosfolípidos podrán analizarse tras saponificación y esterificación de los ácidos grasos.

Lo insaponificable no se elimina y, si estuviera presente en cantidad apreciable, puede interferir en los análisis ulteriores (nota 1).

3. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS QUE TENGAN 6 ÁTOMOS DE CARBONO Y MÁS

En el punto 3.1, se da un método general de preparación de los ésteres metílicos utilizando el trifluoruro de boro que deberá adoptarse con carácter preferente. Por si no fuere posible utilizar dicho método, se describen métodos alternativos en el punto 3.2.

3.1. **Método general utilizando el trifluoruro de boro**

3.1.1. *Principio*

Saponificación de los glicéridos, luego liberación y esterificación de los ácidos grasos en presencia de trifluoruro de boro.

3.1.2. *Material*

— matraces de 50 a 100 ml de cuello esmerilado,

— refrigerante derecho, de 20 a 30 cm de longitud útil, con esmerilado adaptable al matraz,

— regularizador de ebullición, exento de grasa,

— tubo para burbujeo de nitrógeno,

— pipeta graduada, de una capacidad al menos igual a 10 ml, y perilla pará pipeta o pipeta automática,

— tubos de ensayo de tapón esmerilado,

— ampollas de decantación de 250 ml.

3.1.3. *Reactivos*

— solución metanólica de hidróxido de sodio de alrededor de 0,5 N:

disolver 2 g de hidróxido de sodio en 100 ml de metanol que no contenga más del 0,5 % (m/m) de agua. Cuando se deba utilizar la solución durante un período de tiempo considerablemente largo, se formará un poco de carbonato de sodio (precipitado blanco); éste no tendrá ninguna influencia sobre la preparación de los ésteres metílicos,

— solución metanólica de trifluoruro de boro, de contenido comprendido entre el 12 y 15 % (m/m). (Existen soluciones al 14 y 50 % en el comercio) (nota 2).

Advertencia: El trifluoruro de boro es un compuesto tóxico. Por ello no se recomienda preparar uno mismo la solución a partir de trifluoruro de boro y de metanol (nota 3),

— heptano, para cromatografía (nota 2, nota 4),

— éter de pétróleo bidestilado (Eb 40-60 °C), índice de bromo inferior a 1, exento de residuo, o hexano (nota 2),

— sulfato de sodio anhidro,

— solución saturada de cloruro de sodio,

— rojo de metilo, en solución al 0,1 % (m/v) en el etanol al 60 % (v/v),

— nitrógeno que contenga menos de 5 mg de oxígeno por kg.

3.1.4. *Método operatorio*

Las operaciones siguientes se efectuarán preferentemente bajo una campana de gases a causa de las propiedades tóxicas del trifluoruro de boro. Todo el material de vidrio se lavará con agua inmediatamente después de su empleo.

En presencia de aceites o de ácidos grasos que contengan ácidos de más de dos dobles enlaces, se recomienda eliminar el aire contenido en el metanol y en el matraz por burbujeo de nitrógeno durante algunos minutos.

Preparar la muestra de conformidad con «I. Preparaciones de las muestras».

No es necesaria una pesada exacta. La importancia de la toma de muestras sólo ha de conocerse para escoger el tamaño del matraz y las cantidades de reactivos, según el siguiente cuadro:

Toma de muestras (mg)	Matraz (ml)	NaOH 0,5 N (ml)	Solución metanólica de BF_3 (ml)
100- 250	50	4	5
250- 500	50	6	7
500- 750	100	8	9
750-1 000	100	10	12

En caso en que los ésteres metílicos estén destinados al análisis por cromatografía en fase gaseosa, la toma de muestras será preferentemente de alrededor de 350 mg. Si fuere más pequeña, convendrá tomar precauciones para que la muestra tomada sea representativa (nota 5).

3.1.4.1. *Para los aceites y grasas*

Introducir la toma de muestras preparada en el matraz. Añadir la cantidad indicada de la solución metanólica de hidróxido de sodio y un regularizador de ebullición. Adaptar el refrigerante sobre el matraz. Llevar a ebullición con reflujo hasta que desaparezcan las gotitas de materia grasa (esta operación puede durar de cinco a diez minutos, pero, en algunos casos excepcionales, puede sobrepasar los diez minutos).

Añadir a la mezcla en ebullición, por la parte superior del refrigerante y utilizando la pipeta graduada con la pera para pipeta o la pipeta automática, la cantidad indicada de la solución metanólica de trifluoruro de boro. Continuar la ebullición durante dos minutos.

Añadir a la mezcla hirviendo 2 a 5 ml de heptano (nota 4) por la parte superior del refrigerante (la cantidad de heptano no tiene importancia en la reacción) y continuar la ebullición durante un minuto.

Quitar la fuente de calor del matraz, y después el refrigerante. Añadir algunos ml de la solución saturada de cloruro de sodio y agitar suavemente el matraz varias veces por rotación.

Continuar añadiendo solución saturada de cloruro de sodio para llevar el nivel del líquido al cuello del matraz. Trasladar alrededor de 1 ml de la capa superior (solución heptánica) a un tubo de ensayo esmerilado y añadir la cantidad de sulfato de sodio anhidro necesaria para eliminar los restos de agua. En el caso de una toma de muestras de 350 mg, la solución obtenida contendrá alrededor del 5 al 10 % de ésteres metílicos y podrá inyectarse directamente en la columna de cromatografía en fase gaseosa. En los otros casos, diluir la solución heptánica para obtener una concentración del 5 al 10 % en ésteres metílicos (nota 6).

Para obtener la totalidad de los ésteres secos, trasladar la solución salina y la fase heptánica a una ampolla de decantación de 250 ml. Decantar. Extraer la solución salina con 50 ml de éter de petróleo (Eb 40-60 °C) o de hexano.

Repetir una segunda vez esta extracción. Reunir la fase heptánica y los dos extractos y lavarlos con porciones de 20 ml de agua hasta la desaparición de la acidez (indicador: rojo de metilo). Secar con sulfato de sodio anhidro y evaporar el disolvente al baño maría bajo corriente de nitrógeno (nota 6, nota 7). Para tomas de muestras inferiores a 500 mg, es preferible reducir proporcionalmente los volúmenes de disolvente y de agua.

3.1.4.2. *Para los ácidos grasos*

Si la muestra está constituida únicamente por ácidos grasos, no se efectúa la saponificación.

Introducir la cantidad deseada de ácidos grasos preparados en el matraz. Añadir la cantidad indicada de la solución metanólica de trifluoruro de boro. Llevar a ebullición durante dos minutos. Proceder a continuación como se indica en el punto 3.1.4.1 a partir de: «Añadir a la mezcla hirviendo . . .»

3.2. **Métodos alternativos no utilizando el trifluoruro de boro**

3.2.1. *Para los cuerpos grasos neutros (IA < 2)*

3.2.1.1. *Principio*

Metanólisis de los glicéridos en medio alcalino.

3.2.1.2. *Material*

— agitador que permita una agitación rápida y dispositivo de calentamiento apropiado (por ejemplo, agitador magnético calentador),

— frasco cónico o matraz de 100 ml de cuello esmerilado,

— tubo para burbujeo de nitrógeno,

— refrigerante que se adapte sobre el frasco cónico o el matraz,

— regularizador de ebullición, exento de grasa,

— ampollas de decantación de 125 ml,

— frasco cónico, de boca estrecha, de 50 ml.

3.2.1.3. *Reactivos*

— metanol que no contenga más de 0,5 % (m/m) de agua,

— solución metanólica de hidróxido de potasio de alrededor de 1 N:

disolver 5,6 g de hidróxido de potasio en 100 ml de metanol que no contenga más del 0,5 % (m/m) de agua,

— heptano para cromatografía (nota 2, nota 4),

— sulfato de sodio anhidro,

— nitrógeno que contenga menos de 5 mg de oxígeno por kg.

3.2.1.4. *Método operatorio*

En presencia de aceites que contengan ácidos de más de 2 dobles enlaces, es recomendable eliminar el aire contenido en el metanol y en el matraz mediante burbujeo de nitrógeno durante algunos minutos.

Preparar la muestra de conformidad con «I. Preparaciones de las muestras».

En un frasco cónico o un matraz de 100 ml, introducir alrededor de 4 g (nota 5) de cuerpo graso preparado. Añadir alrededor de 40 ml de metanol, 0,5 ml de la solución de hidróxido de potasio y un regularizador de ebullición. Poner bajo refrigerante a reflujo, agitar y llevar a ebullición. La solución debe hacerse límpida. La reacción estará prácticamente terminada al cabo de cinco a diez minutos. En caso de aceites del tipo «aceite de ricino», la limpidez no será el criterio de reacción (nota 8).

Refrigerar bajo corriente de agua y trasvasar a una ampolla de decantación de 125 ml. Enjuagar el frasco o el matraz con 20 ml de heptano (nota 4) y verterlos en la ampolla.

Añadir alrededor de 40 ml de agua, agitar y dejar decantar. Los ésteres se reunirán en la fase heptánica superior. Agotar la fase acuosa una segunda vez con 20 ml de heptano. Reunir los dos extractos y lavarlos dos veces con 20 ml de agua. Después de la decantación, secar sobre sulfato de sodio anhidro la solución de ésteres, filtrar sobre algodón y evaporar el disolvente, si fuera necesario, hasta 20 ml en baño de agua hirviendo burbujeando nitrógeno en un frasco cónico de 50 ml (nota 6, nota 7).

3.2.2. *Para los cuerpos grasos ácidos (IA > 2) y los ácidos grasos*

3.2.2.1. *Principio*

Para los cuerpos grasos ácidos, neutralización de los ácidos grasos libres, metanólisis alcalina de los glicéridos, y después esterificación de los ácidos grasos en medio ácido.

Para los ácidos grasos, esterificación en medio ácido.

3.2.2.2. *Material*

— agitador que permita una agitación rápida y dispositivo de calentamiento apropiado (por ejemplo, agitador magnético calentador),

— frasco cónico o matraz de 250 ml de cuello esmerilado,

— tubo para burbujeo de nitrógeno,

— refrigerante que se adapte sobre el frasco cónico o el matraz,

— regularizador de ebullición, exento de grasa,

— ampollas de decantación de 250 ml,

— frasco cónico, de boca estrecha, de 100 ml.

3.2.2.3. *Reactivos*

— solución de metilato de sodio obtenida disolviendo 1 g de sodio en 100 ml de metanol que no contenga más del 0,5 % (m/m) de agua,

— solución metanólica de ácido clorhídrico anhidro de alrededor de 1 N (ver advertencias 3.2.2.6 a) y b)),

— heptano para cromatografía (nota 2, nota 4),

— sulfato de sodio anhidro,

— nitrógeno que contenga menos de 5 mg de oxígeno por kg.

3.2.2.4. *Método operatorio para los cuerpos grasos ácidos (IA > 2)*

En presencia de aceites que contengan ácidos de más de 2 dobles enlaces, es recomendable eliminar el aire contenido en el metanol y en el matraz mediante burbujeo de nitrógeno durante algunos minutos.

Preparar la muestra de conformidad con «I. Preparaciones de las muestras».

En un frasco cónico o un matraz de 250 ml, introducir alrededor de 4 g (nota 5) de cuerpo graso preparado.

Añadir 40 ml de la solución de metilato de sodio (ver observación 3.2.2.6 c)). Poner bajo refrigerante a reflujo, agitar y llevar a ebullición. La solución debe hacerse límpida, lo que se produce generalmente al cabo de una decena de minutos. La reacción estará prácticamente finalizada después de quince minutos.

Introducir a continuación en el frasco o en el matraz al menos 50 ml de la solución clorhídrica, luego llevarla de nuevo a ebullición durante diez minutos (ver advertencia 3.2.2.6 d)).

Refrigerar bajo corriente de agua, añadir a continuación en el frasco o en el matraz 100 ml de agua, verter luego la mezcla en una ampolla de decantación de 250 ml y añadir 30 ml de heptano (ver nota 4). Agitarla vigorosamente y dejarla decantar hasta una separación completa de las dos fases. Recoger la fase heptánica. Agotar la fase acuosa una segunda vez mediante 30 ml de heptano. Reunir los dos extractos heptánicos y lavarlos varias veces con agua hasta la neutralidad. Después de la decantación, secar sobre sulfato de sodio. Filtrar sobre algodón y evaporar el disolvente, si fuera necesario, hasta 20 ml en baño de agua hirviendo burbujeando nitrógeno en un frasco cónico de 100 ml (nota 6, nota 7).

3.2.2.5. *Método operatorio para los ácidos grasos*

Para los ácidos grasos, será conveniente utilizar el método operatorio simplificado siguiente:

En presencia de ácidos grasos que contengan ácidos de más de 2 dobles enlaces, es recomendable eliminar el aire contenido en el metanol y en el matraz burbujeando nitrógeno durante algunos minutos.

Preparar la muestra, de conformidad con «I. Preparaciones de las muestras».

En un frasco cónico o un matraz de 250 ml, introducir alrededor de 4 g (nota 5) de cuerpo graso preparado.

Introducir 50 ml de la solución clorhídrica y un regulador de ebullición, adaptar el refrigerante, después llevar a ebullición durante diez minutos.

Refrigerar bajo corriente de agua, añadir a continuación en el frasco o en el matraz 100 ml de agua, luego verter la mezcla en una ampolla de decantación de 250 ml y añadir 30 ml de heptano (nota 4). Agitarla vigorosamente y dejarla decantar hasta una separación completa de las dos fases. Trasegar la fase acuosa y agotarla una segunda vez mediante 30 ml de heptano. Reunir los dos extractos heptánicos y lavarlos varias veces con agua hasta la neutralidad. Después de la decantación, secar sobre sulfato de sodio. Filtrar sobre algodón y evaporar hasta 20 ml el disolvente en baño de agua hirviendo burbujeando nitrógeno en un frasco cónico de 100 ml (nota 6, nota 7).

3.2.2.6. *Observaciones*

a) En el laboratorio es fácil preparar pequeñas cantidades de ácido clorhídrico gaseoso anhidro por simple desplazamiento de su solución comercial (d = 1,18) añadiéndole poco a poco ácido sulfúrico concentrado (d = 1,84). El gas que se desprenda será simplemente secado mediante burbujeo en el ácido sulfúrico.

Al ser el metanol muy ávido de gas clorhídrico, será recomendable tomar todas las precauciones de utilización para la disolución, por ejemplo: efectuar la introducción del gas con la ayuda de un pequeño embudo invertido que llegue hasta la superficie del nivel del metanol. Es posible, además, preparar de antemano cantidades importantes de soluciones metanólicas clorhídricas que se conservan perfectamente en frascos esmerilados matenidos en la oscuridad.

b) Es posible utilizar ácido sulfúrico metanólico de alrededor de 1 N en lugar de ácido clorhídrico metanólico, pero la duración de la esterificación deberá ser de 20 minutos como mínimo y los precipitados de sulfato de sodio entorpecen la ebullición e imponen la filtración o el empleo de un agitador magnético.

c) Antes de la introducción de la toma de muestras, también es posible verter 40 ml de metanol y añadir 0,4 g de sodio, lo que supone una solución de metilato de sodio preparada y administrada al momento.

d) En caso de materias grasas muy ácidas, se produce, habida cuenta de la cantidad relativamente importante de metilato de sodio, una precipitación de cloruro de sodio que puede provocar algunos sobresaltos en el curso de la ebullición que sigue. Es posible filtrar dicho precipitado, pero ello no es necesario generalmente debido a la breve duración del calentamiento preconizado.

4. MÉTODOS PARTICULARES DE PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS DE 4 ÁTOMOS DE CARBONO Y MÁS

4.1. Principio

Los ésteres metílicos se obtienen por reacción de los cuerpos grasos con una solución metanólica de hidróxido de potasio en un estado intermedio antes de que tenga lugar la saponificación.

4.2. Ambito de aplicación

El método está destinado principalmente a la preparación de los ésteres metílicos que deban ser analizados por cromatografía en fase gaseosa. El método no es aplicable a los cuerpos grasos ácidos (índice de acidez < 2).

4.3. Material

— tubos de ensayo de tapón esmerilado de alrededor de 20 ml,

— matraces aforados de 50 y 100 ml,

— pipetas graduadas de 1 ml (o más),

— probetas graduadas de 10 ml.

4.4. Reactivos

— solución metanólica de hidróxido de potasio de alrededor de 2 N:

disolver 11,2 g de hidróxido de potasio en 100 ml de metanol que no contenga más de un 0,5 % (m/m) de agua,

— heptano para cromatografía (nota 2, nota 4),

— solución de referencia I: en un matraz aforado de 50 ml, pesar, con precisión de 0,1 mg, 1 g de pentanoato de metilo y enrasar con el heptano.

— solución de referencia II: en un matraz aforado de 100 ml, pesar, con precisión de 0,1 mg, 200 mg de pentanoato de metilo y enrasar con el heptano.

4.5. **Método operatorio**

Si fuera necesaria la dosificación ulterior del ácido butírico por cromatografía en fase gaseosa, será conveniente utilizar una solución de referencia: solución de referencia I si el contenido supuesto en ácido butírico fuera superior al 1 %; solución de referencia II si dicho contenido fuera inferior al 1 %.

En caso de que se requiriera la determinación de la composición en ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa, no será necesario utilizar una solución de referencia.

Preparar la muestra de conformidad con «I. Preparaciones de las muestras».

En un tubo de ensayo de tapón esmerilado de alrededor de 20 ml, pesar, con precisión de 1 mg, 1 g de la muestra preparada. Añadir 10 ml de heptano medidos con la probeta graduada. Con una pipeta graduada, añadir 1,0 ml de la solución de referencia conveniente.

Nota: Cuando no se requiera la dosificación de ácido butírico, no será necesario pesar la muestra con precisión de 1 mg ni añadir la solución de referencia.

Añadir 0,5 ml de la solución metanólica de hidróxido de potasio de alrededor de 2 N y mezclar el contenido del tubo de ensayo mediante balanceos hasta que dicho contenido se haga claro. Ello exige alrededor de veinte segundos. Casi inmediatamente después de esta clarificación, la solución se enturbiará de nuevo, a consecuencia de la separación de la glicerina. Se produce asimismo la decantación de la glicerina.

Decantar la capa superior que contiene los ésteres metílicos.

5. NOTAS

1. Si entorpeciera lo insaponificable, se diluirá con agua la solución obtenida después de la saponificación y se eliminará lo insaponificable mediante extracción por óxido dietílico, hexano o éter de petróleo en las condiciones acostumbradas.

   Acidificar la solución jabonosa acuosa, y separar los ácidos grasos. Preparar sus ésteres metílicos según los procedimientos 3.1.4.2 ó 3.2.3.5.

2. Durante la cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos, algunos reactivos y en especial las soluciones metanólicas de trifluoruro de boro pueden llevar a la aparición de picos parásitos (en la región $C_{20}C_{22}$ para las soluciones metanólicas de trifluoruro de boro). Como consecuencia, cada nuevo lote de reactivo deberá someterse a prueba preparando ésteres metílicos del ácido oleico puro y después cromatografiándoles. Si apareciera un pico parásito, deberá eliminarse el reactivo utilizado.

   Los distintos reactivos no deben dar el pico que interfiera con los de los ésteres metílicos de ácidos grasos en el curso de la cromatografía en fase gaseosa.

3. Si fuera absolutamente indispensable preparar una solución metanólica de trifluoruro de boro, a partir de trifluoruro de boro gaseoso, operar como sigue: Tarar un matraz de dos litros que contenga un litro de metanol. Refrigerar en un baño de agua helada. Estando todavía el matraz en el baño, burbujear con BF_3 procedente de una botella de gas por medio de un tubo de vidrio en el metanol hasta la absorción de 125 g, operando bajo una campana de gases. Hacer pasar la corriente de BF_3 al tubo de vidrio antes de sumergirlo en el metanol y hasta que sea retirado, para evitar cualquier vuelta de líquido al sistema descompresor de gas. El gas, al escaparse demasiado rápidamente, no debería dar como resultado pequeñas nubes de humo blanco. El reactivo permanece estable durante dos años.

4. El heptano (mezcla de isómetos C_7 puros sometida a prueba por cromatografía en fase gaseosa) puede sustituirse por hexano en ausencia de ácidos grasos de 20 átomos de carbono y más.

5. Si no se dispusiera de la masa de toma de muestras prevista, ésta podrá ser reducida hasta 10 mg e incluso hasta menos, siempre que disminuyan proporcionalmente los volúmenes de reactivos y la capacidad del equipo.

6. Los ésteres metílicos deberán ser analizados preferentemente lo más rápidamente posible. Si fuera necesario, la solución heptánica que contenga los ésteres metílicos podrá conservarse bajo gas inerte y en el refrigerador. Para un almacenamiento de larga duración, será deseable proteger los ésteres metílicos contra la autooxidación por adición a la solución de un antioxidante en una concentración que no interfiera en los análisis ulteriores, por ejemplo un 0,005 % (m/v) de BHT (di t.butil-2-6 metil-4 fenol). Si fuera necesario, les ésteres metílicos secos y sin disolvente podrán, en su caso, concervarse 24 horas bajo gas inerte en el refrigerador, o más tiempo en tubo sellado en vacío en el congelador.

7. Existe un riesgo de perder una parte de los ésteres metílicos más volátiles si la eliminación del disolvente se prolongara o si la corriente de nitrógeno fuera demasiado vigorosa.

   Para la espectrofotometría infrarroja, dicha eliminación del disolvente deberá ser lo más completa posible. Para la cromatología en fase gaseosa, es deseable no expulsar el disolvente.

8. En el caso de aceite del tipo de aceite de ricino, la limpidez no será el criterio de reacción.

III. CROMATOGRAFÍA EN FASE GASEOSA DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS

1. PREÁMBULO

El presente método tiene por objeto dar las líneas directrices básicas para la determinación por cromatografía en fase gaseosa de la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenida según el título II. Los ácidos grasos polimerizados no son analizables por este método.

Las indicaciones aportadas se refieren a los equipos normales de cromatografía en fase gaseosa con columna de relleno y detector de ionización de llama (nota 1).

2. MATERIAL

2.1. **Aparato de cromatografía en fase gaseosa**

Cualquier equipo que permita alcanzar el grado de eficacia y la resolución tal como se definen en el punto 4.1.2 es conveniente.

2.1.1. *Dispositivo de inyección*

El dispositivo de inyección deberá tener el volumen muerto más débil posible. Salvo imposibilidad material, se le llevará a una temperatura superior en 25 a 50 °C a la de la columna.

2.1.2. *Horno*

El horno deberá ser capaz de llevar las columnas a una temperatura de al menos 220 °C y de mantener la temperatura escogida con precisión de 1 °C.

En caso de utilización de condiciones programadas, se aconseja escoger un aparato de doble columna.

2.1.3. *Columna*

2.1.3.1. *Tubo*

Tubo de material inerte respecto a las materias que deban analizarse: cristal o, en su defecto, acero inoxidable (nota 2).

Longitud: de 1 a 3 m. Se utilizará una columna relativamente corta en los casos en que estén presentes los ácidos grasos de cadena larga (> C_{20}).

En los casos de determinación de los ácidos en C_4 y C_6, se recomienda utilizar una columna de 2 m.

Diámetro interior: de 2 a 4 mm.

2.1.3.2. *Relleno*

Soporte: Tierra de diatomeas lavada con ácidos y silanizada, o cualquier otro soporte inerte que sea conveniente, con un estrecho intervalo de granulometría (25 µm entre 125 y 200 µm), estando ligado el valor medio al diámetro interior y a la longitud de la columna.

Fase estacionaria: fase polar de tipo poliéster (por ejemplo polisicinato de dietilenoglicol, polisucinato de butanediol, poliadipato de etilenoglicol, etc.) o cualquier otra fase que responda a las exigencias citadas a continuación (por ejemplo cianosiliconas, etc.). El coeficiente de impregnación estará comprendido entre el 5 y el 20 %. Para determinadas separaciones podrán utilizarse fases apolares.

2.1.3.3. *Envasado*

Después de haber desconectado, si fuera posible, la columna del detector, poner el horno del aparato a 10 °C por encima de la temperatura de trabajo y mantener la columna que acabe de ser preparada bajo una corriente de gas inerte de 20 a 60 ml/min durante al menos dieciséis horas a dicha temperatura, después durante dos horas a 195 °C.

2.1.4. *Detector*

El detector deberá preferentemente ser adecuado para llegar a una temperatura superior a la de la columna.

Los detalles operatorios dados a continuación se refieren al empleo de un detector de ionización de llama (nota 1).

2.2. **Jeringa**

Jeringa de 10 µl como máximo, dividida en décimas de µl.

2.3. **Aparato registrador**

Cuando se utilice la curva registrada para calcular la composición de la mezcla analizada, el aparato registrador deberá ser un aparato electrónico de gran precisión compatible con el equipo utilizado:

— velocidad de respuesta inferior a 1,5 seg, preferentemente a 1 seg (la velocidad de respuesta es el tiempo necesario para que la pluma del aparato registrador vaya del 0 al 90 % al producirse la introducción momentánea de una señal del 100 %,

— anchura del papel: 25 cm como mínimo,

— velocidad de desenrollamiento del papel: 25 a 150 cm/h.

2.4. **Integrador o calculador (opcional)**

El empleo de un integrador electrónico o de un calculador permite un cálculo rápido y preciso. Este cálculo deberá suministrar una respuesta lineal, tener una sensibilidad suficiente y la corrección de la desviación de la línea de base deberá ser satisfactoria.

3. REACTIVOS

— gas vector: gas inerte (nitrógeno, helio, argón, etc.) muy bien desecado y conteniendo menos de 10 ppm de oxígeno,

— gases auxiliares: hidrógeno al 99,9 % como mínimo que no contenga productos orgánicos, aire u oxígeno que no contenga productos orgánicos,

— productos de graduación: mezcla de ésteres metílicos o ésteres metílicos de un aceite de composición conocida, a ser posible parecida a la de los cuerpos grasos que deban analizarse.

4. MÉTODO OPERATORIO

4.1. **Reglaje del aparato**

4.1.1. *Determinación de las condiciones óptimas de trabajo*

Para escoger las condiciones de trabajo, deberán tenerse en cuenta las siguientes variables:

— longitud y diámetro de la columna,

— naturaleza y cantidad de la fase estacionaria,

— temperatura de la columna,

— caudal del gas vector,

— resolución deseada,

— importancia de la toma de muestras,

— duración del análisis.

La importancia de la toma de muestras será escogida de forma tal que el conjunto detector-electrómetro suministre una respuesta lineal.

En general, los siguientes valores serán los que den los resultados deseados, a saber número de platos teóricos para el estearato de metilo al menos igual a 2 000 y elución de éste en aproximadamente quince minutos

Diámetro interior de la columna	Velocidad del gas vector
2 mm	15-25 ml/min
3 mm	20-40 ml/min
4 mm	40-60 ml/min

Concentración de la fase estacionaria	Temperatura
5 %	175 °C
10 %	180 °C
15 %	185 °C
20 %	185 °C

Cuando el aparato lo permita, estará el inyector a una temperatura cercana a los 200 °C y el detector a una temperatura igual o superior a la de la columna.

El caudal de hidrógeno del detector de ionización de llama es, en general, de cerca de la mitad del gas vector y el de oxígeno es de 5 a 10 veces el del hidrógeno.

4.1.2. *Determinación de la eficacia de la resolución*

Efectuar el análisis de una mezcla de estearato y de oleato de metilo en proporciones sensiblemente equivalentes (por ejemplo, ésteres metílicos de manteca de cacao). La importancia de la toma de muestras, la temperatura de la columna y el caudal del gas vector se escogerán de manera que el máximo del pico de estearato de metilo se registre alrededor de 15 minutos después del pico del disolvente y que dicho pico corresponda aproximadamente a los tres cuartos de la escala total.

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

$$n = 16 \left(\frac{dR_1}{\omega 1}\right)^2$$

y la resolución R por la fórmula:

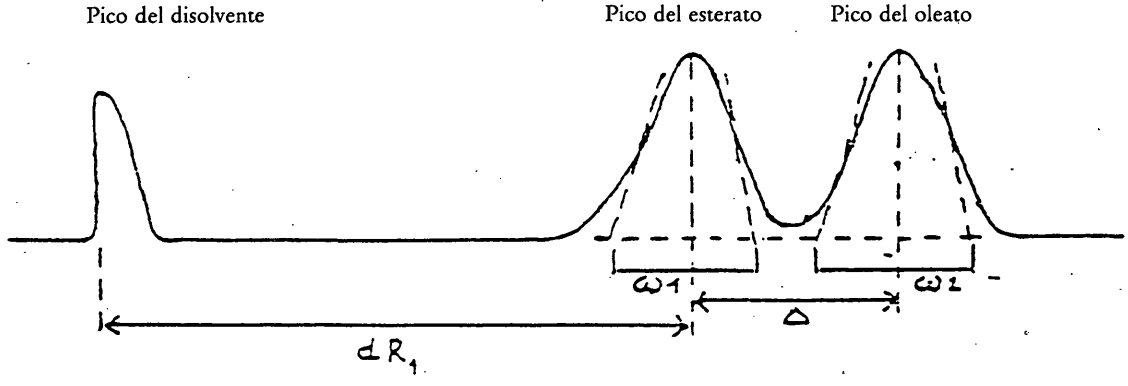
$$R = \frac{2\,\Delta}{\omega 1 + \omega 2}$$

donde

dR_1 es la distancia de retención en mm medida a partir de la introducción hasta el máximo relativo del pico del estearato de metilo,

$\omega 1$ y $\omega 2$ son las anchuras en mm de los picos del estearato y del oleato de metilo medidas entre los puntos de inflexión de la curva,

Δ es la distancia entre los máximos relativos de los picos del estearato y del oleato de metilo



Las condiciones de operación que se tomarán en consideración serán las que den un número de platos teóricos para el estearato de metilo al menos igual a 2 000 y una resolución de al menos 1,25. Deberán, además, ser tales que el ácido linolénico ($C_{18:3}$) sea separado de los ácidos aráquico ($C_{20:0}$) y gadoleico ($C_{20:1}1$).

4.2. **Análisis**

La toma de muestras será de 0,1 a 2 µl de la solución heptánica de los ésteres metílicos obtenida según el título II. En los casos de ésteres exentos de disolventes, hacer una solución al 10 % aproximadamente en el heptano e inyectar de 0,1 a 1 µl de ésta.

Para la búsqueda de componentes presentes en trazas, esta toma de muestras podrá aumentarse (hasta 10 veces); en los casos habituales, las condiciones de operación serán las determinadas en el punto 4.1.1. Sin embargo, será posible operar con una temperatura de columna más baja en el caso en que sea necesario dosificar ácidos grasos inferiores a C_{12}, o más elevada en el caso en que fuera necesario dosificar ácidos grasos superiores a C_{20}.

En su caso, es posible operar a una temperatura programada en los dos casos precedentes. Por ejemplo, si la muestra contuviera ésteres metílicos de ácidos grasos de menos de 12 átomos de carbono, inyectar la muestra de 100 °C (o a 50-60 °C si el ácido butírico estuviera presente) y programar inmediatamente a 4-8 °C/min hasta la temperatura óptima.

En determinados casos, podrán combinarse los dos procedimientos: después del período de programación de temperatura, continuar la elución a temperatura constante hasta elución de todos los constituyentes. Si el aparato no pudiera trabajar a temperatura programada, operar a dos temperaturas fijadas entre 100 y 195 °C.

Si fuera necesario, se recomienda hacer un análisis sobre dos fases fijas de polaridades diferentes para comprobar la ausencia de picos ocultos, por ejemplo para los aceites de pescado o en el caso de la presencia simultánea de $C_{18:3}$ y $C_{20:3}$ y de $C_{18:3}$ y de $C_{18:2}$ conjugados.

5. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

5.1. **Análisis cualitativo**

En condiciones de operación idénticas a las del ensayo, analizar la mezcla testigo, de composición conocida, y determinar las distancias de retención (o los tiempos de retención) para los ácidos grasos constitutivos. Trazar las curvas que den el logaritmo de la distancia de retención (o del tiempo de retención) en función del número de átomos de carbono; en condiciones isotermas y para los ésteres de cadena recta y un índice de insaturación fijado, dichas curvas trazadas sobre papel semilogarítmico deberán ser rectas notablemente paralelas.

Para la prueba, identificar los picos remitiéndose a dichas rectas, si fuera necesario interpolando.

Deberán evitarse las condiciones operativas en las que existan «picos ocultos», o sea que dos constituyentes no puedan distinguirse como consecuencia de una resolución insuficiente.

5.2. **Análisis cuantitativo**

5.2.1. *Determinación de la composición*

Utilizar el método de normalización interna (salvo excepciones), o sea admitir que la totalidad de los constituyentes presentes en la muestra está representada sobre el cromatograma, y por tanto que la suma de las áreas de los picos representa el 100 % de los constituyentes (elución total).

Si el equipo incluye un integrador, utilizar las cifras suministradas por él. En caso contrario, determinar el área de cada pico por triangulación multiplicando la altura de éste por su anchura a media altura, considerando, si fuera necesario, las diversas atenuaciones utilizadas en el curso del registro.

5.2.1.1. *Caso general*

A falta de constituyentes importantes inferiores a C_8, calcular el contenido en constituyente, expresado en porcentaje en ésteres metílicos, determinando el porcentaje representado por el área del pico correspondiente con respecto a la suma de la totalidad de los picos:

$$\% \text{ (m/m) del compuesto i expresado en ésteres metílicos} = \frac{A_i}{\Sigma A_i} \times 100$$

A_i = área del pico correspondiente del compuesto i;

ΣA_i = suma de las áreas de la totalidad de los picos.

5.2.1.2. *Empleo de 105 factores de corrección*

En algunos casos, en especial en presencia de ácidos inferiores a C_8 o de ácidos de funciones secundarias y cuando se utilicen detectores de conductibilidad térmica, procederá utilizar factores de corrección para convertir los porcentajes de las áreas de los picos en porcentajes en masa de los constituyentes.

Determinar los factores de corrección con la ayuda de un cromatograma obtenido a partir de una mezcla testigo de ésteres metílicos de composición exactamente conocida en condiciones operativas idénticas a las de la prueba.

Para dicha mezcla testigo:

$$\% \text{ (m/m) del compuesto i} = \frac{B_i}{\Sigma B_i} \times 100$$

B_i = masa del compuesto i en la mezcla testigo,

ΣB_i = suma de las masas de los distintos consituyentes de la mezcla testigo.

El cromatograma obtenido a partir de la mezcla testigo permite calcular:

$$\% \text{ (área/área) del compuesto i} = \frac{C_i}{\Sigma C_i} \times 100$$

C_i = área del pico correspondiente al compuesto i,

ΣC_i = suma de las áreas de la totalidad de los picos.

de donde:

$$\text{factor de corrección } K_i = \frac{B_i \times \Sigma C_i}{C_i \times \Sigma B_i}$$

Habitualmente, los factores de corrección se reducen a $K_{16} = 1$ y de los factores relativos se convierten en:

$$K_i = \frac{K_i}{K_{16}}$$

Para la muestra, el contenido en cada constituyente está dado por % (m/m) del compuesto i expresado en ésteres metílicos

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

5.2.1.3. *Empleo de un patrón interno*

En determinados casos (en especial, dosificación de los ácidos C_4 y C_6 y dosificación de los ácidos en caso de que todos los ácidos grasos no estén eluidos) procederá utilizar un patrón interno (respectivamente C_8 y C_{13} o C_{17}) y, a continuación, determinar el factor de corrección del patrón interno.

$$\text{porcentaje (m/m) del compuesto i expresado en ésteres metílicos} = \frac{m_s \times K'_i \times A_i}{m \times K'_s \times A_s} \times 100$$

m_s = masa del patrón interno en mg,

m = masa de la muestra en mg,

K_s = factor de corrección del patrón interno,

A_s = área del pico correspondiente al patrón interno,

A_z = área del pico correspondiente al compuesto i.

5.2.2. *Expresión de los resultados*

Dar el resultado con:

3 cifras significativas por encima del 10 %,

2 cifras significativas entre el 1 y el 10 %,

1 cifra significativa por debajo del 1 %,

o sea en cada caso con una cifra después de la coma.

5.2.3. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas el mismo día, con el mismo aparato, por la misma persona y sobre los mismos ésteres y para los constituyentes presentes en más del 5 % no deberá exceder en valor relativo del 3 % del valor determinado, con un máximo absoluto del 1 %. Para los constituyentes presentes en menos del 5 %, la repetibilidad se hace rápidamente menos buena, en valor relativo, a medida que el contenido disminuye.

5.2.4. *Reproductibilidad*

La diferencia entre los resultados obtenidos en dos laboratorios diferentes para los constituyentes presentes en más del 5 % no deberá exceder en valor relativo del 10 % del valor determinado, con un máximo absoluto del 3 %. Para los constituyentes presentes en menos del 5 %, la reproductibilidad se hace rápidamente menos buena, en valor relativo, a medida que disminuye el contenido.

6. NOTAS

1. Podrá emplearse un aparato de cromatografía en fase gaseosa con un detector de conductibilidad térmica (catarómetro). Las condiciones descritas se modificarán entonces de la siguiente manera:

— tubo:	longitud 2 a 4 m — diámetro interior: 4 mm
— soporte:	granulometría entre 160 y 200 µm
— índice de impregnación:	del 15 al 20 %
— gas vector:	helio, o en su defecto hidrógeno, con un contenido en oxígeno tan débil como sea posible
— ningún gas auxiliar	
— temperatura del inyector:	40 a 60 °C superior a la de la columna
— temperatura de la columna:	de 180 °C a 200 °C
— caudal del gas vector:	generalmente comprendido entre 60 y 80 ml/min
— cantidades inyectadas:	generalmente entre 0,5 y 2 µl

Para el análisis cuantitativo, tomar en consideración los factores de corrección definidos en el punto 5.2.1.2.

2. Si estuvieran presentes constituyentes poliinsaturados de más de 3 dobles enlaces, un tubo de acero inoxidable podría provocar su descomposición.