

# I. Disposiciones generales

## PRESIDENCIA DEL GOBIERNO

**16116** *Métodos Oficiales de Análisis de Aceites y Grasas, Cereales y Derivados, Productos Lácteos y Productos Derivados de la Uva, establecidos por Orden de 31 de enero de 1977. (Continuación.)*

### 33.2. Material y aparatos.

33.2.1. Matraz de 100 ml provisto de refrigerante de reflujo, con cierres esmerilados.

33.2.2. Pipeta de 5 ml graduada en décimas de grado.

33.2.3. Pipeta de 5 ml.

33.2.4. Probeta de 50 ml.

33.2.5. Bloque de calefacción que permita mantener el matraz a unos 80° C.

33.2.6. Termómetro de 0° C a 60° C, graduado en décimas.

### 33.3. Reactivos.

33.3. (1, 2 y 3). Como en 32.3. (1, 2 y 3).

### 33.4. Procedimiento.

Preparar la muestra como en 32.4.

Verter en el matraz 1 g aproximadamente de aceite. Agregar 5 ml de disolución alcohólica de hidróxido potásico. Ajustar el refrigerante y mantener a ebullición durante diez minutos, agitando de cuando en cuando, dejar enfriar hasta la temperatura ambiente, agregar 1,5 ml de disolución de ácido acético y 50 ml de etanol de 70°, calentando previamente a 50° C. Mezclar mediante agitación, introducir el termómetro y dejar enfriar, observando el aspecto de la disolución cuando alcance la temperatura de 45° C. Si se forma un precipitado flocooso a temperatura superior a 40° C, el ensayo es positivo.

Dejar enfriar a temperatura ambiente (no inferior a 18° C) durante 12 horas, como mínimo. Observar de nuevo la disolución: La formación de un precipitado flocooso, flotando en el centro del líquido, indica que la reacción es positiva. Una turbidez no resuelta en copos no indica la presencia de aceite de orujo.

### 33.5. Expresión de los resultados.

Positivo o negativo.

### 33.6. Observación.

Excepcionalmente, puede suceder que algunos aceites de oliva vírgenes, de segunda presión, den un resultado positivo.

### 33.7. Referencias.

1. Bellier.—Compt. Rend. Congr. Inter. Chim. Appl. 1896, 4, 311.
2. Marcille, R.—Ann. Chim. Anal. Chim. Appl. 1939, 21, 311.
3. Consejo Oleícola Internacional, 1957.

## 34. DETERMINACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE LOS ACIDOS GRASOS SITUADOS EN LA POSICION B DE LOS TRIGLICERIDOS

### 34.1. Principio.

El procedimiento se basa en someter la muestra de grasa neutra, previamente purificada mediante tratamiento con alumina activada, a una hidrólisis bajo la acción de la lipasa pancreática, que actúa selectivamente sobre los radiales acilo situados en la posición  $\alpha$  de los triglicéridos, con una acumulación de  $\beta$ -monoglicéridos inalterados.

Se separan estos  $\beta$ -monoglicéridos por cromatografía en capa fina de gel de sílice, efectuándose el análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos por cromatografía en fase gaseosa de sus ésteres metílicos.

Es aplicable a los aceites y grasas comestibles que se encuentran normalmente en el comercio tanto al estado bruto como refinados.

Es utilizable, con reserva, en grasas que contengan ácidos con funciones oxigenadas o de cadena no lineales, cuyo comportamiento ante la lipasa ha de ser previamente investigado.

### 34.2. Material y aparatos.

34.2.1. Tubo para cromatografía, el cual consta de dos partes: La parte superior tiene un diámetro interior de 35 mm, y la parte inferior, un diámetro interior de 10 mm. Cada una de estas partes tiene una longitud de 23 cm, lo que da al tubo cromatográfico una longitud total de 46 cm. La mitad inferior tiene, en su extremidad, una estrangulación o el dispositivo conveniente para retener el tapón de algodón o lana de vidrio que ha de servir de soporte al absorbente; o bien, una placa filtrante de vidrio de porosidad 2.

34.2.2. Filtro de vidrio Jena 11 G2 u otro equivalente.

34.2.3. Matraz redondo de fondo plano y boca esmerilada, de 100 ml de capacidad.

34.2.4. Ampolla de extracción de 500 ml.

34.2.5. Vasito de vidrio, cilíndrico de fondo plano y boca esmerilada, con las siguientes dimensiones aproximadas: 18 milímetros  $\varnothing$ ; 60 mm de altura total, incluida la boca, constituida por un cono esmerilado, normalizado, con una altura de 10 milímetros; irá provisto de tapón de teflón, aunque puede sustituirse por tapón de vidrio.

34.2.6. Pipetas de 0,2-0,5-1 y 2 ml de capacidad.

34.2.7. Vibrador en el cual pueda agitarse fuertemente el vaso descrito en 34.2.5; debe dar, aproximadamente, unas 50 vibraciones por segundo.

34.2.8. Equipo de cromatografía en capa fina; placas de gel de sílice G de 20 x 20 cm y 0,25 mm de espesor y cubeta para el desarrollo de dichas placas.

34.2.9. Matraz de 50 ml de forma análoga a un matraz aforado con cuello de 10 mm  $\varnothing$  exterior y boca esmerilada, cono normalizado 12/21.

34.2.10. Embudo de vidrio soplado.

34.2.11. Varilla de reflujo, provista de cono esmerilado macho 12/21.

34.2.12. Medidor de pH de lectura directa. En el caso de operar con indicador interno según se indica en 34.5.1, puede prescindirse de este aparato, aunque es preferible su utilización.

34.2.13. Termostato de agua que permita mantener una constancia de temperatura  $\pm 0,5^\circ$  C.

34.2.14. Bureta de 5 ml con divisiones de 1/20 ml, y bureta de 25 ml graduada en décimas.

34.2.15. Vaso de 50 ml de capacidad.

34.2.16. Agitador pequeño de hélice.

34.2.17. Cronómetro.

### 34.3. Reactivos.

34.3.1. Alúmina activada, para cromatografía, actividad I según Brockman. Un tipo de alúmina que da muy buenos resultados es el óxido de aluminio FLUKA para cromatografía, tipo 507C neutro.

34.3.2. Etanol de 96° exento de aldehídos.

34.3.3. Disolución de hidróxido sódico 2N. Disolver 100 g de hidróxido sódico en lentejas, calidad R. A., en agua destilada, recientemente hervida, completando el volumen hasta 1.000 mililitros.

34.3.4. Lipasa pancreática de cerdo, cuya actividad esté comprendida entre 0,8 y 2 unidades lipásicas por mg.

34.3.5. Disolución acuosa de Tris (hidroximetil) —amino-metano 1 M— ajustada a pH = 8 con ácido clorhídrico 6N.

34.3.6. Disolución acuosa de cloruro cálcico al 22 por 100.

34.3.7. Disolución acuosa de colato sódico al 0,1 por 100.

34.3.8. Acido clorhídrico, aproximadamente 6 N.

34.3.9. Eter etílico.

34.3.10. Eter de petróleo, o hexano normal.

34.3.11. Mezcla de éter de petróleo-éter etílico, en la proporción de 2 a 1, a la cual se adiciona 1,8 por 100 de ácido fórmico (aproximadamente de 98 por 100).

34.3.12. Disolución de metilato sódico en metanol. Disolver sodio en metanol, con las precauciones habituales en la cantidad necesaria para obtener una concentración 0,2 M.

34.3.13. Disolución de ClH gaseoso en metanol aproximadamente al 4 por 100.

34.3.14. Disolución acuosa saturada de cloruro sódico.

34.3.15. Suspensión de goma arábiga al 10 por 100 en agua.

- 34.3.16. Disolución acuosa de colato sódico al 20 por 100.  
 34.3.17. Hidróxido sódico 0,1 N.  
 34.3.18. Disolución acuosa de rojo cresol al 1 por 100.  
 34.3.19. Aceite de oliva neutralizado.  
 34.3.20. Fenoltaleína al 1 por 100 en metanol.  
 34.3.21. Acetona o cloroformo, calidad para análisis.

#### 34.4. Procedimiento.

Preparación de la lipasa pancreática: Aunque este producto puede adquirirse en el mercado, damos a continuación un método para su preparación: 5 kg de páncreas frescos de cerdo, se enfrían a 0° C; se liberan de la grasa sólida y del tejido conjuntivo que los rodean, y se trituran en un molino de cuchillas hasta obtener una pasta fluida. Esta pasta se agita en frío, durante 4-6 horas, con 2,5 litros de acetona anhidra y después se centrifuga. El residuo se extrae otras tres veces con el mismo volumen de acetona, dos veces con una mezcla de acetona-éter etílico (1:1) y dos veces con éter etílico. El producto se seca durante 48 horas al vacío, obteniéndose un polvo estable que debe conservarse en refrigerador.

Valoración de la actividad lipolítica del polvo de lipasa: Se prepara una emulsión de aceite de oliva agitando, en un mezclador adecuado durante unos 10 minutos, una mezcla constituida por 185 ml de suspensión de goma arábiga al 10 por 100; 15 g de hielo picado en trozos finos; y 20 ml de aceite de oliva, previamente neutralizado.

Diez ml de la emulsión anterior se introducen en un vaso de 50 ml. Se añaden 0,3 ml de disolución de colato sódico al 20 por 100 y 20 ml de agua destilada.

Se coloca el vaso en el termostato, regulado a 37° C, y se introducen los electrodos de un medidor de pH y un agitador de hélice (34.5.1).

Con la bureta de 5 ml se añade, gota a gota, disolución de hidróxido sódico 0,1 N hasta conseguir un pH de 8,5. Se añade un volumen conveniente de suspensión de polvo de lipasa en agua, según se indica en el párrafo siguiente y, tan pronto como el medidor de pH acusa un pH de 8,3, se pone en marcha el cronómetro y se va añadiendo la disolución de hidróxido sódico 0,1 N, al ritmo necesario para mantener constante el valor 8,3 de pH, anotando cada minuto el volumen de disolución alcalina consumida que acusa la bureta.

Los datos obtenidos se llevan a un sistema de ejes coordenados, marcando, en abscisas, los tiempos y, en ordenadas, los mililitros de disolución alcalina consumida para mantener el pH constante; debe obtenerse una gráfica lineal.

La suspensión de lipasa a que se alude en el párrafo anterior, se prepara al 0,1 por 100 en agua, tomando para cada ensayo la cantidad necesaria para que en 4 ó 5 minutos se consuma alrededor de 1 ml de disolución alcalina. Normalmente se consigue este resultado con 1 a 5 mg de polvo.

La unidad lipásica se define como la cantidad de enzima que libera 10 $\mu$ -equiv. de ácido por minuto. La actividad del polvo utilizado, medida en unidades lipásicas por mg, se calcula por la fórmula:

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

A = actividad en unidades lipásicas por mg.

V = ml de disolución de hidróxido sódico 0,1 N, consumidos por minuto, calculados a partir de la gráfica.

P = peso tomado de polvo, expresado en mg.

La lipasa utilizada ha de tener una actividad comprendida entre 0,8 y 2 unidades lipásicas por miligramo.

Preparación de la muestra. Si la grasa tuviera una acidez libre igual o inferior a 3 por 100, se someterá directamente a la purificación en columna de alúmina, según se describe más adelante.

Si la grasa tuviese una acidez superior al 3 por 100 se someterá a una neutralización alcalina en hexano, según se describe más adelante, y la grasa neutra obtenida se purificará en columna de alúmina siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

Purificación con alúmina: Se toman 15 g de alúmina activada y se disponen en el tubo cromatográfico (34.2.1), alojándose en la mitad inferior de diámetro más estrecho, pudiéndose efectuar el llenado en seco o en húmedo, utilizando para ello el disolvente que se disponga para el desarrollo, bien sea el éter de petróleo o el hexano. Una vez preparada la columna, se vierten 5 g de muestra, pesada con exactitud del centígramo y disuelta en 50 ml de éter de petróleo o hexano (34.5.2).

La disolución oleosa que pasa por la columna se filtra a través del filtro de vidrio (34.2.2) previamente desecado en estufa a 105° C.

La disolución filtrada se recoge en un matracito redondo de unos 100 ml y se destila el disolvente al vacío, operando a una temperatura no superior a 30° C. Para esta operación resulta muy ventajosa la utilización de un evaporador rotatorio (34.5.3).

El aceite obtenido, libre de disolvente, se utilizará para la hidrólisis por la lipasa pancreática, según se describe más adelante.

Neutralización con hidróxido sódico en hexano. En una ampolla de extracción de 500 ml se introducen unos 20 g de muestra, 100 ml de hexano, 50 ml de etanol, una gota de disolución alcohólica de fenoltaleína al 1 por 100, y el volumen de disolución de hidróxido sódico 2N, correspondiente a la acidez libre de la muestra, medido con pipeta o bureta graduada en décimas de milímetro (34.5.4).

Se agita la mezcla enérgicamente; se agregan 50 ml de agua destilada, se agita nuevamente y se deja en reposo hasta que la mezcla se separe en dos capas bien definidas.

Se extrae por la llave la capa hidro-alcohólica inferior conteniendo los jabones.

La disolución de hexano conteniendo la grasa neutra se lava con porciones sucesivas de 25 ml de una mezcla de etanol de 96° y agua destilada 1:1 (v/v), hasta que el líquido de lavado no colorea en rosa a la fenoltaleína.

La disolución en hexano, libre de jabones, se deseca agregando 3-4 gramos de sulfato sódico anhidro; y se evapora el disolvente en evaporador rotatorio al vacío, o mediante una corriente de nitrógeno seco (pureza mínima 98 por 100). En todo caso, no debe calentarse por encima de 30° C.

Hidrólisis por la lipasa pancreática. A 100 mg de la muestra de grasa, preparada como se ha indicado anteriormente (ver 34.5.5), pesados en el vasito descrito en 34.2.5, se añaden 20 miligramos de polvo de lipasa y 2 ml de la disolución 34.3.5. Se agita suavemente y se añaden 0,2 ml de disolución de cloruro cálcico al 20 por 100 y 0,5 ml de disolución de colato sódico al 0,1 por 100.

Se coloca el vasito, durante 1 minuto, en un baño a 40° C. Se tapa y se agita fuertemente en el vibrador durante 2 minutos. Al cabo de este tiempo, se añade 1 ml de ácido clorhídrico 6N y 2 ml de éter etílico; se tapa y se agita con la mano. Se deja en reposo hasta que se separe la capa superior de éter etílico. Si se forma una emulsión, se rompe invirtiendo el tubo varias veces con suavidad.

Separación de los monoglicéridos por cromatografía en capa fina. Con ayuda de una jeringa adecuada, se coloca la mayor parte de la disolución etérea decantada en la parte inferior de una placa de gel de sílice de 20 x 20 cm, depositando las gotas de una forma regular en una línea horizontal situada a unos 15 mm del extremo inferior, dejando libre unos 10 mm en cada extremo. Una vez depositada la disolución, se introduce la placa en la cubeta, conteniendo el disolvente descrito en 34.3.11 en la cuantía necesaria para que la superficie quede unos 5 mm por debajo del producto depositado.

Cuando el frente del disolvente haya recorrido unos 15 centímetros, se saca la placa de la cubeta y se deja evaporar al aire el disolvente.

Observando la placa contra la luz de una ventana, se pueden ver perfectamente las bandas correspondientes a los productos formados en la liposis. La banda situada inmediatamente por encima de la posición original está constituida por los  $\beta$ -monoglicéridos. Con ayuda de una pequeña espátula, se raspa, recogiendo el polvo de sílice en un pequeño embudo de vástago ancho, colocado sobre el matraz de metilación (34.2.9).

Preparación de los ésteres metílicos. Al matraz conteniendo la sílice raspada de la placa se agregan 10 ml de la disolución de metilato sódico (34.3.12), se coloca la varilla de reflujo, y se hierve durante 5 minutos.

Se añade una gota de fenoltaleína en metanol al 1 por 100 y, seguidamente, disolución de clorhídrico en metanol (34.3.15) gota a gota, hasta decoloración del indicador. Se hierve a reflujo otros 5 minutos. Se deja enfriar añadiendo 1 ml de hexano o de éter de petróleo (34.3.10) y disolución acuosa saturada de cloruro sódico hasta que el hexano se sitúe en el cuello estrecho del matraz. Se agita fuertemente y se deja reposar. En pocos minutos se separa la disolución hexánica de los ésteres metílicos, que queda limpia y transparente en el cuello del matraz; pasándose, seguidamente, a inyectar esta disolución en el cromatógrafo para la determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos.

Cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos. Los ésteres metílicos se determinan a continuación según el método número 41—determinación de ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa—de los métodos oficiales de análisis de aceites y grasas.

34.5. *Observaciones.*

34.5.1. Si no se dispone de medidor de pH, puede utilizarse para su regulación en el medio reaccionante, el rojo cresol como indicador interno.

Para ello, al colocar el vaso en el termostato, según se indica en 34.4, se agregan 5 gotas de disolución acuosa al 1 por 100 del indicador (34.3.18) y se adiciona la disolución 0,1 N de hidróxido sódico, manteniendo una coloración rosa-violeta que corresponde, aproximadamente, a un pH de 8,3.

34.5.2. Con algunos aceites extraídos con disolventes, al efectuar la disolución en éter de petróleo o hexano puede formarse una turbidez que, si fuese muy intensa, podría perturbar el proceso cromatográfico de purificación. En estos casos, resulta aconsejable filtrar o centrifugar la disolución turbia, separando el sedimento y operando con la disolución transparente.

34.5.3. Si no se dispone de evaporador rotatorio, la eliminación del disolvente se puede realizar con análoga rapidez y eficacia, haciendo pasar por el interior del matraz una corriente de nitrógeno puro ( $\leq 98$  por 100), calentando en baño de agua a temperatura que no exceda de 30° C.

34.5.4. Teniendo en cuenta que se han tomado 20 g de muestra por cada 1 por 100 de acidez libre de oleico, se deberá adicionar 0,36 ml de la disolución de hidróxido sódico 2N. Si la fenoltaleína no acusase reacción alcalina, deberá adicionarse más disolución gota a gota, y agitando después de cada adición, hasta conseguir el viraje del indicador.

34.5.5. Con aceites comestibles de buena calidad aparente, y acidez reducida ( $\leq 3$  por 100) en operaciones de rutina, se puede omitir el tratamiento previo de purificación con alúmina, ya que, en la inmensa mayoría de los casos, esta purificación no es necesaria. Sin embargo, como norma general, este tratamiento debe considerarse como necesario, y cualquier valor anormal obtenido efectuando una lipólisis directa no deberá ser aceptado sin confirmarlo previamente, con la grasa sometida al proceso de purificación.

34.6. *Referencia.*

1. Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española 55.079.

35 RECONOCIMIENTO DEL ACEITE DE ORUJO DE ACEITUNA  
(Prueba de Vizern)35.1. *Principio.*

Este método tiene por objeto la identificación del aceite extraído por disolventes de los orujos grasos de aceituna.

Se aplica para determinar la pureza de los aceites de oliva vírgenes y refinados. En presencia de otros aceites, su aplicación e interpretación de resultados debe ser discrecional.

35.2. *Material y aparatos.*

35.2.1. (1, 2, 3 y 4). Como 22.2. (1, 2, 3 y 4).

35.2.5. Matraz erlenmeyer de 100 ml, con boca esmerilada, provisto de refrigerante de reflujo de aire, constituido por un tubo de 80 a 100 cm de longitud aproximadamente.

35.2.6. Tubo de ensayo de paredes gruesas, con dimensiones aproximadas de 160 mm de altura y 30 mm de diámetro interior.

35.2.7. Probeta de 10 ml.

35.3. *Reactivos.*

35.3.1. (1, 2, 3, 4, 5 y 6). Como 22.3. (1, 2, 3, 4, 5 y 6).

35.3.7. Alcohol etílico de 85 por 100 en volumen. Diluir 885 mililitros de etanol de 96° hasta 1.000 ml con agua destilada. La densidad será 0,8520. Comprobar con un alcoholómetro.

35.4. *Procedimiento.*

Extraer el insaponificado de 5 g de aceite como en 22(a), empleando éter de petróleo.

La totalidad del insaponificable aislado recogido en el matraz de 100 ml se disuelve en 10 ml de etanol de 85°, en caliente con refrigerante de reflujo.

La disolución alcohólica se transvasa al tubo de ensayo 35.2.6 y se enjuaga el matraz con otros 10 ml de etanol de 85°, que se incorporan también al tubo de ensayo. Se homogeneiza la mezcla y se enfría a unos 25° C; dejándolo en reposo durante una hora, a temperatura entre 20-25° C. Observar al cabo de la hora.

La formación de un precipitado flocooso, que se deposita en el fondo del tubo, en forma de copos, acusa la presencia de aceite de orujo. Un precipitado más dividido o pulverulento, no resuelto en copos, no puede interpretarse como positivo, siendo muchos los aceites de oliva de presión que originan estos precipitados.

35.5. *Expresión de los resultados.*

Positivo o negativo.

35.6. *Referencia.*

1. M. Vizern. Ann. Fals. Fraud. 1953. 31.

## 36. TETRABROMUROS

(Prueba de Vizern-Guillot)

36.1. *Principio.*

Está fundamentada en la insolubilidad de los derivados tetrabromados de los ácidos grasos en éter de petróleo, en las condiciones especificadas en la prueba.

Se aplica al reconocimiento de aceites semisecantes en aceites de oliva.

La sensibilidad es del 5 por 100 para el aceite de soja y del 10 por 100 para los demás aceites.

36.2. *Material y aparatos.*

36.2.1. Tubo de vidrio con tapón esmerilado de aproximadamente 20 mm de diámetro y 180 mm de largo.

36.3. *Reactivos.*

36.3.1. Eter de petróleo (p. e. 40-70° C) exento de productos reaccionables con los halógenos.

36.3.2. Bromo para análisis, exento de cloro.

36.3.3. Reactivo de bromación. Agregar gota a gota y agitando continuamente 4 ml de bromo a 100 ml de éter de petróleo, enfriado previamente a 0° C. Conservar el reactivo en hielo fundente hasta el momento del ensayo.

36.4. *Procedimiento.*

Filtrar el aceite a ensayar que debe estar totalmente exento de humedad.

En el tubo de ensayo, desecado, introducir 1 ml de aceite seco y filtrado, disolverlo en 10 ml de éter de petróleo. Mantenerlo durante 5 minutos en hielo fundente, con el tubo cerrado. Agregar en pequeñas adiciones 10 ml de reactivo de bromación, agitar ligeramente y mantener el conjunto durante una hora en hielo fundente, al cabo de dicho tiempo el color de la disolución debe indicar la permanencia de exceso de bromo.

Observar el aspecto de la disolución. La presencia de aceite semisecante se acusa por la formación de un precipitado más o menos intenso, según la composición del aceite y su contenido en la mezcla, los aceites de oliva puros darán un ensayo limpio y transparente.

36.5. *Expresión de los resultados.*

Positivo o negativo.

36.6. *Referencia.*

1. M. Vizern. Ann. Fals. Fraud. 1953. 31.

## 37. MODIFICACION SYNODINOS-KONSTAS

(Prueba de Hauchecorne)

37.1. *Principio.*

Se hace actuar el ácido nítrico concentrado sobre el aceite, el cual reacciona con productos de oxidación originados en las materias grasas parcialmente alteradas, hayan sido sometidas o no a un proceso de transformación industrial.

Es aplicable solamente a aceites de oliva «vírgenes» y refinados o a sus mezclas, pudiéndose obtener una coloración no satisfactoria en aceites no adulterados, cuya calidad deficiente o su conservación inadecuada sea responsable de la respuesta obtenida en el ensayo.

37.2. *Material y aparatos.*

37.2.1. Frascos de unos 50 ml de capacidad con tapón esmerilado.

37.2.2. Probeta graduada con tapón esmerilado de 25 ml.

37.2.3. Embudo de 6 cm de diámetro.

37.2.4. Probeta graduada de 30 ml.

37.2.5. Papel de filtro corriente.

37.3. *Reactivos.*

37.3.1. Tierra decolorante para aceites de elevada actividad.

37.3.2. Ácido nítrico, para análisis, densidad 1,40.

37.4. *Procedimiento.*

Medir, con la probeta graduada, 30 ml de aceite de la muestra y verter en el frasco de 50 ml. Pesar 3 g de tierra decolorante y agregarlos al frasco, agitándose fuertemente durante 30 segundos.

El producto tratado con tierra se filtra, por filtro de pliegues, recogiendo 10 ml en la probeta de tapón. Si se dispusiere de centrifuga, sería preferible centrifugar realizándose la operación en menos tiempo y con más eficacia.

Agregar, al aceite contenido en la probeta, 10 ml de ácido nítrico ( $d = 1,40$ ) y agitar durante unos 30 segundos, dejándose reposar seguidamente y observándose el color desarrollado en la capa superior oleosa (ver 4.6).

### 37.5. Expresión de los resultados.

El aceite de oliva «virgen» de características normales y bien conservado, produce una coloración amarilla clara.

Los aceites de oliva refinados, procedentes de un «lampante» de buena calidad, suelen dar un color amarillo sucio que, frecuentemente, se acerca al amarillo tostado.

Los aceites de orujo refinados y, en general, los aceites de calidad deficiente, tanto «vírgenes» como refinados o las mezclas de ambos, dan una coloración marrón, obteniéndose una respuesta análoga con los aceites esterificados.

Los aceites de semillas refinados dan coloraciones muy diversas que no pueden considerarse como específicas para cada uno, pero que, sin embargo, un operador experto en la aplicación de la prueba los diferencia perfectamente de las coloraciones atribuibles a los aceites de oliva.

### 37.6. Observaciones.

37.6.1. El tiempo de desarrollo de estas coloraciones es muy variable. Generalmente se puede observar a los 2 ó 3 minutos de haberse separado la capa oleosa de la capa ácida, pero no se debe dar el dictamen definitivo hasta observar la coloración transcurridos unos 15 minutos de reposo.

### 37.7. Referencia.

- Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española 55.053.

## 38. RECONOCIMIENTO DEL ACEITE DE ALGODÓN (Reacción de Halphen)

### 38.1. Principio.

Este método detecta cualitativamente el aceite de algodón en mezcla con otros aceites o grasas vegetales o animales.

Puede considerarse específica del aceite de algodón, excepto en presencia de aceites de Kapok y de grasas procedentes de animales que hayan sido alimentados con harina de semilla de algodón o alguna materia que contenga ácidos ciclopropenoides; en ambos casos habrá que realizar pruebas discriminatorias.

### 38.2. Material y aparatos.

38.2.1. Tubos de ensayo de dimensiones 250 x 25 mm aproximadamente.

38.2.2. Baño de agua caliente con temperatura regulable.

38.2.3. Baño de aceite o bloque de calefacción adecuado para los tubos de ensayo que han de ser utilizados, regulables a una temperatura de 110-115°C. En lugar de aceite puede emplearse una disolución acuosa saturada de cloruro sódico.

### 38.3. Reactivos.

38.3.1. Preparar una disolución de azufre en bisulfuro de carbono al 1 por 100 y añadir un volumen igual de alcohol amílico.

### 38.4. Procedimiento.

Tomar en un tubo de ensayo de 10 ml de aceite muestra y agregar un volumen igual de reactivo. Agitar y calentar en un baño de agua a 70-80°C durante unos cuantos minutos, agitando de cuando en cuando, hasta que el bisulfuro de carbono comience a hervir y la muestra comience a desprender vapores.

Colocar el tubo en un baño regulado a 110-115°C durante 1-2 horas. La presencia de aceite de algodón se acusa por el desarrollo de un color rojo más o menos intenso; los aceites refinados suelen dar color rosa. En el caso de débiles contenidos de aceite de algodón por bajo del límite de sensibilidad del ensayo, el líquido toma color amarillo.

### 38.5. Expresión de resultados.

Positiva o negativa.

### 38.6. Observaciones.

38.6.1. La estructura del ciclopropeno responsable del desarrollo del color se destruye por calefacción, y a 200°C la destrucción es prácticamente completa. Por tanto, los aceites refinados

suelen dar, a lo sumo, una reacción débil y frecuentemente dan resultado negativo. Del mismo modo, la hidrogenación y los tratamientos con ácidos u otros agentes químicos reducen la intensidad y pueden anularla por completo.

38.6.2. Diferentes lotes de aceite de algodón pueden reaccionar con intensidades diferentes. La intensidad del color no puede tomarse como índice del contenido en aceite de algodón.

### 38.7. Referencias.

- J. Pharm. Chim. 1897. 6, 390.
- Analyst. 1897. 22, 396.
- American Oil Chemists' Society. Official and Tentative Methods. Cb. 1-25.

## 39. RECONOCIMIENTO DEL ACEITE DE SEMILLA DE TÉ EN ACEITE DE OLIVA

(Reacción de Fitelson)

### 39.1. Principio.

Este método es aplicable solamente a la identificación de aceite de semilla de té en mezcla con aceite de oliva.

### 39.2. Material y aparatos.

39.2.1. Tubos de ensayo con dimensiones aproximadas de 150 x 15 mm.

39.2.2. Pipeta de 1,5 ml, graduada en décimas.

39.2.3. Pipeta cuentagotas, con orificio de salida de, aproximadamente, 2 mm de diámetro, calibrado de tal forma que siete gotas de aceite pesen, aproximadamente, 0,22 g.

### 39.3. Reactivos.

39.3.1. Cloroformo, reactivo análisis.

39.3.2. Ácido sulfúrico, reactivo análisis,  $d = 1,84$ .

39.3.3. Anhídrido acético, reactivo análisis.

39.3.4. Éter etílico anhidro, reactivo análisis.

### 39.4. Procedimiento.

Colocar en un tubo de ensayo, medidos con pipeta, 0,8 ml de anhídrido acético, 1,5 ml de cloroformo y 0,2 ml de ácido sulfúrico. Mezclar y enfriar en un baño de agua con hielo a 5°C.

Añadir con la pipeta cuentagotas 0,22 g de la muestra de aceite. Si aparece turbidez, añadir anhídrido acético, gota a gota, agitando después de cada adición hasta que desaparezca. Mantener a 5°C durante 5 minutos.

Añadir 10 ml de éter etílico, previamente enfriado a 5°C, tapar el tubo de ensayo con un corcho y mezclar inmediatamente invirtiendo el tubo dos veces. Colocar nuevamente el tubo en el baño de agua-hielo y observar el color.

El aceite de semilla de té puro da una coloración roja intensa, alcanza un máximo y seguidamente desaparece.

### 39.5. Expresión de resultados.

Positiva o negativa.

### 39.6. Observaciones.

39.6.1. Muchas muestras genuinas de aceite de oliva dan coloraciones rosa de una intensidad comparable a un contenido de aceite de semilla de té del 10 por 100 o más. Por consiguiente, coloraciones rosadas débiles en muestras presentadas como aceite de oliva puro no pueden ser atribuidas a la presencia de aceite de semilla de té.

39.6.2. Algunas muestras de aceite de oliva, especialmente de calidad refinable o tipos industriales muestran una coloración oscura que tiende a enmascarar el color rojo característico de la reacción. Para evitar este inconveniente, proceder como sigue: Saponificar una muestra de 5 g de la muestra y 5 g de parafina líquida blanca, utilizando un exceso de hidróxido potásico en disolución alcohólica (aproximadamente 5 ml de hidróxido potásico al 50 por 100 diluido con 30 ml de alcohol etílico). Una ebullición mantenida durante 10-15 minutos es generalmente suficiente. Pasar la disolución del producto saponificado a una ampolla de decantación y añadir un volumen igual de agua destilada, mezclar y dejar que decante, separándose en dos capas. Separar la capa inferior constituida por la disolución jabonosa. Lavar la capa oleosa varias veces con agua destilada con el fin de eliminar los restos de jabón. Secar el producto una vez lavado, añadiendo sulfato sódico anhidro y dejar en reposo durante unos minutos. Filtrar y operar como se indica en 39.4.

39.6.3. Es aconsejable trabajar simultáneamente y en forma idéntica con muestras especialmente preparadas que sirvan como patrones de comparación.

## 39.7. Referencias.

1. J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 1936. 19, 493-97.
2. American Oil Chemists' Society. Official and Tentative Methods. Cb. 3-39.

40. RECONOCIMIENTO DEL ACEITE DE SESAMO  
(Reacción de Pavolini)

## 40.1. Principio.

Este método tiene por objeto el reconocimiento del aceite de sésamo en mezcla con otros aceites y grasas comestibles.

Es aplicable aunque el aceite de sésamo se haya sometido a un proceso de refinación alcalina, o hidrogenación parcial para la preparación de «shortenings» o margarinas.

## 40.2. Material y aparatos.

40.2.1. Tubo de ensayo de 20 X 110 mm de diámetro interior y longitud, respectivamente, con tapón esmerilado y llave de salida de vidrio en su parte inferior. Debe llevar una marca indicando los volúmenes de 10 ml y 15 ml.

40.2.2. Soporte para mantener el tubo anterior en posición vertical.

40.2.3. Cápsula de porcelana, fondo plano, de unos 60 mm de diámetro.

## 40.3. Reactivos.

40.3.1. Ácido sulfúrico concentrado ( $d = 1,84$ ).

40.3.2. Disolución de 0,35 ml de furfural, recientemente destilado, en un litro de anhídrido acético. Esta disolución debe guardarse en frascos oscuros, de tapón esmerilado, preferiblemente provistos de capuchón protector, también con ajuste esmerilado. Manteniendo en debidas condiciones el reactivo, se conserva largo tiempo. No es necesario que el anhídrido acético sea rigurosamente anhidro, pudiéndose tolerar hasta un 5 por 100 de agua.

## 40.4. Procedimiento.

En el tubo graduado se vierten 10 ml de la muestra de aceite, y seguidamente 5 ml de reactivo 40.3.2. Agitar durante 1 minuto aproximadamente, colocar el tubo en el soporte y dejar reposar hasta que se separen las dos capas.

Verter de 1 a 2 ml de la capa inferior a la cápsula de porcelana. Agregar 5 ó 6 gotas de ácido sulfúrico concentrado y mezclar imprimiendo a la cápsula un suave movimiento de rotación.

Para cantidades de aceite de sésamo superiores al 1 por 100 se desarrolla inmediatamente una coloración azul de Prusia oscura, con ligero tinte verdoso. Para contenidos menores, el color azul va siendo más débil, aumentando al mismo tiempo el periodo requerido para el desarrollo completo del color. En mezcla con aceites de oliva y soja, el límite de detección es de 0,25 por 100, acusándose la presencia por la aparición de un color gris azulado, que tarda en desarrollarse de 5 a 10 minutos.

## 40.5. Expresión de resultados.

Positivo o negativo.

## 40.6. Referencias.

1. Pavolini L. Olii Minerali, Grassi Saponi, Colori Vernici; 12, 41, 1934.
2. Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española 55.068.

## 41. DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA EN FASE GASOSA

## 41.1. Principio.

El método está basado en la separación y determinación cromatográfica de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Es aplicable a las grasas vegetales y animales con ácidos grasos de 12 a 24 átomos de carbono. No es aplicable para la determinación de ácidos grasos oxidados y epoxiácidos.

## 41.2. Material y aparatos.

41.2.1. Matraz redondo, fondo plano, de 100 ml, boca esmerilada.

41.2.2. Refrigerante de reflujo, adaptable al matraz anterior.

41.2.3. Ampollas de decantación de 500 ml.

41.2.4. Matraz redondo, fondo plano, de 200 ml.

41.2.5. Cromatógrafo apto para separar los ésteres metílicos, provisto de horno con regulación de temperatura hasta 250°-300° C, e inyector susceptible de ser calentado hasta 50° C por

encima de la temperatura del horno. Detector suficientemente sensible y aparato registrador continuo.

41.2.6. Botella con nitrógeno a presión; riqueza mínima 99,9 por 100.

41.2.7. Columna de acero inoxidable, aluminio, cobre o vidrio de 3-6 mm de diámetro interior, de 2 m de longitud, rellena con Chromosorb P o W (60-80 mallas) o Celite 545 (60-100 mallas), impregnada con 5 por 100 de succinato de polietilenglicol.

41.2.8. Jeringa, de 5 a 10  $\mu$ l de capacidad.

## 41.3. Reactivos.

41.3.1. Metanol absoluto, reactivo para análisis.

41.3.2. Sodio metálico, reactivo para análisis.

41.3.3. Disolución de metilato sódico. Disolver 5 g de sodio metal en 1.000 ml de metanol absoluto (aprox. 0,2 N).

41.3.4. Eter de petróleo (p. e., 40°-60° C) o hexano, para cromatografía.

41.3.5. Disolución de ácido clorhídrico anhidro en metanol absoluto al 3-4 por 100.

41.3.6. Cloruro sódico, reactivo para análisis.

41.3.7. Sulfato sódico, reactivo para análisis.

41.3.8. Disolución de fenoltaleína al 1 por 100 en metanol.

41.3.9. Disolución de rojo de metilo al 0,1 por 100 en etanol al 60 por 100.

41.3.10. Nitrógeno gas puro (99,9 por 100).

## 41.4. Procedimiento.

41.4.1. Preparación de los ésteres metílicos.

41.4.1.1. Aceites y grasas de cualquier acidez e insaponificable no superior al 2 por 100.

a) Pesar 1 g de grasa en matraz de 100 ml. Agregar 25 ml de disolución de metilato sódico. Adaptar refrigerante de reflujo y hervir hasta obtener una sola fase; aproximadamente, 5 minutos. Interrumpir la calefacción.

b) Agregar al matraz 30 ml de disolución de ácido clorhídrico en metanol. Volver a calentar a reflujo 5 minutos. Enfriar.

c) Extracción de los ésteres metílicos.

Método rápido. Pasar la disolución obtenida en el matraz a otro de 100 ml con cuello estrecho y largo. Lavar el primero con 4-5 ml de hexano o heptano y pasarlos al segundo; calentar éste sin llegar a hervir, imprimiéndole movimiento de rotación durante 1 ó 2 minutos. Agregar disolución saturada de cloruro sódico en cantidad suficiente para situar la capa de hexano en el cuello del matraz; dicha capa presentará aspecto limpio y transparente. Tomar con una pipeta 2 ó 3 ml, pasarlos a un recipiente adecuado para su conservación o inyección directa en el cromatógrafo.

Método de referencia. Pasar la disolución contenida en el matraz a una ampolla de extracción de 500 ml, lavar aquél con unos 30 ml de éter de petróleo o hexano. Añadir a la ampolla 125 ml de agua destilada. Agitar fuertemente y dejar reposar. Extraer tres veces consecutivas la capa inferior con 50 ml de éter o hexano cada vez. Lavar repetidamente los tres extractos reunidos en una ampolla de extracción con 15 ml de agua destilada cada vez, hasta eliminar completamente el ácido, empleando rojo de metilo como indicador. Secar la disolución con sulfato sódico anhidro. Eliminar el disolvente en baño de agua bajo corriente de nitrógeno.

41.4.1.2. Aceites y grasas de acidez no superior al 0,3 por 100 en ácido oleico.

Omitir la metanolisis en medio ácido. Realizar la metanolisis alcalina según 41.4.1.1 a) y, estando aún caliente el matraz, agregar por la parte superior del refrigerante una gota de disolución de fenoltaleína y disolución de ácido clorhídrico en metanol en cantidad algo superior a la necesaria para neutralizar el metilado. Dejar enfriar. Pasar la disolución a la ampolla de extracción. Proceder a la extracción de los ésteres metílicos según 41.4.1.1 c).

41.4.1.3. Aceites y grasas de acidez superior al 80 por 100 en ácido oleico.

Omitir la metanolisis alcalina. Realizar la metanolisis ácida, pesando en el matraz 2 g de muestra, previamente filtrada y seca. Agregar 60 ml de la disolución de ácido clorhídrico en metanol. Proseguir según 41.4.1.1. b) y 41.4.1.1 c).

41.4.1.4. Aceites y grasas con insaponificable superior al 2 por 100.

Eliminar la materia insaponificable según el método «Determinación de la materia insaponificable». La solución hidroalcohólica de jabones resultantes se concentra en evaporador rotatorio hasta unos 50 ml. Pasar éstos a una ampolla de extracción. Acidificar con ácido clorhídrico 2 N hasta reacción ácida

al rojo de metilo. Extraer con éter de petróleo o hexano. Proseguir como en 41.4.1.3.

#### 41.4.2. Preparación de la columna.

41.4.2.1. Soporte: En un vaso de 600 ml colocar 100 g de Chromosorb W o P, o Celita 545, preferentemente el primero, agregar ácido clorhídrico al 20 por 100 en cantidad suficiente hasta cubrir el producto. Dejar en reposo durante 15 horas. Decantar el ácido. Agregar agua destilada, agitando fuertemente, y dejar reposar 5 minutos. Decantar el agua y volver a cubrir con ácido clorhídrico al 20 por 100 y reposar durante 2 horas. Filtrar sobre embudo de vidrio y lavar con agua destilada hasta neutralidad. Extender seguidamente el soporte en capa delgada en cápsulas de porcelana o cubeta de vidrio. Desecar en estufa a 110° C durante 2 horas.

41.4.2.2. Fase estacionaria: Succinato de polietilenglicol comercial.

41.4.2.3. Impregnación del soporte: Disolver, en cápsula de porcelana, 0,5 g de la fase estacionaria o fija de unos 50 ml de acetona o cloroformo. Añadir 9,5 g de soporte tratado. Regular el disolvente para obtener una papilla de fluidez adecuada para una buena homogeneización por agitación. Eliminar el disolvente sobre baño de agua, removiendo con espátula, hasta obtener el producto en forma de polvo suelto. Extenderlo en capa delgada e introducirlo en estufa a 100° C durante 2 horas.

41.4.2.4. Llenado de la columna: Introducir el soporte impregnado con fase fija en la columna, haciéndola vibrar por percusión o con un vibrador magnético, hasta su llenado total. Es preciso que el material rellene la columna homogéneamente, evitando la formación de vías o canales, para que no pierda eficacia. Obturar los extremos con tapón de lana de vidrio y/o cilindros de malla metálica de cobre.

#### 41.4.3. Condiciones operatorias.

Acoplar al cromatógrafo la columna preparada, o la suministrada por la firma comercial del aparato.

Regular la temperatura del horno entre 160-170° C, la cámara de inyección 50° C más alta que la del horno y el detector 25° C sobre la de la columna.

Ajustar el flujo de gas portador, en principio del orden de 4 l/hora, y mantenerlo constante. Acondicionar la nueva columna para la temperatura de operación, fluyendo gas portador durante 24 horas o hasta estabilidad. Registrar la línea base para comprobar la estabilidad del aparato.

Operar con patrones, rectificando las condiciones operatorias a la vista de los resultados obtenidos, regulando el flujo de gas portador de forma que el linolenato de metilo sea eluido en 30 minutos, como máximo. Medirlo periódicamente con el medidor de flujo de burbuja de jabón y otro medio.

Preparar una disolución de los ésteres metílicos en acetona o hexano de pureza comprobada. Inyectar de 0,4 a 0,6 µl, con jeringa, descargando y retirando la aguja rápidamente.

El registro obtenido será admisible si cumple las siguientes condiciones: a) El área total de los picos registrados, referida a la sensibilidad máxima utilizada, no será inferior a 5.000 mm<sup>2</sup>. De esta forma, los componentes presentes en la cuantía de 0,2 por 100 deberán dar picos de 10 mm<sup>2</sup>, como mínimo. b) Todos los picos han de caer dentro del papel registrador.

Señalar en el cromatograma el punto de referencia de introducción de la muestra, los picos iniciales de salida del aire y la atenuación de registro de cada pico.

41.4.4. Comprobación de las condiciones de trabajo del instrumento y de la columna.

Se realiza cromatografiando una muestra de patrones conteniendo aproximadamente cantidades iguales de estearato y oleato de metilo, inyectando una cantidad de muestra tal que los picos registrados sean del 25 al 50 por 100 del ancho del papel de registro, y determinando la resolución de los dos ácidos según:

$$\text{Resolución} = \frac{2 D}{O + E}$$

D = distancia entre los dos máximos de los picos del oleato y estearato.

O = ancho de la base del oleato.

E = ancho de la base del estearato.

Si la resolución es igual o mayor de 1,0, el instrumento y columna están en condiciones de trabajo satisfactorias.

Todas las columnas experimentan con el uso una pérdida gradual de resolución; cuando ésta es menor de 1,0, la columna será reemplazada.

#### 41.5. Cálculo.

41.5.1. Identificación de los picos. Los ésteres aparecen en orden creciente del número de átomos de carbono y de aumento

de insaturación para un mismo número de átomos de carbono. El palmítico (C<sub>16</sub>) aparece delante de los C<sub>18</sub>, y éstos en el orden oleato (C<sub>18</sub>:1), linoleato (C<sub>18</sub>:2) y linoleato (C<sub>18</sub>:3); el aráquico (C<sub>20</sub>:0) aparece normalmente después del (C<sub>18</sub>:3), pero pueden estar invertidos en algunos casos. Se establecerá la identidad para una columna dada inyectando muestras patrones.

Fijar los tiempos de retención, medidos en el cromatograma (distancia entre el máximo de cada pico y la posición del pico inicial de salida del aire, o del pico de salida del disolvente en el caso de detectores de llama de hidrógeno). Compararlos con los obtenidos con las mezclas patrones.

41.5.2. Determinación cuantitativa. Se considera que la superficie del triángulo formado por cada pico y la línea base es proporcional a la cantidad de componente identificado con dicho pico.

Determinar el área trazando líneas tangentes a los lados de cada pico prolongadas hasta cortar la línea base. Multiplicar la altura del triángulo (corregida para la atenuación empleada) por la mitad de la base.

Si se ha registrado con atenuación única, medir el área multiplicando la altura del pico por su ancho a la mitad de la altura.

Sumar las áreas de todos los picos y calcular el tanto por ciento correspondiente a cada pico:

$$\% P_i = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100$$

P<sub>i</sub> = tanto por ciento de cada componente en la mezcla.

A<sub>i</sub> = área de cada pico.

Normalmente se empleará este criterio y expresión.

41.5.2.1. Factores de corrección. En algunos casos, por no ser lineal la respuesta del instrumento y por las diferencias en los pesos moleculares, se determinan los factores de corrección de cada ácido, referidos al ácido palmítico, analizando mezclas conocidas de composición similar a la mezcla problema.

$$f_x = \frac{x \cdot A_p}{A_x \cdot P}$$

f<sub>x</sub> = factor de corrección del ácido.

x = tanto por ciento del ácido en la mezcla.

A<sub>x</sub> = área del pico x.

P = tanto por ciento del ácido palmítico en la mezcla patrón.

A<sub>p</sub> = área del pico del ácido palmítico.

$$\text{Área corregida del pico } x = A_c = f_x \cdot \frac{A_x}{A_p}$$

#### 41.6. Referencias.

1. Jacini y otros. La Rivista Italiana de la Sostanze Grasse. 1963. 103, 40.
2. Firestone, D. Journal Association of Official Agricultural Chemists. 1963. 46, 1.
3. International Union of Pure and Applied Chemistry Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Soaps. 1964. II. D. 19. Suplemento 5.º ed.
4. Consejo Oleícola Internacional. Métodos de Análisis. 1967.

#### 42. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN MATERIA GRASA DE LOS ALPECHINES

##### 42.1. Principio.

Se considera materia grasa del alpechín el producto obtenido por extracción con éter de petróleo en condiciones determinadas. El procedimiento es aplicable a toda clase de alpechines, ya sean centrifugados o no.

##### 42.2. Material y aparatos.

42.2.1. Ampollas de extracción de un litro y medio de capacidad.

42.2.2. Vaso de precipitado de un litro y medio de capacidad.

42.2.3. Mairaz redondo, de fondo plano, de 250 ml de capacidad.

42.2.4. Embudo de pico corto de 80 mm de diámetro.

##### 42.3. Reactivos.

42.3.1. Eter de petróleo, para análisis (ver 42.6.1).

42.3.2. Sulfato sódico anhidro puro. 50 gr de este producto, introducido en un cartucho y extraído en un Soxhlet con éter de petróleo durante cinco horas, no debe dejar en el matraz, una vez desecado en estufa a 105° C durante dos horas, un residuo superior a un centígramo.

(Continuará)