

EL ORGANO EJECUTIVO EN EL RAMO DE ECONOMIA,

Vista la solicitud presentada por el Ingeniero, **CARLOS ROBERTO OCHOA CORDOVA**, Director Ejecutivo del **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA, CONACYT**, relativa a que se apruebe la Norma Salvadoreña Recomendada: MATERIAS GRASAS, DETERMINACION DEL ACIDO ERUCICO EN GRASAS COMESTIBLES POR CROMATOGRAFIA GASEOSA: NSR: 67.00.295:00.

CONSIDERANDO:

Que la Junta Directiva de la citada Institución, ha aprobado la Norma antes relacionada, mediante el Punto Número SEIS del Acta Número TRESCIENTOS SEIS, de la Sesión celebrada el 13 de septiembre del año dos mil.

POR TANTO;

De conformidad al Artículo 36 Inciso Tercero de la Ley del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,

ACUERDA:

1° - APRUEBASE la Norma Salvadoreña Recomendada: MATERIAS GRASAS, DETERMINACION DEL ACIDO ERUCICO EN GRASAS COMESTIBLES POR CROMATOGRAFIA GASEOSA. NSR: 67.00.295:00, de acuerdo a los siguientes términos:

NORMA

NSR UNE-55-120-81

SALVADOREÑA

CONACYT

MATERIAS GRASAS, DETERMINACION DEL ACIDO ERUCICO EN GRASAS COMESTIBLES POR CROMATOGRAFIA GASEOSA.

CORRESPONDENCIA: Esta Norma es una adopción equivalente de la Norma UNE 55-120-81,1981.

ICS 67.200.10

NSR 67.00.295:00

Editada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, Colonia Médica, Avenida Dr. Emilio Alvarez, Pasaje Dr. Guillermo Rodríguez Pacas, # 51, San Salvador, El Salvador, Centro América. Teléfonos: 226-2800, 225-6222; Fax. 225-6255; e-mai:info@ns.conacyt.gob.sv.

Derechos Reservados

NORMA SALVADOREÑA

NASR 67.00.295:00

1. OBJETO

Esta Norma tiene por objeto describir un método adecuado para la determinación cuantitativa, por cromatografía gaseosa, del ácido erúxico (13,14-docosenoico), contenido en aceites y grasas utilizadas en la alimentación humana. En el caso de que existan isómeros del ácido erúxico, el valor obtenido deberá tomarse como suma de los ácidos docosenoicos presentes.

2. FUNDAMENTO DEL METODO

El método se funda en obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos contenidos en la muestra problema por metanolisis con metóxido sódico, completada con una metanolisis ácida si fuera necesario, adicionando previamente a la muestra un peso determinado de tetracosanoato de metilo (lignocerato de metilo) o el ácido libre, que se utiliza como patrón interno.

Se inyecta en el cromatógrafo una cantidad adecuada de la disolución de ésteres metílicos, calculándose las cantidades relativas del ácido erúico y del patrón; y, a partir de la cantidad pesada de éste para el peso tomado de muestra, se calcula su contenido en ácido erúico.

3. MATERIAL NECESARIO

- 3.1 Cromatógrafo para trabajar en fase gaseosa, que permita operar en las condiciones que se indican en el apartado 5.4.
- 3.2 Registrador para la señal de salida del cromatógrafo, siendo preferible, aunque no indispensable, acoplar un integrador electrónico.
- 3.3 Tubo de nitrógeno para su utilización como gas portador, debiendo tener una riqueza mínima del 99,8%.
- 3.4 Generador de hidrógeno y suministrador de aire purificado, para la alimentación del detector de llama; o, en su defecto, tubo de hidrógeno, con una riqueza mínima del 99,9% y tubo de aire seco.
- 3.5 Jeringa para inyección de la muestra, con una capacidad de 5 ó 10 µl.
- 3.6 Columna cromatográfica, constituida por un tubo de acero inoxidable o de vidrio, de 24 mm diámetro interior y 2 m de longitud, con un relleno conteniendo una fase fija de poliéster que, en las condiciones operativas que se indican en el capítulo 5, de lugar en el cromatograma a picos simétricos, bien separados y cómodamente cuantificables, del ácido erúico y del patrón.

Se recomienda la utilización de Supelcoport 80-100 como soporte, conteniendo 5% de dietilenglicolsuccinato (DEGS).

Antes de emplear una columna nueva en la resolución de problemas analíticos, deberá ser acondicionada, eliminando todos aquellos compuestos volátiles que producirían un señal de fondo en el detector. Para ello, se monta en el cromatógrafo sin conectar con el detector, regulando la temperatura del horno a unos 10°C por encima de la temperatura máxima a que vaya a ser utilizada, haciendo pasar, al mismo tiempo, una corriente de nitrógeno. El tiempo necesario para el acondicionamiento es muy variable, dependiendo de la pureza de la fase fija y la naturaleza del soporte. Con un DEGS de buena calidad, el relleno preparado con Supelcoport, no requiere, prácticamente, acondicionamiento, bastando mantener la columna en el cromatógrafo de una a dos horas.

En cualquier caso, la buena estabilización de la columna se advertirá en la señal dada por el detector con la columna sin carga ninguna, debiendo dar una señal muy reducida y estable durante un intervalo de tiempo relativamente prolongada, en el supuesto de que el instrumento funcione correctamente.

3.7 MATRAZ DE METILACION

Matraz de 50 ml de capacidad, con cuello estrecho y largo (5-6 cm), y tapón esmerilado. Puede servir un matraz aforado.

- 3.8 Refrigerante Liebig, de 120 mm de longitud útil adaptable al matraz de metilación.
- 3.9 Erlenmeyer de 250 ml con tapón provisto de tubo conteniendo sílice desecante.

4. REACTIVOS NECESARIOS

- 4.1 Metanol absoluto (99,8%) calidad reactivo análisis.
- 4.2 Sodio metálico, reactivo para análisis.

4.3 DISOLUCION DE METILATO SODICO APROXIMADAMENTE 0,5 N.

Se toma 1g de sodio metálico, se lava con hexano, y se seca con papel de filtro. Seguidamente se introduce en un erlenmeyer de 250 ml, se agregan 100ml de metanol y se tapa el erlenmeyer con un tapón provisto de tubo con sílice desecante, se deja en reposo hasta disolución total del sodio.

4.4 DISOLUCION, EN METANOL, DE ACIDO CLORHIDRICO ANHIDRO AL 4- 5%

Se puede obtener fácilmente el ácido clorhídrico gaseoso haciendo caer lentamente, en aparato adecuado, ácido sulfúrico ($d=1,84$) sobre una disolución concentrada de ácido clorhídrico ($d=1,18$); se seca el gas haciéndolo pasar por un frasco lavador con ácido sulfúrico y se hace llegar al metanol anhidro, contenido en un erlenmeyer. Se pesa el erlenmeyer con el metanol al comienzo de la operación y, por pesadas sucesivas se determina la cantidad disuelta del clorhídrico, prolongando la operación hasta alcanzar una concentración superior a la deseada. Una vez determinada por pesada la concentración final, se calcula la cantidad necesaria de metanol para llevar la concentración deseada al 4 ó 5 %, que se adiciona seguidamente.

4.5 Heptano normal, de pureza adecuada para cromatografía gaseosa.

4.6 Disolución acuosa saturada de cloruro sódico reactivo para análisis.

4.7 Erucato de metilo (docosenoato de metilo), patrón para cromatografía gaseosa, con una riqueza mínima del 99,5 %.

4.8 Lignocerato de metilo (tetracosanoato de metilo), patrón para cromatografía, con una riqueza mínima del 99 %.

Nota 1. En lugar del erucato y lignocerato de metilo se pueden utilizar como patrones los ácidos libres, siempre que tengan un mínimo de pureza del 99%.

En este caso, para determinar el factor de respuesta erucato/lignocerato, se deberán tomar los volúmenes de soluciones patrones que se indican en el apartado 5.2 recogidos en un matraz de metilación; se elimina el disolvente con una corriente de nitrógeno puro y seco y se metila adicionando 10 ml de solución clorhídrica de metanol e hirviendo a reflujo durante una hora. Se sigue como se indica en el apartado 5.3 pero omitiendo la adición de metilato sódico.

4.9 Solución patrón de erucato de metilo, en heptano, conteniendo 2 mg/ml.

4.10 Solución patrón de lignocerato de metilo, en heptano, conteniendo 2 mg/ml.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra que se utiliza debe estar seca y libre de sedimentos constituidos por materias extrañas. Si no fuese así, se filtrará previamente por un papel de filtro, agregando, si fuese necesario, una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro para retener la humedad. Si los sedimentos estuviesen constituidos por materia grasa sólida, se fundirá, calentando suavemente la muestra, agitando lo necesario para conseguir su homogenización.

5.2 DETERMINACION DEL FACTOR DE RESPUESTA PARA EL ERUCATO DE METILO EN RELACION AL LIGNOCERATO DE METILO

Se toma, con una pipeta, 1 ml de solución patrón de erucato de metilo (apartado 4.9) que se deposita en un matracito cónico de 25 ml, agregando 3 ml, medidos, también, con pipeta, de la solución patrón de lignocerato de metilo (apartado 4.10). Se agregan 4 ml de heptano y se agita suavemente para homogeneizar la mezcla.

Se preparan otras dos soluciones tomando, respectivamente, 2 y 3 ml de la solución de erucato, y añadiendo en cada caso 3 ml de la solución de lignocerato, completando con heptano hasta un volumen total de 8 ml.

Se inyectará 2 µl de cada solución, teniendo en cuenta lo que se señala en el apartado 5.4, determinando las respuestas del detector para los picos del erucato y lignocerato de metilo.

Se calcula el factor de respuesta del erucato, en cada cromatograma, por la fórmula siguiente:

$$Re = \frac{Ag \cdot Pe}{Ae \cdot Pg}$$

Re= Factor de respuesta.

Ag= Respuesta del ácido lignocérico expresada ya sea en área, "cuentas" del integrador, etc.

Ae= Respuesta del ácido erúico, expresada en las mismas unidades.

Pe= Peso del erucato, en miligramos.

Pg= Peso del lignocerato, en miligramos.

5.3 PREPARACION DE LOS ESTERES METILICOS

En un matraz de metilación seco, se pesan, con precisión de 0,1 mg., 50 mg. de la muestra convenientemente preparada, agregando 3 ml de la solución patrón de lignocerato de metilo (Ver nota 1.) y 10 ml de la solución de metilato sódico. Se agregan 2 ó 3 trocitos de plato poroso, se coloca el refrigerante y se calienta hasta iniciar una ebullición suave, que se mantiene durante una hora. Al cabo de este tiempo y sin interrumpir la ebullición, se agregan, por la boca superior del refrigerante, 10 ml de la solución metanólica de clorhídrico, continuando la ebullición durante 15 min (Ver nota 2)

Al cabo de este tiempo, se deja enfriar el matraz, una vez frío, se quita el refrigerante, adicionando 5 ml de heptano; se tapona el matraz, agitando fuertemente durante un minuto. Se adiciona solución acuosa saturada de cloruro sódico hasta situar la capa de heptano en el cuello del matraz.

Nota. 2. Si la muestra analizada está constituida por una grasa neutra como es el caso normal al tratarse de aceite de semillas refinados, y el patrón utilizado es el lignocerato de metilo, bastará efectuar solamente la metilación alcalina, sin que sea necesario la utilización de la solución clorhídrica en metanol.

Según esto, transcurrido el período de ebullición de una hora, después de agregar la solución de metilato, se deja enfriar, se agregan 10 ml de solución acuosa de clorhídrico 1 N y 5 ml de heptano, continuando como se indica en el último párrafo del apartado 5.3.

Si fuese necesaria la metilación de ácidos libres provenientes bien de la muestra o del patrón por utilizar ácido lignocérico, se deberá seguir la metodología completa descrita en el apartado 5.3.

5.4 CROMATOGRAFIA GASEOSA DE LOS ESTERES

Se inyectan 2 µl de la solución de heptano. (Ver nota 3)

Las condiciones operativas más adecuadas deben ser establecidas por el operador a la vista de los resultados obtenidos con las mezclas patrones de ésteres metílicos. Como orientación, y si se utiliza el relleno recomendado en el apartado 3.6, se pueden indicar las siguientes: Temperaturas del inyector, 250°C; temperatura de la columna, 190°C; temperatura del detector, 250°C. El flujo de nitrógeno deberá ser regulado para obtener un tiempo de retención para el lignocerato de unos 17 min., obteniéndose normalmente esta retención con 30-40 ml/min.

Se determina la respuesta del detector para los picos del erucato y el lignocerato por cualquiera de los procedimientos que se utilizan con este fin.

Nota 3. Ajustándose estrictamente a las condiciones operativas indicadas en todo el curso de la metodología, la cantidad inyectada de erucato y lignocerato no debe sobrepasar, en cada caso, de 10, µg. En cualquier caso, para obtener una respuesta cuantitativa correcta, este límite no debe sobrepasarse, sirviendo los resultados obtenidos en la determinación del factor de respuesta, tal como se describe en el apartado 5.2, para apreciar los límites de linealidad en la respuesta del detector.

6. CALCULOS

$$\text{Porcentaje de ácido erúico en el aceite} = \frac{A_e \cdot P_p \cdot R_e}{A_p \cdot P_m} \cdot 100$$

Ae= Respuesta del ácido erúico expresado ya sea en área, "cuentas" del integrador, etc.

Ap= Respuesta del patrón (lignocerato) expresado en las mismas unidades.

Pp= Peso del patrón, en mg.

Pm= Peso de la muestra de aceite, en miligramos.

Re= Factor de respuesta del erucato de metilo en relación al lignocerato de metilo, determinado como se indica en el apartado 5.2

-FIN DE LA NORMA-