

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
2281:2002**

**ACEITES Y GRASAS VEGETALES.
DETERMINACIÓN DEL PERFIL
DE ÁCIDOS GRASOS
E ÍNDICE DE IODO
POR CROMATOGRFÍA DE GASES**

(2^{da} Revisión)



FONDONORMA

GOVERNIO
VENEZUELA

NORMA
VEN 2281:1998

MINISTERIO DEL PODER EJECUTIVO
COMISIÓN NACIONAL DE NORMALIZACIÓN

PRÓLOGO

La presente norma sustituye totalmente a la Norma Venezolana COVENIN 2281:1998 **Aceites y grasas vegetales. Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases**, fue revisada de acuerdo a las directrices del Comité Técnico de Normalización **CT10 Productos Alimenticios**, por el Subcomité Técnico **SC13 Aceites y grasas**, a través del convenio para la elaboración de normas suscrito entre **ASOGRASA** y **FONDONORMA**, siendo aprobada por **FONDONORMA** en la reunión del Consejo Superior N° 2002-07 de fecha 31/07/2002.

En la revisión de esta norma participaron las siguientes entidades: Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Universidad Simón Bolívar, CIEPE, Alimentos Kraft, ASOGRASAS, Cargill de Venezuela; COPOSA, Industrias Diana, Instituto Nacional de Higiene, Instituto Nacional de Nutrición, MAVESA, C.A. Bananera Venezolana; Remavenca.



COMISIÓN NACIONAL DE NORMALIZACIÓN
MINISTERIO DEL PODER EJECUTIVO

NORMA VENEZOLANA
ACEITES Y GRASAS VEGETALES.
DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS
GRASOS E ÍNDICE DE IODO POR
CROMATOGRAFÍA DE GASES

COVENIN
2281:2002
(2^{da} Revisión)

1 OBJETO

1.1 Esta Norma Venezolana contempla la determinación del índice de iodo a partir de la composición de los ácidos grasos determinados por cromatografía de gases en grasas y aceites vegetales o de origen animal.

1.2 El método es aplicable a los ésteres metílicos de los ácidos grasos de aceites y grasas vegetales o animales que contienen entre 8 y 24 átomos de carbono y permite la separación y cuantificación de mezclas que contengan ésteres metílicos, ácidos grasos saturados e insaturados.

1.3 Las condiciones especificadas en estos métodos no son apropiadas para determinar ácidos grasos que contengan grupos epóxidos, oxidados o polimerizados.

2 REFERENCIAS NORMATIVAS

La siguiente norma contiene disposiciones que al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Venezolana. La edición indicada estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquéllos que realicen acuerdos en base a ella, que analicen la conveniencia de usar la edición más reciente de la norma citada seguidamente.

COVENIN 635-1997. Grasas y aceites vegetales. Preparación de la muestra para análisis.

COVENIN 1190:1996 Aceites y grasas vegetales. Muestreo

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta Norma Venezolana COVENIN se aplica a la siguiente definición:

3.1 Índice de iodo de un aceite o grasa

Es una medida de la instauración de las grasas y aceites y se expresa en términos del número de centigramos de iodo absorbidos por gramo de muestra.

4 PRINCIPIO

El método de ensayo descrito en la presente norma se basa en el cálculo del índice de iodo a partir de la composición de los ácidos grasos obtenida por cromatografía de gases.

5 MATERIALES Y APARATOS

5.1 Viales de 5 ó 10 ml con tapa de rosca

5.2 Papel de filtro Whatman N° 1 de 7 cm o equivalente.

5.3 Microjeringa de 1,0 a 10,0 μ l de capacidad con volumen conocido y reproducible.

5.4 Solución jabonosa Lauril sulfato al 5 %.

5.5 Cronómetro.

5.6 Plancha de calentamiento rápido.

5.7 Succionador automático de pipetas.

5.8 Condensador de agua.

5.9 Matrazes de fondo redondo de 50 ml de capacidad, con juntas esmeriladas 24 / 40.

5.10 Vasos de precipitados de 50 ml, 250 ml y 1000 ml.

5.11 Pipeta graduada de 1 ml.

5.12 Embudo de separación de 50 ml.

5.13 Embudo pequeño de vidrio.

5.14 Balones de ebullición de fondo redondo de 50 ml o 125 ml.

5.15 Cromatógrafo de gases con horno capaz de mantener y programar la temperatura de operación entre 40 °C y 300 °C ±. Puerto de inyección: calentado independientemente hasta la temperatura alrededor de 50 °C por encima de la temperatura inicial del horno. El detector, debe mantenerse alrededor de 50 °C por encima de la temperatura final de la columna.

5.16 Columnas de 1,5 a 3 m (5 a 10 pies) con un diámetro externo entre 3 y 6 mm (1/8 a 1/4 pulgada); de acero inoxidable, vidrio, cobre o aluminio; empacada con una fase líquida de EGSS-X al 10 % impregnada sobre Chromosorb W 80 -100 mesh lavado con ácido, o columnas capilares de 0,1 mm hasta 0,53 mm diámetro interno con la fase líquida polar adecuada para análisis.

5.17 Registrador, cualquier registrador integrador o sistema computarizado que cumpla con las especificaciones de voltaje de salida del cromatógrafo (típicamente 0 - 1 V).

5.18 Gases

5.18.1 Gas de arrastre, gas transportador o fase móvil. Para el detector de conductividad térmica debe usarse helio (He) con una pureza mínima de 99,95 %. Para el detector de llama ionizable debe usarse helio, nitrógeno, hidrógeno, o argón, con una pureza mínima de 99,95 %.

5.18.2 Otros gases: mezcla combustible para el detector de llama ionizable. Debe usarse hidrógeno (H₂) con un mínimo de 99,95 % de pureza y aire seco y limpio con 99,90 % de pureza.

5.19 Medidor de flujo de burbuja de jabón o rotámetro calibrado. Una bureta de 50 ml acoplada a un brazo lateral que a su vez esté conectado a la salida del detector mediante que manguera flexible y por el fondo a una pera que contenga solución jabonosa para que libere la burbuja de jabón que va a ser impulsada por el gas y con un cronómetro se determina el flujo de gas de arrastre en ml / min.

6 REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de grado analítico a menos que se especifique lo contrario

6.1 Metanol

6.2 Solución metanólica de hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 N. Pesar 20 g ó 25 g de hidróxido de sodio y diluir a 1000 ml con metanol. Valorar con solución de biftalato de potasio.

6.3 Ácido perclórico al 70%, trifluoruro de boro (BF₃) al 14 % en metanol o ácido sulfúrico (H₂SO₄). Utilizar el reactivo de acuerdo al método a emplear.

6.4 Sulfato de sodio anhidro, Na₂SO₄

6.5 Éter de petróleo o heptano, grado cromatográfico.

6.6 Solución anaranjado de metilo al 1% en metanol.

6.7 Solución saturada de cloruro de sodio.

6.7.1 Agregar una cierta cantidad de cloruro de sodio a 100 ml de agua destilada caliente. La solución saturada se indica por la presencia de cristales no disueltos en la solución.

6.8 Patrones de referencia de ésteres de ácidos grasos puros o de mezclas de composición conocida, metilados o no de grado cromatográfico.

6.9 Preparación del reactivo de derivatización (solución para metilación). Mezclar 50 ml de solución 0,5 N de metóxido de sodio en metanol con 50 ml éter etílico en un recipiente con tapa de rosca.

7 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

7.1 Pesarse por lo menos 10 g de muestra y colocar en un matraz Erlenmeyer. Si es posible colocar nitrógeno en el espacio libre del recipiente para minimizar la oxidación del aceite, colocarlo cerrado en un baño de agua, baño de vapor o estufa, agitar el contenedor ocasionalmente y calentar a la más baja temperatura que sea posible hasta que la muestra esté completamente fundida.

7.2 Tomar la cantidad de muestra indicada de acuerdo al método de metilación (véase nota 1)

NOTA 1: En el caso que la muestra sea líquida tomar la muestra directamente y en el caso de muestras sólidas aplica la Norma Venezolana COVENIN 635.

8 MÉTODOS DE ENSAYO

8.1 Método del ácido perclórico para ácidos grasos de cadena larga

8.1.1 Pesarse 0,5 g de la muestra (± 15 gotas) en un matraz de fondo redondo con cuello esmerilado (véase nota 2).

NOTA 2: En el caso de trabajo con columnas capilares se puede disminuir la cantidad de muestra siempre y cuando la cantidad que se tome sea representativa.

8.1.2 Agregar 0,8 ml de la solución de hidróxido de sodio 0,5 N, utilizar la pipeta y el succionador automático.

8.1.3 Acoplar el condensador al matraz y calentarlo en un baño de agua hirviendo. Es esencial que el agua esté hirviendo.

8.1.4 Dejar por 10 min o más, hasta reacción completa (desaparición de glóbulos de aceite).

8.1.5 Agregar 0,8 ml de ácido perclórico (utilizando pipeta y el succionador automático), por la parte superior del condensador.

8.1.6 Dejar reaccionar 10 min y luego añadir 10 ml de éter de petróleo, por la parte superior del condensador. Mantener en ebullición por 2 min. más.

8.1.7 Desacoplar el matraz del condensador, transferir el líquido al embudo de separación, lavar el matraz con agua destilada fría y pasarlo al embudo. Agregar 40 ml de solución saturada de cloruro de sodio y agitar.

8.1.8 Descartar la fase acuosa del embudo de separación y lavar varias veces hasta obtener reacción neutra.

8.1.9 Descartar el agua y ácidos grasos disueltos en el éter, pasarlos a un vaso de precipitado de 50 ml. Añadir 1 g de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para desecar y filtrar a través de papel de filtro. Recoger el filtrado en un vial con tapa de rosca. Identificar la muestra.

8.1.10 Esta mezcla puede ser inyectada inmediatamente en el cromatógrafo de gases. De no ser así, mantener la muestra bajo refrigeración hasta que vaya a ser analizada.

8.2 Método del trifluoruro de boro

El peso de la muestra no es necesario conocerlo con exactitud, solamente es necesario el peso aproximado para determinar el tamaño del balón de ebullición y la cantidad de reactivos que deben ser utilizados de acuerdo a la siguiente tabla:

Muestra (mg)	Frasco (ml)	Hidróxido de Sodio 0,5 N (ml)	Reactivo Trifluoruro de Boro: Metanol (ml)
100 - 250	50,00	4,00	5,00
250 - 500	50,00	6,00	7,00
500 - 750	125,00	8,00	9,00
750 - 1000	125,00	10,00	12,00

8.2.1 Para ácidos grasos

8.2.1.1 Al balón de fondo redondo agregar aproximadamente 300 mg de la muestra respectivamente.

8.2.1.2 Al balón en 8.2.1.1. agregar 7 ml de trifluoruro de boro : metanol.

8.2.1.3 Colocar los balones en reflujo en un baño por dos minutos e inmediatamente agregar 5 ml de n - heptano a través del tope del condensador y que ebulle por un minuto adicional.

8.2.1.4 Retirar los balones del calor y dejarlos enfriar a temperatura ambiente.

8.2.1.5 Agregar solución saturada de sal a los balones con agitación hasta llevar el nivel al cuello de los balones. Tomar entre 1 ml a 2 ml de la capa orgánica y transferirlos a viales que contengan sulfato de sodio anhidro.

8.2.1.6 Inyectar 0,5 µl de la solución seca de heptano directamente al cromatógrafo.

8.2.2 Para grasas y aceites

8.2.2.1 Al balón fondo redondo agregar aproximadamente 300 mg de la muestra respectivamente

8.2.2.2 A los balones 8.2.2.1 agregar 6 ml de 0,5 N NaOH en metanol anhidro.

8.2.2.3 Colocar los balones en reflujo en un baño o equivalente hasta que los glóbulos de grasa se disuelvan, este paso debe tomar entre 5 min. - 10 min., usualmente dejar por 10 min.

8.2.2.4 Agregar 7 ml de trifluoruro de boro: metanol por encima del condensador y dejar bajo reflujo por dos minutos.

8.2.2.5 De la misma manera que en 8.2.2.4, agregar 5 ml de n - heptano y dejar en reflujo por un min.

8.2.2.6 Dejar enfriar a temperatura ambiente, agregar la solución saturada de cloruro de sodio hasta el cuello y trasladar de 1 - 2 ml de la capa superior a viales con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄). En el caso de no tener sulfato de sodio utilizar sulfato de potasio seco.

8.2.2.7 Esta mezcla puede ser inyectada inmediatamente en el cromatógrafo de gases. De no ser así, mantener la muestra bajo refrigeración hasta que vaya a ser analizada.

8.3 Método de metóxido de sodio

8.3.1 Colocar un tubo de ensayo vacío de 13mm x 100mm en un bloque de calentamiento a 50 °C por un minuto antes de añadir la muestra

8.3.2 Agregar dos perlas de vidrio en cada tubo de ensayo y transferir dos gotas de muestra al tubo de ensayo dentro del bloque del calentamiento.

8.3.3 Añadir 1,5 ml del reactivo de derivatización, dejar reaccionar por dos minutos, agitar el tubo de ensayo cada 30 seg. y volver a colocar en el bloque.

8.3.4 Después de los dos minutos remover el tubo del calor y añadir 1 ml de heptano ó hexano y llenar el tubo con solución saturada de cloruro de sodio, tapar el tubo y agitar vigorosamente por 15 seg., dejar separar las fases y transferir con una pipeta pasteur la capa de arriba a un vial de 2 ml con alrededor de 100 mg de

sulfato de sodio anhidro y colocar una tapa. La muestra esta lista para análisis por cromatografía de gas (véase nota 3)

NOTA 3: En el caso de análisis con columnas capilares se puede aumentar la cantidad de heptano o hexano añadido hasta 5 ml para ajustar la concentración de la muestra.

8.3.5 Esta mezcla puede ser inyectada inmediatamente en el cromatógrafo de gases. De no ser así, mantener la muestra bajo refrigeración hasta que vaya a ser analizada.

8.4 Determinación cromatográfica

8.4.1 Cuando estén presentes ésteres de ácidos grasos de cadena larga, debe aumentarse el flujo de gas de arrastre y/o la temperatura de la columna, de manera que el tiempo de retención del último componente se reduzca.

Para determinaciones de ácidos grasos menores de C₁₂ se necesitan temperaturas más bajas de la columna, la temperatura programada es útil, en tales casos, si el aparato no tiene temperatura programable, debe operarse a dos temperaturas fijas entre 100 °C y 195 °C.

8.4.2 Inyectar entre 0,5 µl y 2 µl de la muestra en el cromatógrafo de gases.

8.5 Identificación

Analizar los patrones de referencia de ésteres metílicos de ácidos grasos bajo las mismas condiciones de operación de la muestra. Determinar el tiempo de retención de cada uno de los ésteres metílicos, tomándose como valores de referencia para la identificación de sus homólogos en la muestra. Deben evitarse las condiciones que permitan "picos superpuestos".

9 CÁLCULOS

Usar el método de normalización, el cual supone que todos los componentes de la muestra están en el cromatograma, de manera que la suma de las áreas bajo los picos representa el 100 %. Determinar el área de cada pico.

Tomar un ácido como referencia (tiempo de retención absoluto), generalmente el esteárico C_{18:0}, el tiempo de retención absoluto o factor de respuesta absoluto del esteárico va a ser divisor para obtener el tiempo de retención relativo o factor de respuesta relativo:

Ejemplos

Ácido	Tiempo retención de absoluto (min)	Tiempo de retención relativo (min)
C _{16:0}	3.1	3,1 / 5,2 = 0,6
C _{18:0}	5.2	5,2 / 5,2 = 1,0
C _{18:1}	5.9	5,9 / 5,2 = 1,13

Con los tiempos de retención relativos se identifican los ésteres metílicos que contengan la muestra y el aparato registra las áreas (composición porcentual de los ácidos grasos de la muestra) por lo cual se pueden cuantificar relativamente.

Uso de la triangulación: Se dibujan líneas perpendiculares a la tangente de cada pico y que intercepten la línea base. Se calcula el área del triángulo resultante multiplicando la altura (corregida para cada cambio en atenuación) por la mitad de la base. Para picos automáticamente atenuados se obtiene el ancho del pico trazando tangentes a los lados externos (estas debe ser completas a lo largo de la carta y por lo menos 2/3 partes del pico debe ser usadas) e interceptando la línea de base. Calcular el área, multiplicando la altura por la mitad de la base. (véase nota 4)

NOTA 4: Los equipos disponibles en el mercado efectúan estas operaciones en forma automática.

10 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

10.1 La composición relativa en ácidos grasos de la muestra se expresa en porcentaje de área p/p en orden creciente de número de átomos de carbono.

10.2 Para calcular el índice de yodo de los Triglicéridos, multiplique el porcentaje de cada uno de los ácidos grasos indicados a continuación por el factor y sume los resultados:

Índice de yodo de Triglicéridos

Ácido Hexadecanóico	C16:1 (Ácido Palmitoléico) x 0.950
Ácido Octadecanóico	C18:1 (Ácido Oléico) x 0.860
Ácido Octadecadienóico	C18:2 (Ácido Linoléico) x 1.732
Ácido Octadecatrienóico	C18:3 (Ácido Linolénico) x 2.616
Ácido Eicosenoico	C20:1 (Ácido Gadoléico) x 0.785
Ácido Docosenoico	C22:1 (Ácido Erucico y Cetoléico) x 0.723

10.3 Para calcular el índice de yodo de los ácidos grasos libres, multiplique el porcentaje de cada uno de los ácidos grasos indicados a continuación por el factor y sume los resultados

Índice de yodo de Ácidos Grasos Libres

Ácido Hexadecanóico	C16:1 (Ácido Palmitoléico) x 0.990
Ácido Octadecanóico	C18:1 (Ácido Oléico) x 0.8986
Ácido Octadecadienóico	C18:2 (Ácido Linoléico) x 1.810
Ácido Octadecatrienóico	C18:3 (Ácido Linolénico) x 2.735
Ácido Eicosenoico	C20:1 (Ácido Gadoléico) x 0.8175
Ácido Docosenoico	C22:1 (Ácido Erucico y Cetoléico) x 0.7497

10.3 El resultado obtenido en los puntos 10.2 y 10.3 es el índice de yodo, se expresa como centigramos de yodo absorbido por gramo de muestra

11 INFORME

El informe debe contener lo siguiente:

- 11.1 Fecha de realización del ensayo
- 11.2 Identificación completa de la muestra
- 11.3 Resultado del análisis realizado
- 11.4 Número y título de la Norma Venezolana COVENIN consultada
- 11.5 Nombre del analista
- 11.6 Observaciones

BIBLIOGRAFÍA

American Oil Chemists Society (AOCS) Método tentativo Ce 1- 62 Rev. 1970 y Ce 2 - 66 Rev. 1969

AOAC. Ed XVI, Vol. II, Capt. 41 pto. 969.33. 1995.

Bannon, C.D, G.J. Breen , J.D. Craske, N.T Hai, N.L. Harper and K.I. O' Rourke. J. Chromatogr. 247:71. 1982.

Craske J.D, C.D. Bannon and L.M. Morman Journal AOCS. 65:262. 1988

Mavrikos, P.J. and Eliopoulos, G. Preparation of methyl esters of long chain fatty acids. Journal AOCS 50 (5) : 174, 1973

Participaron en la segunda revisión: Benavente, Héctor; Chacín, Yulay; Dávila, Saskia; Dramiński, Wojciech; Gil, Wilma; González, Mario; Noguera, Deinny; Rodríguez, Julio Cesar; Rosa, Yadira; Useche, Morelia; Valle, María Teresa.

Participaron en la revisión de esta norma: Benavente, Hector; Chacín, Yulay; Dramiński, Wojciech; Gil, Wilma; González, Mario; Linares, Oscar; Moreán, Gilberto; Rosa, Yadira; Silva, Richard; Useche, Morelia.



COVENIN
2281:2002

CATEGORÍA
B

FONDONORMA
Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12
Telf. 575.41.11 Fax: 574.13.12
CARACAS

publicación de:



FONDONORMA

I.C.S: 67.200.10

ISBN: 980-06-3021-X

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS
Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.

Descriptores: Aceite, grasa vegetal, perfil de ácidos grasos, índice de iodo, cromatografía de gases.