

Determinación de absorción de luz UV a 232 nm, composición de ácidos grasos, trilinoleína y triglicéridos con número equivalente de carbonos igual a 42, en aceites de oliva y de orujo de oliva: Determinación de precisión de los métodos analíticos mediante el estudio estadístico de los resultados de un análisis colaborativo.

Por **A. Cert, W. Moreda, M. León-Camacho y M. C. Pérez-Camino**

Instituto de la Grasa. Avda. Padre García Tejero, 4. E-41012 Sevilla. España

RESUMEN

Determinación de absorción de luz UV a 232 nm, composición de ácidos grasos, trilinoleína y triglicéridos con número equivalente de carbonos igual a 42, en aceites de oliva y de orujo de oliva: Determinación de la precisión de los métodos analíticos mediante el estudio estadístico de los resultados de un análisis colaborativo.

Algunos de los métodos analíticos oficiales de la Unión Europea y del Consejo Oleícola Internacional para determinar características de los aceites de oliva no presentan datos sobre su precisión. Con la participación de 22 laboratorios españoles del gobierno y de la industria, se ha llevado a cabo un estudio colaborativo de los métodos analíticos siguientes: absorción de luz UV, a 232 nm (K232), composición de ácidos grasos, trilinoleína, y triglicéridos con número equivalente de carbonos 42 (NEC42). Los datos de repetibilidad y reproducibilidad se han obtenido mediante estudios estadísticos de los resultados según la norma ISO 5275/1986 (E). También se ha estudiado el efecto de la purificación de los aceites en columna de sílica gel sobre los valores de K232 y triglicéridos. Finalmente se han comparado las composiciones de ácidos grasos obtenidas utilizando los métodos de reacción con potasa alcohólica en frío y de reacción en caliente con metilato sódico.

PALABRAS-CLAVE: Aceite de oliva – Acido graso – Estudio colaborativo – K232 – Precisión – Triglicérido – Trilinoleína.

SUMMARY

Determination of UV absorption at 232 nm, fatty acid composition, trilinolein and triglycerides of 42 equivalent carbon number in olive and olive residue oils: Statistical assessment of the precision characteristics from a collaborative trial.

Some analytical methods for the determination of olive oil characteristics included in the European Union and International Olive Oil Council regulations lack precision data. To overcome such inconvenient a collaborative trial was set up including 22 laboratories from governmental institutions and industries. UV absorption at 232 nm, fatty acid composition, trilinolein and triglycerides with 42 equivalent carbon number were the tried methods. Repeatability and reproducibility data were obtained using the statistical method included in the International Standard ISO 5275/1986 (E). The effect of oil purification through a silica gel column on K232 and triglycerides was also studied. Finally for fatty acid determination, methylations by cold methanolic potash and by heating with methylated sodium were compared.

KEY-WORDS: Collaborative study – K232 – Fatty acid – Olive oil – Precision – Triglyceride – Trilinolein.

1. INTRODUCCIÓN

En los Reglamentos de la Comisión de la Unión Europea, CEE/2568/91, y CEE/1429/92, sobre características de los aceites de oliva y de orujo de oliva y en la Norma Comercial del Consejo Oleícola Internacional (1995) se indican los métodos analíticos a aplicar para la determinación de los parámetros que caracterizan al aceite de oliva en sus diversas categorías. Algunos de estos métodos ya se encuentran estandarizados por la IUPAC, otros se han sometido a ensayos colaborativos (Morchio *et al.*, 1989; Moreda *et al.*, 1995) pudiéndose disponer de datos relativos a su repetibilidad y reproducibilidad y quedan algunos que carecen de datos de precisión. Por este motivo se planteó la necesidad de organizar un nuevo estudio colaborativo, con participación de laboratorios españoles de la administración y de la industria, en el que se aplicasen dichos métodos analíticos y se obtuviesen los datos necesarios para realizar los cálculos estadísticos pertinentes. Se eligieron las determinaciones de absorción de luz UV a 232 nm, composición de ácidos grasos, trilinoleína y triglicéridos de número equivalente de carbonos igual a 42 (NEC42).

La absorción UV a 232 nm (K232) determina la presencia de dienos conjugados en el aceite. Este parámetro se relaciona con la calidad ya que los procesos oxidativos forman hidroperóxidos del ácido linoleico que por descomposición originan dienos conjugados (Rosell, 1986). Se ha observado que la absorción disminuye si se eliminan del aceite los compuestos polares mediante el paso del aceite a través de una columna de sílice. En previsión de futuras investigaciones que pudiesen recomendar la determinación del K232 después de pasar el aceite por sílica gel, se ha considerado conveniente realizar el estudio de precisión también en los aceites purificados.

La composición de ácidos grasos obtenida por análisis cromatográfico en columna capilar de los

ésteres metílicos, tiene interés para la determinación de la pureza del aceite, por la capacidad de detección de pequeñas cantidades de determinados aceites vegetales (palma, cacahuete, lino). También se ha realizado una comparación de los resultados obtenidos aplicando dos procedimientos para la obtención de los ésteres metílicos: metilación en frío con potasa metanólica y tratamiento en caliente con metilato sódico seguido de calentamiento en medio ácido. El primer método es mucho más rápido y puede aplicarse para la obtención de los ésteres metílicos en la determinación de los isómeros *trans* de los ácidos grasos.

La trilinoleína es un parámetro de pureza que ayuda a detectar aceites de semilla con alto contenido en ácido linoleico (girasol, colza, cártamo). Sin embargo la determinación de este triglicérido puede estar afectada de error puesto que la trilinoleína es un triglicérido que en el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) origina un pico muy pequeño dentro de un grupo de triglicéridos de número equivalente de carbonos igual a 42. Por otra parte hay aceites de oliva genuinos que tienen un contenido en trilinoleína superior al límite máximo establecido. Para evitar estos inconvenientes, el Consejo Oleícola Internacional (COI) ha propuesto sustituir la determinación de trilinoleína por el cálculo de la diferencia entre la suma de los porcentajes de los triglicéridos de NEC42 determinados experimentalmente por CLAE y el calculado teóricamente a partir de la composición de ácidos grasos, suponiendo una disposición en el triglicérido 1,3-al azar, 2-al azar.

Para la determinación de trilinoleína o de triglicéridos NEC42 en aceites de oliva lampantes y de orujo crudo, debe purificarse previamente el aceite pasándolo a través de columnas de sílica gel. El procedimiento descrito en el reglamento CEE/1996/92 es muy largo puesto que exige comprobar la constancia de la composición de los ácidos grasos. En el presente trabajo se ensaya un nuevo método de purificación propuesto por León y Cert (1994) y se comparan las composiciones de ácidos grasos antes y después de dicho proceso.

2. PARTE EXPERIMENTAL

El estudio colaborativo se planteó siguiendo las indicaciones dadas por W. Horwitz (1988). A cada laboratorio participante se le enviaron 8 muestras identificadas con claves que correspondían a duplicados de 2 tipos de aceites de oliva y 2 tipos de aceite de orujo de oliva (Tabla 1). A la muestra de aceite de orujo refinado se le añadió aceite de girasol refinado para obtener un mayor valor de trilinoleína. La adición de pequeñas cantidades de aceite de girasol alto oleico (AO) y de oliva refinado se debe a que las muestras se utilizaron para otras determinaciones cuyos resultados no se incluyen en el presente trabajo. La remisión de duplicados con código diferente tuvo por objeto evaluar la repetibilidad del método.

Tabla 1
Descripción de las muestras

Código	Aceite	Acidez (%)	LLL (%)
1 y 4	Orujo de oliva crudo + 5% oliva refinado + 3% girasol AO	10,8	≈ 0.5
2 y 8	Oliva refinado + 1% girasol AO	0,41	≈ 0.2
3 y 7	Oliva lampante + 1% girasol AO	3,8	≈ 0.2
5 y 6	Orujo de oliva refinado + 1,5% girasol refinado	0,20	≈ 0.8 0.5 orujo ref. 0.3 girasol

Junto a las muestras se incluía una circular donde se indicaban las determinaciones a realizar, los métodos analíticos a usar y una hoja de resultados con indicación del número de cifras decimales con que debían expresarse cada uno de ellos. Los métodos analíticos recomendados fueron los siguientes:

– Purificación de los aceites por paso a través de columna de sílica gel.

Se ofrecían dos alternativas:

a) Columna de vidrio conteniendo sílica gel (20 g de sílica gel G60, 70-230 mallas, conteniendo 5% de agua) y operada siguiendo en líneas generales el método IUPAC 2.507 para la determinación de componentes polares en grasa de fritura. Una mezcla de 1 g de aceite con 1 ml de líquido de elución se introduce en la parte superior de la columna y se eluye con 150 ml de la mezcla hexano-éter etílico 87:13 a un flujo aproximado de 3 ml/min. El eluido se evapora a presión reducida y temperatura ambiente y el residuo constituye el aceite purificado.

b) Extracción en fase sólida (EFS) en columnas tipo Sep-Pack de 1 g de sílice. Se activa una columna Sep-Pack con 3 ml de hexano. Se añaden a la columna 200 µl de una mezcla aceite-hexano 1:1 y se eluye con 15 ml de la mezcla hexano-éter etílico 9:1 aplicando vacío. Se recoge el eluido y se evapora a presión reducida. Para reutilizar la columna en una nueva extracción, se lava con 5 ml de cloroformo-metanol 2:1, a continuación con 5 ml de acetona y se deja aplicando vacío hasta que se seque la fase.

– K232. Medida de la absorción específica a 232 nm de una solución del aceite según reglamento CEE/2568/91 anexo IX.

– Composición de ácidos grasos. Análisis por cromatografía gas-líquido en columna capilar con fase polar de los ésteres metílicos obtenidos por transesterificación (Reglamento CEE/1429/92). La preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos se ha realizado siguiendo en líneas generales el procedimiento de metilación en caliente indicado en el apartado 4.2 del método IUPAC n.º 2.301. El aceite se calienta a reflujo en metanol con metilato sódico, se neutraliza con ácido sulfúrico en metanol al 3%, se acidula ligeramente y se vuelve a calentar a reflujo. A continuación se enfría, se añade agua saturada de sal y se extrae

con hexano. Este método de metilación se comparó con la metilación con potasa alcohólica en frío llevada a cabo siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 5 del ya mencionado método IUPAC. Se disuelven 0,1 g de aceite en 3 ml de hexano, se añaden 0,4 ml de disolución 2N de potasa metanólica, se agita vigorosamente durante 20 segundos y se deja decantar.

– Determinación de trilinoleína (LLL) y triglicéridos de NEC42. Análisis de una solución del aceite en acetona por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) con detector de índice de refracción (Reglamento CEE/2568/91 anexo VIII). Para el cálculo del NEC42 se suman todos los picos correspondientes a triglicéridos con número equivalente de carbonos igual a 42.

– Determinación teórica de triglicéridos NEC42. Se calculan los porcentajes de los triglicéridos LLL, LnLO y LnLP mediante un programa informático, facilitado por el Consejo Oleícola Internacional junto con el Documento COI/T20, que supone una distribución 1,3-al azar 2-al azar de los ácidos grasos en la molécula de glicerina. El NEC42 es la suma de los porcentajes de los tres triglicéridos.

– Repetición de las determinaciones de LLL y NEC42 en los aceites purificados por paso a través de sílica gel según el procedimiento mencionado anteriormente.

El análisis estadístico de repetibilidad y reproducibilidad de los resultados se realizó de acuerdo con la Norma Internacional ISO 5275/1986 (E) donde se indican los criterios usados tanto para el rechazo de resultados como los procedimientos matemáticos seguidos. Como criterio de verificación de resultados anómalos se usaron los métodos de Cochran y Dixon, determinando respectivamente laboratorios que dan resultados cuya diferencia entre valores es excepcionalmente alta y laboratorios que dan valores que son significativamente diferentes a los aportados por los demás.

Los parámetros estadísticos utilizados fueron los siguientes:

S_r : Desviación estándar de la repetibilidad.

r : Repetibilidad ($2.8\sqrt{S_r^2}$).

RSD_r : Desviación estándar relativa de la repetibilidad.

S_R : Desviación estándar de la reproducibilidad.

R : Reproducibilidad ($2.8\sqrt{S_R^2}$).

RSD_R : Desviación estándar relativa de la reproducibilidad.

Ho_R : Índice Horrat $\left[\frac{RSD_{R\text{ exp}}}{RSD_{R\text{ teor}}} \right]$ donde $RSD_{R\text{ teor}} = 2^{(1-0.5 \log C)}$

siendo C la concentración del analito expresada en potencias de 10.

que los valores obtenidos por dos laboratorios diferentes sobre una misma muestra, utilizando el mismo método analítico, no diferirán en más del valor de R .

También cabe destacar el significado del índice Horrat (Horowitz ratio) que tiene en cuenta el orden de magnitud de la concentración del analito. Se calcula mediante el cociente entre la RSD_R experimental y la teórica, de tal manera que valores iguales o menores que 1 indican que el método analítico tiene una buena reproducibilidad (Pocklington, 1991).

Para la comparación de los métodos de metilación de los ácidos grasos, así como de la composición de ácidos grasos antes y después de purificar se empleó el análisis estadístico de varianza (ANOVA) con medidas repetidas completamente al azar, considerándose significativas las diferencias con significancia mayor del 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis colaborativo participaron un total de 22 laboratorios de los cuales no todos realizaron todas las determinaciones. En las Tablas 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la absorción UV a 232 nm a las muestras de aceite sin purificar y purificado por paso a través de una columna de sílica gel, respectivamente. La purificación la llevaron a cabo los laboratorios por el método de la columna de sílica gel.

Tabla 2

Parámetros estadísticos para absorción UV a 232 nm (K232) en muestras *sin purificar*

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	20	20	20	20
Laboratorios rechazados	1	2	3	3
Valor medio	4,19	2,74	2,85	3,34
Repetibilidad				
S_r	0,177	0,051	0,060	0,034
r	0,50	0,14	0,17	0,10
RSD_r (%)	4,23	1,86	2,09	1,02
Reproducibilidad				
S_R	0,420	0,234	0,213	0,209
R	1,17	0,66	0,60	0,59
RSD_R (%)	10,02	8,57	7,46	6,25

De estos datos se concluye que tanto la repetibilidad del método (RSD_r , 1-4,2%) como la reproducibilidad (RSD_R , 6,2-10%) son buenas en las determinaciones directas sobre el aceite. El paso de la purificación introduce una disminución de la repetibilidad (RSD_r ,

Tabla 3

Parámetros estadísticos para absorción UV a 232 nm (K232) en muestras purificadas

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	16	16	16	16
Laboratorios rechazados	1	2	3	0
Valor medio	1,71	1,68	1,30	2,42
Repetibilidad				
S_r	0,135	0,062	0,027	0,054
r	0,38	0,17	0,08	0,15
RSD_r (%)	7,91	3,67	2,10	2,23
Reproducibilidad				
S_R	0,172	0,144	0,128	0,270
R	0,48	0,40	0,36	0,76
RSD_R (%)	10,04	8,59	9,82	11,16

2,1-7,9%) aunque la reproducibilidad apenas se reduce (RSD_R , 8,6-11,2%) probablemente como consecuencia de que los valores medios se reducen en cantidades importantes. En consecuencia se puede afirmar que la determinación del K232 previa purificación del aceite muestra una reproducibilidad aceptable.

En las Tablas 4 a 16 recogen los estadísticos del análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos. En las determinaciones de los ácidos que se encuentran en pequeña proporción, tales como mirístico, palmitoleico, margárico, margaroleico, aráquico, eicosenoico, behénico y lignocérico, las desviaciones estandar relativas alcanzan a veces valores altos, sobre todo en los ácidos C14:0 (RSD_r de 27%; RSD_R de 41%) y C24:0 (RSD_r de 18%; RSD_R de 29%). En el primer ácido ello es debido a que las concentraciones son muy bajas ($\approx 0,02\%$) y en el segundo que es un pequeño pico cromatográfico de alto tiempo de retención. Sin embargo los índices Horrat están alrededor de 1 lo que indica que las determinaciones tienen una precisión que se puede considerar normal. Las determinaciones de los restantes ácidos, al ser estos muy abundantes, se llevan a cabo con notable precisión según indican los valores inferiores a 0,5 de los índices Horrat.

Las composiciones en ácidos grasos de las muestras de orujo crudo y de oliva lampante, que tienen un alto grado de acidez (10,8% y 3,8% respectivamente), se obtuvieron utilizando los procedimientos de metilación en caliente y en frío descritos en la parte experimental y realizando análisis por duplicado en cada uno de ellos. El análisis de varianza de los resultados no mostró diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos de metilación a pesar de la presencia de gran cantidad de ácidos libres. Este hecho sugiere que el método de metilación en frío es también aplicable a aceites de oliva y de orujo con un grado de hidrólisis elevado.

Tabla 4

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido mirístico (C14:0)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	20	20	19	20
Laboratorios rechazados	1	1	0	0
Valor medio (%)	0,026	0,020	0,020	0,026
Repetibilidad				
S_r	0,003	0	0,006	0,003
r	0,009	0	0,015	0,009
RSD_r (%)	12,26	0	27,09	12,40
Reproducibilidad				
S_R	0,007	0,005	0,008	0,006
R	0,020	0,013	0,023	0,018
RSD_R (%)	27,20	22,84	41,38	24,42
Ho_R	1,0	0,8	1,4	0,9

Tabla 5

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido palmítico (C16:0)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	22	22	22	22
Laboratorios rechazados	2	1	2	0
Valor medio (%)	11,01	10,81	10,68	11,01
Repetibilidad				
S_r	0,196	0,191	0,153	0,183
r	0,55	0,53	0,43	0,51
RSD_r (%)	1,78	1,77	1,44	1,66
Reproducibilidad				
S_R	0,379	0,481	0,454	0,480
R	1,06	1,35	1,27	1,34
RSD_R (%)	3,44	4,45	4,25	4,36
Ho_R	0,3	0,4	0,4	0,4

Tabla 6

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido palmitoleico (C16:1)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	22	22	22	22
Laboratorios rechazados	3	2	1	0
Valor medio (%)	0,781	0,740	0,768	0,776
Repetibilidad				
S_r	0,020	0,019	0,033	0,018
r	0,055	0,054	0,092	0,050
RSD_r (%)	2,52	2,60	4,30	2,31
Reproducibilidad				
S_R	0,112	0,094	0,089	0,085
R	0,314	0,264	0,249	0,239
RSD_R (%)	14,38	12,75	11,56	11,01
Ho_R	0,9	0,8	0,7	0,7

Tabla 7

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido margárico (C17:0)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	21	21	21	21
Laboratorios rechazados	0	3	3	3
Valor medio (%)	0,083	0,122	0,124	0,073
Repetibilidad				
S_r	0,009	0,006	0,003	0,005
r	0,023	0,018	0,009	0,013
RSD_r (%)	10,13	5,17	2,57	6,18
Reproducibilidad				
S_R	0,016	0,007	0,010	0,008
R	0,044	0,020	0,028	0,023
RSD_R (%)	19,06	5,82	8,04	11,54
Ho_R	0,8	0,3	0,4	0,5

Tabla 8

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido margoleico (C17:1)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	22	22	21	22
Laboratorios rechazados	3	3	0	2
Valor medio (%)	0,120	0,183	0,193	0,099
Repetibilidad				
S_r	0,006	0,006	0,009	0,003
r	0,015	0,018	0,025	0,009
RSD_r (%)	4,57	3,44	4,62	3,24
Reproducibilidad				
S_R	0,015	0,011	0,017	0,018
R	0,042	0,031	0,047	0,050
RSD_R (%)	12,30	6,00	8,67	18,12
Ho_R	0,6	0,3	0,4	0,8

Por el contrario, el paso del aceite a través de sílica gel originó una pequeña disminución del porcentaje de ácido linoleico en una cantidad promedio del 0,21%, siendo esta variación estadísticamente significativa (nivel de probabilidad $p=0,035$). En los porcentajes de los restantes ácidos no se apreciaron diferencias.

En la determinación de LLL por CLAE, tanto en los aceites iniciales como después de la purificación por paso a través de sílica gel (Tabla 17 y 18 respectivamente), la precisión es buena puesto que los índices Horrat están por debajo de 0,8. Como consecuencia de la purificación se observan disminuciones del valor medio en las muestras de orujo crudo (0,114%), de oliva lampante (0,024%) y de orujo refinado (0,040%),

Tabla 9

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido esteárico (C18:0)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	22	22	22	22
Laboratorios rechazados	3	1	2	0
Valor medio (%)	3,063	3,074	3,266	2,823
Repetibilidad				
S_r	0,028	0,038	0,063	0,019
r	0,079	0,106	0,177	0,052
RSD_r (%)	0,92	1,23	1,97	0,66
Reproducibilidad				
S_R	0,146	0,148	0,176	0,151
R	0,409	0,415	0,493	0,423
RSD_R (%)	4,77	4,82	5,46	5,35
Ho_R	0,4	0,4	0,4	0,4

Tabla 10

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido oleico (C18:1)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	22	22	22	22
Laboratorios rechazados	1	1	1	0
Valor medio (%)	72,784	73,517	74,282	71,533
Repetibilidad				
S_r	0,352	0,234	0,366	0,193
r	0,985	0,654	1,023	0,540
RSD_r (%)	0,48	0,32	0,49	0,27
Reproducibilidad				
S_R	0,851	0,695	0,845	0,702
R	2,383	1,945	2,365	1,966
RSD_R (%)	1,17	0,95	1,14	0,98
Ho_R	0,1	0,1	0,1	0,1

así como una constancia en la muestra de oliva refinada. Estas disminuciones que no son proporcionales al valor medio de la LLL, no pueden atribuirse a la pequeña pérdida de ácido linoleico (0,21%), puesto que ello afectaría a todas las muestras; por el contrario, esta pérdida es consecuente con la eliminación de productos oxidados que interfieren con el pico cromatográfico de la LLL (Reglamento CEE/1996/92), ya que las pérdidas son mayores en los aceites de orujo. En el caso del aceite de orujo refinado, la diferencia entre los valores medios obtenidos sin purificar y después de la purificación invita a reflexionar si en el caso de estos aceites debiera recomendarse la purificación para eliminar los posibles compuestos oxidados que no se destruyen durante la refinación.

Tabla 11

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido linoleico (C18:2)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	22	22	22	22
Laboratorios rechazados	1	2	3	2
Valor medio (%)	9,899	9,566	8,620	11,433
Repetibilidad				
S_r	0,192	0,153	0,047	0,056
r	0,538	0,429	0,132	0,158
$RSD_r(\%)$	1,94	1,60	0,55	0,49
Reproducibilidad				
S_R	0,244	0,215	0,283	0,240
R	0,683	0,601	0,793	0,671
$RSD_R(\%)$	2,47	2,25	3,29	2,10
Ho_R	0,2	0,2	0,3	0,2

Tabla 12

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido linolénico (C18:3)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	22	22	22	22
Laboratorios rechazados	3	2	2	1
Valor medio (%)	0,711	0,645	0,704	0,709
Repetibilidad				
S_r	0,016	0,016	0,032	0,019
r	0,044	0,044	0,089	0,052
$RSD_r(\%)$	2,22	2,45	4,52	2,64
Reproducibilidad				
S_R	0,048	0,057	0,041	0,053
R	0,134	0,159	0,116	0,148
$RSD_R(\%)$	6,71	8,82	5,89	7,45
Ho_R	0,4	0,5	0,4	0,4

El cálculo teórico de la LLL, que se obtiene aplicando a la composición de ácidos grasos el programa matemático facilitado por el COI, mostró un índice Horrat inferior a 0,4 (Tabla 19). La diferencia entre el valor experimental de LLL y el valor teórico muestra también una buena precisión (Tabla 20).

En general tanto los valores de reproducibilidad y repetibilidad de la determinación del NEC42 por CLAE en aceites sin purificar y purificados son aceptables (Tablas 21 y 22), aunque ligeramente mayores que los encontrados para la determinación de LLL (Tablas 17 y 18). Sin embargo, en el cálculo teórico del NEC42 (Tabla 23) se observa una disminución importante de la precisión, a pesar de que los cálculos se efectúan con los mismos valores de composición de ácidos gra-

Tabla 13

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido aráquico (C20:0)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	22	22	22	22
Laboratorios rechazados	1	1	0	1
Valor medio (%)	0,484	0,473	0,459	0,510
Repetibilidad				
S_r	0,011	0,017	0,018	0,015
r	0,029	0,047	0,050	0,043
$RSD_r(\%)$	2,17	3,53	3,90	2,98
Reproducibilidad				
S_R	0,050	0,049	0,048	0,048
R	0,141	0,138	0,135	0,133
$RSD_R(\%)$	10,42	10,44	10,47	9,31
Ho_R	0,6	0,36	0,6	0,5

Tabla 14

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido eicosenoico (C20:1)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	21	20	21	20
Laboratorios rechazados	1	2	4	1
Valor medio (%)	0,343	0,334	0,321	0,353
Repetibilidad				
S_r	0,008	0,013	0,016	0,016
r	0,023	0,036	0,045	0,045
$RSD_r(\%)$	2,45	3,77	5,01	4,56
Reproducibilidad				
S_R	0,066	0,045	0,023	0,047
R	0,184	0,126	0,063	0,131
$RSD_R(\%)$	19,14	13,41	7,04	13,28
Ho_R	1,0	0,7	0,4	0,7

so, ya que los índices Horrat son el doble de los encontrados para el cálculo teórico de la LLL. En consecuencia, las diferencias entre el valor de NEC42 experimental y el teórico (que es el parámetro contemplado en la Norma Comercial COI) muestran valores excepcionalmente altos (Tabla 24) tanto en repetibilidad como en reproducibilidad (índices de Horrat, 1,2 a 2,6). De la comparación de estos resultados con los de la determinación de la diferencia $LLL_{CLAE} - LLL_{teórico}$ (Tabla 20) se concluye que el análisis de este último es bastante más preciso y reproducible que el de la diferencia de triglicéridos NEC42.

La mayor variabilidad del NEC42 respecto a la LLL se debe a que la concentración de ácido linolénico interviene directamente en el cálculo del primer pará-

Tabla 15

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido behénico (C22:0)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	19	20	20	20
Laboratorios rechazados	0	1	2	1
Valor medio (%)	0,214	0,155	0,149	0,222
Repetibilidad				
S_r	0,017	0,011	0,009	0,013
r	0,048	0,032	0,025	0,037
RSD_r (%)	7,95	7,34	5,97	5,85
Reproducibilidad				
S_R	0,031	0,022	0,021	0,032
R	0,087	0,062	0,060	0,089
RSD_R (%)	14,49	14,23	14,34	14,23
Ho_R	0,7	0,7	0,7	0,7

Tabla 16

Parámetros estadísticos de la determinación de ácido lignocérico (C24:0)

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	16	14	15	16
Laboratorios rechazados	1	2	3	2
Valor medio (%)	0,106	0,081	0,075	0,092
Repetibilidad				
S_r	0,019	0,007	0,008	0,006
r	0,054	0,020	0,023	0,015
RSD_r (%)	18,06	8,73	11,20	5,99
Reproducibilidad				
S_R	0,031	0,012	0,013	0,022
R	0,086	0,033	0,037	0,061
RSD_R (%)	28,98	14,51	17,23	23,86
Ho_R	1,3	0,6	0,7	1,0

metro, puesto que incluye los triglicéridos OLLn y PLLn. En la Tabla 25 se observa que una variación de 0,1% en la concentración de ácido linoléico produce una gran variación de NEC42, quedando prácticamente inalterada la LLL.

Anteriormente se ha puesto de manifiesto que el paso del aceite a través de una columna de sílica gel origina una disminución de aproximadamente 0,2% en la concentración del ácido linoleico. El efecto de esta pérdida sobre el cálculo teórico del NEC42 y de la LLL es insignificante, como puede apreciarse en la Tabla 26.

Tabla 17

Parámetros estadísticos de la determinación de LLL. Aceite sin purificar

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	15	15	15	15
Laboratorios rechazados	2	1	2	0
Valor medio (%)	0,636	0,232	0,242	0,863
Repetibilidad				
S_r	0,023	0,025	0,019	0,027
r	0,065	0,070	0,054	0,077
RSD_r (%)	3,62	10,74	7,92	3,17
Reproducibilidad				
S_R	0,064	0,038	0,027	0,068
R	0,179	0,107	0,075	0,191
RSD_R (%)	10,04	16,44	11,06	7,912
Ho_R	0,6	0,8	0,6	0,5

Tabla 18

Parámetros estadísticos de la determinación de LLL. Aceite purificado

Muestras	Orujo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orujo de oliva refinado
Participantes	12	12	12	12
Laboratorios rechazados	1	1	2	1
Valor medio (%)	0,522	0,232	0,218	0,823
Repetibilidad				
S_r	0,021	0,009	0,013	0,040
r	0,058	0,025	0,036	0,111
RSD_r (%)	3,96	3,84	5,79	4,80
Reproducibilidad				
S_R	0,038	0,026	0,023	0,043
R	0,107	0,072	0,065	0,120
RSD_R (%)	7,31	11,09	10,58	5,20
Ho_R	0,4	0,6	0,5	0,3

4. CONCLUSIONES

Las determinaciones de la absorción UV a 232 nm, tanto en aceite sin purificar como purificado, mostraron una precisión aceptable.

La determinación de la composición de ácidos grasos se llevó a cabo con notable precisión, excepto en los casos de los ácidos mirístico (C14:0) y lignocérico (C24:0) que mostraron una precisión sólo aceptable. Los procedimientos de metilación en frío con potasa metanólica y por calentamiento con metilato sódico seguido por calentamiento en medio ácido dieron resultados de composición de ácidos grasos estadísticamente iguales.

Tabla 19
Parámetros estadísticos de la determinación teórica de LLL

Muestras	Orojo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orojo de oliva refinado
Participantes	15	15	15	15
Laboratorios rechazados	0	2	1	0
Valor medio (%)	0,112	0,099	0,076	0,168
Repetibilidad				
S_r	0,005	0,003	0,003	0,003
r	0,013	0,009	0,009	0,009
RSD_r (%)	4,03	3,24	4,21	1,91
Reproducibilidad				
S_R	0,008	0,006	0,006	0,012
R	0,022	0,015	0,015	0,034
RSD_R (%)	6,89	5,57	7,23	7,28
Ho_R	0,3	0,3	0,3	0,4

Tabla 21
Parámetros estadísticos de la determinación de NEC42. Aceite sin purificar

Muestras	Orojo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orojo de oliva refinado
Participantes	16	16	16	16
Laboratorios rechazados	3	2	3	1
Valor medio (%)	1,198	0,665	0,667	1,329
Repetibilidad				
S_r	0,049	0,042	0,036	0,0605
r	0,137	0,119	0,101	0,1694
RSD_r (%)	4,07	6,36	5,43	4,55
Reproducibilidad				
S_R	0,228	0,108	0,111	0,141
R	0,639	0,301	0,312	0,394
RSD_R (%)	19,06	16,16	16,69	10,58
Ho_R	1,2	1,0	1,0	0,7

Tabla 20
Parámetros estadísticos de la determinación $LLL_{CLAE} - LLL_{teórica}$

Muestras	Orojo de oliva crudo	Oliva refinado		Oliva lampante	Orojo de oliva refinado	
	Purificado	Sin purificar	Purificado	Purificado	Sin purificar	Purificado
Participantes	12	12	12	12	12	12
Laboratorios rechazados	1	2	1	2	0	1
Valor medio (%)	0,411	0,140	0,131	0,141	0,710	0,655
Repetibilidad						
S_r	0,023	0,010	0,008	0,014	0,026	0,037
r	0,063	0,029	0,023	0,039	0,071	0,104
RSD_r (%)	5,50	7,53	6,39	9,79	3,59	5,65
Reproducibilidad						
S_R	0,037	0,022	0,023	0,023	0,065	0,040
R	0,103	0,063	0,065	0,065	0,181	0,111
RSD_R (%)	8,91	16,06	17,50	16,45	9,11	6,03
Ho_R	0,5	0,8	0,8	0,8	0,5	0,4

La diferencia $LLL_{CLAE} - LLL_{teórica}$ se determinó con mayor precisión que la diferencia $NEC42_{CLAE} - NEC42_{teórico}$, como consecuencia de que pequeños errores en la determinación del ácido linoléico (0,1%) dieron lugar a importantes variaciones en el $NEC_{teórico}$. Por el contrario la purificación del aceite mediante sílicagel, que produjo una disminución del 0,2% en el porcentaje de ácido linoleico, no originó cambios significativos en los valores de la $LLL_{teórica}$ y del $NEC42_{teórico}$.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a los responsables de los laboratorios participantes en el estudio colaborativo: Aceites del Sur, S. A. (Sevilla), Aceites Toledo S. A. (Los Yébenes), Agra S. A. (Gandía), A.N.I.E.R.A.C. (Madrid), Coreysa (Osuna), Estación de Olivicultura (Menjíbar), Gaspar Peral y Cía (Valencia), Industrias Pont, S. A. (Tárrega), Instituto de la Grasa (Sevilla), Juan Ballester Rosés (Tortosa), Koipe, S.A. (Andújar), Laboratorio Agrario de la Generalitat de Catalunya (Cabrils), Laboratorio

Tabla 22
Parámetros estadísticos de la determinación
de NEC42. Aceite *purificado*

Muestras	Orojo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orojo de oliva refinado
Participantes	16	16	16	16
Laboratorios rechazados	3	2	2	3
Valor medio (%)	0,906	0,613	0,558	1,238
Repetibilidad				
S_r	0,061	0,028	0,025	0,039
r	0,170	0,078	0,069	0,108
RSD_r (%)	6,69	4,56	4,43	3,12
Reproducibilidad				
S_R	0,075	0,075	0,073	0,082
R	0,211	0,211	0,204	0,230
RSD_R (%)	8,30	12,29	13,04	6,64
HO_R	0,5	0,7	0,8	0,4

Tabla 23
Parámetros estadísticos de la determinación
teórica de NEC42

Muestras	Orojo de oliva crudo	Oliva refinado	Oliva lampante	Orojo de oliva refinado
Participantes	22	22	22	22
Laboratorios rechazados	1	1	4	1
Valor medio (%)	0,515	0,463	0,439	0,628
Repetibilidad				
S_r	0,022	0,030	0,012	0,025
r	0,061	0,085	0,033	0,069
RSD_r (%)	4,22	6,53	2,69	3,93
Reproducibilidad				
S_R	0,054	0,054	0,030	0,065
R	0,151	0,150	0,084	0,183
RSD_R (%)	10,47	11,57	6,83	10,38
HO_R	0,6	0,6	0,4	0,6

Tabla 24
Parámetros estadísticos de la determinación de NEC42_{CLAE}-NEC_{teórico}

Muestras	Orojo de oliva crudo	Oliva refinado		Oliva lampante	Orojo de oliva refinado	
	Purificado	Sin purificar	Purificado	Purificado	Sin purificar	Purificado
Participantes	14	16	14	14	16	14
Laboratorios rechazados	2	1	1	1	0	2
Valor medio (%)	0,386	0,197	0,141	0,123	0,667	0,602
Repetibilidad						
S_r	0,069	0,050	0,040	0,028	0,058	0,053
r	0,193	0,139	0,111	0,077	0,163	0,149
RSD_r (%)	17,81	25,17	28,20	22,26	8,71	8,83
Reproducibilidad						
S_R	0,090	0,103	0,057	0,070	0,145	0,119
R	0,253	0,289	0,158	0,196	0,407	0,334
RSD_R (%)	23,40	52,36	40,13	56,95	21,77	19,83
HO_R	1,3	2,6	1,9	2,6	1,3	1,2

Tabla 25
Efecto de la concentración de ácido linoléico sobre el NEC42 y la LLL

C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	NEC42	LLL
11,0	0,8	3,0	73,7	11,0	0,5	0,46	0,146
11,0	0,8	3,0	73,6	11,0	0,6	0,52	0,145
11,0	0,8	3,0	73,5	11,0	0,7	0,58	0,145

Tabla 26
Efecto de la concentración de ácido linoléico sobre el cálculo teórico del NEC42 y la LLL

C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	NEC42	LLL
12,0	0,8	3,0	74,3	9,2	0,7	0,46	0,085
12,0	0,8	3,0	74,5	9,0	0,7	0,45	0,080
12,0	0,8	3,0	71,3	12,2	0,7	0,67	0,193
12,0	0,8	3,0	71,5	12,0	0,7	0,65	0,185
8,0	0,8	3,0	75,3	12,2	0,7	0,68	0,198
8,0	0,8	3,0	75,5	12,0	0,7	0,66	0,190

Agroalimentario (Córdoba), Laboratorio Agroalimentario (Granada), Laboratorio Agroalimentario (Madrid), Laboratorio Arbitral del M.A.P.A. (Madrid), Laboratorio de Veterinaria Militar (Madrid), Laboratorio Municipal (Barcelona), Laboratorio Municipal de Higiene (Madrid), Minerva, S.A. (Málaga), S.E.N.P.A. (Madrid) y Unaproliva (Jaén).

Asimismo agradecen la colaboración de D. Manuel Rodríguez Aguilar por el trabajo experimental y a la CICYT por el soporte económico (Proyecto ALI94-0782).

BIBLIOGRAFÍA

- Consejo Oleícola Internacional (1991). —«Composición teórica en triglicéridos de ECN42 y del ECN44», Documento COI/T.20/Doc. n.º 9.
- Consejo Oleícola Internacional (1995). —«Norma comercial aplicable al aceite de oliva y al aceite de orujo de oliva», Documento COI/T.15/NC n.º 2/Revisión 3.
- Horwitz, H. (1988). —«Protocol for the design, conduct and interpretation of collaborative studies». — *Pure Appl. Chem.* **60**, 855-864.
- IUPAC n.º 2.301 (1987). —«Preparation of the fatty acid methyl esters» en «Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives». — 7th edition, Blackwell, Oxford, p. 123.
- IUPAC n.º 2.507 (1987). —«Determination of polar compounds in frying fats» en «Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives». — 7th edition, Blackwell, Oxford, p. 216.
- León, M. y A. Cert (1994). —«Recomendaciones para la aplicación de algunos métodos analíticos incluidos en el Reglamento CEE 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de orujo de oliva». — *Grasas y Aceites* **45**, 395-401.
- Morchio, G. *et al.* (1989). —«Análisis cromatográfico de esteroles con columnas capilares. Resultados de un estudio colaborativo». — *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **66**, 531-538.
- Moreda, W., M. C. Pérez-Camino y A. Cert (1995). —«Determinación de algunos parámetros de pureza en aceites de oliva. Resultados de un estudio colaborativo». — *Grasas y Aceites* **46**, 279-284.
- Pocklington, W. D. (1991). —«Precision and accuracy of analysis; standardisation of analytical methods» en «Analysis of Oilseeds, Fats and Fattyfoods», J. B. Rossell and J. L. Pritchard (Eds.), Elsevier Applied Science Publishers, p. 1.
- Reglamento CEE 2568/91 de la Comisión (1991). —«Relativo a las características de los aceites de oliva y de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis». — *Diario Oficial* **L248**, 1-48.
- Reglamento CEE 1429/92 de la Comisión (1992). —«Por el que se modifica el Reglamento CEE/2568/91». — *Diario Oficial* **L150**, 17-20.
- Reglamento CEE 1996/92 de la Comisión (1992). —«Por el que se modifica el Reglamento CEE/2568/91». — *Diario Oficial* **L199**, 18.
- Rosell, J. B. (1986). —«Classical analysis of oils and fats». En «Analysis of oils and fats», R. J. Hamilton y J. B., Rossell (Eds.). — Elsevier Applied Science Publishers, p. 1.

Recibido: Julio 1996
Aceptado: Noviembre 1996