

Determinación de esteroides y diolcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico

Por Arturo Cert (1), Wenceslao Moreda (1) y Josep García-Moreno (2)

(1) Instituto de la Grasa (C.S.I.C.). Avda. Padre García Tejero 4. Sevilla. E-41012. España
(2) Agra, S.A., Avda. Pius XI, 24. Gandía (Valencia). E-46700. España

RESUMEN

Determinación de esteroides y diolcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico.

Se presenta un método para la determinación conjunta de esteroides y diolcoholes triterpénicos (eritrodíol y uvaol) en aceites de oliva que consta de las etapas siguientes: obtención del insaponificable, fraccionamiento mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) en régimen isocrático con detector de índice de refracción, preparación de derivados sililados y análisis por cromatografía de gases en columna capilar. Se comparan cuatro procedimientos que utilizan el análisis por cromatografía de gases de las fracciones de esteroides y de esteroides + diolcoholes obtenidas tanto por CLAE como por CCF. Se lleva a cabo un análisis colaborativo para la determinación de esteroides comparando los métodos CLAE-esteroides+diolcoholes y CCF-esteroides (método oficial). Los resultados mostraron que por el primer procedimiento la determinación de Δ^7 -esteroides se realiza con mayor repetibilidad y reproducibilidad, aunque los valores resultantes son más altos. No se encontraron diferencias en los parámetros de precisión ni en los valores de los restantes esteroides. Las determinaciones de eritrodíol+uvaol por los métodos CLAE-esteroides+diolcoholes y CCF-esteroides +diolcoholes (método oficial) resultaron con similar precisión.

PALABRAS-CLAVE: Aceite de oliva – Esteroides – Eritrodíol – Estudio colaborativo – Uvaol.

SUMMARY

Determination of sterols and triterpenic diolcohols in olive oils using HPLC separation and GC analysis. Standardization of the analytical method.

A method is developed for the analysis of sterols together with triterpenic alcohols (erythrodiol and uvaol) in vegetable oils. The method involves obtention of the unsaponifiable matter, isocratic HPLC separation with refractive index detector, preparation of silyl-derivatives, and analysis by capillary GC. Four procedures involving GC analysis of sterol and sterol+diolcohol fractions obtained by HPLC and CCF separations are compared. A collaborative trial comparing HPLC-sterols+diolcohols and CCF-sterols (official) methods is carried out. For Δ^7 -sterols, higher values and better repeatability and reproducibility were observed in the first method, but no differences for the remainder sterols were found. The erythrodiol+uvaol determinations by HPLC-sterols+diolcohols and CCF-sterols+diolcohols (official) methods resulted in similar precision.

KEY-WORDS: Collaborative trial - Erythrodiol - Olive oil - Sterols - Uvaol.

1. INTRODUCCIÓN

La composición de la fracción esterólica del aceite de oliva es un parámetro de gran utilidad para detectar adulteraciones por la presencia de otras grasas y aceites. Así, mediante la determinación de colesterol, brasicasterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol y Δ^7 -estigmasterol puede detectarse la adición de las grasas siguientes: una proporción muy baja (aproximadamente el 1%) de grasa animal y de los aceites de cártamo, colza, germen de trigo, girasol, maíz y sésamo; una cantidad algo mayor (2-3%) de los aceites de jojoba, lino, soja y semilla de té; porcentajes mayores (5-9%) de manteca de cacao y de aceites de algodón, cacahuete, palma y pepita de uva; y alrededor del 20% de aceite de avellana. Asimismo, la suma de los alcoholes triterpénicos eritrodíol y uvaol es de utilidad para detectar la presencia de aceite de orujo. En consecuencia los reglamentos sobre el aceite de oliva de la Comunidad Europea y del Consejo Oleícola Internacional, y el Codex Alimentarius de la FAO/OMS establecen límites para los porcentajes de estos compuestos.

La determinación de esteroides y eritrodíol+uvaol actualmente se realiza mediante dos métodos similares que constan de las siguientes etapas: a) obtención y purificación del insaponificable; b) separación de las fracciones de esteroides y de alcoholes triterpénicos mediante cromatografía en capa fina de sílica gel (CCF); c) raspado de las bandas correspondientes y extracción de los compuestos adsorbidos sobre la sílica gel; d) preparación de los derivados silanizados; y e) análisis por cromatografía de gases en columna capilar sobre fase de 5%-fenilmetilsilicona o similar. Para la determinación de esteroides se raspa únicamente la banda que contiene estos compuestos mientras que para la determinación de eritrodíol+uvaol se raspan conjuntamente las bandas de esteroides y diolcoholes triterpénicos; por tanto hay que repetir la etapa de separación en CCF y siguientes, con el consiguiente costo de tiempo y dinero.

Por otra parte, tal cantidad de operaciones da lugar a que la determinación de los esteroides que se encuentran en baja proporción (colesterol, brasicasterol y Δ^7 -estigmastenol) esté afectada de falta de repetibilidad y, sobre todo, de reproducibilidad (Morchio *et al.*, 1989; Moreda *et al.*, 1995). Especialmente delicado es el caso del Δ^7 -estigmastenol que se encuentra en los aceites de oliva en proporciones (0,2-0,4%) cercanas al límite máximo permitido (0,5%) y cuya determinación resultó con una desviación estándar relativa de la repetibilidad (RSD_r) entre 13 y 24% y una desviación estándar relativa de la reproducibilidad (RSD_R) entre 26 y 36%. León y Cert (1994) en un estudio sobre el método analítico encuentran que la insuficiente separación en CCF entre la banda de esteroides y alcoholes triterpénicos, la delimitación de la banda de esteroides en la CCF y las impurezas cercanas a la banda de los dialcoholes triterpénicos son las principales causas de esta falta de precisión.

Recientemente, Biedermann *et al.* (1993) han puesto a punto un método para la determinación de esteroides en el que se transesterifica el aceite mediante metilato sódico, la mezcla de reacción se extrae con hexano y el extracto se inyecta en un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia acoplado con un cromatógrafo de gases (CLAE-CG). Este procedimiento junto con el oficial fue aplicado a 30 muestras (Lanuzza *et al.*, 1995) obteniéndose resultados similares, aunque no se realizó estudio estadístico para analizar la significación de las diferencias. Este método tiene dos claras ventajas, la eliminación de la etapa de saponificación y una mejor separación de fracciones, pero hemos detectado los inconvenientes siguientes: a) el análisis por cromatografía de gases se efectúa con los esteroides libres dando lugar a una descomposición parcial de los esteroides durante la transferencia del cromatógrafo líquido al de gases; b) a veces se observan importantes interferencias positivas en el colesterol; y c) el método sólo es válido para el análisis de esteroides puesto que la metilación no libera totalmente los dialcoholes triterpénicos.

Amelio *et al.* (1992) describen un método analítico para el análisis simultáneo de ambas familias de compuestos que consiste en el fraccionamiento del insaponificable mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) sobre columna de sílica gel, utilizando gradiente de disolventes y un detector de luz UV a longitud de onda de 210 nm. Los esteroides y dialcoholes triterpénicos se recogen en una sola fracción que se evapora y el residuo se silaniza para el posterior análisis por CG. Este método presenta el inconveniente de utilizar la CLAE con gradiente de disolventes y un detector UV, ambos equipos no habituales en laboratorios dedicados al análisis de grasas.

En el presente trabajo se ensaya la separación de fracciones por CLAE en régimen isocrático, usando un detector de índice de refracción (IR), equipo instrumental que ya se utiliza para el análisis de triglicéridos. Para comparar los resultados con el método oficial y verificar la precisión del método, se han analizado varias muestras por ambos métodos en un solo laboratorio y posteriormente se ha efectuado un análisis colaborativo entre

varios laboratorios. Los resultados se han estudiado estadísticamente.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos

Éter dietílico, etanol, cloroformo, piridina, sulfato sódico anhidro, trimetilclorosilano y hexametildisilazano de pureza analítica. Hexano y éter dietílico de pureza HPLC se usaron para la separación por CLAE.

La potasa alcohólica para la saponificación fue preparada disolviendo 6,5 g de hidróxido potásico en 10 ml de agua destilada y diluyendo con etanol hasta 50 ml.

Se utilizó una solución patrón de 2 mg/mL de α -colestanol (5α -colestano- 3β -ol, ~ 95% GC, Fluka) en cloroformo.

La alúmina desactivada se preparó calentando óxido de aluminio neutro para cromatografía a 105°C durante 3 horas y luego se dejó enfriar en un desecador. Una vez a temperatura ambiente se añaden 6 mL de agua por cada 100 g de alúmina y se agita durante una hora.

El reactivo de silanización fue piridina-hexametildisilazano-trimetilclorosilano 9:3:1.

2.2. Materiales y aparatos

Las experiencias de puesta a punto del método analítico realizadas en el laboratorio de Agra, S.A. se llevaron a cabo como se indica a continuación:

La CCF se realizó sobre placas de vidrio recubiertas de sílica gel 60, de 0,25 mm de espesor (Merck) desarrollando dos veces con la mezcla hexano-éter (70:3).

Para la CLAE se utilizó un cromatógrafo de líquidos formado por válvula de inyección (Rheodyne 7125) con un volumen de inyección de 0,2 mL, bomba de líquidos de alta presión (Merck L-600) y detector de índice de refracción (Merck RI-71), usando una columna (25 cm x 4 mm de d.i.) rellena de sílica gel 60 de tamaño de partícula 5 μ m (Merck 50830) y como fase móvil la mezcla hexano-éter etílico 50:50 a un flujo de 1 mL/min.

La cromatografía de gases se llevó a cabo en un cromatógrafo equipado con un detector de ionización de llama (Hewlett-Packard, HP-5890 Serie II), utilizando una columna de sílice fundida (25 m x 0,25 mm de d.i.) impregnada con 5%-fenilmetilsilicona (0,25 μ m de espesor) a una temperatura de 265°C, y como gas portador helio con una presión en cabeza de 100 kPa. Las temperaturas del inyector y detector fueron 300 y 310°C respectivamente. Se usó un inyector con divisor de flujo con una relación 1:50. Para la obtención de los cromatogramas y cálculo de las áreas se utilizó una estación de proceso de datos Hewlett-Packard.

2.3. Métodos

2.3.1. Métodos oficiales (separación por CCF)

Para la determinación de esteroides y de eritrodioleol+uvaol se siguieron los procedimientos indicados en los Anexos V y VI del Reglamento CEE/2568/91 de la Comisión de las Comunidades Europeas respectivamente. Etapas comunes para ambos métodos fueron la obtención del insaponificable al éter etílico y su fraccionamiento por CCF. A continuación, en el primer caso se raspa únicamente la banda de los esteroides, mientras que en el segundo se raspan conjuntamente las bandas de esteroides y dialcoholes triterpénicos. Ambas porciones de sílica gel raspada se extraen independientemente con cloroformo y los residuos de la evaporización se silanizan. Finalmente, los productos de reacción se inyectan en el cromatógrafo de gases.

2.3.2. Método por CLAE

El aceite (5 g) se calienta a reflujo con potasa etanólica, se añade agua, el insaponificable se extrae con éter etílico y el extracto etéreo se lava tres veces con agua para eliminar los jabones, todo ello realizado según se indica en el método oficial. La fase etérea se filtra a través de un embudo que contiene papel de filtro con 100 g de sulfato sódico anhidro y a continuación se lava el sulfato con un poco de éter. La mitad de la solución etérea se agita durante 2 min con 1,25 g de alúmina desactivada, se filtra a través de papel y se evapora a presión reducida hasta sequedad. El residuo se disuelve en 1 mL de la mezcla hexano-éter dietílico 50:50 en el caso de aceites de oliva y en 1,5 mL en el caso de aceites de orujo. La solución (0,2 mL) se inyecta en el cromatógrafo de líquidos. El eluido de la columna desde que aparecen los Δ^5 -esteroides hasta que terminan de salir los dialcoholes triterpénicos (aproximadamente desde los 11 a los 24 min) se recoge en un matraz en forma de corazón de 25 mL y se evapora a presión reducida. El residuo se trata con 0,2 mL de reactivo silanizante y se deja estar durante 15 minutos. Una alícuota de la solución (1-2 μ L) se inyecta en el cromatógrafo de gases. Los esteroides y dialcoholes triterpénicos se cuantifican respecto al α -colestanol utilizado como patrón interno, suponiendo para todos los compuestos el mismo factor de respuesta.

2.4. Estudio de repetibilidad del método por CLAE

Una muestra de aceite de oliva se analizó 5 veces como se indica en el apartado 2.3.2 determinándose conjuntamente los esteroides con los dialcoholes triterpénicos.

2.5. Comparación de los métodos oficial y por CLAE, tanto en la determinación de esteroides como en la determinación conjunta de esteroides y dialcoholes triterpénicos

Se utilizaron las 4 muestras de aceite siguientes: oliva, oliva con 1% de girasol, oliva con 2% de girasol y orujo de oliva con 2% de girasol. Se obtuvieron las disoluciones del insaponificable por ambos métodos (ver 2.3.1 y 2.3.2) y cada una de ellas se dividió en dos partes iguales. Una alícuota se utilizó para obtener una fracción que sólo contuviese esteroides y la otra para obtener una fracción que contuviese los esteroides junto con los dialcoholes. Por tanto, se obtuvieron por ambos métodos valores de esteroides analizados con y sin la presencia de los dialcoholes.

2.6. Análisis colaborativo interlaboratorios

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 I). A las muestras se les añadieron distintos porcentajes de aceite de girasol (normal y variedad alto oleico) para obtener diversas concentraciones de Δ^7 -estigmastenol. La remisión de duplicados con código diferente tuvo por objeto evaluar la repetibilidad del método.

Con las muestras se incluía una circular donde se indicaba el procedimiento a seguir, una descripción detallada del procedimiento por CLAE y una hoja de resultados solicitando información del material y de los métodos utilizados en la realización de los análisis. Partiendo de 5 g de muestra se preparó la solución etérea de insaponificable que se dividió en dos partes: una para realizar el análisis por los métodos oficiales (ver 2.3.1) y otra para aplicar el método de separación por CLAE (ver 2.3.2). En el primer caso, se prepararon y desarrollaron dos placas de CCF; en la primera se raspó únicamente la banda de esteroides y en la segunda la banda de esteroides junto con la de dialcoholes triterpénicos. En el análisis por CLAE se recogió una sola fracción conteniendo ambas familias de compuestos.

Tabla I
Descripción de las muestras

Código	Aceite	Acidez (%)
1 y 4	Orujo de oliva crudo + 5% oliva refinado + 3% girasol AO	10.8
2 y 8	Oliva refinado + 1% girasol AO	0.41
3 y 7	Oliva lampante + 1% girasol AO	3.8
5 y 6	Orujo de oliva refinado + 1,5% girasol refinado	0.20

El análisis estadístico de repetibilidad 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 de la repetibilidad.

S_R : Desviación estándar de la reproducibilidad.

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

$RSDR$: Desviación estándar relativa de la reproducibilidad.

$$Ho_R: \text{Índice Horrat} = \left[\frac{RSD_{R \text{ exp}}}{RSD_{R \text{ teor}}} \right]$$

donde $RSD_{R \text{ teor}} = 2(1 - 0.5 \log C)$

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

De entre estos parámetros es importante destacar el significado de la repetibilidad que indica que los valores obtenidos en dos determinaciones sucesivas realizadas sobre la misma muestra, utilizando el mismo método analítico, no diferirán en más del valor de r . De la misma manera, la reproducibilidad expresa 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 $RSDR$ 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).

2.7. Método estadístico para la comparación de resultados

Para la comparación de los resultados de las determinaciones realizadas por diversos métodos analíticos se realizó un análisis estadístico de varianza mediante el programa informático Statistica (StatSoft Inc), utilizando el test ANOVA de dos direcciones.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación por CLAE

En el cromatograma obtenido por CLAE con detector de índice de refracción del insaponificable de un aceite de girasol (figura 1) se observa que la fracción esterólica se desdobra en tres picos correspondientes a los $\Delta 5$ -esteroles, α -colestanol y $\Delta 7$ -esteroles, quedando perfectamente separada de la fracción de alcoholes triterpénicos. En el cromatograma de un aceite de oliva (figura 2) el pico correspondiente a los $\Delta 7$ -esteroles es muy pequeño y aparece el correspondiente a los dialcoholes triterpénicos, sin que entre ambos se observe la presencia de otro tipo de compuestos. Por tanto la fracción que eluye desde un poco antes de los esteroides hasta un poco después de los dialcoholes contiene casi exclusivamente estos compuestos. El análisis por CG de los derivados siliados origina un cromatograma prácticamente libre de interferencias (figura 3).

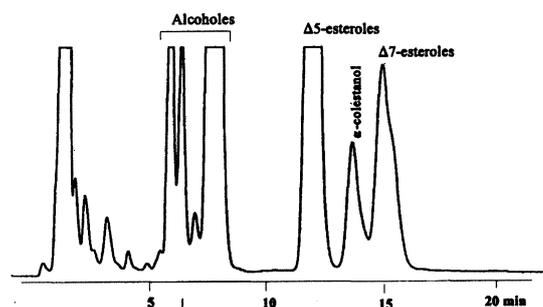


Figura 1

Cromatograma de CLAE con detector de índice de refracción del insaponificable de un aceite de girasol refinado.

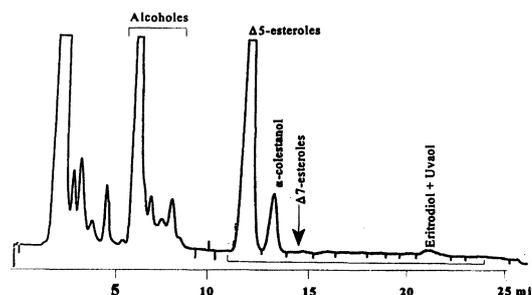


Figura 2

Cromatograma de CLAE con detector del índice de refracción del insaponificable de un aceite de oliva refinado.

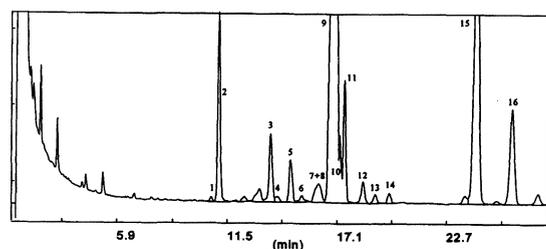


Figura 3

Cromatograma de gases de la fracción esteroides + dialcoholes obtenida por fraccionamiento por CLAE de un insaponificable de aceite de orujo de oliva refinado. 1. colesterol; 2. α -colestanol; 3. campesterol; 4. campestanol; 5. estigmasterol; 6. Δ 7-campesterol; 7. Δ 5,23-estigmastadienol; 8. clerosterol; 9. β -sitosterol; 10. sitostanol; 11. Δ 5-avenasterol; 12. Δ 5, 24-estigmastadienol; 13. Δ 7-estigmastenol; 14. Δ 7-avenasterol; 15.

3.2. Repetibilidad del método CLAE-esteroides-dialcoholes

Los resultados de las 5 determinaciones realizadas en un solo laboratorio sobre una muestra de aceite de oliva, mediante el procedimiento que utiliza separación de fracciones por CLAE, se indican en la Tabla II. Puede observarse que la repetibilidad es buena en todos los casos excepto en el colesterol. Esta falta de precisión en la medida del colesterol está de acuerdo con la existencia de impurezas en la banda de dialcoholes que en la cromatografía de gases aparecen en la zona del colesterol (León y Cert, 1994).

3.3. Comparación de métodos

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el análisis de cuatro muestras en un solo laboratorio no mostró diferencias significativas entre los valores de colesterol, brasicasterol, 24-metilcolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol y esteroides totales obtenidos por los cuatro métodos objeto de la comparación: CCF-esteroides, CCF-esteroides + dialcoholes, CLAE-esteroides y CLAE-esteroides + dialcoholes. Tampoco se encontraron diferencias entre los valores de eritrodol + uvaol obtenidos por CCF-esteroides + dialcoholes y CLAE-esteroides + dialcoholes.

Los valores de β -sitosterol aparente, Δ 7-estigmastenol y Δ 7-avenasterol tampoco mostraron diferencias en las determinaciones por CLAE-esteroides y CLAE-esteroides + dialcoholes, lo cual hace posible las determinaciones de esteroides y dialcoholes en un solo análisis cromatográfico. Sin embargo el método CLAE-esteroides + dialcoholes en comparación con el CCF-esteroides + dialcoholes da lugar a una disminución de los valores de Δ 7-estigmastenol (valor medio del 0,18%) con un nivel de significación del 96%. Este hecho sugiere que la CLAE elimina la interferencia positiva que a veces tiene lugar cuando se efectúa la separación por CCF, probablemente debida al cicloartenol, compuesto que en CCF no se separa perfectamente de los esteroides, o debida a compuestos minoritarios que en CCF eluyen con el eritrodol.

La comparación del método CCF-esteroides (método oficial) con los otros tres muestra unas diferencias entre los valores de estos esteroides con altos niveles de significación (Tabla III). Se observa que los tres métodos dan lugar a valores de los Δ 7-esteroides mayores que el método

Tabla II
Repetibilidad de la determinación de esteroides y dialcoholes triterpénicos por el método de separación por CLAE

	Colesterol (%)	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	β -sitosterol aparente (%)	Δ 7-estigmastenol (%)	Δ 7-avenasterol (%)	Esteroides totales (mg/Kg)	Eritrodol + uvaol (%)
Ensayo 1	0,15	3,26	0,85	94,5	0,49	0,32	1292	3,27
Ensayo 2	0,14	3,28	0,84	94,4	0,47	0,33	1232	3,37
Ensayo 3	0,13	3,59	0,83	94,3	0,46	0,27	1290	3,00
Ensayo 4	0,20	3,32	0,89	94,7	0,46	0,31	1272	3,20
Ensayo 5	0,26	3,39	0,85	94,7	0,47	0,29	1221	3,10
Media	0,16	3,37	0,85	94,5	0,47	0,30	1261	3,19
SD_r	0,034	0,134	0,023	0,181	0,012	0,024	33,03	0,144
RSD_r (%)	20,7	3,97	2,68	0,19	2,60	7,89	2,62	4,52
$r(95\%)^a$	0,094	0,372	0,063	0,503	0,034	0,067	91,8	0,400

(a) $r(95\%)$ = repetibilidad al 95% de confianza ($t_{95, v=4} \times SD$).

Tabla III
Diferencias medias y niveles de significación estadística de los resultados de la determinación por el método CCF-esteroles respecto a las medidas obtenidas por otros métodos

Esteroles	Método analítico					
	CCF esteroles + dialcoholes		CLAE esteroles		CLAE esteroles + dialcoholes	
	d ^a (%)	n.c. ^b	d (%)	n.c.	d (%)	n.c.
β -sitosterol	- 1,01	97,1	- 0,32	86,1	- 0,43	96,7
Δ 7-estigmastenol	+ 0,34	96,6	+ 0,16	94,5	+ 0,13	94,5
Δ 7-avenasterol	+ 0,27	99,4	+ 0,32	99,5	+ 0,29	99,8

(^a) Diferencia entre las medias de los valores obtenidos para las cuatro muestras mediante el método analítico indicado y el método CCF-esteroles.

(^b) Nivel de confianza estadística expresado en %.

do oficial (CCF-esteroles) como consecuencia de la pérdida que se produce en este último al raspar únicamente la banda de esteroles en la CCF (León y Cert, 1994). Esta pérdida también justifica una parte de la disminución que se observa en el β -sitosterol aparente.

3.4. Análisis colaborativo interlaboratorios de la determinación de esteroles

A la vista de la similitud de resultados entre los métodos CLAE-esteroles y CLAE-esteroles + dialcoholes, se decidió organizar un estudio colaborativo de determina-

Tabla IV
Parámetros estadísticos de la determinación de colesterol

Muestras Método	Orujo crudo		Oliva refinado		Oliva lampante		Orujo refinado	
	CCF ^a	CLAE ^b						
Número participantes	17	11	17	11	17	11	17	11
Laboratorios rechazados	3	1	2	2	1	0	0	1
Valor medio (%)	0,19	0,17	0,21	0,15	0,18	0,18	0,23	0,20
Repetibilidad								
S_r	0,04	0,03	0,07	0,02	0,05	0,06	0,07	0,02
r	0,11	0,08	0,19	0,15	0,13	0,16	0,20	0,62
RDS_r (%)	19,8	17,0	33,3	13,3	25,4	31,4	29,9	10,9
Reproducibilidad								
S_R	0,06	0,07	0,11	0,07	0,12	0,08	0,13	0,09
R	0,16	0,19	0,29	0,20	0,33	0,23	0,37	0,26
RSD_R (%)	30,1	41,6	50,5	48,1	66,0	44,9	57,2	46,0
Ho_R	1,5	2,0	2,5	2,3	3,2	2,2	2,9	2,3

a Cromatografía de Capa Fina de Esteroles

b Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Esteroles y Dialcoholes

Tabla V
Parámetros estadísticos de la determinación de campesterol

Muestras	Orujo crudo		Oliva refinado		Oliva lampante		Orujo refinado	
	CCF ^a	CLAE ^b						
Número participantes	17	12	17	12	17	12	17	12
Laboratorios rechazados	1	2	0	2	0	2	2	1
Valor medio (%)	3,29	3,29	2,94	2,91	3,00	2,94	3,38	3,32
Repetibilidad								
S_r	0,08	0,09	0,10	0,05	0,10	0,04	0,08	0,11
r	0,22	0,26	0,29	0,14	0,30	0,12	0,23	0,30
RDS_r (%)	2,3	2,9	3,5	1,7	3,5	1,4	2,4	3,2
Reproducibilidad								
S_R	0,16	0,21	0,15	0,15	0,19	0,10	0,13	0,18
R	0,46	0,60	0,42	0,42	0,54	0,29	0,36	0,51
RSD_R (%)	5,0	6,5	5,1	5,2	6,4	3,5	3,8	5,4
Ho_R	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,3	0,3	0,4

a Cromatografía de Capa Fina de Esteroles

b Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Esteroles y Dialcoholes

Tabla VI
Parámetros estadísticos de la determinación de estigmasterol

Muestras	Orujo Crudo		Oliva Refinado		Oliva lampante		Orujo refinado	
	CCF ^a	CLAE ^b						
Número participantes	17	12	17	12	17	12	17	12
Laboratorios rechazados	2	3	2	1	3	1	2	2
Valor medio (%)	1,59	1,56	1,20	1,14	1,31	1,24	1,46	1,40
Repetibilidad								
S_r	0,04	0,05	0,04	0,07	0,05	0,06	0,05	0,02
r	0,10	0,14	0,11	0,19	0,13	0,18	0,14	0,06
RDS_r (%)	2,2	3,3	3,2	5,9	3,4	5,2	3,4	1,6
Reproducibilidad								
S_R	0,08	0,08	0,10	0,10	0,10	0,14	0,07	0,07
R	0,22	0,23	0,27	0,28	0,27	0,39	0,20	0,21
RSD_R (%)	5,0	5,4	8,1	8,9	7,5	11,2	5,0	5,4
Ho_R	0,3	0,4	0,5	0,6	0,5	0,7	0,3	0,4

a Cromatografía de Capa Fina de Esteroles

b Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Esteroles y Dialcoholes

Tabla VII
Parámetros estadísticos de la determinación de β -Sitosterol aparente

Muestras	Orujo crudo		Oliva refinado		Oliva lampante		Orujo refinado	
	CCF ^a	CLAE ^b						
Número participantes	17	12	17	12	17	12	17	12
Laboratorios rechazados	2	1	3	2	1	2	1	3
Valor medio (%)	93,44	93,07	94,29	94,22	94,10	94,00	93,05	92,61
Repetibilidad								
S_r	0,28	0,38	0,15	0,15	0,23	0,19	0,30	0,16
r	0,79	1,07	0,43	0,42	0,66	0,54	0,85	0,45
RDS _r (%)	0,30	0,41	0,16	0,16	0,25	0,21	0,33	0,17
Reproducibilidad								
S_R	0,52	0,60	0,38	0,28	0,49	0,37	0,62	0,42
R	1,46	1,69	1,06	0,79	1,38	1,03	1,73	1,18
RSD _R (%)	0,56	0,65	0,40	0,30	0,52	0,39	0,66	0,46
Ho_R	0,07	0,08	0,05	0,04	0,06	0,05	0,08	0,06

a Cromatografía de Capa Fina de Esteroles

b Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Esteroles y Dialcoholes

Tabla VIII
Parámetros estadísticos de la determinación de Δ^7 -Estigmastenol

Muestras	Orujo crudo		Oliva refinado		Oliva lampante		Orujo refinado	
	CCF ^a	CLAE ^b						
Número participantes	17	12	17	12	17	12	17	12
Laboratorios rechazados	1	1	2	0	1	2	0	1
Valor medio (%)	0,55	0,69	0,42	0,49	0,38	0,44	0,66	0,82
Repetibilidad								
S_r	0,06	0,08	0,07	0,06	0,06	0,04	0,08	0,08
r	0,16	0,22	0,19	0,18	0,16	0,12	0,23	0,22
RDS _r (%)	10,2	11,4	16,0	12,8	15,2	10,1	12,2	9,6
Reproducibilidad								
S_R	0,18	0,12	0,09	0,09	0,09	0,06	0,16	0,15
R	0,50	0,33	0,25	0,26	0,26	0,16	0,45	0,42
RSD _R (%)	32,9	17,4	21,0	19,2	25,0	12,9	24,4	18,3
Ho_R	1,9	1,0	1,2	1,1	1,3	0,7	1,4	1,1

a Cromatografía de Capa Fina de Esteroles

b Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Esteroles y Dialcoholes

Tabla IX
Parámetros estadísticos de la determinación de Δ^7 -Avenasterol

Muestras	Orujo crudo		Oliva refinado		Oliva lampante		Orujo refinado	
	CCF ^a	CLAE ^b						
Número participantes	17	12	17	12	17	12	17	12
Laboratorios rechazados	0	2	1	1	0	4	1	1
Valor medio (mg/Kg)	0,41	0,48	0,50	0,59	0,47	0,57	0,41	0,49
Repetibilidad								
S_r	0,10	0,04	0,05	0,03	0,11	0,02	0,08	0,04
r	0,28	0,11	0,15	0,08	0,32	0,06	0,22	0,12
RDS _r (%)	25,0	8,4	10,4	4,7	24,2	3,6	18,9	8,8
Reproducibilidad								
S_R	0,20	0,13	0,18	0,12	0,13	0,03	0,16	0,12
R	0,55	0,36	0,52	0,33	0,38	0,08	0,45	0,32
RSD _R (%)	48,5	26,5	36,8	20,1	28,7	5,0	39,1	23,4
Ho_R	2,6	1,5	2,1	1,2	1,6	0,3	2,1	1,3

a Cromatografía de Capa Fina de Esteroles

b Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Esteroles y Dialcoholes

Tabla X
Parámetros estadísticos de la determinación de esteroles totales

Muestras	Orujo crudo		Oliva refinado		Oliva lampante		Orujo Refinado	
	CCF ^a	CLAE ^b						
Número participantes	15	10	15	10	16	10	15	10
Laboratorios rechazados	3	1	3	2	0	0	2	1
Valor medio (mg/Kg)	3668	3547	1845	1813	1844	1737	2576	2409
Repetibilidad								
S_r	208	177	49	27	158	102	93	38
r	582	495	138	77	442	286	260	106
RDS _r (%)	5,70	5,0	2,7	1,5	8,6	5,9	3,6	1,6
Reproducibilidad								
S_R	290	226	154	164	215	158	297	135
R	813	633	431	459	601	442	831	379
RSD _R (%)	7,9	6,4	8,3	9,0	11,6	9,1	11,5	5,6
Ho_R	1,7	1,4	1,6	1,7	2,3	1,7	2,3	1,1

a Cromatografía de Capa Fina de Esteroles

b Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Esteroles y Dialcoholes

ción de esteroides comparando únicamente los métodos oficial (CCF-esteroides) y por CLAE-esteroides + dialcoholes. En el análisis circular participaron 18 laboratorios de la industria y centros oficiales, de los cuales sólo 12 aportaron resultados del método por CLAE. Entre estos últimos, un laboratorio llevó a cabo la purificación del insaponificable mediante lavados alternativos con solución acuosa de hidróxido potásico 0,5N y agua en vez de agitar con alúmina, y dos laboratorios utilizaron detector UV a 210 nm en vez del detector IR, para visualizar la separación por CLAE. La purificación del insaponificable mediante lavados con potasa es un procedimiento también utilizado para eliminar los ácidos grasos. La utilización de un detector UV no afecta a la separación de la fracción esteróica y se ha utilizado en un método similar (Amelio *et al.*, 1995). Por otra parte, los resultados de los tres laboratorios fueron similares a los del resto de participantes. En consecuencia se decidió incluir todos los datos recibidos en el estudio estadístico, cuyos resultados se exponen en las Tablas IV-X.

Los resultados rechazados por la falta de repetibilidad o reproducibilidad al no cumplir los test correspondientes fueron similares en ambos métodos. Comparando la repetibilidad y reproducibilidad medias del método oficial (CCF-esteroides) obtenidas en este estudio, del mismo método en un colaborativo anterior (Moreda *et al.*, 1995) y del método CLAE-esteroides + dialcoholes, no se observan diferencias importantes en la precisión de las determinaciones de colesterol, campesterol, β -sitosterol aparente y esteroides totales. En cuanto a los restantes esteroides (Tabla XI) se observa lo siguiente: el estigmasterol se determina con mejor preci-

Tabla XI
Comparación de los parámetros de precisión de dos métodos analíticos para la determinación de esteroides

Esteroides	Precisión	Método analítico		
		CCF-esteroides (Moreda <i>et al.</i>)	CCF-esteroides (estudio actual)	CLAE-esteroides + dialcoholes
Estigmasterol	RSD_r (%) ^a	8,1	3,1	4,0
	RSD_R (%) ^b	10,4	6,4	7,7
$\Delta 7$ -estigmasterol	RSD_r (%)	19,6	13,4	11,6
	RSD_R (%)	32,5	25,8	17,0
$\Delta 7$ -avenasterol	RSD_r (%)	-	19,6	6,4
	RSD_R (%)	-	38,3	18,8

(a) Valor medio de la repetibilidad de las determinaciones realizadas en cada estudio colaborativo.

(b) Valor medio de la reproducibilidad de las determinaciones realizadas en cada estudio colaborativo.

sión en los dos métodos ensayados en este estudio con respecto al anterior análisis circular; el $\Delta 7$ -estigmasterol se determina con una mejora de la precisión en el actual análisis circular por CCF-esteroides respecto al anterior estudio, mejora que es más acusada en cuanto a reproducibilidad en el método por CLAE; finalmente, el $\Delta 7$ -avenasterol muestra una mejora de ambos parámetros de precisión en la determinación por el método CLAE.

La comparación de las medias de los valores medios obtenidos por cada método (Tabla XII) muestra que hay un incremento del $\Delta 7$ -estigmasterol y $\Delta 7$ -avenasterol con alto nivel de significación y que en relación al valor absoluto de la medida tiene considerable importancia. Este resultado concuerda con lo observado en el experimento de comparación llevado a cabo en el laboratorio (ver Tabla III). También se observa una disminución de los esteroides totales que puede atribuirse a pérdida del patrón α -colesterol en la separación por CCF. Las restantes variables muestran diferencias de escasa entidad.

Tabla XII
Comparación de los valores medios de esteroides obtenidos por el método CLAE-esteroides + dialcoholes y CCF-esteroides en el análisis colaborativo

Esteroides	Método		diferencia media ^b	nivel de confianza (%)
	CLAE-esteroides + dialcoholes	CCF-esteroides		
	media ^a	media ^a		
Colesterol (%)	0,18	0,20	-0,02	88,6
Campesterol (%)	3,12	3,15	-0,03	92,0
Estigmasterol (%)	1,34	1,39	-0,05	99,2
β -sitosterol aparente (%)	93,47	93,72	-0,25	92,0
$\Delta 7$ -estigmasterol (%)	0,61	0,50	+0,11	97,7
$\Delta 7$ -avenasterol (%)	0,53	0,45	+0,08	99,9
Esteroides totales (mg/Kg)	2376	2483	-107	96,8

(a) Media de los valores obtenidos para las cuatro muestras.

(b) Diferencia entre las medias CLAE-esteroides + dialcoholes y CCF-esteroides.

3.5. Estudio colaborativo interlaboratorios de la determinación de eritrodol + uvaol

Para la determinación de eritrodol + uvaol se utilizaron los métodos oficial (CCF-esteroides + dialcoholes) y por CLAE-esteroides + dialcoholes, siguiendo el mismo protocolo que el empleado para los esteroides. Los resultados expuestos en la Tabla XIII indican una precisión similar para ambos métodos. No se encontraron diferencias significativas entre los valores medios obtenidos por cada método.

Tabla XIII
Parámetros estadísticos de la determinación de Eritrodiol + Uvaol

Muestras	Orujo crudo		Oliva refinado		Oliva lampante		Orujo refinado	
	CCF ^a	CLAE ^b						
Número participantes	17	12	17	12	17	12	17	12
Laboratorios rechazados	0	1	3	0	4	3	1	0
Valor medio (%)	15,70	16,48	2,31	2,35	2,90	2,96	25,10	25,26
Repetibilidad								
S_r	0,73	0,79	0,29	0,24	0,31	0,16	1,33	0,90
r	2,03	2,20	0,82	0,67	0,86	0,44	3,72	2,5
RDS_r (%)	4,6	4,8	12,6	10,2	10,5	5,3	5,3	3,6
Reproducibilidad								
S_R	1,88	1,54	0,44	0,33	0,42	0,49	1,99	1,90
R	5,27	4,32	1,22	0,91	1,18	1,36	5,58	5,33
RSD_R (%)	12,0	9,4	18,8	13,8	14,6	16,4	7,9	7,5
Ho_R	1,1	0,9	1,3	1,0	1,1	1,2	0,8	0,8

a Cromatografía de Capa Fina de Esteroles

b Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Esteroles y Dialcoholes

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la determinación por el método CCF-esteroles (oficial) muestran una mejora de precisión con respecto a ensayos colaborativos anteriores, como consecuencia de la experiencia adquirida por los laboratorios en la aplicación del método. La reproducibilidad es aceptable en las muestras de aceite de oliva pero es baja en las de aceite de orujo.

El método de análisis CLAE-esteroles + dialcoholes muestra una precisión aceptable en la determinación del $\Delta 7$ -estigmastanol, tanto en los aceites de oliva como de orujo. Esto se atribuye a que se elimina la posibilidad de interferencia positiva, probablemente debida al cicloartenol o a compuestos que en CCF eluyen con el eritrodiol, y a que no tiene lugar la ambigüedad del raspado la banda de esteroides que es consustancial con el método CCF-esteroles. Por otra parte se observa un aumento de los valores de los $\Delta 7$ -esteroides, con respecto al método oficial.

La adopción del método CLAE-esteroles + dialcoholes por los laboratorios de las industrias oleícolas reportaría un ahorro económico y de tiempo al permitir el análisis de esteroides y eritrodiol + uvaol en una sola determinación. Además la mayor precisión del método daría mayor confianza en el resultado obtenido. Finalmente, el incremento del valor del $\Delta 7$ -estigmastanol obtenido por este método reduciría la probabilidad de que el análisis por el método oficial diese valores más altos, suceso

posible dada la reproducibilidad que muestra el método oficial.

La adopción de este método en los reglamentos que regulan el comercio del aceite de oliva, disminuiría los casos de discrepancia de resultados entre laboratorios, dada su mayor precisión. Sin embargo habría que efectuar una revisión del límite máximo permitido para el $\Delta 7$ -estigmastanol, ya que el actual está establecido con los datos obtenidos mediante determinaciones con el método CCF-esteroles, que para los $\Delta 7$ -esteroides origina valores significativamente inferiores. Ello implicaría la obtención de un banco de datos por aplicación del nuevo método a aceites de oliva y de orujo genuinos con alto contenido en $\Delta 7$ -esteroides.

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); ANIERAC (Madrid); Coreysa (Osuna); Gaspar Peral y Cía (Valencia); Instituto de la Grasa (Sevilla); Juan Ballester Rosés (Tortosa); Koipe (Andújar); Laboratori Agrari de la Generalitat de Catalunya (Cabrils); Laboratorio Agroalimentario de Granada (Atarfe); Laboratorio Agroalimentario de Madrid, Laboratorio Arbitral del M.A.P.A. (Madrid); Laboratorio de

Veterinaria Militar (Madrid); Laboratorio Municipal de Barcelona, Laboratorio Municipal de Higiene (Madrid); Minerva, S. A. (Málaga) y SENPA (Madrid).

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

BIBLIOGRAFÍA

- Amelio, M., Rizzo, R. y Varazini, F. (1992). —«Determination of sterols, erythrodiol, uvaol and alkanols in olive oil, using combined solid-phase extraction, high-performance liquid chromatographic and high-resolution gas chromatographic techniques». — *J. Chromatogr.* **606**, 179-185.
- Biedermann, M., Grob, K. y Mariani, C. (1989). —«Transesterification and on-line LC-GC for determining the sum of free and esterified sterols in edible oils and fats». — *Fat Sci. Technol.* **95**, 127-133.
- Horwitz, H. (1988). —«Protocol for the design, conduct and interpretation of collaborative studies». — *Pure Appl. Chem.* **60**, 855-864.
- Lanuzza, F., Micali, G. y Calabrò, G. (1995). —«Sterol analysis in olive oil by transesterification and HPLC-HRGC coupling». — *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **72**, 105-109.
- León, M. y Cert, A. (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 esteroides. Resultados de un estudio colaborativo». — *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **66**, 531-538.
- Moreda, W., Pérez-Camino, M. C. y Cert, A. (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. Anexos V y VI». — *Diario Oficial* **L248**, 15-24.

Recibido: Marzo 1997
Aceptado: Julio 1997