

## 1. OBJETO

1.1 La presente norma tiene por objeto establecer los métodos de análisis para la determinación cualitativa de BHA, BHT, NDGA y PG y la determinación cuantitativa de BHA, BHT, DG, Ionox-100, NDGA, OG, PG, THBP y TBHQ en productos alimenticios.

1.2 Los métodos que se describen en la presente norma son los siguientes:

- a) Método colorimétrico para la determinación de la presencia de BHA, BHT, NDGA y PG en aceites y grasas;
- b) Método por cromatografía líquida a alta presión (HPLC) para la determinación del contenido de BHA, BHT, DG, Ionox-100, NDGA, OG, PG, THBP y TBHQ en aceites, grasas y grasa de leche anhidra o mantquilla anhidra; y
- c) Método por cromatografía en fase gaseosa para la determinación del contenido de BHA y BHT en cereales listos para comer.

## 2. NORMAS COGUANOR A CONSULTAR

COGUANOR NGO 4 010	Sistema Internacional de Unidades.
COGUANOR NGO 7 001	Tamices de ensayo y cribas metálicas o zarandas. Tamaño nominal de las aberturas.
COGUANOR NGO 56 002	Precauciones básicas en el manejo de sustancias peligrosas en el laboratorio.

## 3. DEFINICIONES

3.1 BHA (butilhidroxianisol). Son los compuestos químicos 2- y 3-terc-butil-4-hidroxianisol.

3.2 BHT (butilhidroxitolueno). Es el compuesto químico 3,5-di-terc-butil-4-hidroxitolueno.

3.3 DG. Es el compuesto químico galato de dodecilo.

3.4 Ionox-100. Es el compuesto químico 2,6-di-terc-butil-4-hidroximetilfenol.

3.5 NDGA (ácido nordihidroquayarético). Es el compuesto químico 4,4'-(2,3-dimetiltetrametileno) dipirocatecol.

3.6 OG. Es el compuesto químico galato de octilo.

3.7 PG. Es el compuesto químico galato de propilo.

3.8 THBP. Es el compuesto químico 2,4,5-trihidroxi-buti-rofenona.

Continúa

3.9 TBHQ. Es el compuesto químico terc-butilhidroquinona.

#### 4. METODO COLORIMETRICO PARA LA DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE BHA, BHT, NDGA Y PG EN ACEITES Y GRASAS.

##### 4.1 Reactivos.

4.1.1 Eter de petróleo y solución (1+1) de éter de petróleo en éter etílico.

Nota 1. El éter de petróleo es altamente inflamable. Véase lo referente a líquidos inflamables en la norma COGUANOR NGO 56 002.

4.1.2 Alcohol etílico al 95% (v/v) y al 50% (v/v).

4.1.3 Solución 1 N de NaOH.

4.1.4 Cianuro de metilo o acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN).

4.1.5 Cloruro de sodio (NaCl).

4.1.6 Solución al 1% (m/v) de hidróxido de bario. Se disuelve Ba(OH)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O en agua destilada recién hervida. La solución se mantiene en un frasco con tapón hermético.

Nota 2. El hidróxido de bario es venenoso. Véase lo referente a productos químicos venenosos en la norma COGUANOR NGO 56 002.

4.1.7 Reactivo de Ehrlich (ácido diazobencensulfónico). Se prepara una solución al 0.5% (m/v) de NaNO<sub>2</sub> en agua destilada y una solución al 0.5% (v/v) de ácido sulfanílico (ácido p-aminobencensulfónico) en HCl (1+19). El reactivo de Ehrlich se obtiene mezclando diariamente 1 parte de solución de NaNO<sub>2</sub> en 100 partes de solución de ácido sulfanílico. La solución de NaNO<sub>2</sub> debe prepararse cada 3 semanas.

Nota 3. Las soluciones se deben de mantener en refrigeración.

4.1.8 Solución de dianisidina. Se disuelven 250 mg de dianisidina (3,3'-dimetoxibencidina) en 50 mL de alcohol metílico anhidro, se adicionan 100 mg de carbón activado, se agita durante 5 min, se filtra y se mezclan 40 mL de filtrado claro con 60 mL de HCl 1N. La solución debe prepararse diariamente y protegerse de la luz.

Nota 4. La dianisidina puede ser nociva. Véase lo referente a polvos tóxicos en la norma COGUANOR NGO 56 002.

4.1.9 Solución al 0.3% (m/v) de nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>).

4.1.10 Triclorometano o cloroformo (CHCl<sub>3</sub>).

4.1.11 Florisil (1). adsorbente cromatográfico con un tamaño de partícula entre 250 μm (tamiz No. 60) y 150 μm (tamiz No. 100) activado a 260°C o a 650°C.

(1) "Florisil" es el nombre comercial del adsorbente cromatográfico de la casa "Floridin Co., USA".

#### 4.2 Aparatos o materiales.

- 4.2.1 Balanza analítica de precisión. que aprecie 0.1 mg.
- 4.2.2 Columnas cromatográficas. de 20 mm de diámetro exterior y 250 mm de longitud, con llave de teflón.
- 4.2.3 Probetas. de 50, 100 y 500 mL.
- 4.2.4 Embudos separadores. de 60, 125, 250 mL y 1 L.
- 4.2.5 Vasos de precipitados. de 30, 50, 100 y 200 mL.
- 4.2.6 Pipetas. de diferentes volúmenes.
- 4.2.7 Instrumental de laboratorio.

#### 4.3 Extracción de los antioxidantes de la muestra.

4.3.1 Se pesan aproximadamente 30 g de muestra de aceite o de grasa fundida por un calentamiento suave.

4.3.2 Se disuelve la muestra en 60 mL de éter de petróleo, se transfiere la solución a un embudo separador de 250 mL, se adicionan 15 mL de agua destilada, se agita suavemente durante 1 min, se deja que las capas se separen y se transfiere la fase acuosa a un embudo separador de 125 mL, dejando cualquier emulsión en la fase orgánica o etérea.

4.3.3 Se repite dos veces la extracción en el éter de petróleo, con porciones de 15 mL de agua destilada, transfiriendo los extractos acuosos al embudo separador de 125 mL. La fase acuosa se utiliza en la determinación del galato de propilo (PG) (véase numeral 4.4) y el extracto etéreo (A) se reserva para las otras determinaciones (véase numeral 4.5).

#### 4.4 Determinación de la presencia de galato de propilo (PG).

4.4.1 Se adicionan 15 mL de éter de petróleo, a los extractos acuosos combinados contenidos en el embudo separador de 125 mL (véase numeral 4.3.3), se agita durante 1 min y se desecha la fase acuosa.

4.4.2 Se transfiere la fase etérea a un vaso de precipitados de 30 mL, se evapora casi a sequedad el éter de petróleo, se le agrega al residuo de la evaporación 4 mL de alcohol etílico al 50% (v/v), se agita con movimiento circular y se adiciona 1 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Si el galato de propilo (PG) está presente, la solución se torna de un color rosa, el cual es inestable y desaparece después de unos pocos minutos.

#### 4.5 Separación de antioxidantes en el extracto etéreo.

4.5.1 Se transfiere el extracto etéreo (A) (véase numeral 4.3.3) a un embudo separador de 125 mL, se adicionan 20 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , se agita durante 2 min, se deja que las capas se separen y se transfiere la fase  $\text{CH}_3\text{CN}$  a un embudo separador de 1 L.

4.5.2 Se repite dos veces la extracción en la fase etérea con porciones de 30 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , desechando la fase etérea.

4.5.3 Se diluyen con 400 mL de agua destilada los extractos de  $\text{CH}_3\text{CN}$  combinados, se adicionan 2-3 g de  $\text{NaCl}$  y 20 mL de éter de petróleo, se agita durante 2 min, se deja que las capas se separen y se transfiere la fase  $\text{CH}_3\text{CN}$  diluida a un segundo embudo separador de 1 L.

Continúa

4.5.4 Se repite dos veces la extracción en la fase  $\text{CH}_3\text{CN}$  diluida, con porciones de 20 mL de éter de petróleo. Finalmente se combinan los diferentes extractos etéreos (B) en un vaso de precipitados de 100 mL, para utilizarlos en las determinaciones de BHA y BHT (véase los numerales 4.7 y 4.8); el extracto  $\text{CH}_3\text{CN}$  diluido se utiliza en la determinación del ácido nordihidroguayarático (NDGA) (véase el numeral 4.6).

#### 4.6 Determinación de la presencia del ácido nordihidroguayarático (NDGA).

4.6.1 Al extracto  $\text{CH}_3\text{CN}$  diluido (véase el numeral 4.5.4) se le adicionan 50 mL de solución (1+1) de éter de petróleo en éter etílico, se agita durante 2 min teniendo el cuidado de permitir la ventilación del embudo separador, se deja que las capas se separen y se descarta la fase  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

4.6.2 En un vaso de precipitados pequeño se evapora el éter de petróleo casi a sequedad, se agregan 4 mL de alcohol etílico al 50% (v/v), se agita con movimiento circular, se adiciona 1 mL de solución de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  al 1% (m/v) y se mezcla. Si el ácido nordihidroguayarático (NDGA) está presente, la solución se torna de un color azul que desaparece rápidamente.

#### 4.7 Determinación de la presencia de butilhidroxianisol (BHA).

4.7.1 Se transfiere 1/3 de los extractos etéreos combinados (B) (véase numeral 4.5.4) a un vaso de precipitados pequeño y se evapora casi a sequedad usando calor suave bajo una corriente de aire.

4.7.2 Se disuelve el residuo con 2.5 mL de alcohol etílico al 95% (v/v), se diluye con 2.5 mL de agua destilada, se agita con movimiento circular, se adiciona 1 mL de reactivo de Ehrlich e inmediatamente después se agrega 1 mL de solución de NaOH 1N y se agita nuevamente con movimiento circular. Si el butilhidroxianisol (BHA) está presente, la solución se torna de un color rojo púrpura.

#### 4.8 Determinación de la presencia de butilhidroxitolueno (BHT).

##### 4.8.1 Prueba de retención de BHT por el adsorbente florisil.

4.8.1.1 Se preparan una columna de Florisil según lo indicado en el numeral 5.8.2 y una solución de 0.2 mg de BHT en 25 mL de éter de petróleo. Se hace pasar la solución a través de la columna, se extrae con 150 mL de éter de petróleo, se recibe el extracto en un vaso de precipitados de 250 mL y se realiza el ensayo de presencia de BHT de acuerdo a lo indicado en los numerales 4.8.3.2 al 4.8.3.4

4.8.1.2 Si el BHT no es extraído, se activa el Florisil restante calentándolo a  $650^\circ\text{C}$  durante 2 h, se enfría, se desactiva adicionando agua destilada en una proporción equivalente al 6.5% de su masa y se homogeniza por agitación durante 1 h en un recipiente cerrado.

##### 4.8.2 Preparación de la columna cromatográfica de Florisil para la limpieza del extrato de BHT.

4.8.2.1 Se inserta un pequeño tapón de lana de vidrio dentro de la columna cromatográfica y se adicionan aproximadamente 12 g de Florisil, golpeando suavemente la columna.

4.8.2.2 Se lava la columna con dos porciones de éter de petróleo de 15 mL cada una, adicionando la segunda porción cuando el nivel del líquido de la primera esté aún por encima del nivel de Florisil. Cuando el nivel de la segunda porción se encuentra aproximadamente 1 cm encima del nivel de Florisil, se cierra la llave de la columna.

Continúa

Nota 5. PRECAUCION. No deje que la columna se seque.

#### 4.8.3 Procedimiento para la determinación de BHT.

4.8.3.1 Se hacen pasar 2/3 de los extractos etéreos combinados (B) (véase numeral 4.5.4) a través de una columna cromatográfica preparada de acuerdo al numeral 4.8.2, se extrae con 150 mL de éter de petróleo y se recibe el extracto en un vaso de precipitados de 250 mL.

4.8.3.2 Se evapora el extracto hasta sequedad, se disuelve el residuo con 2.5 mL de alcohol etílico al 95% (v/v), se agita con movimiento circular y se diluye con 2.5 mL de agua destilada.

4.8.3.3 Se adicionan 2 mL de solución de dianisidina y se mezcla, luego se adicionan 0.8 mL de solución al 0.3% (m/v) de  $\text{NaNO}_2$ , se mezcla, se deja reposar durante 5 min y se transfiere la mezcla a un embudo separador pequeño.

4.8.3.4 Se adicionan a la mezcla 0.5 mL de  $\text{CHCl}_3$ , se agita vigorosamente durante 30 s y se deja que las capas se separen. Si el butilhidroxitolueno (BHT) está presente, la capa de  $\text{CHCl}_3$  se torna de un color rosa a rojo.

4.8.4 Confirmación de la presencia de BHT. La presencia de BHT se confirma comparando la curva espectrofotométrica del extracto de  $\text{CHCl}_3$  coloreado, con una curva control de estándares de referencia de BHT, preparada de la manera siguiente: se disuelven aproximadamente 15 mg de estándar de BHT en 5 mL de alcohol en agua (1+1), se adicionan 2 mL de solución de dianisidina y se procede de acuerdo a lo indicado en los numerales 4.8.3.3 y 4.8.3.4.

### 5. **METODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC) PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO DE BHA, BHT, DG, Ionox-100, NDGA, OG, PG, THBP Y TBHQ EN ACEITES, GRASAS Y GRASA O MANTEQUILLA DE LECHE ANIDRA (2)**

5.1 Campo de aplicación. El método es aplicable a BHA, BHT, Ionox-100, NDGA, PG, THBP Y TBHQ a concentraciones de 20 mg a 200 mg por gramo en aceites y grasas y para OG y DG a concentraciones de 10  $\mu\text{g}$  a 100  $\mu\text{g}$  por gramo en grasa o mantequilla de leche anhidra.

5.2 Principio del método. Se extraen los antioxidantes con acetonitrilo, se concentra el extracto y se diluye el contenido con un volumen igual de 2-propanol. Se separan los antioxidantes por cromatografía líquida y se miden en un detector ultra violeta (UV) a 280 nm.

#### 5.3 Reactivos

5.3.1 Solventes. Acetonitrilo, 2-propanol (iso-propanol) y hexano, destilados en vidrio.

5.3.1.1 Solvente de extracción (A). Hexano saturado. Se saturan aproximadamente 300 mL de hexano en un embudo de separación, agregando acetonitrilo, agitando durante 2 min y descartando la capa superior de acetonitrilo cuando ambas capas se separen.

5.3.1.2 Solvente de extracción (B). Acetonitrilo saturado. Se saturan aproximadamente 300 mL de acetonitrilo en un embudo de separación, agregando hexano, agitando durante 2 min y descartando la capa superior de hexano al separarse.

(2) La grasa o mantequilla de leche anhidra se conoce como "Butter Oil".

Continúa

5.3.2 Antioxidantes de referencia. BHA (mezcla de 2- y 3-BHA), BHT, TBHQ, Ionox-100, THBP y PG (3); NDGA, OG y DG (4). Todos los antioxidantes de referencia deben tener una pureza igual o mayor al 97%.

5.3.3 Soluciones estándar de antioxidantes. Las soluciones se preparan con 2-propanol-acetonitrilo (1+1) y se refrigeran protegidas de la luz. Se debe verificar la respuesta del TBHQ relativa al PG o al THBP y preparar soluciones estándar frescas si la respuesta disminuye en un 5%.

Nota 6. PRECAUCION. El TBHQ se oxida rápidamente, especialmente en presencia de luz.

5.3.3.1 Solución madre o concentrada, de 1 mg/mL. Se prepara de la manera siguiente: se pesan cuidadosamente 50 mg de cada antioxidante de referencia con una exactitud de 0.1 mg, se transfieren a un matraz volumétrico de 50 mL, se disuelven con solución (1+1) de 2-propanol-acetonitrilo, se lleva a volumen y se mezcla.

5.3.3.2 Solución estándar de trabajo, de 0.01 mg/mL (10 µg/mL). Se prepara de la manera siguiente: con una pipeta se transfiere 1 mL de la solución madre a un matraz volumétrico de 100 mL, se lleva a volumen con solución (1+1) de 2-propanol-acetonitrilo y se mezcla.

5.3.4 Solventes. Deben utilizarse solventes grado reactivo para cromatografía líquida de alta presión o equivalentes.

5.3.4.1 Solvente A. Agua destilada adicionada de un 5% (v/v) de ácido acético.

5.3.4.2 Solvente B. Solución (1+1) de acetonitrilo-metanol.

5.4 Aparatos o materiales

5.4.1 Balanza analítica de precisión, que aprecie 0.1 mg.

5.4.2 Cromatógrafo líquido de alta presión. Equipado con bomba binaria o cuaternaria que permita trabajar con gradientes, registrador o integrador de 10 mV para medir electrónicamente la altura de los picos, asa de 10 µL, detector de UV para medir absorbencias a 280 nm y que opere a las condiciones siguientes.

a) Detector de sensibilidad: 0.05 AUFS;

b) Constante de tiempo: 0;

c) Temperatura: ambiente; y

d) Velocidad de flujo: 2 mL/min.

5.4.3 Columna cromatográfica. Empacada con sílica esférica (de preferencia) ligada-C<sub>18</sub>, o un empaque equivalente. Si se desea, se usa columna de protección.

---

(3) Los antioxidantes BHA, BHT, TBHQ, Ionox-100, THBP y PG pueden obtenerse en Poly Science, Niles IL, USA (del antioxidante Ionox-100 no hay mucha disponibilidad).

(4) Los antioxidantes NDGA, OG y DG pueden obtenerse en Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI, USA.

Continúa

5.4.3.1 La separación de la línea base de los 9 antioxidantes, se debe obtener tal como se muestra en la figura 1. Si es necesario, se verifica la identidad de los picos, inyectando individualmente los estándares.

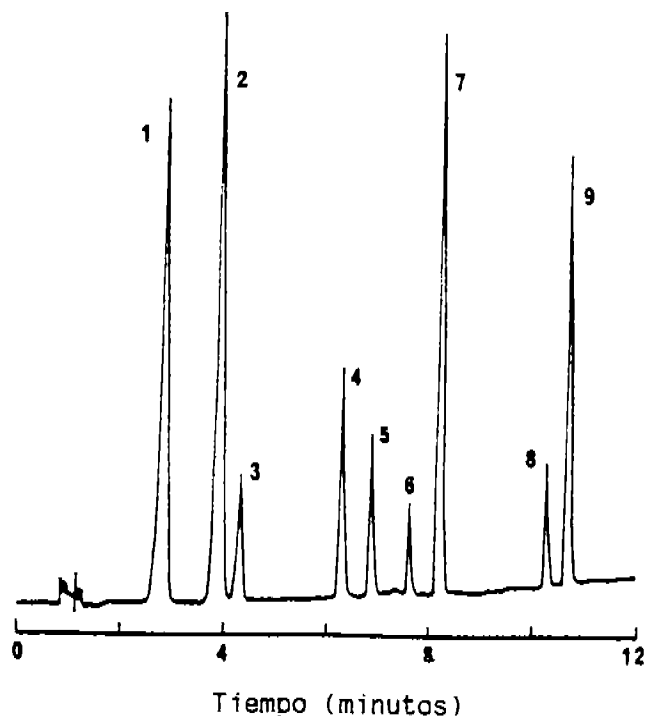


Fig. 1 Separación cromatográfica de antioxidantes estándar, aproximadamente 0.1  $\mu$ g de cada antioxidante. 1) PG; 2) THBP; 3) TBHQ; 4) NDGA; 5) BHA; 6) Ionox-100; 7) OG; 8) BHT; 9) DG.

5.4.4 Cristalería de laboratorio. Toda la cristalería se lava con los solventes siguientes, en su orden: cloroformo, acetona y alcohol metílico; finalmente se seca con una corriente de nitrógeno.

#### 5.5 Extracción de antioxidantes

5.5.1 En un vaso de precipitados de 50 mL se pesan 5.5 g de muestra de aceite o grasa anhidra con una exactitud de 0.01 g; o bien se pesan aproximadamente 3.0 g de muestra de grasa o manteca, la cual luego se funde a 60°C en un baño de agua o en un horno, agitando la muestra para su homogenización.

5.5.2 Se transfiere toda la muestra a un embudo de separación de 125 mL que contenga hexano saturado (20 mL para muestras de aceite y grasa anhidra y 22.4 mL para muestras de grasas o mantecas). Se vuelve a pesar el vaso de precipitados para determinar por diferencia la masa exacta de la muestra transferida.

5.5.3 Se agita el embudo de separación para mezclar la muestra con el hexano, y se hacen tres extracciones con porciones de 50 mL de acetonitrilo saturado. Si durante la extracción se forman emulsiones, se rompen introduciendo el embudo separador en agua caliente durante 5 s a 10 s, teniendo cuidado de no introducir agua dentro del embudo.

5.5.4 Se recogen los extractos en un embudo separador de 250 mL y estos extractos combinados se pasan lentamente a un matraz de fondo redondo de 250 mL o 500 mL. Las gotas de hexano-aceite que puedan estar presentes en la superficie se eliminan con este procedimiento.

Continúa

Nota 7. En este momento puede suspenderse el procedimiento y almacenar en refrigeración, durante la noche, el extracto de acetonitrilo.

5.5.5 Se concentra el extracto de acetonitrilo a un volumen de 3 mL a 4 mL, evaporando con vacío y un baño de agua a una temperatura menor o igual a 40°C. Esta evaporación debe efectuarse en un tiempo menor de 10 min.

Nota 8. Pérdidas de antioxidante TBHQ pueden ocurrir si el tiempo de evaporación es mayor de 10 min. Debe usarse una fuente eficiente de vacío y hielo-agua en el condensador de enfriamiento, para disminuir el tiempo de evaporación.

Nota 9. Al emplear un matraz de 500 mL se reducen las pérdidas causadas por ebullición violenta. Debe garantizarse la transferencia cuantitativa del extracto concentrado.

5.5.6 Con una pipeta desechable se transfiere la mezcla concentrada de acetonitrilo-gotas de aceite a una probeta graduada de 10 mL, con tapón de vidrio.

5.5.7 Se lava el matraz de fondo redondo con porciones pequeñas de acetonitrilo no saturado y con la pipeta desechable se transfieren los líquidos de lavado a la probeta graduada de 10 mL, hasta que se reúnan 5 mL.

5.5.8 Se lava la pipeta desechable completamente y se continúa el lavado del matraz de fondo redondo con porciones pequeñas de 2-propanol, se transfieren los líquidos de lavado a la probeta graduada de 10 mL hasta que se reúnan 10 mL y finalmente se mezcla el contenido de la probeta graduada, obteniéndose así la solución de muestra preparada.

Nota 10. Luego que se ha obtenido la solución de muestra preparada, se deben evitar atrasos en la continuación del análisis debido a que pueden ocurrir pérdidas del antioxidante TBHQ.

## 5.6 Fase móvil

5.6.1 Gradiente lineal. Se utiliza un gradiente lineal de acuerdo al programa siguiente: se inicia con un 30% de solvente B en solvente A hasta tener 100% de solvente B en un período de 10 min; se debe mantener el 100% de B hasta que el último antioxidante (DG) sea extraído.

5.6.1.1 Gradiente lineal para las muestras. Se aumenta la velocidad de flujo a 4 mL/min, manteniendo un 100% de solvente B por un período de 6 min o hasta que los lípidos no polares sean extraídos.

5.6.1.2 Gradiente lineal para las muestras y estándares. Se retorna a un 30% de solvente B en solvente A en un período de 1 min a un flujo de 2 mL/min y se deja que la línea base y la presión se estabilicen (aproximadamente 6 min).

Nota 11. Si resulta una excesiva contrapresión se reduce la velocidad de flujo y proporcionalmente se incrementan los tiempos de enjague y equilibrio.

5.6.2 Gradiente en blanco. Se corre una prueba en blanco (sin inyección) para asegurar que no están presentes picos que interfieran con cualquiera de los antioxidantes sometidos a ensayo. Para eliminar o reducir los picos resultantes del solvente de extracción A, se reemplaza el filtro de entrada con el cartucho de extracción sólido-fase C<sub>18</sub> preenjaguado y se usa filtro en línea. Si se encuentran pequeños picos de interferencias que no pueden eliminarse, se debe corregir la altura de todos los picos relevantes a manera de eliminar el efecto de la interferencia.

Continúa



## 5.7 Cromatografía

5.7.1 A través de la válvula de inyección, se inyectan dentro de la columna 10 µL de la muestra extraída y luego se sigue el programa de solvente para muestras (véase el numeral 5.6.1.1). Antes y después de cada 3 o 4 inyecciones de prueba, o más frecuentemente si se encuentran diferencias entre las alturas de los picos del estándar superiores al 5%, se inyectan 10 µL de solución estándar de trabajo (10 µg/mL) y luego se sigue el programa de solvente para muestras y estándares.

5.7.2 Para picos fuera de la escala o superiores a tres veces el valor del estándar, se diluye cuantitativamente la muestra con 2-propanol-acetonitrilo (1+1) y se reinyecta.

5.7.3 Identificación de antioxidantes. Se identifican los antioxidantes en la muestra, comparándolos con los tiempos de retención de los estándar de antioxidantes.

## 5.8 Prueba en blanco para los reactivos.

5.8.1 Extracción. Con una pipeta se transfieren 25 mL de hexano saturado a un embudo separador de 125 mL y se continúa la extracción en blanco siguiendo el procedimiento indicado en los numerales 5.5.3 a 5.5.8.

5.8.2 Cromatografía. Se inyectan 10 µL de la solución de reactivos resultante de la extracción en blanco y luego se sigue el programa de solventes para muestras (véase el numeral 5.6.1.1). No deben estar presentes picos que interfieran con la determinación de cualquier antioxidante.

5.9 Utilización de las pruebas en blanco. Se utiliza un gradiente cromatográfico en blanco, como guía para:

- a) Seguir la línea base de los antioxidantes;
- b) La determinación de la altura promedio de los picos de antioxidantes en la muestra inyectada por duplicado (corregidos para reactivos y gradiente en blanco); y
- c) La determinación de la altura promedio de los picos de los estándares de antioxidantes, inyectados antes y después de la inyección de la solución de muestra (corregidos para gradiente en blanco).

5.10 Cálculos. La concentración de los antioxidantes se calcula con la fórmula siguiente:

$$A_x = (R_x/R_s) \times (C_s/W_x) \times D$$

en donde:

$A_x$  = Contenido del antioxidante presente en la muestra, en miligramos por kilogramo (partes por millón).

$R_x$  = Altura del pico del antioxidante en la muestra.

$R_s$  = Altura del pico del estándar de antioxidante.

$C_s$  = Concentración del estándar de antioxidante, en microgramos por mililitro.

$W_x$  = Masa de la muestra en 10 mL de extracto final, en gramos por mililitro.

$D$  = Factor de dilución (se utiliza cuando la muestra preparada se inyecta diluida; véase numeral 5.7.2).

Continúa

5.11 Tablas de comportamiento del método de determinación de antioxidantes fenólicos en aceites, grasas y grasa de leche anhidra.

**TABLA 1. Comportamiento del método de determinación de antioxidantes fenólicos en aceite por cromatografía líquida de alta presión.**

Anti-oxidante	Promedio recuperado, en microgramos por gramo			Repetibilidad		Reproducibilidad	
	Agregado (a)	Recuperado	Porcentaje	Sr	RSD <sub>r</sub> , porcentaje	SR	RSD <sub>R</sub> , porcentaje
PG	193.7	184	95.2	16.0	8.66	16.0	8.66
PG	96.7	93.8	96.9	4.50	4.80	4.50	4.80
PG	19.4	17.6	90.9	2.01	11.5	2.52	14.3
THBP <sup>(b)</sup>	203.2	199	98.1	9.99	5.0	9.99	5.01
THBP	101.6	99.1	97.5	5.25	5.30	5.58	5.63
THBP	20.3	19.6	96.7	0.97	4.94	1.53	7.77
TBHQ	196.1	201	103	8.77	4.36	22.8	11.4
TBHQ	98.1	100	102	3.63	3.63	21.5	21.5
TBHQ	19.6	19.1	97.5	1.50	7.85	3.17	16.6
NDGA	93.8	91.7	97.8	5.06	5.51	6.39	6.97
NDGA	18.8	18.4	98.3	0.34	1.83	0.60	3.24
BHA	198.5	197	99.1	6.54	3.32	6.61	3.36
BHA	99.2	99.7	101	5.43	5.45	6.15	6.17
BHA	19.9	19.5	98.0	0.43	2.19	0.76	3.92
IONOX	208.2	198	95.3	17.7	8.92	19.4	9.76
IONOX	104.1	98.7	94.8	10.2	10.4	10.5	10.6
IONOX <sup>(c)</sup>	20.8	20.2	97.0	0.71	3.54	1.14	5.63
BHT <sup>(c)</sup>	202.9	170	83.8	3.50	2.06	4.54	2.67
BHT <sup>(c)</sup>	101.5	84.3	83.1	2.36	2.80	2.36	2.80
BHT	20.3	17.2	85.1	0.90	5.22	1.06	6.18

(a) Los valores de antioxidante agregado son medidos con 4 cifras significativas, pero redondeados al más cercano 0.1 µg/g.

(b) Dos de siete laboratorios rechazados como no confiables por la prueba Grubbs par.

(c) Uno de siete laboratorios rechazado como no confiable por la prueba Grubbs simple.

Continúa

**TABLA 2. Comportamiento del método de determinación de antioxidantes fenólicos en manteca por cromatografía líquida de alta presión.**

Anti-oxidante	Promedio recuperado, en microgramos por gramo			Repetibilidad		Reproducibilidad	
	Agregado (a)	Recuperado	Porcentaje	Sr	RSDr, porcentaje	SR	RSDR, porcentaje
PG	96.9	90.1	93.0	3.18	3.53	3.18	3.53
PG	38.7	34.6	89.4	1.55	4.48	1.55	4.48
THBP	101.6	97.9	96.4	6.75	6.89	14.3	14.6
THBP(b)	40.7	36.4	89.5	1.35	3.71	1.47	4.06
TBHQ	98.1	95.6	97.5	7.71	8.07	22.1	23.2
TBHQ	39.3	35.0	89.0	6.04	17.3	11.6	33.2
NDGA	93.8	87.8	93.6	2.65	3.02	4.74	5.40
NDGA	37.5	35.3	94.2	1.06	3.01	1.79	5.06
BHA	99.2	97.4	98.2	2.49	2.56	3.72	3.82
BHA	39.7	38.3	96.6	1.90	4.97	1.90	4.97
IONOX	104.1	99.3	95.4	4.83	4.87	5.45	5.49
IONOX	41.7	40.7	97.7	3.49	8.56	4.90	12.0
BHT	101.5	87.9	86.6	4.63	5.27	4.90	5.58
BHT	40.6	34.6	85.2	1.11	3.22	1.17	3.39

(a) Los valores de antioxidante agregado son medidos con 4 cifras significativas, pero redondeados al más cercano 0.1 µg/g.

(b) Uno de siete laboratorios fue rechazado como no confiable por la prueba Grubbs simple.

Continúa

**TABLA 3. Comportamiento del método de determinación de antioxidantes fenólicos en grasa de leche anhidra o mantequilla anhidra por cromatografía líquida de alta presión.**

Anti-oxidante	Promedio recuperado, en microgramos por gramo			Repetibilidad		Reproducibilidad	
	Agregado (a)	Recuperado	Porcentaje	Sr	RSDr, porcentaje	SR	RSDR, porcentaje
PG	92.1	89.3	97.0	4.76	5.33	6.08	6.81
PG	46.0	46.9	102	3.86	8.23	4.54	9.67
PG	9.20	9.53	104	0.450	4.72	0.875	9.17
THBP	87.0	82.3	94.6	5.34	6.48	11.2	13.6
THBP	43.6	42.8	98.1	3.77	8.81	6.68	15.6
THBP	8.69	8.7	101	1.39	15.9	2.00	22.9
TBHQ	105.9	111	105	10.9	9.78	24.3	21.8
TBHQ	52.8	51.8	98.2	2.01	3.87	11.0	21.2
TBHQ	10.5	11.3	107	1.55	13.8	3.82	34.0
NDGA(b)	96.5	93.0	96.4	6.27	6.74	6.27	6.74
NDGA	48.3	47.0	97.3	3.22	6.86	4.66	9.91
NDGA	9.63	8.9	92.5	2.11	23.7	2.39	26.8
BHA	101.3	96.3	95.2	8.49	8.81	8.49	8.81
BHA	50.6	48.8	96.5	2.29	4.70	2.50	5.12
BHA	10.1	10.2	101	0.515	5.06	0.597	5.87
IONOX	105.7	103	97.4	4.79	4.66	7.52	7.31
IONOX	52.9	50.2	94.9	3.77	7.51	4.13	8.24
IONOX	10.6	9.36	88.6	1.22	13.0	1.25	13.4
OG	89.2	86.3	96.8	3.80	4.40	4.37	5.06
OG	43.7	42.0	96.2	2.89	6.87	2.89	6.87
OG	8.76	8.19	93.5	1.69	20.6	1.69	20.6
BHT	96.5	76.7	79.4	9.16	12.0	9.51	12.4
BHT(b)	48.4	38.8	80.2	2.58	6.64	3.16	8.12
BHT(c)	9.65	7.47	77.4	0.443	5.94	1.03	13.8
DG	101.1	96.7	95.7	4.02	4.16	7.94	8.21
DG	50.6	48.8	96.5	2.98	6.12	3.05	6.24
DG	10.1	9.76	96.4	0.468	4.80	0.742	7.61

(a) Los valores de antioxidante agregado fueron medidos con 4 cifras significativas, pero redondeados al más cercano 0.1 µg/g.

(b) Dos de nueve laboratorios fueron rechazados como no confiables por la prueba Grubbs par.

(c) Dos de nueve laboratorios fueron rechazados como no confiables por la prueba Cochran y luego por la prueba Grubbs simple.

Continúa

5.11.1 En las tres tablas anteriores las siglas incluidas tienen el siguiente significado:

$s_r$  = Desviación estándar de repetibilidad.

$S_R$  = Desviación estándar de reproducibilidad.

$RSD_r$  = Desviación estándar relativa de repetibilidad.

$RSD_R$  = Desviación estándar relativa de reproducibilidad.

## 6. METODO POR CROMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO DE BHA Y BHT EN CEREALES LISTOS PARA COMER.

6.1 Principio del método. Los antioxidantes BHA y BHT se extraen de la muestra de cereales listos para comer con disulfuro de carbono y se determinan por cromatografía en fase gaseosa usando detector de ionización de llama.

### 6.2 Reactivos.

6.2.1 Disulfuro de carbono ( $CS_2$ ). grado reactivo. Claro, incoloro o amarillo débil; si tiene un color amarillo debe destilarse antes de usarse.

Nota 12. El disulfuro de carbono es altamente inflamable. Véase lo referente a líquidos inflamables en la norma COGUANOR NGO 56 002.

6.2.2 Solución estándar interna. a una concentración de 0.1  $\mu g$  di-BHA/ $\mu L$   $CS_2$ . La solución debe ser fresca y haber sido almacenada después de su preparación en envases de vidrio de bajo contenido actínico.

6.2.3 Mezcla estándar de BHA, BHT y di-BHA. a una concentración de 0.02  $\mu g$  BHA/ $\mu L$   $CS_2$ , 0.02  $\mu g$  BHT/ $\mu L$   $CS_2$  y 0.02  $\mu g$  di-BHA/ $\mu L$   $CS_2$ . Se prepara de la manera siguiente: En un matraz volumétrico de 50 mL se disuelven 1.00 mg de BHA y 1.00 mg de BHT con pequeñas cantidades de  $CS_2$ , se adicionan 10 mL de solución estándar interna y se lleva a volumen con  $CS_2$ , o bien se preparan soluciones de mezcla estándar más concentradas y se toman alícuotas para obtener las concentraciones indicadas. La solución debe ser fresca y haber sido almacenada en envases de vidrio de bajo contenido actínico, después de su preparación.

6.2.4 Solución de diclorodimetilsilano. Se transfieren 5 mL de diclorodimetilsilano a un matraz volumétrico de 100 mL y se lleva a volumen con tolueno.

Nota 13. El diclorodimetilsilano es tóxico; evítese su contacto con la piel y ojos. Véase lo referente a productos químicos tóxicos en la norma COGUANOR NGO 56 002.

6.2.5 Tetracloruro de carbono ( $CCl_4$ ).

Nota 14. El tetracloruro de carbono es tóxico. Véase lo referente a productos químicos tóxicos en la norma COGUANOR NGO 56 002.

6.2.6 Cloruro de metileno ( $CH_2Cl_2$ ) o cloroformo ( $CHCl_3$ ).

### 6.3 Aparatos o materiales.

6.3.1 Balanza de precisión. que aprecie 0.1 mg.

6.3.2 Cromatógrafo de gases. provisto de detector de ionización de llama. Las condiciones de operación del cromatógrafo serán las siguientes:

Continúa

- a) Temperatura de la columna: 160°C.
- b) Temperatura del detector: 210°C.
- c) Temperatura del puerto de inyección: 200°C.
- d) Velocidad del flujo de N: Ajustado para extraer el BHT en 3-4 min en una columna empacada con QF-1 y para extraer el BHA en 3-4 min en una columna empacada con Apiezon L.
- e) Velocidad del flujo de H: aproximadamente 40 mL/min en una columna empacada con Apiezon L y aproximadamente 25 mL/min en una columna empacada con QF-1.
- f) Velocidad del flujo de aire: Aproximadamente 340 mL/min.
- g) Sensibilidad del electrómetro: 500 x (5 x 10<sup>-10</sup>A, de deflexión a escala completa) con registrador de 1 mV.

6.3.3 Columnas de vidrio para cromatografía gaseosa, (véase numeral 6.4.2.2).

- a) Columna de 1.2 m x 4 mm, empacada con Apiezon L sobre Gas-Chrom Q (5) de un tamaño de partícula de 180-150 µm; y
- b) Columna de 1.8 m x 4 mm, empacada con aceite de silicona QF-1 (Flúor silicona fluida, FS 1265) sobre Gas-Chrom Q de un tamaño de partícula de 180-150µm.

6.3.4 Tubo cromatográfico de vidrio o columna de extracción, de 200 mm x 25 mm. Con el extremo terminado en punta fina tipo gotero de 50 mm de largo x 6 mm de diámetro exterior, con disco de vidrio de porosidad media o sin él y una varilla de vidrio ajustada para compactar.

6.3.5 Lana de vidrio fina. Se lava con CS<sub>2</sub> y se seca.

6.3.6 Cristalería de laboratorio.

6.4 Preparación de las columnas cromatográficas.

6.4.1 Limpieza. Las columnas y el material para columnas se preparan lavando cuidadosamente el interior de las columnas y cantidades pequeñas de lana de vidrio fina con solución de diclorodimetilsilano, después se enjuagan con alcohol metílico y finalmente se secan.

6.4.2 Preparación del soporte.

6.4.2.1 Se llena casi completamente con CCl<sub>4</sub> un vaso de precipitados de 800 mL, se esparcen lentamente sobre el solvente 50 g de soporte Gas-Chrom Q, se remueven las partículas finas de soporte que permanecen sobre la superficie utilizando una línea de vacío, se decanta el solvente y se seca el soporte.

6.4.2.2 Se transfieren 20 g de Gas-Chrom Q seco a un matraz de fondo redondo de 500 mL, se adicionan 100 mL de CHCl<sub>3</sub> o de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se mezcla suavemente; luego se disuelve 1.0 g de Apiezon L ó 2.0 g de QF-1, según corresponda, en 50 mL de CHCl<sub>3</sub> o de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se transfieren al matraz de fondo redondo, finalmente se mezcla suavemente y se evapora a sequedad usando un evaporador rotatorio al vacío con baño de agua a 35°C cuando se usa CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y a 70°C cuando se usa CHCl<sub>3</sub>.

(5) "Gas-Chrom Q puede obtenerse en "Applied Science Laboratories, USA".

Continúa

### 6.4.3 Empacado de la columna.

6.4.3.1 Se tapa cuidadosamente la salida de la columna con un tapón pequeño de lana de vidrio fina.

6.4.3.2 Se aplica vacío al puerto de salida (agujero de salida) de la columna y a través del puerto de inyección (agujero de inyección) se adiciona soporte recubierto, golpeando muy suavemente para ayudar a la compactación del soporte, se empaca dejando libre 1 cm en el área calentada por el puerto de inyección del cromatógrafo. se tapa con un tapón de lana de vidrio fina y se acondiciona a 200°C con un flujo bajo de N<sub>2</sub> (10 mL/min), durante 3 días o hasta que se obtenga una línea base constante.

Nota 15. En la columna de 1.2 m de largo se utiliza soporte recubierto Apiezon L/Gas-Chrom Q y en la columna de 1.8 m de largo se utiliza soporte recubierto QF-1/Gas-Chrom Q.

### 6.5 Preparación del cromatógrafo.

6.5.1 Si fuera necesario se ajusta el flujo de H<sub>2</sub> y el flujo de aire. Alternativamente se ajusta la sensibilidad del electrómetro a manera que 0.1 µg de BHA den una deflexión de aproximadamente el 50% de la escala. Se repiten las inyecciones hasta que se obtienen picos de altura constante en inyecciones sucesivas de volúmenes idénticos de mezcla estándar.

Nota 16. El orden de aparición de los antioxidantes en la columna de 1.2 m empacada con Apiezon L/Gas-Chrom Q es: BHA, BHT, di-BHA; y el orden de aparición en la columna de 1.8 m empacada con QF-1/Gas-Chrom Q es BHT, BHA, di-BHA.

6.5.2 Se utilizan dos columnas de cromatografía gaseosa para identificar BHA y BHT. Se utiliza la columna de 1.2m empacada con Apiezon L/Gas-Chrom Q para resolver los isómeros 2- y 3-BHA, ajustando el cromatógrafo para obtener una buena separación de los isómeros de BHA, a una temperatura de la columna de 150°C y una sensibilidad del electrómetro de 1000 x. Se ajusta la cantidad de estándar de BHA inyectado, para dar una deflexión del 50% de la escala.

### 6.6 Procedimiento.

#### 6.6.1 Generalidades.

- Se deben proteger todas las soluciones de la luz.
- Se debe completar el ensayo en un día.
- Se puede utilizar para el análisis, cualquiera de las columnas para cromatografía indicadas en el numeral 6.3.3.

#### 6.6.2 Extracción de los antioxidantes.

6.6.2.1 Se muele la muestra a un tamaño de partícula tal que pase por el tamiz No. 20 (850 µm) y se mezcla bien.

Nota 17. Cuando sea necesario, la muestra molida puede almacenarse congelada bajo atmósfera de nitrógeno por unos pocos días.

6.6.2.2 Se coloca, si fuera necesario, un pequeño tapón de lana de vidrio fina en el fondo del tubo cromatográfico, se adicionan a la columna 20 g de muestra molida usando la varilla de compactación para empacarla firmemente sin solvente y luego se coloca en la parte superior de la columna otro tapón de lana de vidrio, presionando hacia abajo.

6.6.2.3 Se coloca abajo de la columna de extracción, para recolectar los extractos, un vaso de precipitados de 100 mL marcado al nivel de 50 mL.

6.6.2.4 Se agregan a la columna 3 porciones de CS<sub>2</sub> de 5 mL cada una, dejando que cada porción penetre dentro de la columna antes de adicionar la siguiente. El flujo de CS<sub>2</sub> debe mantenerse a una velocidad de 5 mL/min, usando N si fuera necesario.

6.6.2.5 Se agregan a la columna varias porciones de CS<sub>2</sub> de 10 mL cada una, dejando que cada porción penetre dentro de la columna antes de adicionar la siguiente hasta que se recolecten 50 mL de extractos.

6.6.2.6 Se lava la parte inferior de la columna con pequeñas cantidades de CS<sub>2</sub>.

6.6.2.7 Se adiciona a los extractos con mucho cuidado di-BHA, a manera de tener una concentración de 0.02 µg di-BHA/µL de solución final o muestra para análisis cromatográfico.

6.6.2.8 Se evapora el extracto a un volumen menor de 5 mL bajo una campana de extracción, a temperatura ambiente y con una corriente suave de N. Con mucho cuidado se diluye la muestra evaporada a 5 mL, obteniéndose así la muestra para análisis cromatográfico.

### 6.6.3 Cromatografía.

6.6.3.1 Con una jeringa de 10 µL, se inyectan dentro del cromatógrafo 3.0-9.0 µL de muestra para análisis cromatográfico.

6.6.3.2 Antes y después de cada serie de cromatogramas de muestra, se inyectan 3.0-9.0 µL de la mezcla estándar, se promedian los valores estándar para usarlos en los cálculos y finalmente se mide la altura de cada pico en milímetros.

Nota 18. La altura de los picos de BHA, BHT y di-BHA, deben estar en el rango de 30-95% de la escala completa de deflexión.

6.7 Cálculos. La concentración de los antioxidantes, corregida para estándar interno, se calcula de la manera siguiente:

$$A_x = (H/H') \times (C'/C) \times (H_i'/H_i) \times (C_i/C_i')$$

en donde:

x = Contenido de BHA o BHT en la muestra, en miligramos por kilogramo (partes por millón).

H = Altura del pico del antioxidante en la muestra, en milímetros.

H' = Altura del pico del antioxidante estándar, en milímetros.

H<sub>i</sub> = Altura del pico del estándar interno en la muestra, en milímetros.

H<sub>i</sub>' = Altura del pico de la solución estándar, en milímetros.

C = Concentración de la muestra, en gramos por microlitro.

C' = Concentración del estándar, en microgramos por microlitro.

C<sub>i</sub> = Concentración del estándar interno en la muestra, en microgramos por microlitro.

C<sub>i</sub>' = Concentración de la solución estándar, en microgramos por microlitro.

Continúa



**7. CORRESPONDENCIA**

Esta norma norma concuerda con:

- a) Method 965.28 "Antioxidants in Food. Qualitative Color Tests. AOAC. Official Methods of Analysis (1995). USA.";
- b) Method 983.15 "Phenolic Antioxidants in Oils Fats and Butter Oil. Liquid Chromatographic Method. AOAC. Official Methods of Analysis (1995). USA.";
- c) Method 968.17 "Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene in Cereals. Gas Chromatographic Method. AOAC. Official Methods of Analysis (1995). USA.".

———ULTIMA LINEA———

FW3

C:/ 34147h31