

MAYONESA

Determinación de colesterol

1. OBJETO

Esta norma tiene por objeto establecer los métodos para determinar el contenido de colesterol en la mayonesa.

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

- a) Método cromatográfico con derivatización de los esteroides como trimetilsilil ésteres
- b) Método cromatográfico con derivatización de los esteroides como acetato

2. NORMAS COGUANOR A CONSULTAR

COGUANOR NGO 4 010 Sistema Internacional de Unidades (SI)
1a. Revisión

COGUANOR NGO 56 002 Precauciones básicas en el manejo de sustancias peligrosas en el laboratorio

3. DEFINICIONES

3.1 Contenido de colesterol en la mayonesa. Es el contenido de colesterol determinado bajo las condiciones descritas en la presente norma.

4. METODO CROMATOGRAFICO CON DERIVATIZACION DE LOS ESTEROLES COMO TRIMETILSILIL ESTERES

4.1 Principio del método. El método se basa en la extracción de los lípidos de la muestra mediante una mezcla de solventes, y saponificación posterior de los mismos. La fracción insaponificable que contiene el colesterol y otros esteroides es extraída con benceno; los

Continúa

esteroles son transformados a la forma trimetilsilil ésteres (TMS) los cuales son determinados cuantitativamente por cromatografía de gases, usando 5 α -colestano como estándar interno.

4.2 Reactivos o materiales. Todos los reactivos deben ser de calidad analítica reconocida. El agua debe ser destilada o de pureza equivalente.

4.2.1 Soluciones estándar de colesterol.

4.2.1.1 Solución patrón. Se prepara disolviendo la cantidad necesaria de colesterol en dimetilformamida para obtener una solución de 1,0 mg por centímetro cúbico de concentración.

4.2.1.2 Soluciones de trabajo. Se preparan diluyendo la solución patrón con dimetilformamida de manera de obtener concentraciones desde 0,05 a 0,5 mg/cm³. Se deben preparar como mínimo 5 soluciones de trabajo; con concentraciones comprendidas entre los límites indicados.

4.2.2 Soluciones de 5 α -colestano para estándar interno.

4.2.2.1 Solución patrón. Se prepara disolviendo la cantidad necesaria de 5 α -colestano en n-heptano para obtener una solución de 1,0 mg por centímetro cúbico de concentración.

4.2.2.2 Solución de trabajo. Se prepara diluyendo la solución patrón con n-heptano para obtener una concentración de 0,2 mg por centímetro cúbico.

4.2.3 Dimetildiclorosilano.

4.2.4 Dimetilformamida, destilada en un aparato de vidrio.

4.2.5 Lana de vidrio, tratada con Silano

4.2.6 n-Heptano, destilado en aparato de vidrio.

4.2.7 Hexametildisilazano (HMDS).

4.2.8 Solución concentrada de hidróxido de potasio. Se prepara disolviendo 60 g de KOH en 40 cm³ de agua.

4.2.9 Reactivo alcohólico. Se prepara mezclando 90 partes de etanol con 5 partes de metanol y 5 partes de isopropanol, todas en volumen.

4.2.10 Tolueno-Nanogrado, destilado en aparato de vidrio.

4.2.11 Trimetilclorosilano (TMCS)

4.2.12 Reactivo trimetilsilil (TMS). Se prepara mezclando 9 volúmenes de hexametildisilazano, mas 6 volúmenes de trimetilclorosilano mas 10 volúmenes de piridina.

PRECAUCION: Todos los silanos son tóxicos, se debe evitar el contacto con la piel y con los ojos, y usar un removedor efectivo de sus gases.

4.2.13 Solución al 5% de ácido fluorhídrico, véase la norma COGUANOR NGO 56002.

Continúa

- 4.2.14 Metanol anhidro
- 4.2.15 Iso-octano, véase la norma COGUANOR NGO 56 002
- 4.2.16 Material de empaque para la columna del cromatógrafo de gas
- 4.2.16.1 Material de empaque comercial. De 0,5% de Apiezon L sobre Gas - Chrom Q que pase un tamiz No. 80 ó 100.
- 4.2.16.2 Material de empaque preparado en el laboratorio. Si no se dispone del material indicado en 4.2.16.1 se puede preparar de la manera siguiente:
- a) Se pesa 0,5 g de Apiezon L en un vaso de precipitados de 100 cm³, se agregan 80 cm³ de tolueno, se agita con un agitador magnético hasta disolución completa y se transfiere a un erlenmeyer de 500 cm³, enjuagando el vaso de precipitados con cuatro porciones de 5 cm³ de tolueno cada una.
- b) En un erlenmeyer con tapón esmerilado se pesan 10g de Gas - Chrom Q que pase un tamiz No. 80 ó 100 y se adicionan a la solución de Apiezon L; se tapa el erlenmeyer y se agita hasta obtener una consistencia pastosa delgada, inmediatamente se filtra toda la pasta a través de un embudo Buchner con filtro de vidrio poroso, de porosidad media, usando vacío y agitando continuamente hasta que todo el líquido haya sido eliminado, el cual no debe descartarse.
- c) En una probeta graduada se mide el volumen de filtrado obtenido y se determina la cantidad de Apiezon L absorbida.
- d) Se deja reposar bajo vacío agitando ocasionalmente hasta que el material esté casi seco, se transfiere el material de empaque a una cápsula de evaporación, se seca completamente en una estufa a 110-120°C, y se guarda el material seco en frasco de vidrio hasta el momento en que se va a usar.
- 4.2.17 Cloroformo
- 4.2.18 Sulfato de sodio anhidro
- 4.2.19 Papel filtro cualitativo, de poro muy fino y filtración rápida (1)
- 4.2.20 Papel filtro cualitativo, de poro fino y filtración rápida (2)
- 4.2.21 Eter de petróleo
- 4.2.22 Benceno
- 4.2.23 Solución 1N de hidróxido de potasio
- 4.2.24 Solución 0,5N de hidróxido de potasio

(1) El papel filtro Whatman No. 1 es apropiado
 (2) El papel filtro Whatman No. 4 es apropiado

4.2.25 Acetona

4.3 Aparatos

4.3.1 Balanza analítica de precisión, que aprecie 0,1 mg

4.3.2 Aparato aspirador

4.3.3 Estufa, regulada a 100° C con corriente de aire

4.3.4 Embudos de vidrio

4.3.5 Cápsula de aluminio

4.3.6 Homogeneizador, que emplee vasos de 350 cm³, de boca ancha con tapa roscada

4.3.7 Embudos separadores, de 250 y 500 cm³

4.3.8 Probetas graduadas, de 50; 100; 200 y 250 cm³

4.3.9 Vaso de precipitados, de 250 cm³

4.3.10 Baño de agua o de vapor, a 90° C

4.3.11 Erlenmeyer con tapón de vidrio esmerilado, de 125 y 300 cm³

4.3.12 Hornilla de plancha con agitador magnético, de velocidad variable y con regulador de temperatura

4.3.13 Aparato condensador

4.3.14 Pipetas volumétricas, de 1,0; 10 y 50 cm³

4.3.15 Pipetas graduadas, de 1,0; 5 y 10 cm³

4.3.16 Balón de concentración, de 100 cm³ con tapón de vidrio

4.3.17 Evaporador rotatorio, con un frasco condensador de vidrio entre el balón de concentración y el eje metálico.

4.3.18 Tubos para centrifugadora de vidrio pyrex, de 15 cm³ silanizados en la forma siguiente: se enjuagan los tubos limpios con metanol anhidro; se secan durante 30 min a 110° C y se transfieren a un desecador. Se llenan los tubos con solución al 10% de dimetildiclorosilano (DMCS) en tolueno, se tapan los tubos y se dejan en reposo durante 1h; se drenan, se enjuagan completamente con metanol anhidro y se secan en una estufa a 110° C antes de usarlos. Después de usar los tubos se limpian con metanol, luego con agua y nuevamente con metanol secándolos a 100° C antes de su uso. Los tubos pueden usarse nuevamente sin silanizarlos mientras no sean lavados con solución alcalina concentrada.

4.3.19 Centrifugadora

4.3.20 Agitador para tubos de ensayo Vortex - Genie o su equivalente

Continúa

4.3.21 Cromatógrafo de gas, con las siguientes especificaciones:

- a) Detector de ionización de llama de hidrógeno
- b) Sistema de inyección sobre la columna
- c) Columna de vidrio en forma de U, de 2,4 m de longitud, con diámetro interno de 3 mm, empacada con uno de los materiales de empaque descritos en 4.2.16.

Nota. Alternativamente puede usarse una columna de vidrio en forma de U de 1,8 m x 4 mm de diámetro interno empacada con 1% de SE-30 sobre Gas-Chrom Q que pase una malla No. 100 ó 120.

- d) Temperaturas de operación: 275°C en la puerta de inyección; 275°C en el detector; y 230°C en la columna.
- e) Velocidad de flujo en centímetros cúbicos por minuto: para el nitrógeno (de alta pureza) aproximadamente 50, para eluir el colesterol en un tiempo de 9 a 11 min; para el hidrógeno aproximadamente 35; y para el aire 350.
- f) Sensibilidad del electrómetro, 1×10^{-9} A de desviación completa de la escala con un registrador de 1 mV.

4.3.22 Instrumental de laboratorio4.4 Procedimiento4.4.1 Preparación y empaque de la columna del cromatógrafo de gas

4.4.1.1 Se conecta la columna vacía al aspirador y se aspira a través de ella la solución al 5% de HF, se corta el vacío mediante una pinza de compresión, rápidamente se tapan ambos extremos de la columna con tapones de caucho y se deja reposar la columna llena con la solución de HF durante 10 min; se conecta nuevamente la columna al aspirador, se decanta la solución de HF, se enjuaga con aproximadamente 150 cm³ de agua seguidos por 150 cm³ de metanol anhidro, y finalmente se enjuaga la columna con 150 cm³ de iso-octano. Luego se aspira aire a través de la columna hasta que se seque.

4.4.1.2 Se llena la columna con el reactivo TMS (véase 4.2.12), obligándolo a pasar lentamente a través de ella con el aspirador, se tapan ambos extremos de la columna y se deja en reposo durante 30 min; se aspira el reactivo a través de la columna y se enjuaga inmediatamente con 100 cm³ de metanol anhidro seguidos por 200 cm³ de iso-octano; se deja secar la columna bajo vacío.

4.4.1.3 Se empaqa la columna con uno de los medios de empaque descritos en 4.2.16, en la forma siguiente: se calienta el material de empaque en una estufa a 100°C durante 15 min, se tapa el extremo detector de la columna silanizada con 6 mm de lana de vidrio silanizada (véase 4.2.5) y se conecta al aspirador. Se agrega el material de empaque tibio a través de un embudo conectado al otro extremo de la columna y se la golpea suavemente; finalmente se tapa la puerta de inyección con lana de vidrio silanizada y se acondiciona la columna durante 24 h a 235°C con corriente de nitrógeno.

4.4.2 Extracción de lípidos, véase la norma COGUANOR NGO 56 002, en lo que se refiere a líquidos inflamables, etanol y metanol.

Continúa

4.4.2.1 Con exactitud se pesan aproximadamente 1,2 a 1,5 g de muestra perfectamente mezclada y se transfiere en forma cuantitativa al vaso del homogeneizador con 100 cm³ de metanol anhidro; se agregan 40 cm³ de agua y 50 cm³ de cloroformo, y se mezcla durante 3 min a velocidad media; adicionalmente se agregan 50 cm³ de cloroformo, se mezcla durante 0,5 min a velocidad media, se agregan 50 cm³ de agua y nuevamente se mezcla durante 0,5 min a velocidad media.

4.4.2.2 Se transfiere el homogeneizado a un embudo separador de 500 cm³, se enjuaga el vaso con tres porciones de 20 cm³ cada una de cloroformo y se adicionan estos enjuagues al embudo separador; se mezcla el contenido mediante rotación suave del separador dándole al mismo tiempo un movimiento de cabeceo para llevar su contenido de un extremo a otro, y se dejan separar las capas.

4.4.2.3 Se drena la capa inferior, la cual corresponde al cloroformo, a una probeta graduada. Se enjuaga la capa acuosa de metanol con 40 cm³ de cloroformo, se agrega el enjuague a la probeta, y se mezcla; se anota el volumen de la capa de cloroformo.

4.4.3 Saponificación y extracción de la fracción insaponificable, véase la norma COGUANOR NGO 56 002, en lo que se refiere a líquidos inflamables, empleo de pipetas, benceno y éter de petróleo.

4.4.3.1 Se filtra una alícuota de 150 cm³ del extracto de cloroformo obtenido en 4.4.2.3 a través de un embudo de vidrio que contiene un pequeño tapón de lana de vidrio y aproximadamente 25 g de Na₂SO₄ anhidro y se recibe el filtrado en el vaso de precipitados de 250 cm³; se enjuaga el Na₂SO₄ con 15 cm³ de cloroformo y se evapora el extracto a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno, sobre un baño de agua o de vapor a 90°C.

4.4.3.2 Se disuelve el residuo en aproximadamente 70 cm³ de éter de petróleo y se filtra a través de un papel filtro cualitativo de poro muy fino que contiene aproximadamente 20 g de Na₂SO₄ anhidro; el filtrado se recibe en un erlenmeyer de 300 cm³ que tenga tapa de vidrio. Se enjuaga el vaso de precipitados y el Na₂SO₄ con varias porciones de 10 cm³ cada una de éter de petróleo y se evapora a sequedad bajo corriente suave de nitrógeno sobre un baño de vapor.

4.4.3.3 Se introduce la barra magnética de agitación en el erlenmeyer, se coloca éste en la hornilla de plancha con agitador magnético y mientras se agita suavemente se agregan lentamente 8 cm³ de la solución concentrada de KOH y 40 cm³ del reactivo alcohólico.

4.4.3.4 Se ensambla el condensador al erlenmeyer, se conecta la hornilla de plancha con agitador magnético y se deja en reflujo la solución durante 1 h. Se desconecta la fuente de calor y, a través del condensador, se agregan a la solución saponificada 60 cm³ del reactivo alcohólico mientras se agita y enfría.

4.4.3.5 Una vez que cese el reflujo de la muestra, se desconecta el condensador y se agrega con pipeta 100 cm³ de benceno a la muestra mantenida con agitación lenta. Se remueve la barra magnética de agitación, se tapa el erlenmeyer y se agita vigorosamente durante 30 s.

4.4.3.6 Se vierte el contenido del erlenmeyer a un embudo separador de 500 cm³ sin enjuagar, se agregan 200 cm³ de la solución 1N de KOH y se agita vigorosamente durante 10 s; se dejan separar las capas y se descarta la capa inferior acuosa y turbia. Se lava la capa de benceno con 40 cm³ de la solución 0,5 N de KOH durante 10 s, rotando suavemente el separador dándole al mismo tiempo un movimiento de cabeceo para llevar su contenido de un extremo a otro, se dejan separar las capas, y se descarta la capa inferior acuosa.

Continúa

4.4.3.7 Se drena la capa de benceno a otro embudo separador de 250 cm³ y se enjuaga con 40 cm³ de agua mediante rotación suave del separador, dándole al mismo tiempo 10 veces el movimiento de cabeceo, y se repite el lavado con agua 3 veces más; el pH del último lavado deberá ser aproximadamente 7.

4.4.3.8 A través de un papel filtro cualitativo de poro fino que contenga aproximadamente 15 g de Na₂SO₄ anhidro, se filtra el extracto de benceno vaciándolo por la parte superior del separador. El filtrado se recibe en un erlenmeyer de 125 cm³ con tapón de vidrio, al cual se agregan aproximadamente 20 g de Na₂SO₄ anhidro, se tapa, se agita en forma vigorosa y se deja en reposo durante 15 min.

4.4.3.9 Se transfiere con pipeta una alícuota de 50 cm³ a un balón de concentración de 100 cm³ y se evapora a sequedad en el evaporador rotatorio a 40°C. Se agregan 3 cm³ de acetona, se evapora nuevamente a sequedad y finalmente se disuelve el residuo en 3 cm³ de dimetilformamida.

4.4.4 Estándares de colesterol y calibración del cromatógrafo

4.4.4.1 Formación del derivado

- a) Se transfiere 1 cm³ de cada una de las soluciones de trabajo de colesterol (véase 4.2.1.2), a tubos para centrifugadora silanizados de 15 cm³.

Nota. Los tubos silanizados con dimetildiclorosilano deben guardarse limpios y secos.

- b) Se adicionan a cada tubo 0,2 cm³ de hexametildisilazano (HMDS) y 0,1 cm³ de trimetilclorosilano (TMCS), se tapan los tubos y se agitan vigorosamente en el agitador de tubos o bien con la mano durante 30 s, y se dejan en completo reposo durante 15 min.
- c) Se agrega 1 cm³ de la solución de trabajo del estándar interno de 5 α -colestano (véase 4.2.2.2) y 10 cm³ de agua a cada tubo, se agitan vigorosamente durante 1 min y se centrifugan durante 2 min.

4.4.4.2 Calibración del cromatógrafo

- a) Se inyectan en duplicado, al cromatógrafo de gas, 3 μ L u otro volumen apropiado, de la capa de heptano; siempre se debe usar el mismo volumen para los estándares y las muestras. Se ajustan los parámetros de la cromatografía gas-líquido para dar tiempos de retención de aproximadamente 5 min para el 5 α -colestano y de 10 min para el colesterol. Se determina el área de cada pico usando las medidas de altura y ancho o el integrador digital.
- b) Se divide el área del pico de colesterol entre el área del pico del estándar interno para obtener la relación de respuesta estándar y se promedian los resultados obtenidos en las determinaciones en duplicado.
- c) Se traza una curva colocando la relación de respuesta estándar promedio en el eje Y-Y, y la concentración de colesterol en miligramos por centímetro cúbico, en el eje X-X. La relación de respuesta de la muestra deberá caer sobre algún punto de la curva estándar trazada con las relaciones de respuesta de las soluciones de trabajo cuyas concentraciones están comprendidas entre 0,05 y 0,5 mg/cm³ de colesterol, ya que no se deben extrapolar los resultados.

4.4.5 Formación del derivado y análisis de la muestra.

4.4.5.1 Se transfieren dos alícuotas de 1,0 cm³ cada una de la solución de la muestra obtenida en 4.4.3.9 a sendos tubos para centrifugadora silanizados de 15 cm³ y se procede con cada uno por separado como se indica desde 4.4.4.1 (b) hasta 4.4.4.2 (a) inclusive.

4.4.5.2 Se divide el área del pico del colesterol contenido en la muestra, entre el área del pico del estándar interno, para obtener la relación de respuesta de la muestra y se promedian los resultados obtenidos en la determinación en duplicado.

4.4.5.3 Si la respuesta de la cromatografía gas-líquido para la muestra cae fuera de la curva estándar, se diluye la solución de la muestra y se deriva nuevamente.

4.5 Expresión de los resultados.

4.5.1 El contenido de colesterol se expresa en miligramos por 100 g de muestra y se calcula con la fórmula siguiente:

$$C = \frac{L \times 100}{m}$$

En la que:

C = Contenido de colesterol, expresado en miligramos por 100 g de muestra

L = Miligramos de colesterol por centímetro cúbico de la solución de la muestra, leídos en la curva patrón

m = Masa de la muestra original contenida en el centímetro cúbico usado para la formación del derivado, en gramos

4.5.2 Repetibilidad. La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas simultáneamente o en rápida sucesión por el mismo analista, no deberá ser mayor del 5% del valor medio.

4.5.3 El resultado final será la media aritmética de las dos determinaciones, siempre que el requisito de repetibilidad se haya cumplido.

5. METODO CROMATOGRAFICO CON DERIVATIZACION DE LOS ESTEROLES COMO ACETATO.

5.1 Principio del método. El método consiste en saponificar una determinada cantidad de muestra y luego, extraer la materia insaponificable con éter etílico. Los esteroides contenidos en la fracción insaponificable son transformados a derivados de acetato, y luego son determinados cuantitativamente por cromatografía de gases, usando 5 α -colestano como estándar interno.

5.2 Reactivos o materiales. Todos los reactivos deben ser de calidad analítica reconocida. El agua debe ser destilada o de pureza equivalente.

5.2.1 Alcohol etílico al 95% (v/v).

Continúa

- 5.2.2 Solución aproximadamente al 60% de KOH. Se disuelven 60g de KOH en 40 cm³ de agua y luego se enfría la solución.
- 5.2.3 Eter etílico.
- 5.2.4 Solución aproximadamente 0,5 N de KOH. Se disuelven en agua 30 g de KOH, se enfría la solución y se lleva a un volumen de 1 000 cm³.
- 5.2.5 Solución indicadora al 1% de fenolftaleína. Se disuelve 1g de fenolftaleína en 100 cm³ de alcohol etílico al 95% (v/v).
- 5.2.6 Cloroformo, destilado en aparato de vidrio.
- 5.2.7 Solución estándar de 5 α -colestano. Con una concentración de 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; se prepara pesando 40,0 mg de 5 α -colestano estándar en un matraz aforado de 100 cm³ y se diluye a volumen con acetato de etilo.
- 5.2.8 Solución de 5 α -colestano para estándar interno, con una concentración de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; se prepara diluyendo 10 cm³ de la solución 5.2.7 a un volumen de 20 cm³ con acetato.
- 5.2.9 Solución estándar de colesterol, con una concentración de 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; se prepara pesando 60,0 mg de colesterol estándar en un matraz aforado de 50 cm³ y se diluye a volumen con acetato de etilo.
- 5.2.10 Mezcla estándar de colestano y colesterol, con una concentración de 0,2 μg de colestano y 0,6 μg de colesterol, por microlitro; se prepara mezclando volúmenes iguales de la solución 5.2.7 y de la solución 5.2.9.
- 5.2.11 Piridina.
- 5.2.12 Anhidrido acético.
- 5.2.13 Mezcla estándar de colesterol, β -sitosterol, con una concentración de 0,6 μg de colesterol y 1,5 μg de β -sitosterol, por microlitro; se prepara mezclando volúmenes iguales de la solución 5.2.9 y de la solución 5.2.14.
- 5.2.14 Solución estándar de β -sitosterol, con una concentración de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; se prepara pesando 30,0 mg de β -sitosterol estándar en un matraz aforado de 10 cm³ y se diluye a volumen con acetato de etilo.

Nota. El material comercial es una mezcla de campesterol y β -sitosterol.

- 5.2.15 Solución estándar de acetato de colesterilo, con una concentración de 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; se prepara pesando 30,0 mg de acetato de colesterilo estándar en un matraz aforado de 50 cm³ y se diluye a volumen con acetato de etilo.
- 5.2.16 Material de empaque para la columna del cromatógrafo de gas.
- 5.2.16.1 Fase estacionaria. Como fase estacionaria se puede usar cualquiera de los reactivos indicados a continuación:
- JXR;
 - OV - 1;

- c) OV-101 dimetil polisiloxano;
- d) OV-17; 6
- e) OV-22 metilfenilpolisiloxano

5.2.16.2 Soporte. Como soporte se debe utilizar Gas-Chrom Q, que pase un tamiz No. 100 ó 120.

Nota. Se puede utilizar material de empaque ya preparado comercialmente que tenga 1 a 3% de la fase estacionaria.

5.2.17 Tolueno ó solución (1+1) de tolueno y diclorometano.

5.2.18 Lana de vidrio.

5.2.19 Solución al 5% de diclorodimetilsilano en tolueno.

5.2.20 Metanol.

5.2.21 Papel indicador.

5.3 Aparatos.

5.3.1 Balanza analítica de precisión, que aprecie 0,1 mg.

5.3.2 Matraces Erlenmeyer, de 200 cm³, con unión ξ 24/40.

5.3.3 Probetas graduadas, de 50 cm³.

5.3.4 Pipetas graduadas, de 5 cm³.

5.3.5 Baño de vapor o baño maría.

5.3.6 Condensadores de reflujo de aire, con uniones esmeriladas que puedan adaptarse a los matraces Erlenmeyer.

5.3.7 Embudos separadores, de 250 cm³.

5.3.8 Vasos de precipitados, de 250 cm³.

5.3.9 Frasco pequeño en forma de tubo, de unos 14 cm³ de capacidad, con tapadera rosada.

5.3.10 Pipetas volumétricas, de 1,0 cm³.

5.3.11 Cromatógrafo de gas, con las siguientes especificaciones:

a) Detector de ionización de llama de hidrógeno

b) Columna de vidrio en forma de U, de 1,8 m de longitud, con diámetro interno de 4 mm, empacada con uno de los materiales de empaque descritos en 5.2.16.

Continúa

- c) Temperaturas de operación: 240 a 270°C en la puerta de inyección y en el detector; y 220 a 250°C en la columna.
- d) Velocidad de flujo: para el nitrógeno (de alta pureza) 138 a 172 kPa (20 a 25 psi), para eluir el colesterol en un tiempo de 8 a 12 min; para el hidrógeno aproximadamente 40 a 45 cm³/min; y para el aire 300 a 340 cm³/min.
- e) Sensibilidad del electrómetro, 1×10^{-9} A de desviación completa de la escala con un registrador de 1 mV.

5.3.12 Evaporador rotatorio.

5.3.13 Baño de agua, regulado a 50°C.

5.3.14 Estufa de vacío, regulada a 50°C.

5.3.15 Instrumental de laboratorio.

5.4 Procedimiento.

5.4.1 Preparación y empaque de la columna del cromatógrafo de gas.

5.4.1.1 Si se dispone del material de empaque comercial (véase nota al numeral 5.2.16.2), se empaqueta con él la columna de vidrio de 1,8 m con diámetro interno de 4 mm; en caso contrario se procede como se indica a continuación:

5.4.1.2 Se disuelven 0,4 a 1,2 g de polisiloxano en 200 cm³ de tolueno o en una solución (1+1) de tolueno y diclorometano, calentando para tal fin ya que el polisiloxano se disuelve lentamente en una mezcla de solventes.

PRECAUCION: Debido a que los siloxanos son tóxicos, se deben usar guantes desechables y un removedor efectivo de sus vapores cuando se estén manipulando.

5.4.1.3 Se agrega la solución a 40 g de Gas-Chrom Q y se deja en reposo con agitación suave ocasional; se seca en un evaporador rotatorio colocado en un baño de agua a 50°C o se calienta sobre un baño de vapor con agitación suave ocasional, y se remueve el solvente residual en una estufa de vacío a 50°C.

5.4.1.4 Cuidadosamente se lava el interior de la columna y una pequeña cantidad de lana de vidrio, con una solución al 5% de diclorodimetilsilano en tolueno, se enjuaga con metanol hasta que los enjuagues sean neutros al papel indicador y se seca con aire. En la salida de la columna se inserta un pequeño tapón de lana de vidrio silanizada y un septo completamente perforado (véase nota), y en el brazo de inyección de la columna se inserta un septo con perforación a la mitad; (véase nota).

Nota. El septo (o septum) completamente perforado es un pequeño cilindro de caucho de silicón perforado de lado a lado en su eje longitudinal. El septo (o septum) con perforación a la mitad es un pequeño cilindro de caucho de silicón perforado en su eje longitudinal desde una de sus caras hasta la mitad del largo de dicho cilindro.

5.4.1.5 Para el llenado de la columna se agrega el material de empaque recubierto a través de la puerta de inyección en 4 porciones procediendo en la forma siguiente para cada

Continúa

porción: en la puerta de inyección se coloca un embudo y un tubo de plástico, se agrega un cuarto del material de empaque, se retira el embudo y se aplica nitrógeno a una presión de 34,5 a 69 kPa (5 a 10 psi) a la puerta de inyección, mientras se golpea suavemente la columna para asentar el empaque.

5.4.1.6 Se empaca hasta 2,5 cm por debajo de la puerta de inyección, se tapa con un tapón de lana de vidrio silanizada y se acondiciona la columna calentando a 260°C durante no menos de 8h, con una corriente de nitrógeno fluyendo a través de la columna, con una presión de 34,5 a 69 kPa (5 a 10 psi); se desconecta la presión, se sube la temperatura a 290°C y se continúa el calentamiento durante no menos de 8h. Se reduce nuevamente la temperatura a 260°C, se ajusta la presión del nitrógeno a 34,5 - 69 kPa y se calienta durante un período adicional de no menos de 12 h.

5.4.1.7 Se determinan los tiempos de retención y la resolución de la columna, inyectando al cromatógrafo aproximadamente 2 μ L de la mezcla estándar de colesterol - β - sitosterol. Se requiere un mínimo de 1600 platos teóricos para el pico de colesterol; el número de platos teóricos es igual a $(L/B)^2 \times 16$, en la que L = distancia entre el pico del colesterol y el punto de inyección, en centímetros, y B es el ancho de la base triangulada del pico de colesterol, en centímetros. Adicionalmente la separación entre los picos del colesterol y del campesterol, expresada como resolución de pico, debe ser igual o mayor de 2,2. La fórmula para la resolución de pico es igual a $2D/(B+P)$, en la que D es la distancia entre los picos máximos del colesterol y del campesterol, en centímetros; B es el ancho de la base triangulada del pico de colesterol; y P es el ancho de la base triangulada del pico de campesterol. Se determina la resolución de pico de una muestra que contenga cantidades aproximadamente iguales de colesterol y campesterol (áreas de los picos aproximadamente iguales); la muestra inyectada debe dar alturas de pico de 25 a 50% de la altura total de la gráfica.

5.4.2 Saponificación y extracción de la fracción insaponificable. Se procede en la forma siguiente:

- a) En un erlenmeyer de 200 cm³ se pesan 2,0 a 2,5 g de la muestra, se agregan 25 cm³ de alcohol etílico y 1,5 cm³ de la solución al 60% de hidróxido de potasio y se mezcla bien.
- b) Se conecta el condensador y se saponifica llevando a ebullición durante 30 min en un baño de vapor o en un baño María. No debe haber pérdida de alcohol durante la saponificación.
- c) Se transfiere la solución alcohólica de jabón obtenida, mientras todavía está tibia, a un embudo de separación, con ayuda de varias porciones de agua destilada, usando un total de 50 cm³.
- d) Se lava el erlenmeyer con 50 cm³ de éter etílico, transfiriendo éste al embudo, y se enfría a la temperatura ambiente.
- e) Se tapa y se agita cuidadosamente el embudo, por lo menos durante 1 minuto, y se deja en reposo para que se separen dos capas de líquido claro.
- f) Se elimina la capa inferior y se vierte la capa etérea, por el extremo superior del embudo a un segundo embudo de separación que contenga 20 cm³ de agua destilada, se enjuaga con éter el extremo superior del primer embudo, y se agregan los enjuagues al segundo embudo separador.
- g) En la misma forma se hacen dos extracciones más de la solución de jabón con porciones de 50 cm³ de éter.

porción: en la puerta de inyección se coloca un embudo y un tubo de plástico, se agrega un cuarto del material de empaque, se retira el embudo y se aplica nitrógeno a una presión de 34,5 a 69 kPa (5 a 10 psi) a la puerta de inyección, mientras se golpea suavemente la columna para asentar el empaque.

5.4.1.6 Se empaqueta hasta 2,5 cm por debajo de la puerta de inyección, se tapa con un tapón de lana de vidrio silanizada y se acondiciona la columna calentando a 260°C durante no menos de 8h, con una corriente de nitrógeno fluyendo a través de la columna, con una presión de 34,5 a 69 kPa (5 a 10 psi); se desconecta la presión, se sube la temperatura a 290°C y se continúa el calentamiento durante no menos de 8h. Se reduce nuevamente la temperatura a 260°C, se ajusta la presión del nitrógeno a 34,5 - 69 kPa y se calienta durante un período adicional de no menos de 12 h.

5.4.1.7 Se determinan los tiempos de retención y la resolución de la columna, inyectando al cromatógrafo aproximadamente 2 μ L de la mezcla estándar de colesterol - β - sitosterol. Se requiere un mínimo de 1600 platos teóricos para el pico de colesterol; el número de platos teóricos es igual a $(L/B)^2 \times 16$, en la que L = distancia entre el pico del colesterol y el punto de inyección, en centímetros, y B es el ancho de la base triangulada del pico de colesterol, en centímetros. Adicionalmente la separación entre los picos del colesterol y del campesterol, expresada como resolución de pico, debe ser igual o mayor de 2,2. La fórmula para la resolución de pico es igual a $2D/(B+P)$, en la que D es la distancia entre los picos máximos del colesterol y del campesterol, en centímetros; B es el ancho de la base triangulada del pico de colesterol; y P es el ancho de la base triangulada del pico de campesterol. Se determina la resolución de pico de una muestra que contenga cantidades aproximadamente iguales de colesterol y campesterol (áreas de los picos aproximadamente iguales); la muestra inyectada debe dar alturas de pico de 25 a 50% de la altura total de la gráfica.

5.4.2 Saponificación y extracción de la fracción insaponificable. Se procede en la forma siguiente:

- a) En un erlenmeyer de 200 cm³ se pesan 2,0 a 2,5 g de la muestra, se agregan 25 cm³ de alcohol etílico y 1,5 cm³ de la solución al 60% de hidróxido de potasio y se mezcla bien.
- b) Se conecta el condensador y se saponifica llevando a ebullición durante 30 min en un baño de vapor o en un baño María. No debe haber pérdida de alcohol durante la saponificación.
- c) Se transfiere la solución alcohólica de jabón obtenida, mientras todavía está tibia, a un embudo de separación, con ayuda de varias porciones de agua destilada, usando un total de 50 cm³.
- d) Se lava el erlenmeyer con 50 cm³ de éter etílico, transfiriendo éste al embudo, y se enfría a la temperatura ambiente.
- e) Se tapa y se agita cuidadosamente el embudo, por lo menos durante 1 minuto, y se deja en reposo para que se separen dos capas de líquido claro.
- f) Se elimina la capa inferior y se vierte la capa etérea, por el extremo superior del embudo a un segundo embudo de separación que contenga 20 cm³ de agua destilada, se enjuaga con éter el extremo superior del primer embudo, y se agregan los enjuagues al segundo embudo separador.
- g) En la misma forma se hacen dos extracciones más de la solución de jabón con porciones de 50 cm³ de éter.

Continúa

- h) Imprimiendo al embudo un suave movimiento de rotación, se agitan cuidadosamente los extractos combinados de éter con los 20 cm³ de agua, evitando toda agitación violenta que pueda conducir a la formación de emulsiones estables. Se dejan separar las dos capas y se elimina la capa acuosa inferior.
- i) Se lava la capa de éter con dos porciones adicionales de 20 cm³ de agua destilada, agitando vigorosamente y descartando la porción acuosa.
- j) Se lava la solución de éter tres veces con porciones alternadas de 20 cm³ de solución 0,5 N de hidróxido de potasio y 20 cm³ de agua destilada, agitando vigorosamente cada vez. Si se forma una emulsión durante el lavado, debe esperarse hasta que las capas se separen tanto como sea posible y se elimina la capa acuosa, dejando en el embudo la emulsión remanente con la capa etérea y prosiguiendo con el siguiente lavado.
- k) Después del tercer tratamiento con la solución de hidróxido de potasio, se lava la solución de éter con porciones de 20 cm³ de agua destilada, hasta que el líquido de lavado no dé reacción alcalina a la fenolftaleína.
- l) Se transfiere el extracto etéreo a un vaso de precipitados de 250 cm³, se enjuaga con éter el embudo de separación y se agregan los líquidos de enjuague a la solución principal.
- m) Se evapora el extracto etéreo a sequedad sobre un baño de vapor y empleando una corriente de nitrógeno.
- n) La materia insaponificable contenida en el vaso de precipitados se disuelve en 4 a 5 cm³ de CHCl₃, se transfiere a un frasco pequeño en forma de tubo, de unos 14 cm³ de capacidad con tapadera de rosca y se evapora a sequedad.
- o) Se lava el vaso con cloroformo empleando tres porciones sucesivas, de 3 cm³ cada una, teniendo mucho cuidado de disolver todo el material adherido a las paredes del vaso de precipitados; cada uno de los lavados se agrega al pequeño frasco en forma de tubo y se evapora a sequedad bajo nitrógeno.

5.4.3 Determinación del colesterol.

5.4.3.1 Calibración del cromatógrafo.

- a) Se ajusta la sensibilidad del electrómetro de manera que 1,5 µg de colesterol den una deflexión aproximada del 50%; se repiten las inyecciones hasta que se obtengan alturas constantes de pico cuando se inyectan sucesivamente volúmenes idénticos de la mezcla estándar.

5.4.3.2 Análisis de la muestra y de los estándares. Luego de calibrar el cromatógrafo según se indica en 5.4.3.1, se procede como sigue:

5.4.3.2.1 Al extracto seco obtenido en 5.4.2 (o) se le agrega 1 cm³ de la solución de 5 α -colestano como estándar interno, se rota el frasco para lavar las paredes con la solución de estándar interno y se agita para disolver los esteroides.

5.4.3.2.2 Se inyectan al cromatógrafo como mínimo 2 µL de la muestra, en duplicado y a continuación se inyectan 2 µL de la mezcla estándar de colestano y colesterol, en duplicado.

5.4.3.2.3 Se identifica el pico del colesterol en la muestra a partir de su tiempo de retención en la mezcla estándar. Si la altura del pico del colesterol en la muestra es mayor que un 60% de la deflexión de la escala completa, se agrega adicionalmente 1,0 cm³ de la solución de 5 α -colestano como estándar interno a la muestra y se vuelve a inyectar la muestra y la mezcla estándar como se indicó anteriormente.

5.4.3.2.4 Se mide la altura de los picos de colestano y colesterol en milímetros y se determina el contenido de colesterol en la muestra empleando la fórmula indicada en 5.5.1.

5.4.3.2.5 Para tener un resultado de análisis más confiable, se derivatiza el colesterol a la forma acetato y se realiza un nuevo cromatograma, en la forma indicada a continuación:

- a) Después de determinar el colesterol según 5.4.3.2.1 a 5.4.3.2.4 se evapora la muestra a sequedad sobre un baño de vapor y bajo corriente de nitrógeno, se deja enfriar, se agregan 3 cm³ de piridina y 1 cm³ de anhídrido acético.
- b) Se tapa el frasco, se coloca sobre un baño de vapor y se le imprime un movimiento de rotación hasta que los esteroides se disuelvan, y luego se continúa el calentamiento sobre el baño de vapor durante 1 h; finalmente se evapora bajo una corriente de nitrógeno hasta que no se detecte olor a piridina.
- c) Se derivatizan las soluciones estándares de colesterol en la forma indicada para derivatizar la muestra.
- d) Se realiza la correspondiente cromatografía y se comparan los tiempos de retención de los picos de la muestra y del acetato de colestano.

5.5 Expresión de los resultados.

5.5.1 El contenido de colesterol se expresa en miligramos por 100 g de muestra y se calcula aplicando la siguiente fórmula, la cual incluye la corrección para el estándar interno. Se hace notar que la misma fórmula es la que se emplea en el párrafo 5.4.3.2.4.

$$C = \left(\frac{H_i}{H_x} \right) \times \left(\frac{C_x}{C_i} \right) \times \left(\frac{S_x}{S_i} \right) \times \left(\frac{Q_i}{Q} \right) \times 100$$

En la que:

C = Contenido de colesterol, expresado en miligramos por 100 g de muestra

H_i = Altura del pico del colestano en la mezcla estándar, en milímetros

H_x = Altura del pico del colesterol en la mezcla estándar, en milímetros

S_x = Altura del pico del colesterol en la muestra, en milímetros

S_i = Altura del pico del colestano en la muestra, en milímetros

C_x = Masa de colesterol en la mezcla estándar, en microgramos por microlitro

C_i = Masa de colestano en la mezcla estándar, en microgramos por microlitro

Q_i = Masa de colestano en la muestra, en microgramos por microlitro

Q = Masa de la muestra, en miligramos por microlitro

Continúa

5.5.2 Repetibilidad. La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas simultáneamente o en rápida sucesión por el mismo analista, no deberá ser mayor del 5% del valor medio.

5.5.3 El resultado final será la media aritmética de las dos determinaciones, siempre que el requisito de repetibilidad se haya cumplido.

6. INFORME DE LOS ENSAYOS

En el informe de cada ensayo debe indicarse lo siguiente:

6.1 El método usado y el resultado obtenido en cada determinación así como la media aritmética de las determinaciones.

6.2 Cualquier condición no especificada en esta norma, o señalada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en el resultado.

6.3 Todos los detalles necesarios que permitan la completa identificación de la muestra.

7. CORRESPONDENCIA

Para la redacción de la presente norma se tuvo en cuenta:

- a) Métodos 28.099, 28.103 - 28.106 y 43.229 - 43.237, descritos en "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists AOAC", 13a. Edición 1980; y
- b) Correspondencia Técnica.