

Artículo segundo.—La Dirección General de Política Financiera estará integrada por las siguientes Subdirecciones Generales:

- a) Subdirección General de Financiación Interior y Mercado de Capitales.
- b) Subdirección General de Entidades Financieras.
- c) Subdirección General de Financiación Exterior.

Artículo tercero.—El Ministro de Hacienda adoptará las disposiciones y las medidas que sean necesarias para la ejecución del presente Decreto, que comenzará a regir el mismo día de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Así lo dispongo por el presente Decreto, dado en Madrid a veinticuatro de julio de mil novecientos setenta.

FRANCISCO FRANCO

El Ministro de Hacienda,  
ALBERTO MONTREAL LUQUE

## MINISTERIO DE COMERCIO

*DECRETO 2270/1970, de 24 de julio, por el que se suspende parcialmente la aplicación de derechos arancelarios a la importación del algodón sin cardar ni peinar (P. A. 55.01) durante el periodo comprendido entre 11 de agosto y 31 de octubre de 1970*

El nivel actual de los precios del algodón en los mercados exteriores, en relación con los que rigen en el mercado interior, unido a la necesidad de importar la citada fibra para atender el abastecimiento nacional, aconsejan suspender parcialmente los derechos arancelarios a la importación de algodón sin cardar ni peinar de la P. A. 55.01.

En virtud de la facultad concedida al Gobierno en el artículo sexto, apartado dos, de la vigente Ley Arancelaria, a propuesta del Ministro de Comercio, y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día veinticuatro de julio de mil novecientos setenta,

### DISPONGO:

Artículo único.—En el período comprendido entre once de agosto y treinta y uno de octubre de mil novecientos setenta, se suspenden parcialmente los derechos arancelarios del algodón sin cardar ni peinar (P. A. 55.01) en la cuantía necesaria para que el tipo impositivo único aplicable sea del once por ciento ad valorem.

Así lo dispongo por el presente Decreto, dado en Madrid a veinticuatro de julio de mil novecientos setenta.

FRANCISCO FRANCO

El Ministro de Comercio,  
ENRIQUE FONTANA CODINA

*CIRCULAR número 7/70 de la Comisaría General de Abastecimientos y Transportes por la que se disponen las normas técnicas sobre análisis de aceites por los laboratorios.*

### FUNDAMENTO

La necesidad de actualizar la Circular 5/68 de este Organismo, de fecha 26 de abril de 1968 («Boletín Oficial del Estado» número 106 del día 4 de mayo), sobre normas para la realización de análisis de aceites comestibles, incorporando a la misma aquellas pruebas analíticas que hoy se hacen imprescindibles para poder detectar ciertas adulteraciones, aconseja se recojan en la sistemática establecida por aquella disposición los análisis cualitativo y cuantitativo, por cromatografía gaseosa, de las fracciones de ácidos grasos y de esteroides, en los casos que se señalan en las especificaciones correspondientes.

Unidas a dichas importantes determinaciones, que por la mencionada razón tienen que ser incluidas, se mantienen en

todo su vigor los motivos fundamentales de la citada Circular y su texto, con las ligeras modificaciones que recomienda la práctica del tiempo transcurrido desde que fué dictada, y cuya Circular se renueva en cumplimiento de las sucesivas Ordenes de la Presidencia del Gobierno en las que, al fijar anualmente las directrices para las campañas oleícolas, se dispone que los análisis a realizar por los laboratorios en materia de aceites comestibles han de ajustarse a los procedimientos técnicos que se establezcan previamente por esta Comisaría.

Tal decisión está indudablemente impuesta a fin de evitar toda disparidad de criterios en los boletines de análisis extendidos por los laboratorios, ya que, sin la existencia de estas normas, en unos se podría dar validez a una prueba determinada y en otros considerarla sin fuerza probatoria de fraude e incluso registrarse también dicha diferencia de apreciación entre los análisis inicial, contradictorio y dirimente practicados en un mismo expediente en tramitación.

Se pretende, por tanto, con ello mantener un trato de igualdad para todas las personas físicas y jurídicas implicadas en la industrialización y comercialización de los aceites en sus diferentes escalones, no sólo en el acto de la realización de los análisis, sino también en el momento en que deban sustanciarse las actuaciones para fijar la responsabilidad exigible por los fraudes puestos de manifiesto en los dictámenes de los laboratorios.

Con la unificación de las determinaciones a realizar en los análisis, se logra la ventaja de centrar todas las actuaciones en la comprobación de las características físico-químicas de los caldos reconocidos, por medio de unos procedimientos técnicos garantizados y reproducibles, que, por un lado, ofrezcan seguridad a la industria y al comercio de actividad honesta, y por otra parte, impidan subterfugios o salidas hábiles en razón al empleo de técnicas imperfectas.

Al mismo tiempo, al estar señaladas las especificaciones comerciales de los aceites, se puede verificar éstas en cualquier momento mediante la comprobación, por métodos previamente señalados, de que las muestras sometidas a investigación presentan las características físicas y químicas exigibles al producto de que se trata para ser vendido bajo la denominación comercial exhibida.

Lógicamente, las pruebas analíticas que se señalan en la presente Circular son de realización viable en los laboratorios normalmente dotados de material, por lo que no podrán ser utilizados aquellos que no estén en condiciones técnicas de efectuar las determinaciones que se exigen.

Por todo lo expuesto, esta Comisaría General dispone lo siguiente:

### NORMAS SOBRE REALIZACIÓN DE ANÁLISIS

A partir del día siguiente al de la publicación de esta Circular en el «Boletín Oficial del Estado», todos los análisis de aceites comestibles que se recaben de los laboratorios a efectos del cumplimiento de cualquier aspecto relacionado con las normas reguladoras de las campañas oleícolas y de su desarrollo, deberán ser realizados con arreglo a las normas que se señalan a continuación, siguiendo las técnicas indicadas.

De la misma forma, en los análisis contradictorios deberán efectuarse estos procedimientos analíticos, y en caso de discrepancia, incluso basada en la interpretación de las determinaciones, el análisis dirimente se encomendará a un centro especializado de ámbito nacional que, a la vista de los análisis inicial y contradictorio, someterá la muestra de aceite, en primer lugar, a las mismas pruebas efectuadas anteriormente, y en el caso de que considere que los resultados no garantizan la composición y características que definen el producto, podrá realizar aquellas técnicas adecuadas que estime más eficientes para emitir su dictamen.

### ESPECIFICACIONES DE CALIDAD

#### 1. Caracteres organolépticos.

Deberán observarse en todas las muestras de aceite que reciban los laboratorios, aunque sólo se hará constar en el boletín correspondiente cuando se aprecien características anormales o en el caso de que se solicite expresamente.

Los caracteres organolépticos correctos para toda clase de aceites serán los siguientes:

- Aspecto limpio y transparente, mantenidos a una temperatura de 20° ± 2° C durante un periodo de veinticuatro horas.
- Olor y sabor normales, según el tipo de aceite y con sus aromas propios y característicos, sin que se adviertan en ningún caso síntomas organolépticos de rancidez.

En el caso de los aceites de oliva, los comercializados bajo las denominaciones de «extra», «fino» y «puro» tendrán unas características organolépticas absolutamente irreprochables; para los aceites «corrientes» habrá una mayor tolerancia, siendo, no obstante, aceptables.

— Color: Podrá variar del amarillo al verde. Para su medición se utilizará la especificación con arreglo a la escala de índices ABT (Norma UNE 55 021) para los aceites de oliva y de orujo. Para los demás aceites refinados de semillas se medirá el color en el sistema Lovibond.

Los límites de color para los diversos tipos de aceites serán:

Para los aceites vírgenes y puros de oliva no se fijan límites en la escala.

Para el aceite refinado de oliva no será más intenso que el correspondiente a la adición de 0,5 ml. de indicador, para cualquiera de las tonalidades admitidas en el sistema ABT.

Para el aceite de orujo no será más intenso de 1 ml. de indicador para cualquiera de las tonalidades admitidas en el sistema ABT.

Para los demás aceites de semillas refinados, el color se medirá en cubeta de 5,15 pulgadas Lovibond, admitiéndose los siguientes límites:

Aceite de soja, no superior a 3,5 unidades rojas (Norma UNE 55 069).

Aceite de cacahuete, no superior a 10 unidades amarillas y 2 unidades rojas.

Aceite de girasol, no superior a 25 unidades amarillas y 3 unidades rojas.

Aceite de algodón, no superior a 7 unidades rojas (Norma UNE 55 043)

Aceite de cártamo, no superior a 7 unidades rojas y 10 unidades amarillas.

Aceite de colza, no superior a 15 unidades amarillas y 1 unidad roja.

Aceite de maíz, no superior a 70 unidades amarillas y 5 unidades rojas.

Aceite de pepita de uva, no superior a 36 unidades amarillas, 4 unidades rojas y 5 unidades azules.

2. Humedad y materias volátiles (anexo 1).

Esta determinación se realizará únicamente cuando se haga constar de forma expresa por el Organismo o Entidad que solicita el análisis, no siendo necesario hacerla cuando la razón de dicho análisis obedezca a la sospecha de un posible fraude por mezcla de otro tipo de aceite diferente al señalado en la etiqueta.

Los valores máximos tolerados para la humedad y materias volátiles, determinados en estufa a 105° C, serán los siguientes:

Para los aceites de oliva vírgenes: 0,2 por 100.

Para los aceites puros de oliva y demás tipos de aceites refinados: 0,1 por 100.

3. Impurezas insolubles en el éter de petróleo.

Esta determinación se realizará en los mismos casos de los indicados para la humedad y materias volátiles.

El contenido máximo autorizado de impurezas insolubles en el éter de petróleo, según Norma UNE 55 002, será el siguiente: Aceite virgen de oliva: 0,1 por 100.

Aceite puro de oliva y demás tipos de aceites refinados: 0,05 %.

4. Índice de peróxidos.

Determinado según la Norma UNE 55 023, y expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de grasa, no excederá de los límites siguientes:

Aceites de oliva vírgenes de las categorías «extra» y «fino» y aceites «puros de oliva»: 20 máximo.

Aceite de oliva virgen «corriente»: 25 máximo.

Aceites refinados, ya sean de oliva, orujo o de semillas: 10 máximo.

5. Prueba del frío.

Todos aquellos aceites en los que se haga constar que han sido sometidos al tratamiento de invernación (winterizados) deberán cumplir la norma UNE 55 042.

6. Acidez libre.

Se realizará esta determinación en todos los casos expresándose en porcentaje de ácido oleico, según Norma UNE 55 011.

La acidez máxima autorizada para los diferentes tipos de aceite será la siguiente:

Aceite de oliva virgen:

Calidad «extra» .....	1	% máximo
Calidad «fino» .....	1,5	% »
Calidad «corriente» .....	3	% »

Aceite puro de oliva, 1,5 por 100 máximo.

La acidez para los aceites «extra», «fino» y «puro de oliva» tendrá una tolerancia de 0,1, y para los «corrientes», de 0,3, expresadas estas tolerancias en valores absolutos.

Aceites refinados de oliva y todos los restantes, a excepción del orujo refinado, 0,2 por 100 máximo.

Aceite de orujo refinado, 0,3 por 100 máximo.

7. Transmisión en el ultravioleta (anexos 2 y 3).

Se realizará esta determinación siempre que se trate de aceites de oliva y de orujo, muy especialmente para la diferenciación de vírgenes, puros y refinados de oliva.

Los valores límites admitidos serán:

Aceites vírgenes de oliva:

Calidad «extra» y «fino» .....	$K_{270} \leq 0,20$
Calidad «corriente» .....	$K_{270} \leq 0,25$

Los aceites con coeficientes de extinción superiores a 0,25 podrán ser considerados como «vírgenes» si sometidos al tratamiento de purificación con alúmina la materia grasa así purificada tuviese un coeficiente  $K_{270} \leq 0,11$ . Los aceites que satisfagan esta prueba, y siempre que cumplan las restantes especificaciones de calidad y pureza, podrán ser comercializados con la denominación de «corriente», pero en ningún caso como «extra» o «fino».

Aceite puro de oliva .....	$K_{270} \leq 0,80$
Aceite refinado de oliva .....	$K_{270} \leq 0,85$
Aceite de orujo refinado .....	$K_{270} \leq 1,5$

Los demás aceites refinados suelen tener coeficientes de extinción superiores a los indicados, sin que puedan establecerse límites.

CRITERIOS DE PUREZA

1. Índice de saponificación.

Se determinará según la Norma UNE 55 012, siendo los límites normales para cada aceite los siguientes:

Aceites de oliva «virgen» y refinado y aceite de orujo refinado .....	184-196
Aceite de soja refinado .....	189-196
Aceite de algodón refinado .....	189-198
Aceite de girasol refinado .....	184-194
Aceite de cacahuete refinado .....	187-196
Aceite de colza refinado .....	168-181
Aceite de maíz refinado .....	187-195
Aceite de cártamo refinado .....	186-198
Aceite de pepita de uva refinado .....	185-195

2. Prueba de tetrabromuros (Visern-Guillot) (anexo 4).

Se realizará en todos los casos, debiendo dar resultado negativo para los siguientes tipos de aceites:

- Aceite virgen de oliva.
- Aceite refinado de oliva.
- Aceite puro de oliva.
- Aceite refinado de orujo de aceituna.

3. Prueba de Hauchecorne (modificada por Synodinos-Konstas) (anexo 5).

Esta reacción cromática tiene un gran valor indicativo y debe realizarse en todos los casos, aun cuando los resultados obtenidos serán juzgados con prudencia y confirmados por los restantes criterios de pureza.

Las coloraciones normales para los diversos tipos de aceites deben ser:

- Aceite virgen de oliva: Coloración amarilla débil.
- Aceites refinados y puros de oliva: Coloración amarillo tostado.
- Aceite refinado de orujo de aceitunas: Coloración marrón.
- Otros aceites de semillas: Coloraciones diversas no específicas.

4. *Reacción de L. Pavolini.*

Se determinará según la Norma UNE 55 068.

Esta reacción es específica para el aceite de sésamo y debe dar negativa para los demás tipos de aceite.

Deberá efectuarse a juicio del analista si, como consecuencia de las demás pruebas realizadas, pudiera sospecharse la presencia de aceite de sésamo.

5. *Reacción de Halphen (anexo 6).*

Esta reacción es específica del aceite de algodón y debe dar negativa para los demás tipos de aceites.

Deberá efectuarse a juicio del analista si, como consecuencia de las demás pruebas realizadas, pudiera sospecharse la presencia de aceite de algodón.

6. *Reacción de Fitelson (anexo 7).*

Esta reacción es específica del aceite de té y debe dar negativa en los demás tipos de aceite, debiéndose tener en cuenta las observaciones recogidas en la Norma sobre el resultado positivo que dan algunos aceites genuinos de oliva.

Deberá efectuarse a juicio del analista si, como consecuencia de las demás pruebas realizadas, pudiera sospecharse la presencia de aceite de té.

7. *Índice de Bellier.*

Se utilizará el método propuesto en la Norma UNE 55 009. No debe ser superior a 11° C en los siguientes tipos de aceites:

- Aceite virgen de oliva.
- Aceite refinado de oliva.
- Aceite puro de oliva.
- Aceite refinado de orujo de aceituna.

El aceite de cacahuete debe tener un índice de Bellier no inferior a los 35° C.

Esta determinación debe realizarse en todos los casos.

8. *Prueba de Vizern (anexo 8).*

Deberá dar resultado negativo en todas las categorías y tipos de aceite de oliva, salvo en los tipos comerciales en los que exista aceite de orujo. En presencia de otros aceites, su aplicación e interpretación de resultados será discrecional.

Esta prueba se realizará en todas las muestras de aceites de oliva.

9. *Índice de yodo.*

Como norma general, este índice debe ser determinado en todos los aceites (Norma UNE 55 013-Método Hanus), pudiéndose omitir sólo en aquellos casos en que se tiene seguridad de encontrarse ausentes los aceites semisecantes (resultado negativo de la prueba Vizern-Guillot), o bien que se trata de aceites de oliva y sólo hay que discriminar sobre su calidad.

Como orientación, se incluyen a continuación los límites normales para cada aceite:

Aceites de oliva «virgen» y refinado y aceite de orujo refinado .....	76-90
Aceite de soja refinado .....	120-143
Aceite de algodón refinado .....	99-119
Aceite de girasol refinado .....	100-143
Aceite de cacahuete refinado .....	80-105
Aceite de colza refinado .....	94-120
Aceite de maíz refinado .....	103-128
Aceite de cártamo refinado .....	135-150
Aceite de pepita de uva refinado .....	130-140

10. *Índice de refracción.*

Para simplificar el trabajo de inspección y como medida de orientación sobre el grado de instauración de la grasa, puede determinarse el índice de refracción según Norma UNE 55 015, aunque, en caso de duda o de constituir un criterio básico para la calificación de la muestra, nunca deberá omitirse la determinación del índice de yodo.

Como orientación se incluyen a continuación los límites normales para cada aceite, determinados a 25° C:

Aceites de oliva «virgen» y refinado y aceite de orujo refinado .....	1,4657-1,4688
Aceite de soja refinado .....	1,474 -1,476
Aceite de algodón refinado .....	1,463 -1,472
Aceite de girasol refinado .....	1,472 -1,474
Aceite de cacahuete refinado .....	1,467 -1,470
Aceite de colza refinado .....	1,470 -1,474
Aceite de maíz refinado .....	1,470 -1,474
Aceite de cártamo refinado .....	1,472 -1,476
Aceite de pepita de uva refinado .....	1,473 -1,475

11. *Composición de la fracción de ácidos grasos por cromatografía gaseosa.*

Se establece como prueba analítica, que podrá ser ordenada en cuantos casos se estime oportuno para comprobar la pureza de los aceites, el análisis cualitativo y cuantitativo, por cromatografía gaseosa, de la fracción de ácidos grasos. Mientras no existan Normas UNE definidas para efectuar estos análisis tendrá validez oficial el método recogido en el anexo 9.

Los valores límites que se consignan en las tablas siguientes para cada ácido, deben tomarse como orientativas sin excluir la posibilidad de encontrar una cifra que se saiga fuera de estos límites, que deberán aplicarse como un criterio de adulteración, de manera ponderada, teniendo en cuenta el concepto de mayor o menor probabilidad que se deduce de la información recogida en las tablas:

TABLA I

Aceites de oliva vírgenes y refinados y aceites de orujo refinados  
(PORCENTAJE EN PESO REFERIDO A LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS)

Ácidos (c)	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>	Insat. (a) Sat.
Valores extremos .....	8,2-19,9	0,3-2,8	1,2-4,9	61,3-82,4	2,3-17,4	Trazas a 1,4	4,09-6,85
Intervalos (b) más probables .....	10-14	1-2	1-3	74-80	4-6	0,6-0,8	5-6

(a) Esta relación expresa el cociente de la suma palmíticoico, oleico y linoleico dividida por la suma de palmítico y esteárico.

(b) El intervalo más probable representa el que comprende, en el caso del ácido oleico, más del 50 por 100 de las muestras analizadas; en los restantes, y en la relación insat/sat., este porcentaje es superior al 70 por 100.

(c) El ácido mirístico no aparece normalmente en los aceites de oliva, tanto vírgenes como refinados. Puede acusarse en muy pequeña cantidad, de un orden inferior a 0,1 por 100, en aceites que hayan sufrido un proceso de degradación, por cuya razón es más probable la identificación de trazas de ácido mirístico en aceites de orujo refinados que en los aceites de oliva, en los que su presencia constituye un hecho anormal. El ácido láurico no se encuentra nunca, al menos en cantidades detectables por la metódica recomendada, por lo que su presencia es síntoma cierto de adulteración.

Por lo que respecta al ácido mirístico, un pico claramente asignable a este ácido, aunque el cuadro analítico restante sea aceptable para un aceite de oliva o de orujo, debe considerarse como sospechoso de adulteración, debiendo investigarse la presencia de grasa animal antes de emitir un dictamen definitivo, mediante la identificación del colesterol por cromatografía gaseosa. Si el contenido de ácido mirístico fuera superior al 0,2 por 100, siendo satisfactorios los resultados obtenidos en las restantes pruebas de pureza que establece esta Circular, no advirtiéndose tampoco ninguna anomalía en el cuadro de composición de los ácidos grasos, esta confirmación no sería necesaria, pudiéndose dar al aceite por adulterado con grasa animal.

Mientras no existan Normas UNE para el fraccionamiento del insaponificable de grasas por cromatografía en capa fina y el análisis de esteroides por cromatografía gaseosa se utilizarán las técnicas recogidas en el anexo 10.

TABLA II

## Aceites de semillas refinados

(PORCENTAJE EN PESO REFERIDO A LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS-VALORES EXTREMOS) (a)

Aceite	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>	C <sub>20:0</sub>	C <sub>22:0</sub>	C <sub>22:1</sub>	C <sub>24:0</sub>
Soja .....	Cero a trazas	0,1	7-12 (10)	0,5	2,0-5,5 (4)	20-35 (23)	45-60 (53)	5-10 (7,5)	1,0 (0,6)	0,5 (0,4)	—	—
Girasol .....	Cero a trazas	Trazas	5,0-8,0 (6)	0,2	3,0-6,0 (4)	18,0-37,4 (27)	50,0-70,0 (60)	0,2-1,7 (0,5)	0,2-1,2 (0,5)	1,0	—	—
Maíz .....	Cero a trazas	Trazas	10,0-17,0 (11)	0,2	1,5-2,7 (2)	27,5-43,0 (28)	45,0-60,0 (55)	Trazas a 3,0	0,4-1,0 (0,6)	Cero a trazas	—	—
Algodón .....	Trazas a 0,1	0,6-1,2 (0,7)	17,0-29,0 (24)	0,5-1,0 (0,6)	1,0-3,0 (2)	16,0-44,0 (18)	33,0-58,0 (53)	0,1-2,1 (0,5)	0,1-0,3 (0,2)	A cero	—	—
Cártamo .....	Trazas a 0,1	0,1	4,0-10,0 (7)	0,1	2,0-4,0 (2,7)	11,0-25,0 (14)	55,0-80,0 (70)	1,0-3,0 (1,0)	0,2-1,0 (0,7)	0,2-1,0 (0,3)	—	—
Colza (b) y (c).	Trazas a 0,5	Trazas a 0,3	2,0-5,0 (4)	0,5	1,0-2,0 (1,5)	11,0-17,0 (15)	12,0-29,0 (23)	12,0-20,0 (17) (d)	0,4-1,0 (0,8)	0,2-0,8 (0,5)	30-60 (45)	—
Cacahuete .....	Trazas	0,3	8,2-13,0 (9,5)	0,1-0,3 (0,1)	2,8-4,9 (0,3)	38,0-63,0 (45-55)	17,9-41,3 (25-35)	1,0	1,2-2,6 (1,5)	2,0-5,0 (3,0)	—	1,2-2,5 (1,5)
Pepita de uva...	Trazas	0,1	6,5-9,8 (7)	0,1-1,2 (0,2)	3,0-4,7 (3,5)	12,1-24,6 (15)	61,8-77,3 (72)	1,0	Trazas	—	—	—

(a) Las cifras que se indican entre paréntesis representan el valor que puede considerarse como típico para cada grasa; en el aceite de cacahuete, para los ácidos oleico y linoleico, las cifras entre paréntesis representan el intervalo de variación en el que se encuentran comprendidas más del 50 por 100 de las muestras, a base de la información actualmente disponible.

(b) Existen en el mercado internacional numerosos tipos de aceites de colza, que difieren notablemente entre ellos en la composición de sus ácidos grasos. Frente a unas posibilidades tan amplias es prácticamente imposible fijar unos límites para cada ácido que puedan ser de utilidad, a escala mundial, en problemas de identificación. Los límites que se indican en la tabla son de aplicación a los tipos más frecuentes de aceites de colza que circulan en el mercado europeo.

(c) Los aceites de crucíferas tienen como componente característico el ácido erúsico (C<sub>22:1</sub>), que, en los aceites de colza que circulan normalmente en los mercados europeos, es el constituyente mayoritario de la fracción de ácidos grasos.

(d) El ácido de colza tiene un contenido importante de ácido gadoleico (C<sub>22:1</sub>), el cual no se separa, con mucha frecuencia, al operar en condiciones desfavorables, del ácido linoleico. Las cifras que se indican aquí corresponden a la suma de los ácidos linoleico y gadoleico.

En los aceites vegetales la ausencia en el cromatograma de ácido mirístico elimina toda sospecha de adulteración con grasa animal.

Un pico claramente asignable a este ácido, aunque el cuadro analítico restante sea aceptable, debe considerarse como sospechoso de contener grasa animal, debiendo confirmarse esta sospecha, antes de emitir dictamen definitivo, mediante la identificación del colesterol por cromatografía gaseosa.

## REVISIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

Las especificaciones analíticas contenidas en las anteriores normas serán revisadas cuando los avances de la ciencia y/o la tecnología así lo aconsejen.

## DICTÁMENES

La adecuación de los datos analíticos a las especificaciones de estas normas no excluye la posibilidad de adulteraciones debidas al constante progreso de la tecnología moderna. En estos casos los analistas deben acompañar al dictamen un informe detallado de las razones que hacen sospechar la existencia de adulteración a los solos efectos que se señalan en el apartado anterior sobre revisión de las técnicas analíticas, por lo que tales informes deberán ser puestos en conocimiento de esta Comisaría General.

## ANULACIÓN

Ai entrar en vigor la presente Circular quedará anulada la Circular 5/68 de esta Comisaría General de fecha 26 de abril de 1968.

Madrid, 31 de julio de 1970.—El Comisario general, José García de Andoain y Pinedo.

## ANEXO I

## Determinación de humedad y materias volátiles

(Método de la estufa)

## A. OBJETO

Esta Norma tiene por objeto establecer las condiciones adecuadas para la determinación del agua y las materias volátiles, en las condiciones del ensayo, en materias grasas comerciales.

## B. ALCANCE

Aplicable a las grasas animales y vegetales del comercio, excluyéndose los aceites secantes y los del grupo del coco. No es aplicable a materias grasas que hayan sido adicionadas de monoglicéridos.

## C. APARATOS

1. Estufa de aire, de dimensiones adecuadas al número de muestras que se vayan a manejar, pudiendo ser calentada a 150°C como mínimo, y provista de regulación de temperatura con unos límites de oscilación de  $\pm 2^\circ\text{C}$ ; la temperatura será, además, uniforme en todo el espacio interior, tolerándose diferencias que no superen 1°C entre posiciones extremas.

2. Cápsulas de fondo plano, con dimensiones aproximadas de 80 mm. de diámetro y 20 mm. de altura, preferiblemente de acero inoxidable o aluminio o, en su defecto, de porcelana.

3. Desecador, conteniendo como agente desecante sulfato cálcico anhidro, en cualquiera de los tipos comerciales preparados para esta finalidad («Drieritas», «Bikkon», etc.) o Gel de Sílice de 6-20 mallas. Todos estos productos se suministran con indicador de humedad, lo cual resulta muy cómodo y seguro para su utilización en los desecadores.

El ácido sulfúrico monohidrato ( $d = 1,84$ ), en defecto de los productos anteriores, puede ser utilizado, aunque para asegurar una desecación efectiva deberá ser renovado con frecuencia, resultando su uso más inseguro y molesto.

## D. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. La muestra debe ser previamente homogeneizada antes de pesar la cantidad con que se haya de operar. Esto se logra, con las grasas fluidas, agitando fuertemente el fresco que la contiene y vertiendo rápidamente la cantidad aproximada que se vaya a pesar en la cápsula en la que se efectúe la desecación. Si se tratase de grasas sólidas o semisólidas a la temperatura ambiente, calentar suavemente en baño de agua hasta conseguir el grado de fluidez conveniente, cuidando de no llegar a fundir completamente; y homogeneizar por agitación.

## E. PROCEDIMIENTO

1. En una cápsula, desecada previamente en estufa a 105°C y enfriada en un desecador, se pesa, con exactitud de 0,5 mg., una cantidad aproximada de 5 a 10 g. de muestra, según el

contenido de humedad, preparada como se ha indicado en el párrafo anterior D.1.

2. Se coloca en la estufa regulada a 103°C, donde se deja durante treinta minutos. Se pasa a un desecador, donde se deja enfriar, pesando. Repetir este tratamiento hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas no exceda del 0,05 por 100.

## F. CÁLCULOS

$$\% \text{ humedad y materia volátil} = \frac{(P_{\Delta} - P_{\text{O}})}{(P_{\Delta} - P_{\text{O}})} \times 100$$

$P_{\text{O}}$  = Peso de la cápsula vacía y seca.

$P_{\Delta}$  = Peso de la cápsula con la muestra de grasa.

$P_{\text{F}}$  = Peso final de la cápsula con la grasa, al dar por terminada la desecación.

## ANEXO 2

## Medida espectrofotométrica de la absorción de los aceites de oliva en la región ultravioleta del espectro

## 1. Aparatos.

1.1. Espectrofotómetro con equipo para el ultravioleta, cuya escala de longitud de onda permita trabajar con una precisión de 1 m $\mu$  en la región de 220 a 350 m $\mu$ .

1.2. Cubetas prismáticas de cuarzo transparente en la región del espectro comprendida entre 220 y 350 m $\mu$  con un centímetro de paso. La cubeta vacía, comparada contra aire, deberá transmitir, por lo menos, un 80 por 100 de radiación a 220 m $\mu$ .

Se deberá disponer, por lo menos, de un par de cubetas, las cuales estarán pareadas («matched») con una desviación no superior al 2 por 100 a 220 m $\mu$ .

1.3. Matraces aforados, con tapón de vidrio, de 10 ml.

1.4. Matraz aforado, con tapón de vidrio, de 500 ml. y otros de 1.000 ml.

## 2. Productos.

2.1. Disolvente para las medidas espectrofotométricas. Se utilizará el ciclo hexano para espectrofotometría en el ultravioleta, el cual presentará los siguientes valores mínimos de transmisión: a 220 m $\mu$ , 40 por 100; a 250 m $\mu$ , 95 por 100.

2.2. Cromato potásico de calidad «reactivo análisis».

2.3. Hidróxido potásico, de calidad «reactivo análisis».

## 3. Comprobación del espectrofotómetro.

Se prepara la siguiente disolución: 0,2000 g. de cromato potásico, se disuelven en un litro de disolución de hidróxido potásico 0,05 N. Se toman 25 ml. de esta disolución, que se vierten en un matraz aforado de 500 ml. completando hasta el enrase con la disolución de hidróxido potásico 0,05 N. La densidad óptica de esta disolución medida a 275 m $\mu$ , frente a un blanco constituido por la disolución 0,05 N. de hidróxido potásico en cubeta de 1 cm. de espesor, deberá ser  $0,200 \pm 0,005$ .

## 4. Preparación de la disolución de materia grasa.

4.1. El aceite deberá estar completamente limpio y transparente. Si no fuese así, deberá ser filtrado, a la temperatura de la habitación, a través de un papel de filtro adecuado.

4.2. En un matraz aforado de 10 ml. se pesan de la muestra problema las siguientes cantidades aproximadas, con una precisión de 0,5 mg.:

Aceites «virgenes»: 90 mg.

Aceites refinados de lampante o sus mezclas con «virgen»: 60 mg.

Aceites de orujo brutos y refinados: 40 mg.

Se disuelve la cantidad pesada en ciclohexano y se completa hasta el enrase.

4.3. Se efectúa la medida de la extinción, cubeta de 1 cm., empleando como comparación el ciclohexano, a 232 m $\mu$  y a 270 m $\mu$ .

La lectura debe estar comprendida entre 0,2 y 0,8; en el caso de situarse fuera de estos límites, deberá repetirse la medida, bien diluyendo en la relación conveniente o procediendo a una nueva pesada.

## 5. Cálculos.

Se utilizará la fórmula siguiente:

$$K\lambda = \frac{e\lambda}{p} \times 10^3$$

siendo:

$K\lambda$  = Extinción específica a la longitud de onda  $\lambda$

$e\lambda$  = Extinción leída en el aparato.

$p$  = Peso tomado en miligramos de la muestra.

## ANEXO 3

Método de purificación de aceite de oliva por cromatografía sobre alúmina para determinación de los coeficientes de extinción en el ultravioleta

## 1. Aparatos.

1.1. Tubo para cromatografía, el cual consta de dos partes; la parte superior tiene un diámetro interior de 35 mm., y la parte inferior, un diámetro interior de 10 mm. Cada una de estas partes tiene una longitud de 23 cm., lo que da al tubo cromatográfico una longitud total de 46 cm. La mitad inferior tiene en su extremidad una estrangulación o el dispositivo conveniente para retener el tapón de algodón o lana de vidrio que ha de servir de soporte al absorbente.

1.2. Filtro de vidrio Jena 11 G 2, u otro equivalente.

## 2. Productos.

2.1. Alúmina activada para cromatografía, estandarizada según Brockman, actividad I. Un tipo de alúmina que da muy buen resultado es el «Óxido de aluminio FLUKA, para cromatografía». Tipo 507 C Neutro.

2.2. Eter petróleo ajustado a las especificaciones que se indican en la norma UNE 55.016 o A.O.C.S., H 2-41

## 3. Procedimiento operatorio.

3.1. Se toman 30-gramos de alúmina activada y se disponen en el tubo cromatográfico, en la mitad inferior de diámetro más estrecho, pudiéndose efectuar el llenado en seco o en húmedo, utilizando para ello el éter de petróleo.

3.2. Una vez dispuesta la columna, se vierten 10 gramos de aceite, pesados con exactitud del centigramo, disueltos en 100 ml. de éter de petróleo. La disolución oleosa que pasa por la columna se filtra por el filtro Jena, previamente desecado en estufa a 105°C. La disolución filtrada se recoge en un matracito y se destila el disolvente al vacío, operando a una temperatura no superior a 25°C. Para esta operación resulta muy ventajoso el empleo de un evaporador rotatorio.

3.3. El aceite obtenido, libre de disolvente, se utiliza inmediatamente para la determinación de los coeficientes de extinción en el ultravioleta, siguiendo las mismas normas que para los aceites normales.

## ANEXO 4

Reconocimiento de aceites semisecantes en el aceite de oliva

(Prueba de Vizern Guillot)

## 1. Reactivos.

1.1. Eter de petróleo (P. E. 40-70°C) exento de productos reaccionables con los halógenos (norma UNE 55016).

1.2. Bromo, Calidad «para análisis», exento de cloro, conforme a ensayo de la A.O.C.S. La presencia de cloro dificulta la reacción, pudiendo llegar a inhibirla completamente.

1.3. Reactivo de bromación. Se prepara agregando gota a gota y agitando continuamente, 4 ml. de bromo a 100 ml. de éter de petróleo, enfriado a 0°C; el reactivo se conservará hasta el momento de su empleo en hielo fundente.

## 2. Procedimiento.

2.1. El aceite a ensayar deberá ser previamente filtrado, debiendo estar totalmente privado de humedad.

2.2. En un matracito de unos 50 ml. o tubo de ensayo, provisto de tapón esmerilado y desecado previamente, se introduce un ml. del aceite seco y filtrado, disolviéndolo en 10 ml. de éter de petróleo. Se coloca el recipiente tapado en hielo fundente y, después de unos cinco minutos, se agregan, en pequeñas adiciones, 10 ml. del reactivo de bromación, manteniendo la tempe-

ratura de 0°C; el color de la disolución debe indicar claramente el exceso de bromo. Se deja el recipiente tapado en el hielo fundente, observándolo al cabo de una hora. La presencia de aceite semisecante se acusa por la formación de un precipitado más o menos intenso, según la composición del aceite y su contenido en la mezcla. Con los aceites de oliva puros el ensayo queda limpio y transparente.

## 3. Sensibilidad.

Con aceites de soja, el límite de reconocimiento suele ser del 5 por 100, aunque en determinados casos puede ser inferior a esta cifra.

Los aceites de maíz y algodón suelen reconocerse a partir de un 10 por 100.

## ANEXO 5

## Prueba de Hauchecorne

(Modificación Synodinos Konstas)

## 1. Material

1. Frasco de unos 50 ml. de capacidad y tapón esmerilado.
2. Probeta graduada con tapón esmerilado, de 25 ml. de capacidad.
3. Embudo, forma alemana, de unos seis centímetros de diámetro.
4. Probeta graduada de 30 ml.
5. Papel de filtro corriente para trabajo de laboratorio (Albet, núm. 502).

## 2. Reactivos.

1. Tierra decolorante para aceites, de elevada actividad. Un tipo muy apropiado es la TONSIL AC., fabricada por la «Sud-Chemie A. G.», de Munich (Alemania).
2. Ácido nítrico, calidad «para análisis»,  $d = 1.40$ .

## 3. Procedimiento.

1. Con la probeta graduada se miden 30 ml. de aceite de la muestra, que se vierten en el frasco de 50 ml. Seguidamente se pesan tres gramos de tierra decolorante y se agregan al frasco, agitándose fuertemente durante unos treinta segundos.

2. El producto tratado con tierra se filtra, por filtro de pliegues, recogiendo 10 ml. en la probeta de tapón. Si se dispusiese de centrífuga, sería preferible centrifugar, realizándose así la operación en menos tiempo y con más eficacia.

3. Se agregan al aceite contenido en la probeta 10 ml. de ácido nítrico,  $d = 1.40$ , y se agita durante unos treinta segundos, dejando reposar seguidamente, observándose el color desarrollado en la capa superior oleosa. El aceite de oliva virgen produce un color amarillo claro. Los aceites de semillas desarrollan un color amarillo-naranja, más o menos intenso, según sea la naturaleza del aceite y su concentración; el aceite de soja da lugar a un color naranja intenso, aun para concentraciones reducidas.

Los aceites de orujo y los esterificados desarrollan un color marrón más o menos intenso.

El tiempo de desarrollo de estas coloraciones es muy variable. Generalmente se puede observar a los dos o tres minutos de haberse separado la capa oleosa de la capa ácida, pero no se debe dar el dictamen definitivo hasta observar la coloración transcurridos unos quince minutos de reposo.

## ANEXO 6

## Prueba de Halphen

## 1. Objeto.

Este método tiene por objeto la detección cualitativa del aceite de algodón en mezcla con otros aceites o grasas animales o vegetales.

## 2. Alcance.

El aceite de Kapok reacciona con una intensidad mayor que el aceite de algodón, por lo que si existe duda sobre su presencia, deberán realizarse pruebas discriminatorias. Las grasas procedentes de animales que hayan comido harina de semilla de algodón o alguna materia conteniendo ácidos ciclopropenoides, pueden dar resultado positivo en el ensayo. En ausencia de estos aceites y grasas, la prueba puede considerarse específica para el aceite de algodón, entre los restantes que circulan normalmente en el comercio de grasas.

### 3. Instrumental.

3.1. Tubos de ensayo, con unas dimensiones aproximadas de 250 x 25 mm.

3.2. Baño de agua caliente, con temperatura regulable.

3.3. Baño de aceite o bloque de calefacción adecuado para los tubos de ensayo que han de ser utilizados, regulables a una temperatura de 110°-115° C. En lugar del aceite puede emplearse una disolución acuosa saturada de cloruro sódico.

### 4. Reactivo.

Preparar una disolución de azufre en bisulfuro de carbono al 1 por 100 y añadir un volumen igual de alcohol amílico.

### 5. Procedimiento.

5.1. En uno de los tubos de ensayo se toman 10 ml. del aceite que se va a ensayar, agregándole un volumen igual del reactivo. Se agita y se calienta en un baño de agua a 70°-80° C, durante unos cuantos minutos, agitando de vez en cuando hasta que el bisulfuro de carbono comience a hervir y la muestra comienza a producir humos.

5.2. Seguidamente se pasa el tubo a un baño regulado a 110°-115° C en el que se mantiene durante una-dos horas. La presencia del aceite de algodón se acusa por el desarrollo de un color rojo, más o menos intenso. Los aceites refinados suelen dar una coloración rosa. En el caso de débiles contenidos de aceite de algodón, por bajo del límite de sensibilidad del ensayo, el líquido toma un color amarillo.

### 6. Observaciones.

6.1. La estructura del ciclopropeno, responsable del desarrollo del color, se destruye por saponificación; y a 200° C la destrucción es prácticamente completa. Por lo tanto, los aceites refinados suelen dar, a lo sumo, una reacción débil y, frecuentemente, dan resultado negativo. Del mismo modo, la hidrogenación y los tratamientos con ácidos u otros agentes químicos reducen la intensidad y pueden anularla completamente.

6.2. Diferentes lotes de aceites de algodón pueden reaccionar con diferentes intensidades.

6.3. Por lo indicado en los apartados anteriores, la intensidad del color desarrollado no puede tomarse como índice del contenido en aceite de algodón de una muestra en ensayo.

## ANEXO 7

### Reconocimiento de aceite de semilla de té en el aceite de oliva

(Prueba de Fitelson)

#### 1. Alcance.

Este método es aplicable solamente a la identificación de aceite de semilla de té en mezcla con el aceite de oliva.

#### 2. Material.

2.1. Tubos de ensayo con dimensiones aproximadas de 150 x 15 mm. de diámetro.

2.2. Pipeta con una capacidad mínima de 1,5 ml., graduada en décimas.

2.3. Pipeta cuentagotas, con un orificio de salida de diámetro aproximado de 2 mm., calibrado de tal forma que siete gotas de aceite pesen aproximadamente 0,22 gramos.

#### 3. Reactivos.

3.1. Cloroformo calidad «reactivo análisis».

3.2. Ácido sulfúrico, calidad «reactivo análisis» ( $d = 1,84$ ).

3.3. Anhídrido acético, calidad «reactivo análisis».

3.4. Éter etílico anhidro, calidad «reactivo análisis», destilado sobre sodio.

#### 4. Procedimiento.

4.1. Colocar en un tubo de ensayo, medidos con pipeta, 0,8 mililitros de anhídrido acético, 1,3 ml. de cloroformo y 0,2 ml. de ácido sulfúrico. Mezclar y enfriar en un baño de agua con hielo a 5° C.

4.2. Utilizando la pipeta cuentagotas, añadir 0,22 gramos de la muestra a ensayar. Si aparece una turbidez, añadir anhídrido acético gota a gota, agitando después de cada adición hasta que desaparezca. Mantener a 5° C durante cinco minutos.

4.3. Añadir 10 ml. de éter etílico, previamente enfriado a 5° C, tapar el tubo de ensayo con un corcho y mezclar inme-

diatamente, invirtiendo el tubo dos veces. Colocar nuevamente el tubo en el baño de agua-hielo y observar el color. El aceite de semilla de té puro da un intenso color rojo en el intervalo de un minuto, a partir de la adición del éter; alcanza un máximo y, seguidamente, desaparece. (Ver notas 1 y 2.)

#### 5. Notas.

5.1. Muchas muestras genuinas de aceite de oliva dan coloraciones rosa, de una intensidad comparable a un contenido de aceite de semilla de té del 10 por 100, o incluso más. Por consiguiente, coloraciones rosadas débiles en muestras presentadas como aceite de oliva puro no pueden ser atribuidas a la presencia de aceite de semilla de té.

5.2. Algunas muestras de aceite de oliva, especialmente de calidad refinable o tipos industriales, muestran una coloración oscura que tiende a enmascarar el color rojo característico de la reacción. Con el fin de evitar este inconveniente, se recomienda proceder como sigue: Saponificar una mezcla de 5 g. de la muestra y 5 g. de parafina líquida blanca, utilizando un exceso de hidróxido potásico, en disolución alcohólica (aproximadamente 5 ml. de hidróxido potásico al 50 por 100 diluido con 30 ml. de alcohol etílico). Una ebullición mantenida durante 10-15 minutos es generalmente suficiente. Pasar la disolución del producto saponificado a una ampolla de decantación y añadir un volumen igual de agua destilada; mezclar y dejar que decante, separándose en dos capas. Separar la capa inferior constituida por la disolución jabonosa. Lavar la capa oleosa varias veces con agua destilada, con el fin de eliminar los restos de jabón. Secar el producto, una vez lavado, añadiendo sulfato sódico anhidro y dejando en reposo durante unos minutos. Filtrar y operar como se indica en el apartado 4.

5.3. Es aconsejable trabajar, simultáneamente y en forma idéntica, con muestras especialmente preparadas que sirvan como patrones de comparación.

## ANEXO 8

### Prueba de Vizern para el reconocimiento del aceite de orujo

#### 1. Objeto.

Este método tiene por objeto la identificación del aceite extraído por disolventes de los orujos grasos de aceituna.

#### 2. Material.

2.1. Además del material necesario para la determinación de la materia insaponificable y que se indica en la Norma prescrita por la Sección de Materias Grasas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, se requerirá el siguiente:

2.2. Un matraz Erlenmeyer de 100 ml. con cuello esmerilado, provisto de un refrigerante de reflujo constituido por un tubo de 80 a 100 cm. de longitud, aproximadamente.

2.3. Tubo de ensayo de paredes gruesas con dimensiones aproximadas de 160 mm. de altura y 30 mm. de diámetro interior.

2.4. Probeta de 10 ml.

#### 3. Reactivos.

3.1. Los mismos necesarios para la determinación de la materia insaponificable por el método del éter de petróleo; y, además.

3.2. Alcohol etílico de 85 por 100 en volumen. Diluir 885 ml. de alcohol etílico de 96° hasta 1.000 ml. con agua destilada. La densidad a 15°/4° debiera ser 0,8520. Comprobar con alcoholómetro o, si no se dispone de este instrumento, con un densímetro, y ajustar, si fuese necesario.

#### 4. Procedimiento.

4.1. Se toman 5 g. de aceite y se extrae el insaponificable, según el método recomendado por la Sección de Materias Grasas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, empleando el éter de petróleo como disolvente de extracción.

4.2. La totalidad del insaponificable aislado se disuelve en caliente con refrigerante de reflujo, empleando para ello el matraz de 100 ml., en 10 ml. de alcohol etílico de 85°.

4.3. La disolución alcohólica se trasvasa a un tubo de ensayo de las características indicadas en 2.3, y se enjuaga el matraz con otros 10 ml. de alcohol de 85° que se vierten también en el tubo. Se homogeniza la mezcla y se enfría a unos 25° C, dejando en reposo a una temperatura de 20°-25° C. Observar al cabo de una hora.

La formación de un precipitado flocooso, que se deposita en el fondo del tubo bajo forma de copos, acusa la presencia

de aceite de orujo Un precipitado más dividido, no resuelto en copos en el tiempo indicado, no puede interpretarse con carácter positivo, siendo muchos los aceites de oliva de presión que originan estos precipitados.

## ANEXO 9

### Determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa

#### A. OBJETO

Esta norma tiene por objeto el establecimiento del método adecuado para la determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos que entran en la composición de una materia grasa, operando por cromatografía gaseosa.

#### B. ALCANCE

El método es aplicable a aceites y grasas tanto vegetales como animales, que circulan normalmente en el comercio conteniendo ácidos grasos de 12 a 24 átomos de carbono. En el caso de la manteca y de otras grasas conteniendo ácidos grasos inferiores, deberá utilizarse un método adecuado para la preparación de los ésteres metílicos o aislamiento de los ácidos libres de pequeña longitud de cadena, siendo necesario para la separación y determinación de estos últimos efectuar la cromatografía en condiciones distintas de las que se describen en estas normas.

Las condiciones que se especifican no son adecuadas para la determinación de ácidos grasos oxidados y epoxi-ácidos, por lo que la presencia de estos ácidos dificulta la operación, pudiendo llegar a falsear completamente los resultados.

#### C. PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS

##### 1. Material.

1.1. Matraz redondo, fondo plano, de unos 100 ml. de capacidad, con boca esmerilada.

1.2. Refrigerante de agua adaptable al matraz anterior para su utilización como refrigerante de reflujo.

1.3. Ampollas de decantación de unos 500 ml. de capacidad.

1.4. Matraz redondo, fondo plano, de unos 200 ml. de capacidad.

##### 2. Reactivos.

2.01. Metanol absoluto (99.8 %) calidad reactivo análisis.

2.02. Sodio metálico reactivo análisis.

2.03. Disolución de metilato sódico.—Disolver 5 g. de sodio metálico en 1.000 ml. de metanol absoluto (0,2 N, aproximadamente).

2.04. Éter de petróleo (p. e. 40°-60° C) o hexano, que reúnan las características exigidas en la Norma UNE 55 016.

2.05. Hexano o heptano de pureza adecuada para cromatografía gaseosa.

2.06. Disolución de ácido clorhídrico anhidro en metanol absoluto del 3-4 por 100. Se puede obtener fácilmente el ácido clorhídrico gaseoso haciendo caer lentamente en aparato adecuado, ácido sulfúrico ( $d = 1,84$ ) sobre una disolución de ácido clorhídrico ( $d = 1,18$ ); se seca al gas haciéndolo pasar por un frasco lavador con ácido sulfúrico y se hace llegar el metanol anhidro contenido en un Erlenmeyer de boca ancha, a través de un tubo que termina en un embudo, de dimensiones adecuadas al recipiente, colocado de manera que la parte ancha roce la superficie del líquido. Pasando el Erlenmeyer con el metanol al comienzo de la operación, por pesadas sucesivas se determina la cantidad disuelta de clorhídrico, prolongando la operación hasta alcanzar una concentración superior a la deseada. Se adiciona la cantidad de metanol para lograr la concentración del 3-4 por 100.

2.07. Cloruro sódico GP.

2.08. Sulfato sódico anhidro, calidad reactivo análisis.

2.09. Disolución de fenoltaleína al 1 por 100 en metanol.

2.10. Disolución de rojo de metilo al 0,1 por 100 en etanol al 60 por 100 (v/v).

2.11. Gas nitrógeno puro, con un contenido mínimo del 99,8 por 100.

##### 3. Procedimiento.

3.1. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos pueden ser preparados por interesterificación directa de la grasa, siguiendo el método que se detalla en los apartados 3.11, 3.12 y 3.13, el cual

tiene un carácter general, aplicable a una grasa cualquiera que sea su acidez libre y siempre que no tenga un contenido de materia insaponificable superior al 2 por 100, como es el caso en la inmensa mayoría de las materias grasas corrientes.

3.11. Se pesa un gramo de grasa en el matraz de 100 ml., agregando 25 ml. de la disolución de metilato sódico 2,3. Colocar el refrigerante al matraz, hervir hasta obtención de una sola fase y, como mínimo, cinco minutos. Interrumpir la calefacción (ver 3.2).

3.12. Agregar al matraz 30 ml. de la disolución de clorhídrico en metanol (2,5) y volver a calentar, manteniendo en ebullición durante cinco minutos. Enfriar.

3.13. Para la extracción de los ésteres metílicos se procederá según uno de los dos métodos que se describen a continuación. En análisis rápidos en los que interese mucho la rapidez y se opere con aceites y grasas de tipo normal será preferible el método a). Este método tiene, además, la ventaja de no exigir la evaporación del disolvente y, por tanto, se disminuye el riesgo de pérdida de ácidos grasos de bajo peso molecular, cuando existen en el problema.

El método b) es un procedimiento más seguro de recuperación cuantitativa de los ácidos grasos y deberá ser utilizado como método de referencia en los límites de aplicación de esta norma. Operando de la forma que se indica, como se ha señalado antes en el apartado B, hay riesgos de pérdida de ácidos grasos con longitud de cadena inferior a  $C_{12}$ .

Método a).—Pasar la disolución obtenida en el matraz a otro de unos 150 ml. de capacidad, con cuello estrecho y largo (puede servir un matraz alforado), anejungando con unos 4-5 ml. de hexano o heptano de pureza adecuada para cromatografía gaseosa, que se vierten, también, al matraz, calentándose suavemente sin llegar a hervir, mientras se agita dando un movimiento de rotación al matraz, durante uno o dos minutos. A continuación se agrega disolución acuosa saturada de cloruro sódico en cantidad suficiente para situar la capa de hexano o heptano en el cuello del matraz. Esta disolución que contendrá los ésteres metílicos deberá estar limpia y transparente, tomándose con una pipeta 2 ó 3 ml., que se pasan a un frasquito o a una ampolla para su conservación, pudiéndose inyectar directamente esta disolución en el cromatógrafo.

Método b).—Pasar la disolución contenida en el matraz a una ampolla de extracción de 500 ml., enjuagando con unos 30 ml. de éter de petróleo o hexano y añadiendo a continuación en la ampolla 125 ml. de agua destilada. Se agita energicamente y se deja reposar. Se decanta la capa inferior, que se pasa a otra ampolla de extracción y se vuelve a extraer con otros 30 ml. de éter o hexano, repitiéndose la operación una vez más. Los tres extractos se reúnen en una ampolla de extracción y se lavan con porciones sucesivas de 15 ml. de agua destilada, hasta eliminación completa del ácido, acusado con la disolución indicadora de rojo de metilo. Secar la disolución con sulfato sódico anhidro y eliminar el disolvente en el matraz de 200 ml., calentando en un baño de agua bajo corriente de nitrógeno. Esta operación se realizará preferiblemente en un evaporador rotatorio de vacío.

3.2. En el caso de materias grasas con una acidez libre no superior al 0,5 por 100 como sucede normalmente con aceites refinados, se puede simplificar el procedimiento omitiendo la metanolisis en medio ácido. Se realiza la metanolisis alcalina según 3.11 y, estando todavía caliente el matraz, se agrega, por la parte superior del refrigerante una gota de disolución indicadora de fenoltaleína y, seguidamente, disolución de clorhídrico en metanol (2,5) en una cantidad algo superior a la necesaria para neutralizar el metilato, causado por el viaje de la fenoltaleína. Se deja enfriar, pasándose la disolución contenida en el matraz a la ampolla de extracción, siguiéndose según se indica en 3.13.

3.3. Si se trata de ácidos grasos libres o materia grasa de fuerte acidez (> 60 por 100 en ácido oleico) se podrá omitir la metanolisis alcalina, reduciendo la operación a la metanolisis en medio ácido. Para ello se pesan, en el matraz en que se vaya a realizar la operación, dos gramos de muestra, previamente filtrada y seca. Se agregan 80 ml. de la disolución 2,5 de clorhídrico en metanol, procediendo como se señala en 3.12 y 3.13.

3.4. En el caso de que sea necesaria la eliminación previa de la materia insaponificable, se procede según se indica en la Norma UNE 55 004, «Determinación de la materia insaponificable», empleando como disolvente de extracción el éter de petróleo. La disolución hidroalcohólica de jabón se concentra al vacío, preferiblemente en evaporador rotatorio o bajo corriente de nitrógeno, si no se dispusiere de este aparato, hasta alcanzar unos 50 ml., aproximadamente; se pasa el concentrado a una ampolla de extracción, acidificando con clorhídrico 2N hasta reacción ácida al rojo de metilo. Se extrae con éter de petró-

leo o hexano, procediéndose de forma análoga a como se indica en el párrafo anterior 3.3 para la preparación de los ésteres metílicos.

3.5. Los ésteres metílicos obtenidos por uno y otro procedimiento deben ser utilizados en el análisis tan pronto como sea posible. Pueden conservarse durante veinticuatro horas en un frasco bien tapado con tapón de goma, desalojando previamente el aire con nitrógeno y guardando a baja temperatura. Para almacenamiento durante tiempos más largos será necesario conservar en ampolla cerrada a la lámpara, de la cual se ha desalojado previamente el aire con una corriente de nitrógeno.

#### D. PROCEDIMIENTO CROMATOGRÁFICO

##### 1. Material.

1.1. Cromatógrafo apto para la separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos que disponga de un horno capaz de ser calentado a temperatura regulada hasta 250-300°C, de un inyector capaz de ser calentado a una temperatura de unos 50°C superior a la temperatura del horno; un sistema de detección sensible y un aparato registrador continuo.

1.2. Tubo de nitrógeno a presión, utilizable como gas portador, debiendo tener una riqueza mínima del 99.8 por 100.

1.3. Jeringa para la inyección de la muestra, con una capacidad de 5 ó 10  $\mu$ l. El tipo de jeringa más adecuado para estos fines es el de aguja fija fabricada bajo marca Hamilton.

##### 1.4. Columna:

1.41. Se pueden utilizar diversos tipos de columnas, siempre que satisfagan las condiciones determinadas en el apartado E.2. A continuación se dan las características o instrucciones necesarias para la preparación del tipo de columna más utilizado actualmente para el análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos grasos de aquellas materias grasas que circulan normalmente en el comercio, y cuyo comportamiento eficaz ha sido comprobado en numerosos laboratorios. La columna puede adquirirse preparada en las casas fabricantes de material para cromatografía, o bien proceder a su preparación siguiendo las instrucciones que se dan a continuación.

1.42. Columna de acero inoxidable, aluminio o cobre, de 3-8 mm. de diámetro interior y dos metros de longitud, rellena con Chromosorb P o W (60-80 mallas) Celite 545 (80-100 mallas), de la casa Johns Mansville Products (E.E. UU. de Norteamérica), conteniendo 5 por 100 de succinato de polietilenglicol (EGS). Antes de emplear una columna nueva en la resolución de problemas analíticos, deberá ser acondicionada, montándola en el cromatógrafo, desconectada del detector y calentando a 190°C, haciendo pasar, al mismo tiempo, una corriente de nitrógeno que se mantiene durante veinticuatro horas como mínimo. La columna será apta para su utilización si la línea base dibujada por el registrador acusa la estabilidad del sistema. No obstante estas precisiones, no se excluye la posibilidad de utilizar otro tipo de columna capilar o rellena con fase adecuada para el análisis de estos metílicos.

##### 1.43. Preparación de la columna:

###### 1.431. Productos.

1.431. a) Soporte.—Es recomendable utilizar el Chromosorb W (60-80 mallas), pudiendo también emplearse el Chromosorb P, con la misma finura de grano, o Celite 545 (80-100 mallas) de la casa Johns Mansville Corporation de los Estados Unidos de Norteamérica. Estos productos deberán haber sido lavados al ácido, siendo suministrados así por la casa fabricante y utilizados directamente. En el caso de no haber sido sometidos a este tratamiento, se procederá de la forma siguiente: unos 100 gramos de material se colocan en un vaso de 600 ml., agregándose la cantidad necesaria de clorhídrico al 20 por 100 para cubrir el producto. Se deja en reposo durante quince horas como mínimo, se decanta el ácido y se agrega agua destilada, agitando fuertemente; se deja reposar durante unos cinco minutos, se decanta el agua y se vuelve a cubrir con ácido clorhídrico del 20 por 100. Se deja reposar durante unas dos horas, filtrándose, a continuación, por un filtro de vidrio, lavando con agua destilada hasta reacción neutra al tornasol. El producto así lavado se extiende en una cápsula de vidrio y se deseca en estufa a 110°C durante dos horas.

1.431. b) Fase estacionaria.—Succinato de polietilenglicol comercial, sin purificación.

c) Acetona o cloroformo, calidad para análisis.

##### 1.432. Material y aparatos.

a) Tubo de acero inoxidable, de aluminio o cobre, con un diámetro interior de 3-6 milímetros y 2 metros de longitud. Es muy importante que la superficie interior del tubo esté perfectamente pulida.

b) Vibrador magnético.—Aunque no indispensable, es muy conveniente para simplificar la operación del relleno.

c) Bomba pequeña de vacío.

1.433. Impregnación del soporte.—En una cápsula de porcelana, se disuelven unos 0.5 gramos de la fase fija en unos 50 ml. de acetona o cloroformo, añadiendo a esta disolución unos 0.5 gramos del soporte, debidamente preparado. La cantidad de disolvente debe ser suficiente para que, al agregar el soporte, se forme una pasta fluida que permita, por agitación, su homogeneización perfecta. Se calienta la cápsula en baño de María, agitando suavemente la pasta con una espátula, continuando así hasta eliminar totalmente el disolvente, quedando reducido el producto a un polvo suelto. Se introduce la cápsula en una estufa y se calienta a 100°C durante dos horas.

1.434. Llenado de la columna.—Se procede a efectuar el llenado de la forma descrita en todos los tratados de cromatografía, cuidando que el producto se distribuya uniformemente. Esta operación requiere una cierta práctica y ha de hacerse con el máximo cuidado, ya que de ella depende, en gran parte, la eficacia de la columna en la separación cromatográfica.

##### 2. Método operatorio.

2.1. Ajustar el flujo del gas portador (nitrógeno), que deberá ser el adecuado para permitir la elución del linolenato de metilo en un tiempo mínimo de veinticinco minutos. La presión de entrada y el flujo necesario para conseguirlo variará según la columna y el instrumento utilizado, pero será relativamente constante para un aparato y columna determinada. Es necesario mantener un flujo constante durante todo el análisis. El flujo gaseoso será medido con un medidor de burbuja de jabón u otro dispositivo adecuado.

2.2. Poner en marcha la calefacción del horno, de la cámara de inyección y del detector. El horno se regulará a una temperatura aproximada de 160-170°C; la cámara de inyección, a una temperatura 50° superior a la temperatura de la columna, y el detector, a 25° por encima de la temperatura de la columna.

2.3. Las condiciones de trabajo indicadas anteriormente deben considerarse como orientación, ya que la imposibilidad práctica de conseguir el mismo comportamiento en columnas diferentes y las variaciones que presentan en sus características y condiciones operativas los diversos aparatos que se encuentran en el comercio, hace imposible fijar, «a priori», unas condiciones invariables de trabajo aplicables a todos los casos y en todas las circunstancias.

Las condiciones operativas más adecuadas deberán ser establecidas por cada operador, a la vista de los resultados obtenidos con mezclas patrones de ésteres metílicos, siguiendo las instrucciones que se dan en el apartado 3.

2.4. Para todos los demás detalles operativos no mencionados en esta norma, se seguirán las instrucciones dadas por la casa fabricante del aparato.

2.5. Preparar una disolución de los ésteres metílicos en acetona o hexano, cuya pureza haya sido previamente comprobada y, utilizando la jeringa, inyectar 0.4-0.6  $\mu$ l y retirar rápidamente la aguja.

El registro obtenido deberá satisfacer las condiciones que se indican a continuación; caso contrario, se repetirá la inyección hasta obtener un cromatograma satisfactorio.

Los requisitos exigibles son los siguientes:

a) El área total descrita en el cromatograma, referida a la sensibilidad máxima utilizada en el curso de la operación, no deberá ser inferior a 5.000 milímetros cuadrados. De esta forma, los componentes presentes en una cantidad del 0.2 por 100 deberán dar un pico, como mínimo de 10 milímetros cuadrados, siendo, por tanto, perfectamente reconocibles.

b) Con el fin de conseguir que todos los picos caigan dentro del papel registrador, se utilizará, en cada caso, la atenuación de sensibilidad que sea necesaria, cuidando que el pico de mayor intensidad no sea atenuado más de ocho veces.

2.6. Una vez conseguido un registro satisfactorio y habiendo alcanzado nuevamente la pluma la línea base, se interrumpe el funcionamiento del registrador y se retira el papel con el registro para la identificación de los picos y cálculos cuantitativos.

### 3. Identificación de los picos.

3.1. Criterio basado en los tiempos de retención.—Refiriéndonos exclusivamente a los ácidos que entran normalmente en la composición de las grasas naturales, sus ésteres aparecen en el cromatograma en orden creciente de sus átomos de carbono y a su insaturación. Esto es, el palmítico ( $C_{16}$ ) aparece delante del esteárico ( $C_{18}$ ) y los ésteres en  $C_{18}$  aparecen en el orden esteárico; oleato, linoleato y linolenato. El éster del ácido aráquico ( $C_{22}$ ) usualmente aparece después del linoleico ( $C_{18}$ ), pero puede ocurrir lo contrario en algunos casos, dependiendo del tipo de columna y las condiciones de su utilización, o, incluso, superponerse el uno al otro.

Operando en condiciones sensibles, los tiempos de retención son reproducibles en cada especie química, siendo el criterio más frecuentemente empleado para su identificación.

El tiempo de retención viene dado por la distancia recorrida por la carta entre el momento de efectuarse la inyección y la posición del pico máximo de cada banda. Como el momento de efectuarse la inyección no puede registrarse exactamente, para fines prácticos se suele tomar la posición del pequeño pico determinado por la salida del aire inyectado, o bien, si se utiliza un detector como el de llama de hidrógeno, insensible a los componentes del aire, puede tomarse el momento en que se inicia la salida del disolvente, acusada por un fuerte desplazamiento de la pluma del registrador.

3.2. Criterio basado en los tiempos de retención relativos. Los tiempos de retención relativos son más reproducibles. Las retenciones relativas vienen determinadas por el cociente de dividir el tiempo de retención de cada pico por el tiempo registrado para el pico del palmítico de metilo o bien por otro éster que se tome como comparación.

3.3. Como el comportamiento de la columna cambia como consecuencia de factores muy diversos y durante su utilización continuada experimenta un proceso de envejecimiento que altera su capacidad de retención, es conveniente comprobar, periódicamente, la posición de los distintos ésteres en el cromatograma, utilizando mezclas patrones convenientemente preparadas, o bien ésteres metílicos de una grasa previamente analizada y conocida. Esto constituye una de las operaciones de comprobación a que se hace referencia en el apartado 5.

### 4. Determinación cuantitativa.

La determinación cuantitativa se basa en el principio de que los pesos de cada uno de los componentes separados en la mezcla son proporcionales a las áreas comprendidas dentro de los triángulos dibujados debajo de cada pico. El área de cada triángulo se obtiene trazando rectas tangentes a las líneas dibujadas en el registro, prolongándolas hasta su intersección con la línea base, y multiplicando la altura del triángulo por la mitad de la base. En el caso de haber trabajado con atenuaciones diferentes para cada pico, se refirirán todas las medidas a una misma sensibilidad del registrador, multiplicando la altura por el factor de atenuación correspondiente en cada caso y el valor de la altura así corregida por la mitad de la base. Si no es necesario efectuar corrección en relación al cambio de atenuación, como ocurre en la mayor parte de los análisis de rutina en que se trabaja con una sola atenuación, la medida del área se realiza más cómodamente multiplicando la altura del pico por el ancho a la mitad de la altura. El contenido de cada ácido en la muestra viene dado por la expresión

$$\% \text{ A en peso} = \frac{\text{Superficie A}}{\text{De las superficies}} \times 100$$

Siendo A el éster metílico correspondiente a un pico dado.

Para obtener resultados reales es absolutamente indispensable comprobar periódicamente el aparato con ayuda de mezclas patrones, procediendo de la forma que se indica en el apartado 5, o bien, siempre que se introduzca cualquier variación en las condiciones operativas.

En algunos casos será necesario utilizar factores de corrección determinados empíricamente, como se indica en el apartado siguiente, aunque el operador deberá ser extremadamente prudente en la utilización de estos factores.

## E. OPERACIONES DE COMPROBACIÓN

### 1. Reactivos.

Laurato de metilo.  
Palmítico de metilo.

Esteárico de metilo.  
Oleato de metilo.  
Linoleato de metilo.

Estos ésteres metílicos han de ser puros, comprobada su pureza por cromatografía gaseosa y conservados en condiciones que garanticen su inalterabilidad.

### 2. Prueba de comportamiento del instrumento y de la columna.

Se realiza determinando la resolución de dos productos críticos, como son el oleato y el esteárico de metilo. La resolución viene determinada por la expresión

$$\text{Resolución} = \frac{2D}{O + E}$$

Siendo D = distancia entre los dos máximos de los picos del oleato y el esteárico; O = ancho de la base del pico correspondiente al oleato, y E = ancho de la base del pico correspondiente al esteárico.

Estos valores se determinan sobre el cromatograma obtenido con una muestra conteniendo cantidades aproximadamente iguales de esteárico y oleato de metilo, inyectando una cantidad tal que la altura de estos picos alcance al 25-50 por 100 del ancho del papel de registro.

Si la resolución calculada es igual o mayor que 1.0, la columna y el instrumento se encuentran en condiciones satisfactorias. Todas las columnas en el transcurso de su utilización sufren una pérdida gradual en la resolución de los picos: cuando el valor llegue a ser inferior a 1.0 deberá instalarse una nueva columna.

### 3. Situación de los ésteres en el cromatograma.

Utilizando los productos patrones a que se hace referencia en el apartado E.1, se prepara una mezcla que contenga, preferiblemente, cantidades de un orden aproximado al existente en la grasa o grasas que se trata de analizar. Se registra el cromatograma de la forma usual, determinando los tiempos de retención absolutos o relativos para cada una de las especies contenidas en la mezcla.

En el caso de tener que identificar en el problema algún pico que no coincida con los ésteres contenidos en la mezcla patrón, es de suma utilidad efectuar, a partir de los datos obtenidos con la mezcla patrón, la representación gráfica de la función que relaciona los logaritmos de los tiempos de retención con el número de átomos de carbono de cada ácido; para los términos comprendidos en una misma serie homóloga, esta función es lineal; por lo tanto, los tiempos de retención de los términos de la serie de los que no se disponga de muestra patrón pueden calcularse por interpolación, o viceversa.

### 4. Calibrado para aplicación cuantitativa.

Utilizando los productos patrones a que se hace referencia en el apartado E.1, se prepara una mezcla conteniendo cantidades exactamente pesadas de cada uno de los ésteres, debiendo tener una composición análoga a la de la muestra problema. Se registra el cromatograma de la forma usual, efectuándose los cálculos cuantitativos según se indica en el apartado D.4.

Los resultados deducidos del cromatograma, normalmente, coinciden con los valores reales de la mezcla patrón. Sin embargo, en algunos casos, debido a diversas causas, se observan discrepancias que pueden ser corregidas aplicando factores de corrección. Estos factores de corrección no son aplicables más que en la parte lineal de la curva de respuesta del detector para cada constituyente. Por consiguiente, el operador debe ser extremadamente prudente en lo que respecta a la aplicación de estos factores, ya que ellos pueden variar en función de la composición de la mezcla a analizar, modificaciones en el detector y en el amplificador, alteración de la fase fija, etc. Si la cantidad encontrada para un ácido graso cualquiera de la mezcla patrón discrepa en más de un 10 por 100 de la cantidad calculada, esto indica que el aparato no funciona correctamente, siendo necesario buscar la causa.

El factor de corrección para cada ácido se calculará, con relación al ácido palmítico, utilizando mezclas patrones con una composición análoga a la de la muestra problema que se trata de analizar. Se procede de la forma siguiente: dividir el por-

centaje de cada ácido por el área del pico correspondiente y el cociente así obtenido por el valor obtenido para el ácido palmítico.

$$f_x = \frac{x}{A_x} \cdot \frac{P}{A_p} = \frac{x \cdot A_p}{A_x \cdot P}$$

Siendo  $f_x$  factor de corrección del ácido;  $x$ , tanto por ciento del ácido en la mezcla patrón;  $A_x$ , área del pico  $x$ ;  $P$ , tanto por ciento del ácido palmítico en la mezcla patrón;  $A_p$ , área del pico del ácido palmítico. Para aplicar estos factores a la mezcla problema se multiplican por la relación entre el área medida para cada ácido en el cromatograma y el área del pico correspondiente al ácido palmítico; se obtiene, procediendo de esta forma, la relación entre el contenido de cada ácido y el palmítico, tomado como unidad.

$$\frac{X}{P} = f_x \cdot \frac{A_x}{A_p}$$

Si están comprendidos en el cromatograma todos los ácidos componentes de la mezcla problema, a partir de las relaciones calculadas se puede pasar fácilmente a la composición centesimal.

#### ANEXO 10

Análisis de la fracción de esteroides de las materias grasas por cromatografía en fase gaseosa

##### A. OBJETO

Esta Norma tiene por objeto dar instrucciones para el aislamiento de la fracción de esteroides de una materia grasa y la separación de sus componentes con fines cualitativos y cuantitativos.

El procedimiento descrito consta de tres fases:

- a) Saponificación de la grasa y extracción de la materia insaponificable.
- b) Aislamiento de la fracción de esteroides por cromatografía en capa fina.
- c) Separación de los componentes de la fracción de esteroides por cromatografía gaseosa.

##### B. APARATOS

###### 1. Para la cromatografía en capa fina.

- 1.1. Equipo para la preparación de las placas.
- 1.2. Placas de vidrio de 20 × 20 × 0,4 cms. y 20 × 5 × 0,4 centímetros.
- 1.3. Cubeta de vidrio, con su tapa, para el desarrollo de las placas.
- 1.4. Pulverizador para la aplicación del reactivo de revelado a las placas.

###### 2. Para la cromatografía gaseosa.

- 2.1. Cromatógrafo de gas, con un sistema de detección sensible, preferiblemente de ionización de llama de hidrógeno, provisto de columna e inyector de vidrio, con el fin de evitar el contacto a elevada temperatura de las sustancias a ser investigadas con acero inoxidable y otros metales.
- 2.2. Columna de vidrio de unos dos metros de longitud (diámetro exterior, 7,5 mm., y diámetro interior, 2,6 mm.), con relleno de sílica OV17 al 2,5 por 100 sobre Chromosorb G, 80/100 mallas (ver nota E.1). En el caso de que se prefiera proceder a la preparación de la columna, se seguirán las instrucciones que se dan en el apartado D.2.1.

##### C. PRODUCTOS

###### 1. Para la cromatografía en capa fina.

- 1.1. Gel de sílica G Merck.
- 1.2. Rodamina 6G al 0,001 por 100 en etanol del 90 por 100. Se puede emplear cualquier otro colorante que no reaccione con los esteroides, como, por ejemplo, diclorofluoresceína.
- 1.3. Cloroformo calidad reactivo análisis.
- 1.4. Colesterol «purísimo» en disolución al 10 por 100 en cloroformo.

###### 2. Para la cromatografía gaseosa.

- 2.1. Chromosorb G 80/100 mallas, pudiendo también emplearse Chromosorb P o W, de la misma finura de grano (ver nota E.2).
- 2.2. Sílica OV-17 o SE-52.
- 2.3. Cloruro de metileno Q P.
- 2.4. Eter etílico, R.A.
- 2.5. Colesterol, patrón cromatográfico, disolución al 2 por 100 en éter etílico.

##### D. PROCEDIMIENTO

###### 1. Aislamiento de los esteroides.

1.1. Preparación de las cromatoplasmas.—Pesar la cantidad necesaria de gel de sílica G Merck en un vaso forma alta de 250 ml., agregando aproximadamente dos veces su peso de agua destilada y agitando, con una varilla de vidrio, hasta formar una pasta homogénea; 28 gramos de gel de sílica y 60 ml. de agua son suficientes para la preparación de dos placas de 20 × 5 cms. y cuatro placas de 20 × 20 cms. Pasar la pasta al aplicador y extenderla sobre las placas con un espesor de 0,25 mm. Dejar las placas al aire durante unos quince minutos y a continuación desecar en estufa a 100°C durante una hora. Guardar en desecador.

1.2. Preparación de los esteroides.—Extraer la fracción insaponificable de cinco gramos del aceite o grasa, empleando el éter etílico, siguiendo el método descrito en la Norma UNE 55004. La desecación del insaponificable se hará en estufa de vacío, a una temperatura que no sobrepase los 50-60°C.

Disolver el insaponificable extraído en diez veces su peso de cloroformo, siendo normalmente suficiente 0,5-1 ml. (ver nota E.3).

Depositar 16 gotas de 3-4  $\mu$ l, conteniendo aproximadamente 300-400  $\mu$ g, en una placa de 20 × 20 cms., a distancia de un centímetro. Dejar una distancia de dos centímetros a partir del borde inferior y, como mínimo, 2,5 cms. a partir de los bordes laterales. Depositar como referencia una cantidad aproximada de 35  $\mu$ g de colesterol disuelto en unas diez veces su peso de cloroformo, a una distancia de un centímetro de los extremos laterales.

Introducir en la cubeta de desarrollo el cloroformo necesario hasta una altura de un centímetro; se tapa la cubeta y se deja en reposo durante unas tres horas con el fin de lograr el equilibrio líquido-vapor en el interior de la cubeta.

Introducir la placa en la cubeta, poner la tapa y esperar el desarrollo hasta que el frente líquido se haya situado a una distancia de 0,5 a 1 cm., del límite superior de la placa. Sacar la placa de la cubeta y dejar que se evapore el disolvente a la temperatura de la habitación.

Pulverizar la placa con un reactivo de revelado (ver C.12) y examinar el cromatograma bajo una lámpara Wood.

Localizar la posición de los esteroides por medio del colesterol de referencia y marcar esta mancha con una aguja.

Rascar la sílica conteniendo la mancha marcada, e introducir el polvo en un Erlenmeyer de 25 ml. Añadir 5 ml. de cloroformo y hervir en baño de agua.

Filtrar el extracto en cloroformo, sacar el gel de sílica del filtro y repetir la ebullición con otros 5 ml. de cloroformo. Repetir este tratamiento tres veces.

El cloroformo de los tres extractos reunidos se elimina en evaporador rotatorio al vacío. El residuo sólido se disuelve en unos cuantos mililitros de éter etílico, siendo esta disolución la que se inyecta en el cromatógrafo.

###### 2. Cromatografía gaseosa de los esteroides.

2.1. Preparación del relleno de la columna.—Se pesan 500 miligramos de sílica en un matraz de fondo redondo de 250 ml., añadiendo 75 ml. de cloruro de metileno y dejando en reposo toda una noche para conseguir la disolución total de la goma. Añadir 10 g. del soporte, convenientemente preparado, de acuerdo con lo que se indica en la nota E.2, aplicando succión al matraz con el fin de eliminar el aire retenido por el soporte; se agita suavemente durante unos minutos. Interrumpir el vacío y dejar en reposo la suspensión durante unos quince minutos, agitando de vez en cuando.

Disponer un embudo de 12 cms.  $\varnothing$  con un filtro de 24 centímetros  $\varnothing$ , sobre una campana graduada de 100 ml. Pasar la suspensión del matraz al filtro tan cuantitativamente como sea posible y dejar filtrar 45 ml. de disolución.

Poner rápidamente el residuo que quede en el filtro a una capsula de porcelana. Secar durante doce horas a 80°C en una estufa de desecación, quedando así listo el relleno para su introducción en la columna.

## 2.2. Análisis cromatográfico:

2.21. Condiciones de trabajo.—No se pueden indicar condiciones estrictas de trabajo, dependiendo de las condiciones del aparato utilizado, columna, etc. Las que se indican a continuación deben constituir una orientación, que habrán de ser modificadas hasta conseguir un resultado aceptable. El máximo del pico del colesterol deberá registrarse a los dieciséis o diecisiete minutos de la inyección.

Temperatura de la columna, 240°C.

Temperatura del inyector, 290°C.

Temperatura del detector, 290°C.

Flujo del gas portador (nitrógeno), 40 ml/minuto.

2.22. Inyección de la muestra.—Se inyecta aproximadamente 0,5 µl de la disolución de esteroides en éter etílico, debiendo contener esta disolución de 10 a 20 µg por ml.

Como referencia se utiliza una disolución de colesterol cromatográficamente puro. La identificación de esteroides se hace con más precisión, determinando los tiempos de retención referidos al del colesterol tomado como unidad (ver nota E.4).

## E. NOTAS

1. Un comportamiento análogo se obtiene con la sílicona SE-52, aunque la preparación del relleno, en este caso, es más delicada, como consecuencia de las dificultades que puedan encontrarse en la impregnación del soporte.

2. Estos productos vienen normalmente preparados para su utilización directa, habiendo sido sometidos a lavados ácidos para la eliminación del hierro y a un tratamiento de silanización para la inactivación de la superficie; esto último se realiza con dimetildiclorosilano o con hexametildisilazano. Un Chromosorb no tratado de esta forma debe ser sometido, antes de su utilización, a estos tratamientos.

3. Si no se dispone de cloroforno de calidad adecuada puede sustituirse por una mezcla de 3 vol. de hexano y 1 vol. de éter etílico.

4. Trabajando con elevada sensibilidad, muchos aceites vegetales dan un pico situado en la posición del colesterol, que podría ser atribuido a la adulteración de la muestra con grasa animal. Por este motivo, un pico atribuible al colesterol, cuya magnitud no exceda del 1 por 100 de la fracción total de esteroides, no debe ser tomado como prueba de adulteración.

En mantecas de cacao, grasa de palma y aceite de coco esta cantidad puede ser mayor, habiéndose registrado, en algunos casos, hasta un 3 por 100.

## II. Autoridades y personal

### NOMBRAMIENTOS, SITUACIONES E INCIDENCIAS

#### MINISTERIO DE JUSTICIA

*DECRETO 2271/1970, de 16 de julio, por el que se promueve a Magistrado de la Sala Tercera del Tribunal Supremo a don Enrique Amat Casado, Presidente de la Sección 5.ª de la Audiencia Territorial de Madrid.*

A propuesta del Ministro de Justicia, previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día diez de julio de mil novecientos setenta, y de conformidad con lo establecido en el artículo trece, en relación con el catorce, apartados uno a) y dos, del Reglamento Orgánico de la Carrera Judicial y Magistrados del Tribunal Supremo, aprobado por Decreto tres mil trescientos treinta/mil novecientos sesenta y siete, de veintiocho de diciembre,

Vengo en promover a la plaza de Magistrado de la Sala Tercera del Tribunal Supremo, vacante por jubilación de don Tomás Alonso Pérez, que la servía, a don Enrique Amat Casado, Presidente de la Sección Quinta de la Audiencia Territorial de Madrid.

Así lo dispongo por el presente Decreto, dado en Madrid a dieciséis de julio de mil novecientos setenta.

FRANCISCO FRANCO

El Ministro de Justicia,  
ANTONIO MARIA DE ORIOL Y URQUIJO

*DECRETO 2272/1970, de 16 de julio, por el que se nombra Magistrado de la Sala Segunda del Tribunal Supremo a don Fernando Díaz Palos, Abogado Fiscal de la Audiencia Territorial de Barcelona.*

A propuesta del Ministro de Justicia, previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día diez de julio de mil novecientos setenta, y de conformidad con lo establecido en el artículo trece del Reglamento Orgánico de la Carrera Judicial y Magistrados del Tribunal Supremo, aprobado por Decreto tres mil trescientos treinta/mil novecientos sesenta y siete, de veintiocho de diciembre,

Vengo en nombrar, por el turno séptimo, Magistrado de la Sala Segunda de dicho Alto Tribunal, en vacante económica producida por fallecimiento de don Enrique Cid y Ruiz-Zorrilla, a don Fernando Díaz Palos, Abogado Fiscal de la Audiencia Territorial de Barcelona.

Así lo dispongo por el presente Decreto, dado en Madrid a dieciséis de julio de mil novecientos setenta.

FRANCISCO FRANCO

El Ministro de Justicia,  
ANTONIO MARIA DE ORIOL Y URQUIJO

#### MINISTERIO DE HACIENDA

*DECRETO 2273/1970, de 24 de julio, por el que se nombra Director general de Política Financiera a don Mariano Rubio Jiménez.*

A propuesta del Ministro de Hacienda, y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día veinticuatro de julio de mil novecientos setenta,

Vengo en nombrar Director general de Política Financiera a don Mariano Rubio Jiménez.

Así lo dispongo por el presente Decreto, dado en Madrid a veinticuatro de julio de mil novecientos setenta.

FRANCISCO FRANCO

El Ministro de Hacienda,  
ALBERTO MONREAL LUQUE

*ORDEN de 28 de julio de 1970 por la que se nombran Corredores Colegiados de Comercio para diversas plazas, en virtud de oposición restringida entre Corredores Colegiados de Comercio.*

Ilmo. Sr.: Finalizados los ejercicios de las oposiciones restringidas entre Corredores Colegiados de Comercio para cubrir una vacante en cada una de las plazas mercantiles de Albacete, Málaga, Murcia y Pamplona, convocadas por Orden de 20 de enero de este año («Boletín Oficial del Estado» número 29, correspondiente al día 3 de febrero, y

Vista la propuesta del Presidente del Tribunal que juzgó dichas oposiciones, formulada a tenor de lo dispuesto en el número 6.º de la citada Orden de convocatoria, este Ministerio, de conformidad con las normas establecidas en el vigente Reglamento, ha dispuesto lo siguiente:

1.º Nombrar para cubrir las vacantes que a continuación se relacionan a los Corredores Colegiados de Comercio que se indican: