

I. Disposiciones generales

PRESIDENCIA DEL GOBIERNO

16202 REAL DECRETO 1761/1977. de 17 de junio, sobre entrega y conservación de obras y bienes del Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario.

El Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario, continuador de los desaparecidos Instituto Nacional de Colonización y Servicio Nacional de Concentración Parcelaria y Ordenación Rural, tiene habilitados en el Decreto dos mil seiscientos noventa y siete/mil novecientos sesenta y seis, de veinte de octubre, y en el artículo setenta y ocho de la vigente Ley de Reforma y Desarrollo Agrario cauces para la cesión a particulares o Entidades públicas de todos los bienes no destinados a ser conservados en el patrimonio del Organismo.

A través de los últimos años el gran número de obras realizadas por el Instituto y de los bienes adquiridos por el mismo, unido a las circunstancias de diferente índole que han venido retrasando la entrega formal de dichos bienes a sus destinatarios, da lugar a que en el momento presente sea ya muy elevado el número de personas y Entidades que están en el uso de dichos bienes sin haber accedido legalmente a la propiedad de los mismos con la plenitud de derechos y obligaciones que se derivan de la condición de propietarios.

Resulta obvia la conveniencia de poner término cuanto antes a esta situación de provisionalidad, resolviendo al mismo tiempo los problemas que ocasiona la reparación y conservación de dichos bienes, por lo que el Instituto concederá las máximas ayudas que autoriza la legislación vigente cuando los bienes de cuya cesión se trata vengán siendo utilizados con anterioridad a la publicación de este Real Decreto.

Por otra parte, cuando los destinatarios de los bienes sean Ayuntamientos, Entidades locales Menores y otras Entidades Públicas, a los que el Instituto tiene legalmente la facultad y la obligación de ayudar, puesto que se trata de pequeños pueblos creados por el propio Instituto en su actuación en las grandes zonas regables, el presente Real Decreto autoriza, al amparo de la legislación que así lo permite, la adjudicación a título gratuito de determinados bienes para compensar a las Entidades locales Menores de los gastos de reparación o acondicionamiento que se vean obligados a realizar.

En su virtud, a propuesta de los Ministros de Agricultura y de la Gobernación y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día diecisiete de junio de mil novecientos setenta y siete,

DISPONGO:

Artículo uno.—Todas las obras y bienes muebles e inmuebles construidos o adquiridos por el Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario que no hayan de ser retenidos por éste serán entregados en lo sucesivo a sus destinatarios tan pronto como estén en condiciones de utilización.

Si no fuera posible en tal momento formalizar la transmisión del dominio de los bienes en los términos previstos en la Ley, el Instituto entregará y autorizará, en cuanto sea posible, el uso de los mismos.

Artículo dos.—Los gastos que ocasione la conservación de los bienes correrán a cargo de sus usuarios, salvo los que correspondan al constructor en el plazo de garantía.

El Instituto no podrá realizar gasto alguno de conservación de los bienes que haya entregado o cuya utilización hubiere autorizado a su destinatario, salvo los que pudieran corresponderle durante el plazo máximo de un año para la mejor adaptación de la obra al uso a que hubiere sido destinada.

Artículo tres.—El Instituto formalizará la entrega de los bienes, a que se refieren los artículos uno y dos, que estén en poder de los destinatarios el día de la publicación del presente Decreto y concederá, por su excepcional interés, los auxilios técnicos y económicos, así como las subvenciones que autoriza el artículo doscientos ochenta y ocho de la Ley de

Reforma y Desarrollo Agrario para las obras de reparación o acondicionamiento de dichos bienes que sean necesarias y se inicien antes del día treinta y uno de diciembre de mil novecientos setenta y ocho.

Artículo cuatro.—El Instituto, en el plazo más breve posible, entregará los bienes a que se refiere el artículo sesenta y dos de la Ley de Reforma y Desarrollo Agrario que en la fecha de la publicación del presente Real Decreto estén pendientes de cesión a los Ayuntamientos, Entidades locales Menores y demás Entidades Públicas.

Conforme a lo previsto en el artículo nueve del Decreto dos mil seiscientos noventa y siete/mil novecientos sesenta y seis, de veinte de octubre, el Instituto podrá entregar a los Ayuntamientos, Entidades locales Menores y demás Entidades Públicas, a título gratuito, solares, terrenos para futuras ampliaciones, ejidos, ruedos, superficies forestales y bosquetes de los poblados, parques o jardines, terrenos incultos, pastizales y terrenos no adecuados para el cultivo, así como terrenos destinados a huertos familiares para trabajadores.

También se autoriza al Instituto para que pueda ceder a las Entidades locales y Públicas edificios destinados a vivienda y dependencias agrícolas, así como albergues para ganado o almacenes para maquinaria agrícola y demás construcciones e instalaciones análogas, que hayan sido realizadas por el Instituto, con una subvención del treinta por ciento de su coste.

En todos los supuestos que contempla este Real Decreto será necesaria la aceptación previa y expresa de las Entidades locales o Públicas afectadas.

Para que las Entidades locales y Públicas puedan disfrutar de los beneficios que se señalan en los párrafos anteriores tendrán que hacerse cargo de los bienes y servicios a que se refiere el párrafo primero de este artículo.

Los gastos e impuestos a que den lugar las cesiones de bienes serán a cargo del Instituto.

Artículo cinco.—La entrega de los bienes a que se hace referencia en este Real Decreto se realizará, en todo caso, por el procedimiento y con las formalidades establecidas en el artículo setenta y ocho de la vigente Ley de Reforma y Desarrollo.

Dado en Madrid a diecisiete de junio de mil novecientos setenta y siete.

JUAN CARLOS

El Ministro de la Presidencia del Gobierno,
ALFONSO OSORIO GARCIA

16116 Métodos Oficiales de Análisis de Aceites y Grasas, Cereales y Derivados, Productos Lácteos y Productos Derivados de la Uva, establecidos por Orden de 31 de enero de 1977. (Continuación.)

17.4. Procedimiento.

Pesar con una precisión de 1 mg, en una navecilla de vidrio, la cantidad necesaria de materia grasa, según las indicaciones de la tabla siguiente (la cantidad de solución de tiocianógeno será de un 150 por 100 en exceso):

Índice previsto	Peso de la muestra g.	Reactivo ml.
0 a 30	≈ 0,50	25
30 a 50	≈ 0,30	25
50 a 100	≈ 0,25	25
100 a 150	≈ 0,20	50
Superior a 150	≈ 0,15	50

Introducir la navecilla y su contenido en un matraz de boca esmerilada. Agregar 10 ml de tetracloruro de carbono. Disol-

ver. Agregar 25 ó 50 ml exactamente medidos de la solución de tiocianógeno. Tapar el matraz. Mezclar por agitación. Dejar en la oscuridad durante 24 horas, a una temperatura de aproximadamente 20° C.

Agregar 2 g de ioduro potásico pulverizado. Agitar durante 3 minutos. Agregar 30 ml de agua destilada. Valorar en presencia de engrudo de almidón, con la solución de tiosulfato sódico 0,1 N, hasta desaparición del color azul después de enérgica agitación.

Realizar un ensayo en blanco, sin materia grasa, en las mismas condiciones.

La solución de tiocianógeno debe valorarse antes de iniciar los ensayos. Si la diferencia entre esta valoración y la del ensayo en blanco es superior 0,2 ml, significa que la solución se descompone muy rápidamente; repetir las operaciones con otra solución más correcta.

Los ensayos sobre materia grasa y en blanco se realizarán al menos por duplicado. Si entre ambos ensayos, sobre materia grasa y en blanco, se obtienen diferencias superiores a 2 unidades del índice de tiocianógeno, repetir la determinación.

17.5. Cálculo.

$$\text{Índice tiocianógeno} = \frac{12,69 N (V - V')}{P}$$

V = volumen en ml de solución de tiosulfato sódico 0,1 N utilizados en el ensayo en blanco.

V' = volumen en ml de solución de tiosulfato sódico 0,1 N utilizados en un ensayo con materia grasa.

P = peso en g de la muestra ensayada.

N = normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico 0,1 N.

17.6. Referencias.

- H. P. Kaufmann, Chem. Ztg. 1925. 49, 768.
- International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Soaps 1964. II. D.8.

18. INDICE DE POLIBROMUROS

18.1. Principio.

El índice de polibromuros de una sustancia grasa es el peso en g de polibromuros obtenidos, en las condiciones descritas a partir de 100 g de grasa.

El método tiene carácter convencional, por lo que sus prescripciones han de ser observadas rigurosamente.

18.2. Material y aparatos.

18.2.1. Matraz de saponificación, de unos 200 ml, con boca esmerilada adaptable a un tubo refrigerante de reflujo de aproximadamente 1 m de largo.

18.2.2. Matraz aforado de 100 ml.

18.2.3. Matraz erlenmeyer de unos 100 ml de capacidad.

18.2.4. Ampollas de decantación de 500 ml.

18.2.5. Crisol con placa filtrante G3, con dispositivo para refrigerar y kitasato para recoger el filtrado.

18.3. Reactivos.

18.3.1. Disolución alcohólica de hidróxido potásico 1 N.

18.3.2. Disolución de ácido clorhídrico 1 N.

18.3.3. Disolución acuosa de anaranjado de metilo al 0,1 por 100.

18.3.4. Éter etílico, seco.

18.3.5. Solución acuosa al 10 por 100 de cloruro sódico.

18.3.6. Sulfato sódico anhidro.

18.3.7. Disolución de bromo. Agregar 4 ml de bromo puro y seco, enfriados a 0° C, a 100 ml de éter etílico seco, previamente enfriados a la misma temperatura. Realizar la adición de bromo por pequeñas porciones, dejándolas resbalar por las paredes del recipiente y agitando en cada adición. Mantener a 0° hasta el momento de su utilización.

18.4. Procedimiento.

18.4.1. Preparación de los ácidos grasos. Pesar con precisión de 10 mg, 5 g de grasa en el matraz de saponificación. Agregar 25 ml de potasa alcohólica 1 N. Acoplar el refrigerante y calentar a ebullición, con una pequeña llama, durante 30 minutos.

Al principio de la calefacción agitar el matraz por rotación suave, para homogeneizar su contenido, a fin de evitar el sobrecalentamiento de la grasa. Terminada la saponificación, separar el refrigerante. Agregar 50 ml de agua destilada y pasar el contenido del matraz a la ampolla de decantación, utilizando en varias veces, 80 ml de agua en total. Agregar 50 ml de éter etílico y ligero exceso de ácido clorhídrico 1 N, calculado me-

dante la adición de dos gotas de anaranjado de metilo. Agitar fuertemente la ampolla para disolver totalmente los ácidos grasos liberados. Dejar reposar hasta que se separen netamente las dos capas. Pasar la disolución hidro-alcohólica a otra ampolla de decantación y extraer nuevamente con otros 50 ml de éter etílico, repitiendo la operación anterior. Reunir los dos extractos etéreos en una misma ampolla y lavar tres veces, con 50 ml cada una, con la disolución de cloruro sódico. En los tres lavados se obtendrá una buena decantación, por adecuada separación de las dos capas.

Pasar la disolución etérea a un matraz aforado de 100 ml y completar hasta el enrase con éter etílico. Añadir una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro (de 1 a 2 g) para asegurar la deshidratación. Tapar el matraz y agitar para homogeneizar.

En el caso de que la bromación no vaya a realizarse inmediatamente, llenar el matraz con CO₂ o con N₂, tapar y conservar en lugar oscuro.

18.4.2. Bromuración. Pesar el matraz erlenmeyer de 100 mililitros, previamente secado en estufa y enfriado en desecador. Agregar una cantidad de polibromuros del orden de 0,1 g, obtenidos a partir del mismo aceite u otro de naturaleza análoga; pesar nuevamente el matraz. Los polibromuros han de estar perfectamente divididos.

Agregar al matraz 20 ml, exactamente medidos con pipeta, de la disolución etérea de los ácidos grasos. Agitar para asegurar la disolución de los polibromuros. Tapar el matraz e introducirlo en hielo fundente durante 15 minutos, agitando de cuando en cuando, para saturar el líquido de polibromuros.

Añadir 20 ml de la disolución de bromo, poco a poco y resbalando por la pared, agitar en cada adición, cuidando de que la temperatura no exceda nunca de + 2° C. Una vez que se han agregado los dos tercios del reactivo, se puede añadir el resto más rápidamente, utilizando las últimas porciones para limpiar las paredes del matraz. Tapar y dejar en hielo fundente durante 3 horas.

Realizar un ensayo en blanco, en las mismas condiciones.

18.4.3. Filtración y lavados. Al cabo de las 3 horas, filtrar la disolución de los ácidos grasos por el crisol de placa filtrante, previamente desecado en estufa a 105°, enfriado en desecador y tarado. El crisol estará rodeado de hielo fundente; facilitar la filtración mediante un débil vacío, que será eliminado antes de que se consuma el líquido sobre la placa filtrante.

Lavar cuatro veces la torta de polibromuros con disolución de polibromuros en éter etílico (0,06 g en 100 ml), enfriada a 0° C. En los dos primeros lavados utilizar 20 ml cada vez, y en los dos últimos, 10 ml cada vez. Adicionar estos volúmenes de éter sucesivamente al matraz donde se ha efectuado la precipitación, cuidando de lavar bien las paredes y agitando enérgicamente para desprender las partículas adheridas. Después de efectuar estas operaciones conviene introducir el matraz en hielo fundente, y no verter el éter en el crisol hasta asegurarse de haberlo enfriado a 0° C. Cuando se opera con aceite de índice de polibromuros bajo pueden reducirse los lavados a tres solamente, utilizando en cada uno un volumen de 10 ml.

18.4.4. Dsecación y pesada. Colocar en estufa los crisoles y erlenmeyer que se han utilizado en la precipitación; elevar progresivamente la temperatura hasta alcanzar de 95° a 100° C. Dejar 30 minutos a esta temperatura; enfriar en desecador y pesar.

18.5. Cálculo.

$$\text{Índice de polibromuros} = \frac{P' + P''}{P} \times 100$$

P' = aumento de peso en g del conjunto matraz y crisol, empleados en el ensayo de la muestra.

P'' = pérdida de peso en g del conjunto crisol y matraz, empleados en el ensayo en blanco.

P = peso en g de la muestra.

18.6. Referencia.

- International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Soaps. 1964. II. D.11.

19. INDICE DE DIENOS

19.1. Principio.

El índice de dienos representa la cantidad de iodo expresada en g equivalente al anhídrido maleico, fijado por los dobles enlaces presentes en 100 g de grasa.

19.2. Material y aparatos.

19.2.1. Matraz de 250 ml de boca esmerilada y refrigerante de reflujo.

- 19.2.2. Baño de aceite o manta eléctrica.
 19.2.3. Pipeta de 25 ml.
 19.2.4. Embudo de separación de 250 ml.
 19.2.5. Matraz de 300 ml.

19.3. Reactivos.

- 19.3.1. Solución al 6 por 100 de anhídrido maleico (p.f. 52-54° C), en toluol puro; dejar en reposo 24 horas. Filtrar con papel de filtrado rápido antes de su uso.
 19.3.2. Disolución de hidróxido sódico N.
 19.3.3. Eter etílico.

19.4. Procedimiento.

Filtrar la grása a través de un filtro seco.

Pesar con precisión de 1 mg aproximadamente 3 g de materia grasa en el matraz de 250 ml, agregar 25 ml de solución de anhídrido maleico, hervir moderadamente a reflujo durante 3 horas, dejar enfriar unos minutos, agregar a través del refrigerante 5 ml de agua destilada, y volver a hervir durante 15 minutos. Dejar enfriar a la temperatura ambiente, agregar a través del refrigerante 5 ml de éter etílico, y después 20 ml de agua destilada. Quitar el refrigerante y pasar el contenido del matraz al embudo de separación. Lavar el matraz tres veces, con 7 ml de éter etílico cada vez, y después otras tres veces, con 8 ml de agua destilada cada vez, incorporando todos los lavados al embudo de separación. Agitar y dejar reposar hasta la separación de las dos capas. Pasar la capa acuosa al matraz erlenmeyer de 300 ml. Repetir la extracción del extracto etéreo contenido en el embudo de separación, con 25 ml y después con 10 ml de agua destilada, incorporar la capa acuosa al matraz de 300 ml.

Valorar todos los extractos acuosos reunidos con disolución de hidróxido sódico N, usando fenolftaleína como indicador. Realizar simultáneamente un ensayo en blanco.

19.5. Cálculo.

$$\text{Índice de dienos} = \frac{(V - V') \cdot 12,692 \cdot N}{P}$$

V = volumen en ml de NaOH empleados en el ensayo en blanco.
 V' = volumen en ml de NaOH empleados en el ensayo de la grása.

N = normalidad en la solución de hidróxido sódico.

P = peso en g de la materia grasa.

19.6. Observaciones.

Es conveniente que el agua empleada sea destilada, recientemente hervida y enfriada.

19.7. Referencias.

- H. P. Kaufmann, J. Baltés. Fette und Seifen 1936. 43, 93.
- American Oil Chemists' Society. Official and Tentative Methods. Ka 12-55.

20. ACIDOS OXIDADOS

20.1. Principio.

Este método determina los ácidos oxidados contenidos en las grasas, expresados en materia grasa insoluble en éter de petróleo.

Teniendo carácter empírico, exige observar estrictamente las condiciones prescritas.

20.2. Material y aparatos.

- 20.2.1. Matraz de 150 ml, adaptable a refrigerante de reflujo.
 20.2.2. Ampollas de decantación de 500 ml.
 20.2.3. Estufa estabilizada a 103° C ($\pm 2^\circ$ C).
 20.2.4. Crisol de porcelana de 45 mm de altura y 40 mm de diámetro.

20.3. Reactivos.

20.3.1. Solución atánolica de hidróxido potásico, aproximadamente 2 N. Disolver 112 g de potasa en 500 ml de etanol de 96°, y una vez fría la solución, enrasar a 1.000 ml con etanol de 96°.

20.3.2. Eter de petróleo (p. e. 40°-40° C) bidestilado, exento de residuo.

20.3.3. Solución de ácido clorhídrico N.

20.3.4. Eter etílico (C₂H₅)₂O, d = 0,712-0,714.

20.3.5. Etanol, 95° exento de acidez.

20.4. Procedimiento.

Tratar 5 g de grasa pesados con una aproximación de 10 miligramos como en 22(b).4, hasta agotamiento de la disolución hidroalcohólica de jabón por el éter y los dos primeros lavados.

Colocar la disolución hidroalcohólica y el agua procedente de los dos primeros lavados del éter en una cápsula de 500 mililitros. Hervir hasta que queden eliminadas las trazas de éter disuelto y el alcohol en su totalidad.

Trasvasar el contenido de la cápsula a una ampolla de decantación de 500 ml, lavando la cápsula con pequeñas cantidades de agua, procurando que el volumen total del líquido en la ampolla sea de 150 ml aproximadamente.

Añadir solución de ácido clorhídrico N en ligero exceso (51 ml aproximadamente). Agitar 2 minutos. Después de agitado no ha de quedar espuma; en caso contrario se añade un poco más de ácido.

Agregar a la ampolla 100 ml de éter de petróleo. Agitar 1 minuto. Dejar reposar 12 horas. Decantar el agua ácida. Filtrar la solución de éter sobre un filtro lento de 90 mm de diámetro.

Los ácidos oxidados se adhieren generalmente a las paredes del tubo y aparecen en forma de una masa roja oscura.

Si los ácidos oxidados son abundantes, hacer salir el éter de petróleo por la parte superior de la ampolla, para evitar que los ácidos obturen la llave de salida. Lavar dos veces la ampolla de decantación con 25 ml de éter de petróleo y filtrar. Lavar también con éter de petróleo el tubo de vaciado de la ampolla y el embudo, el filtrado y el pico del embudo con porciones de 10, 10 y 5 ml respectivamente. Seguidamente desecar el exterior del pico del embudo y el del tubo de vaciado del embudo de decantación.

Disolver en etanol de 95° por 100 v/v caliente, los ácidos oxidados contenidos en la ampolla: Una vez con 25 ml de etanol caliente, y otra con 50 ml de etanol caliente. Pasar sucesivamente cada porción caliente por el filtro. Lavar el tubo de vaciado de la ampolla, el filtro y el cono del embudo con porciones respectivas de 5 ml de etanol caliente, recoger las soluciones alcohólicas en un vaso de 400 ml.

Evaporar el etanol hasta un volumen muy pequeño (algunos ml).

Transvasar cuantitativamente el residuo a un crisol de porcelana tarado, utilizando pequeñas porciones de éter etílico (así se evitan las dificultades presentadas por la evaporación del alcohol, teniendo este disolvente tendencia a subir por las paredes del crisol).

Comenzar la evaporación al aire libre. Terminarla en baño de agua hirviendo, hasta la desaparición de los olores de éter y alcohol y la aparición de un olor acre.

Colocar el crisol en estufa a 103° C ($\pm 2^\circ$ C), durante media hora. Pasar a desecador con ácido sulfúrico durante 15 minutos y pesar. Repetir sucesivamente estas operaciones hasta pesada constante con una precisión de 1 mg. La última pesada representa el peso de los ácidos oxidados más el de las sales minerales arrastradas con los ácidos oxidados.

Calcinar el residuo, dejar enfriar el crisol y pesar.

20.5. Cálculo.

$$\text{Tanto por ciento de ácidos oxidados} = \frac{100 (P' - P'')}{P}$$

P' = peso en g de los ácidos oxidados, más las sales minerales.

P'' = peso en g de las sales minerales.

P = peso en g de la muestra tomada para análisis.

20.6. Referencias.

- International Union of Pure and Applied Chemistry Standard Methods for the Analysis of Oils. Fats and Soaps. 1964. II. D.12.
- Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española 55.008.

21. INDICE DE PEROXIDOS

21.1. Principio.

Se denomina «índice de peróxidos» a los miliequivalentes de oxígeno activo contenidos en un kilogramo de la materia ensayada, calculados a partir del yodo liberado del yoduro potásico, operando en las condiciones que se indican en la metódica.

Las sustancias que oxidan el yoduro potásico en las condiciones descritas se supone son peróxidos u otros productos similares de oxidación de la grása, por lo que el índice obtenido

puede tomarse, en una primera aproximación, como una expresión cuantitativa de los peróxidos de la grasa.

21.2. *Material y aparatos.*

21.2.1. Navecillas de vidrio de aproximadamente 3 ml para pesada de la grasa.

21.2.2. Matraces con tapón esmerilado, de aproximadamente 250 ml, previamente secados y llenos de gas inerte (anhídrido carbónico o nitrógeno).

21.3. *Reactivos.*

21.3.1. Cloroformo, para análisis, exento de oxígeno por boteo de una corriente de gas inerte puro y seco.

21.3.2. Acido acético glacial puro exento de oxígeno como en 2.3.1.

21.3.3. Solución acuosa saturada de yoduro potásico, exento de yodo y yodatos.

21.3.4. Soluciones acuosas de tiosulfato sódico 0,01 N y 0,002 N exactamente valoradas.

21.3.5. Solución indicadora de almidón al 1 por 100 en agua destilada.

21.4. *Procedimiento.*

Tomar un matraz con cierre esmerilado, de unos 250 ml, previamente seco, y llenar con un gas inerte, puro y seco (anhídrido carbónico o nitrógeno). Introducir tan rápidamente como se pueda la muestra del aceite que se desea ensayar, definida en función de los índices presuñidos (ver 21.6.1).

Agregar 10 ml de cloroformo, en el cual se disuelve rápidamente la grasa por agitación, 150 ml de ácido acético glacial y 1 ml de una disolución acuosa de yoduro potásico.

Cerrar el matraz y mantener en agitación durante un minuto, imprimiéndole un suave movimiento de rotación, conservándolo después en la oscuridad durante 5 minutos; transcurrido este tiempo, agregar 75 ml de agua, agitar vigorosamente y valorar el yodo liberado con una disolución de tiosulfato 0,002 N, para los aceites de índices inferiores o iguales a 20 y 0,01 N para los índices más elevados.

Paralelamente, se efectúa un ensayo testigo, sin aceite, que debe dar un índice nulo.

21.5. *Cálculos.*

El índice de peróxidos se expresa en miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de muestra, y se calculará aplicando la fórmula siguiente:

$$I. P. = \frac{V \cdot N \cdot 1.000}{P}$$

V = tiosulfato, en ml, consumido en la valoración.

N = normalidad de la solución de tiosulfato.

P = peso, en gramos, de la muestra de grasa tomada para la determinación.

21.6. *Observaciones.*

21.6.1. Peso de la muestra. La toma de las muestras para el ensayo se efectuará tomando una cantidad de grasa de acuerdo con el índice de peróxidos que se presupone y que se indica en el cuadro siguiente:

Índice que se presupone	Peso de la muestra en g.
De 0 a 20	De 2,0 a 1,2
De 20 a 30	De 1,2 a 0,8
De 30 a 50	De 0,8 a 0,5
De 50 a 100	De 0,5 a 0,3

21.6.2. Para la expresión del índice de peróxidos se han propuesto otras unidades distintas a la adoptada en esta norma y que suelen ser utilizadas, en algunos casos, presentándose a confusiones en la interpretación de resultados. Para evitar estos errores y los inconvenientes que pudieran derivarse de los mismos, en los informes analíticos deberá indicarse siempre la unidad en la que se expresa el índice.

Para facilitar el paso de una unidad a otra, se indican a continuación, los factores de conversión por los que deberá multiplicarse, en cada caso, la cifra del índice, expresado en una determinada unidad, para obtener la cifra equivalente en la unidad que se define en 21.1.

Índice de peróxidos expresado en

Factor de conversión para calcular el índice expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de grasa

a) Microgramos de oxígeno activo por gramo de grasa	0,125
b) Gramos de oxígeno activo por kilogramo de grasa	125
c) Mililitros de solución de tiosulfato sódico 0,01 N por kilogramo de grasa	0,01
d) Mililitros de solución de tiosulfato sódico 0,01 N por gramo de grasa	10
e) Mililitros de solución de tiosulfato sódico 0,002 N por gramo de grasa	2
f) Milimoles de oxígeno activo por kilogramo de grasa	2

21.7. *Referencias.*

- Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española 55.023.
- International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Soaps 1964. II. D.13.

22(a). INSAPONIFICABLE
(Método éter de petróleo)

22(a).1. *Principio.*

Se entiende por insaponificable el peso en g de sustancias no saponificables, insolubles en agua y solubles en el disolvente utilizado en la determinación, contenidas en 100 g de grasa.

El método es aplicable a todas las materias grasas. Su exactitud es sólo aproximada para aquellas grasas con un contenido de insaponificable muy elevado.

22(a).2. *Material y aparatos.*

22(a).2.1. Matraz de fondo plano, de 200 ml, adaptable a refrigerante de reflujo.

22(a).2.2. Refrigerante de reflujo.

22(a).2.3. Embudos de separación de 500 ml.

22(a).2.4. Estufa graduable a 103° (± 2° C).

22(a).3. *Reactivos.*

22(a).3.1. Solución de hidróxido potásico, alcohólica, 2 N, en etanol, de 95 por 100 v/v.

22(a).3.2. Eter de petróleo (p. e. 40°-60°; índice de bromo, 1), redistilado y exento de residuo.

22(a).3.3. Etanol al 50 por 100 en volumen.

22(a).3.4. Agua destilada

22(a).3.5. Solución de heliantina al 1 por 100.

22(a).3.6. Solución de Acido clorhídrico 0,1 N.

22(a).4. *Procedimiento.*

Eliminar el agua de la muestra por decantación y filtración sobre papel, efectuadas a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión de determinados componentes sólidos que hubieran podido separarse de la materia grasa fluida.

Pesar en el matraz 5 g de materia grasa, con una aproximación de 0,01 g.

Añadir 50 ml de solución alcohólica de potasa 2 N. Adaptar refrigerante de reflujo. Calentar una hora con ligera ebullición. Separar la fuente de calor. Agregar por la parte superior del refrigerante 50 ml de agua destilada y agitar. Dejar enfriar.

Transvasar el contenido del matraz a un embudo de decantación, aclarar y arrastrar las últimas porciones lavando el matraz varias veces con 50 ml de éter de petróleo en total.

Agitar enérgicamente durante un minuto. Dejar en reposo hasta la completa separación de las dos fases. Pasar a un segundo embudo de decantación la fase jabonosa. Extraer ésta con otros 50 ml de éter de petróleo; decantarla de nuevo y volver a extraer con 50 ml de éter de petróleo.

Reunir las tres fracciones etéreas en un mismo embudo de separación y lavarlas tres veces seguidas, utilizando cada vez 50 ml de etanol al 50 por 100 v/v. Transvasar la solución de éter de petróleo a un pequeño matraz de cuello corto, previamente

tarado y eliminar el disolvente por destilación en baño de agua hirviendo.

• Secar colocando el matraz en posición horizontal en una estufa regulada a 103° durante 15 minutos. Dejar enfriar en desecador y pesar. Repetir la operación hasta que las pérdidas entre dos pesadas consecutivas sean inferiores a 0,10 por 100.

Incinerar las sustancias insaponificables obtenidas, y si dejan cenizas, dosificar su alcalinidad en presencia de heliantina con una solución de ácido clorhídrico 0,1 N (1 ml de esta solución representa 0,032 g de jabón de potasa, que hay que deducir).

22(a).5. Cálculo.

Calcular el insaponificable expresado en porcentaje.

$$22(a).5.1. \text{ Insaponificable \%} = \frac{100 P'}{P}$$

22(a).5.2. En el caso de haber incinerado el residuo y valorado con KOH alcohólica 0,1 N.

$$\text{Insaponificable \%} = \frac{100 (P' - 0,32 N V)}{P}$$

P' = peso en g del residuo.

P = peso en g de la muestra.

N = normalidad exacta de la solución acuosa de ClH 0,1 N.

V = volumen en ml de ClH 0,1 N utilizados.

22(a).6. Observaciones.

22(a).6.1. En los certificados de análisis, indicar: Método del éter de petróleo.

22(a).7. Referencias.

1. International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Soaps. 1964. II. D.5.
2. Instituto de Racionalización del Trabajo: Una Norma Española 30.305.

22(b). INSAPONIFICABLE

(Método éter etílico)

22(b).1. Principio.

Como 22(a).1.

22(b).2. Material y aparatos.

Como 22(a).2.

22(b).3. Reactivos.

22(b).3.1. Solución etanólica de hidróxido potásico, aproximadamente 2 N, en etanol de 95° v/v.

22(b).3.2. Solución acuosa de hidróxido potásico, aproximadamente 0,5 N.

22(b).3.3. Eter etílico neutro, recién destilado y exento de residuo.

22(b).4. Procedimiento.

Eliminar el agua de la muestra por decantación y filtración sobre papel, efectuadas a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión de determinados componentes sólidos que hubieran podido separarse de la materia grasa fluida.

Pesar en el matraz, con una precisión de 0,01 g, aproximadamente, 5 g de materia grasa. Saponificar como en 22(a).4.

Separar la fuente de calor. Desconectar el refrigerante. Transvasar el contenido del matraz a una ampolla de decantación. Lavar con 100 ml de agua destilada.

Enjuagar el matraz y el refrigerante con 100 ml de éter etílico, y pasarlos a la ampolla; tapar y agitar vigorosamente, mientras el contenido esté ligeramente caliente. Dejar en reposo hasta separación nítida de las dos capas. Si aparece una emulsión persistente causada por una alcalinidad fuerte del medio, añadir unas gotas de ácido clorhídrico N.

Separar la capa alcohólico-acuosa y verterla en el matraz empleado en la saponificación.

Pasar la capa etérea a una segunda ampolla de decantación conteniendo 40 ml de agua.

Tratar la solución alcohólico-acuosa de jabón dos veces más, con porciones de 100 ml de éter etílico. Reunir las tres fracciones etéreas en la segunda ampolla de decantación. Si las fracciones etéreas reunidas contuviesen materias sólidas en suspensión, filtrar y lavar cuantitativamente el filtro con un poco de éter.

Girar, sobre sí mismo, sin sacudidas violentas, la ampolla que contiene el éter y los 40 ml de agua. Una vez separadas las dos capas, eliminar la capa acuosa. Lavar la capa etérea dos veces, con 40 ml de agua cada vez, agitando energicamente. Después, lavar sucesivamente con 40 ml de solución de potasa acuosa 0,5 N, con 40 ml de agua, y de nuevo con 40 ml de solución acuosa de potasa 0,5 N, y, por lo menos, dos veces con 40 ml de agua. Continuar los lavados con agua hasta que las aguas de lavado no den coloración rosa a la fenoltaleína.

Transvasar cuantitativamente la solución etérea a un matraz tarado de 200 ml, después de reducirla a pequeño volumen por evaporación. Agregar 6 ml de acetona y eliminar completamente el solvente volátil, por medio de una ligera corriente de aire, estando el matraz casi sumergido en un baño de agua hirviendo, en posición oblicua y haciéndole girar. Terminar el secado en estufa a 103° C, como en 22(a).4.

Después de pesar el residuo, disolverlo en 20 ml de etanol de 95 por 100, v/v, recién destilado y neutralizado; valorar con solución alcohólica de hidróxido potásico 0,1 N en presencia de fenoltaleína; si el volumen utilizado de solución alcalina es superior a 0,2 ml, repetir todo el procedimiento.

22(b).5. Cálculo.

Calcular el insaponificable expresado en porcentaje.

$$\text{Insaponificable \%} = \frac{100 P'}{P}$$

P' = peso en g del residuo.

P = peso en g de la muestra.

22(b).6. Observaciones.

En los certificados de análisis indicar: Método del éter de petróleo.

22(b).7. Referencias.

1. International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Soaps. 1964. II. D.5.
2. Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española 30.305.

23. INDICE DE ESCUALENO EN ACEITE DE OLIVA

23.1. Principio.

Se entiende por índice de escualeno el número de mg de este hidrocarburo contenido en 100 g de aceite.

Este método determina el índice de escualeno del aceite de oliva, o el de sus mezclas con otros aceites vegetales de composición análoga.

Los resultados obtenidos con otros aceites vegetales, con un contenido en insaponificable muy diferente al del aceite de oliva, se admitirán con reserva, no dando por segura la cifra obtenida sin asegurarse de que la separación cromatográfica de la fracción de hidrocarburos se ha verificado correctamente, comprobándose en todo caso la ausencia de esterinas, que garantiza en cierto modo la buena marcha de la operación.

23.2. Material y aparatos.

23.2.1. Matraz de saponificación, de fondo plano, de 100 ml, con refrigerante de reflujo, constituido por un tubo de 1 m de longitud.

23.2.2. Ampolla de extracción, de 500 ml de capacidad.

23.2.3. Aparato de destilación, con ajustes esmerilados y con matraz de 100 a 150 ml de capacidad.

23.2.4. Kitasato, de 250 ml.

23.2.5. Tubo de vidrio para la columna de absorción cromatográfica, con un diámetro interior de 13 mm y longitud aproximada de 400 mm. Deberá llevar en su extremo inferior un estrangulamiento o dispositivo para retener el algodón o lana de vidrio que soporta la alúmina; la parte superior irá provista de un tapón de corcho o vidrio con ajuste esmerilado, atravesado por un codo destinado a adaptar una pera de goma.

23.2.6. Embudo de vidrio de 4 cm de diámetro, aproximadamente.

23.2.7. Matraces erlenmeyer, con tapón esmerilado, de 150 ml, provistos de un codillo para destilación.

23.2.8. Buretas. Una de 25 ml, contrastada, graduada en décimas, y otra de 50 ml, graduada en décimas.

23.3. Reactivos.

23.3.1. Hidróxido potásico; reactivo para análisis.

23.3.2. Etanol de 96° exento de aldehídos.

23.3.3. Eter de petróleo para análisis, p. e. 35°-50° C.

23.3.4. Disolución de fenoltaleína al 1 por 100 en etanol de 96°.

23.3.5. Disolución alcohólica de hidróxido potásico 0,5 N.

23.3.6. Sulfato sódico, anhidro.

23.3.7. Óxido de aluminio, para análisis cromatográficos.

23.3.8. Benceno, reactivo para análisis.

23.3.9. Cloroformo, reactivo para análisis.

23.3.10. Reactivo de Hanus. Se prepara como en 18(b).3.5.

23.3.11. Disolución de ioduro potásico al 10 por 100, exento de iodato.

23.3.12. Indicador engrudo de almidón.

23.3.13. Disolución de tiosulfato sódico 0,1 N.

23.4. Procedimiento.

23.4.1. Primera saponificación. Pesar 10 g de aceite en un matraz de 100 ml. Adicionar una disolución preparada disolviendo 3 g de hidróxido potásico en 40 ml de etanol de 96°. En general debe tomarse una cantidad de aceite que contenga de 30 a 40 mg de escualeno. Colocar el refrigerante y hervir durante una hora.

Verter la disolución de jabón, todavía caliente, en una ampolla de extracción de 500 ml; enjuagar el matraz con 100 ml de éter de petróleo e incorporarlos a la ampolla. Enfriar la ampolla y agitar fuertemente. Debe formarse una disolución homogénea. Agregar 40 ml de agua. Dejar reposar hasta la neta separación de las dos capas, aproximadamente dos horas.

Separar la capa alcohólica inferior. Pasar la capa etérea al matraz de destilación y destilar el éter.

23.4.2. Segunda saponificación. El residuo insaponificable obtenido hervirlo con 10 ml de potasa alcohólica 0,5 N, durante 20 a 30 minutos, bajo refrigerante de reflujo. Pasar la disolución alcohólica a la ampolla de extracción; agregar 50 ml de éter de petróleo y 10 ml de agua. Dejar reposar hasta separación de las dos capas; suele bastar con dos horas, aunque es más práctico dejar estar durante una noche. Separar la capa etérea y lavarla con alcohol de 50 por 100, adicionado de unas gotas de fenoltaleína, hasta eliminación total de álcali. Secar con sulfato sódico anhidro en la misma ampolla de extracción; suele bastar con 0,5 a 1 g.

Pasar la disolución de éter de petróleo por un filtro seco, recogiendo el filtrado en un matracito, tarado de 100 a 150 ml. Lavar la ampolla de extracción con 5 ml de éter de petróleo, que se hacen pasar por el mismo filtro. Lavar éste con dos porciones más, de 5 ml cada una, de éter de petróleo. Destilar el éter. Secar el residuo a 100° C, y una vez seco, pesar. Este residuo insaponificable contiene la totalidad de los hidrocarburos existentes, y una parte de las esterinas, además de otros compuestos solubles en el éter de petróleo.

23.4.3. Separación cromatográfica. Cargar el tubo de vidrio destinado a la columna de absorción con óxido de aluminio hasta una altura de 10 cm. El llenado puede hacerse en seco o en húmedo. Una vez cargada colocar un disco de papel de filtro encima de la alúmina, montándose el conjunto según se indica en 23.3.5 y 23.3.6. Agregar benceno por la parte superior de la columna, forzándolo a pasar con una ligera presión realizada con la pera de goma, hasta empapar la columna, bastando para ello unos 20 a 25 ml.

Absorbido el benceno por la alúmina, y restando sobre ésta una pequeña capa de disolvente, agregar el insaponificable disuelto en 10 ml de benceno. Lavar el matraz con 5 ml de benceno, e incorporarlo a la columna. Antes de que hayan desaparecido las últimas porciones de benceno, se agregan 55 ml de éste, y continúa el desarrollo, manteniendo la presión necesaria para que el eluyente fluya de la columna en la proporción de 2 ml por minuto aproximadamente.

Observar líquido recogido y columna bajo la luz de Wood. La disolución no deberá presentar fluorescencia marcada, como tampoco el líquido contenido en la parte inferior de la columna en una altura de 2 a 4 cm.

Pasar el líquido eluido a un matraz de 150 ml, previamente tarado. Destilar el benceno. Secar el residuo a 100° C y pesar.

23.4.4. Valoración del escualeno. Disolver el residuo anterior en el mismo matraz con 5 ml de cloroformo; y adicionar 0,3 ml de reactivo Hanus por cada miligramo de sustancia pesada. Cerrar el matraz con el tapón de vidrio. Dejar en reposo en la oscuridad durante 15 minutos.

Añadir 5 ml de disolución de ioduro potásico al 10 por 100, y 50 ml de agua. Valorar el exceso de iodo con tiosulfato sódico 0,1 N, con engrudo de almidón como indicador.

23.4.5. Ensayo en blanco. Realizarlo en las mismas condiciones.

23.5. Cálculo.

$$\text{Índice de escualeno} = \frac{3.420 N (V' - V)}{P}$$

N = normalidad del tiosulfato sódico.

V = volumen en ml de tiosulfato sódico 0,1 N utilizados en el ensayo muestra.

V' = volumen en ml de tiosulfato sódico 0,1 N utilizados en el ensayo blanco.

P = peso en g de la muestra de aceite.

23.6. Referencias.

1. J. Fitelson. J. Ass. Off. Agr. Chem. 1943. 26. 499.
2. Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española 55.038.

24(a). DETERMINACION DE LA FRACCION DE ESTEROLES POR CROMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA

24(a).1. Principio.

Se aísla la fracción de esterole de una materia grasa y se separan sus componentes con fines cualitativos y cuantitativos. El procedimiento consta de tres fases:

- 1) Saponificación de la grasa y extracción de la materia insaponificable.
- 2) Aislamiento de la fracción de esterole por cromatografía en capa fina.
- 3) Separación de los componentes de la fracción de esterole por cromatografía gaseosa.

24(a).2. Material y aparatos.

24(a).2.1. Estufa de desecación con regulación automática de temperatura.

24(a).2.2. Equipo de preparación de las placas para cromatografía en capa fina.

24(a).2.3. Placas de vidrio de 20 x 20 x 0,4 cm y 20 x 5 x 0,4 centímetros.

24(a).2.4. Cubeta de vidrio, con su tapa, para el desarrollo de las placas.

24(a).2.5. Pulverizador para la aplicación del reactivo de revelado a las placas.

24(a).2.6. 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.

24(a).2.7. Columna de vidrio de unos 2 m de longitud (diámetro exterior, 7,5 mm; diámetro interior, 2,5 mm) con relleno de sílica OV-17 al 2,5 por 100 sobre Chromosorb-G, 80/100 mallas (ver 5.1). En el caso de que se prefiera proceder a la preparación de la columna, se seguirán las instrucciones que se citan en 4.2.1.

24(a).3. Reactivos.

24(a).3.1. Disoluciones alcohólicas de hidróxido potásico con concentraciones aproximadas 2 N, 1 N y 0,1 N. La cantidad necesaria de hidróxido potásico se disuelve en la menor cantidad posible de agua destilada y se diluye con alcohol etílico de 96°, exento de aldehídos hasta el volumen elegido. La pesada de potasa se hará teniendo en cuenta que 1.000 ml de disolución normal requieren 70 g de producto comercial de la calidad indicada.

24(a).3.2. Eter de petróleo.

24(a).3.3. Alcohol etílico exento de aldehídos.

24(a).3.4. Gel de sílice G «Merck».

24(a).3.5. Rodamina 6G al 0,001 por 100 en etanol del 90 por 100. Se puede emplear cualquier otro colorante que no reaccione con los esterole, como, por ejemplo, diclorofluoresceína.

24(a).3.6. Cloroformo.

24(a).3.7. Colesterol purísimo en disolución al 10 por 100 en cloroformo.

24(a).3.8. Chromosorb-G 80/100 mallas, pudiendo también emplearse Chromosorb-P o W, de la misma finura de grano (ver 5.2).

24(a).3.9. Sílica OV-17 o SE-52.

24(a).3.10. Cloruro de metileno Q. P.

24(a).3.11. Eter etílico.

24(a).3.12. Colesterol, patrón cromatográfico, disolución al 2 por 100 en cloroformo.

24(a).4. Procedimiento.

24(a).4.1. Aislamiento de los esterole:

Preparación de las cromatoplasmas.—Pesar la cantidad necesaria de gel de sílice 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 g de gel de sílice y 60 ml de agua son suficientes para la preparación de dos placas de 20 por 5 cm y cuatro placas de 20 por 20 cm. Pasar la pasta al aplicador y extenderla sobre las

placas con un espesor de 0,25 mm. Dejar las placas al aire hasta observar que la superficie esté seca, y a continuación mantener en estufa de 105-110° C durante dos horas. Guardar en desecador.

Preparación de los esteroides.—En un matraz, provisto de un refrigerante de reflujo, se pesan, con exactitud del miligramo, 5 g del cuerpo graso que se ha de ensayar y se añaden 50 ml de disolución alcohólica de potasa 2N, hirviendo durante una hora. Añadir, por la parte superior del refrigerante 50 ml de agua destilada y agitar. Dejar enfriar y trasvasar el contenido del matraz a una ampolla de extracción enjuagando el matraz con éter de petróleo, operando varias veces con 50 ml en total y se trasvasa a la ampolla de extracción. Agitar enérgicamente durante un minuto para asegurar un contacto íntimo entre el éter de petróleo y la disolución jabonosa. Dejar reposar y, cuando las dos fases están completamente separadas, trasvasar la disolución jabonosa a una segunda ampolla de extracción. Tratar de nuevo con 50 ml de éter de petróleo, decantar y hacer un tercer tratamiento de la disolución jabonosa con otros 50 ml de éter de petróleo. Las emulsiones que excepcionalmente se presentan, se destruyen añadiendo pequeñas cantidades de alcohol o de lejía de potasa concentrada. Las tres porciones de éter de petróleo se reúnen en una misma ampolla, se las lava, tres veces seguidas, con porciones de 50 ml de alcohol etílico al 50 por 100 (en volumen). Se trasvasa la disolución de éter de petróleo a un pequeño matraz, se elimina el disolvente por destilación y se deseca 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 5.3). Depositar 16 gotas de 3-4 μ l conteniendo aproximadamente 300-400 μ g en una placa de 20 x 20 cm, a distancias de 1 cm. Dejar una distancia de 2 cm a partir del borde interior y, como mínimo, 2,5 cm a partir de los bordes laterales. Depositar como referencia una cantidad aproximada de 35 μ g de colesterol disuelto en unas diez veces su peso de cloroformo, a una distancia de 1 cm de los extremos laterales.

Introducir en la cubeta el líquido de desarrollo necesario, bien sea cloroformo o mezcla hexano-éter, hasta una altura de 1 cm; 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 [24(a).3.5] y examinar el cromatograma bajo una lámpara de Wood.

Localizar la posición de los esteroides por medio del colesterol de referencia y marcar esta mancha con una aguja. Rascar la sílice 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 sílice 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 cloroformo, siendo esta disolución la que se inyecta en el cromatógrafo.

24(a).4.2. Cromatografía gaseosa de los esteroides:

Preparación del relleno de la columna: Pesar 500 mg de sílica en un matraz de fondo redondo de 250 ml, añadiendo 75 mililitros de cloruro de metileno y dejando en reposo el tiempo necesario hasta conseguir la disolución de la goma. Añadir 10 g del soporte, convenientemente preparado [ver 24(a).5.2], 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 cuando en cuando.

Disponer un embudo de 12 cm \varnothing , con un filtro de 24 cm \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. Pasar rápidamente el residuo que queda en el filtro a una cápsula 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.

Análisis cromatográfico:

Las condiciones de trabajo dependerán del aparato utilizado, columna, etc. Sin embargo, puede considerarse que la operación marcha satisfactoriamente si se registra para el colesterol un pico simétrico, sin la aparición de «colas» y la resolución del estigmasterol-camosterol no es inferior a 0,8 [ver 24(a).5.4].

Normalmente, el máximo del pico del colesterol se suele re-

gistrar, aproximadamente, a los 20 minutos de la inyección, pero pueden producirse retrasos mayores sin que afecte a la eficacia de la operación.

A título de orientación, se indican las condiciones de trabajo alrededor de las cuales se suelen encontrar los valores óptimos en la mayoría de los equipos utilizados en los laboratorios, debiendo ser modificados, en cada caso, hasta encontrar una respuesta satisfactoria.

Temperatura de la columna: 240° C.

Temperatura del inyector: 290° C.

Temperatura del detector: 280° C.

Flujo de gas portador (nitrógeno, 30 ml/minuto).

Inyección de la muestra.—Se inyecta, aproximadamente, 0,5 μ l de la disolución de esteroides en cloroformo, debiendo contener esta disolución de 10 a 20 μ g 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.

24(a).5. Observaciones.

24(a).5.1. La utilización de la fase fija OV-17 que se recomienda no es, desde luego, esencial en la aplicación de la metodología, pudiendo ser empleadas otras fases de las muchas que se encuentran actualmente disponibles en el comercio, como son, por ejemplo, SE-30, SE-52, etc., e incluso otras que puedan aparecer en el futuro y que se comporten más eficazmente en el problema. Del mismo modo, el soporte no tendrá, necesariamente, que ser el que se indica, pudiendo elegirse cualquier otro que tenga un comportamiento satisfactorio.

Lo fundamental es que los resultados satisfagan el mínimo de eficacia que se establece en 24(a).4.2.

24(a).5.2. 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; este último se realiza con dimetildiclorosilano y con hexametildisilazano.

Un Chromosorb no tratado de esta forma debe ser sometido, antes de su utilización, a estos tratamientos.

24(a).5.3. Si no se dispone de cloroformo de calidad adecuada puede sustituirse por una mezcla de 2 vol de hexano y 1 vol de éter etílico, que se utilizará también como líquido de desarrollo.

24(a).5.4. La resolución se calcula por la fórmula usual:

$$R_s = \frac{2(d_2 - d_1)}{b_2 + b_1}$$

siendo d_2 y d_1 = distancias, en el registro, del máximo de los picos al frente de salida del disolvente.

b_2 y b_1 = bases de los picos.

24(a).6. Referencias.

1. Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española. 55.019.

24(b). DETERMINACION CUANTITATIVA DE ESTEROLES

24(b).1. Principio.

Los esteroides se determinan gravimétricamente, precipitándolos como digitónidos insolubles a partir de una solución alcohólica de la grasa saponificada, para liberar los esteroides combinados.

24(b).2. Material y aparatos.

24(b).2. (1, 2 y 3). Como 24(a).2 (1, 2 y 3).

24(b).2.4. Crisol de placa filtrante, G4.

24(b).3. Reactivos.

24(b).3.1. Disolución acuosa de hidróxido potásico, aproximadamente, al 40 por 100, p/v.

24(b).3.2. Disolución digitonina al 1 por 100, p/v. en etanol de 95 por 100 v/v.

24(b).3.3. Etanol de 95 por 100, v/v.

24(b).4. Procedimiento.

Si «s» es el tanto por ciento, p/p, previsible de esteroides en la muestra, pesar exactamente, con aproximación de 0,1 por 100, 5/s g, aproximadamente, de grasa.

Agregar 3/s ml de disolución acuosa de hidróxido potásico, y después 7/s ml de etanol de 95 por 100 v/v. Adaptar el refrigerante de reflujo, y calentar a ebullición suave, sobre baño de agua hirviendo, agitando de vez en cuando, hasta saponificación completa (líquido homogéneo). Continuar calentando de 15 a 20

minutos. Agregar 60 ml de agua destilada y, aproximadamente, 180 ml de etanol de 95 por 100 v/v. Calentar y mantener a, aproximadamente, 50° C.

Agregar de 25 a 30 ml de disolución etanólica de digitonina. Dejar enfriar y reposar durante algunas horas (preferiblemente durante una noche). Filtrar la masa cristalina a través de un crisol de placa filtrante G4, con vacío, y previamente tarado con una precisión de 1 mg. Lavar con agua destilada, después con etanol de 95 por 100 v/v, y por último con algunos ml de éter etílico. Secar en estufa a 103° C ($\pm 2^\circ$ C) y pesar a peso constante.

24(b).5. Cálculo.

$$\text{Esteroles \%} = \frac{25 P}{P'}$$

P' = peso en g de la muestra.

P = peso en g del precipitado de digitonidos.

24(b).6. Referencias.

1. International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Soaps. 1964. II. D. 6.
2. Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española 55.055.

25. IMPUREZAS

25.1. Principio.

Se entiende por impurezas de una grasa el conjunto de sustancias insolubles en un disolvente volátil en las condiciones descritas, y que no hayan sido ya determinadas como «agua y materias volátiles».

Del peso total obtenido de impurezas habrá que deducir, eventualmente, el peso de algunas de ellas, que, según el convenio entre las partes o según la costumbre, no deban ser consideradas como tales.

Los jabones de cal se considerarán como impurezas, a menos que por acuerdo entre las partes se decida otra cosa. En este último caso no será considerado como impureza más que la cal que contenga, expresada en óxido de calcio.

Salvo indicaciones contrarias, los jabones alcalinos no serán considerados como impurezas más que por las bases que contengan, expresadas en óxidos.

25.2. Reactivos.

Para la determinación se podrá usar cualquiera de los disolventes citados posteriormente, condicionando su empleo a la naturaleza de la materia grasa tratada, y a la de las sustancias que deban ser consideradas como impurezas en relación con el destino o aplicación que deba darse a la grasa. Dicha elección podrá ser impuesta por razones o convenio entre las partes.

Las impurezas de las materias grasas comestibles y de las materias grasas brutas con destino comestible después de tratamiento adecuado se determinarán con éter de petróleo.

25.2.1. Eter de petróleo puro para análisis. En las condiciones del procedimiento descrito, el éter de petróleo deja insolubles: impurezas mecánicas (tierra, arena y residuos diversos); parte de ácidos oxidados libres y sus productos de polimerización, lactonas-jabones de cal, hidratos de carbono, materias nitrogenadas, determinadas resinas, materias minerales, y no disuelve más que parcialmente los jabones alcalinos.

25.2.2. Eter técnico (C_2H_5)₂O, puro para análisis. En las condiciones del procedimiento descrito, el éter etílico deja insolubles: Las impurezas mecánicas (tierra, arena y residuos diversos), materias minerales, hidratos de carbono, materias nitrogenadas, ciertas resinas, jabones de cal y jabones alcalinos.

25.2.3. Sulfuro de carbono, S₂C, puro para análisis recién destilado. En las condiciones del procedimiento descrito, el sulfuro de carbono deja insolubles: impurezas mecánicas (tierra, arena y residuos diversos), materias minerales, hidratos de carbono, materias nitrogenadas, ciertas resinas y jabones de cal. No disuelve más que parcialmente los jabones alcalinos.

25.3. Procedimiento.

Pesar exactamente, con una aproximación de 0,01 g. aproximadamente 20 g de materia grasa en un erlenmeyer, con tapón de vidrio esmerilado (la grasa solamente fundida, si es necesario) agregar 200 ml del disolvente elegido, tapar, agitar y dejar en reposo a, aproximadamente, 20° C durante 30 minutos, si se trata de éter etílico o éter de petróleo, y 12 horas si se trata de sulfuro de carbono.

Filtrar sobre filtro sin cenizas, de 12 cm de diámetro, previamente secado y tarado, lavar el filtro con pequeñas porciones de disolvente, utilizando la cantidad estrictamente necesaria

para que el filtrado esté exento de materia grasa, retirar el filtro del embudo, dejar evaporar el disolvente al aire libre, y terminar la evaporación en estufa a -103° C ($\pm 2^\circ$ C). Pesar el filtro.

25.4. Cálculo.

$$\text{Impurezas \%} = \frac{100 (P' - P'')}{P}$$

P'' = peso en g del filtro seco.

P' = peso en g del filtro más impurezas.

P = peso en g de la muestra.

Indicar el disolvente utilizado y, eventualmente, los componentes que han sido deducidos de las impurezas.

25.5. Observaciones.

25.5.1. Si el filtrado contiene cenizas, eliminar el disolvente por destilación, incinerar el residuo, pesar y agregar esta pesada a las impurezas del filtro.

25.5.2. Para una determinación de gran exactitud deberá emplearse una cantidad de disolvente cincuenta veces superior al peso de grasa tomada.

25.5.3. En el caso de una materia grasa que contenga jabones, y en el caso de que estos jabones no deban ser considerados como impurezas, más que por las bases que contengan, separar el residuo insoluble del filtro y tratarlo a ebullición con refrigerante de reflujo, con ácido clorhídrico diluido (1 : 5), hasta que los jabones se hayan descompuesto totalmente. Extraer la materia grasa así liberada en una ampolla de decantación por medio del disolvente utilizado para la determinación de las impurezas. Después de pequeños lavados con agua, destinados a eliminar la acidez mineral, filtración y eliminación del disolvente, pesar los ácidos grasos, y deducir de las impurezas el tanto por ciento así obtenido.

25.6. Referencias.

1. International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Soaps. 1964. II. C. 2.
2. Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española 55.002.

26. CENIZAS

26.1. Principio.

Las cenizas representan el residuo mineral de las materias grasas, previamente filtradas.

Su tanto por ciento no debe añadirse al de las impurezas insolubles en un disolvente, para evitar que ciertos elementos sean considerados dos veces. Ahora bien, como continuación a la dosificación de las impurezas, se puede llegar a dosificar las cenizas sobre la materia grasa purificada después de la expulsión del disolvente. En tal caso, el tanto por ciento de cenizas se añade al de impurezas.

(Continuará.)

MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES

16203

CORRECCION de errores de la Resolución de la Secretaría General Técnica sobre la aplicación del artículo 32 del Decreto 801/1972 relativo a la ordenación de la actividad de la Administración de España en materia de Tratados Internacionales, publicada en el «Boletín Oficial del Estado» de 4 de junio de 1977.

Convenio sobre reconocimiento y ejecución de las decisiones en materia de obligaciones alimenticias hacia los niños. La Haya, 15 de abril de 1958:

Dice: «La Haya, 14 de abril de 1958», debe decir: «La Haya, 15 de abril de 1958».

Convenio para facilitar el tráfico marítimo internacional. Londres, 9 de abril de 1965:

Falta «Boletín Oficial del Estado» de 26 de septiembre de 1973.

Acuerdo europeo referente al transporte internacional de mercancías peligrosas por carretera (ADR). Ginebra, 30 de septiembre de 1957: