grado de probabilidad la presencia del CV. En caso de duda, deberá verificarse la totalidad del espectro de masa.

1.5.3 Repetibilidad: La diferencia entre los resultados de dos determinaciones 1.4.4 paralelas, efectuadas de forma simultánea o en rápida sucesión sobre la misma muestra por el mismo analista y en las mismas condiciones, no deberá superar los 0,003 miligramos de CV por kilogramo de producto alimentario.

1.6 *Referencias.*-Directiva de la Comisión de 29 de abril de 1981 (81/432/CEE). «Diario Oficial de las Comunidades Europeas» número L 167/6, de 24 de junio de 1981.

3419 *ORDEN de 31 de enero de 1989 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de aceites y grasas (ácido erúcico).*

Por Ordenes de 31 de enero de 1977 («Boletín Oficial del Estado» de los días 17 a 27 de julio); 31 de julio de 1979 («Boletín Oficial del Estado» de los días 29 a 30 de agosto); 17 de septiembre de 1981 («Boletín Oficial del Estado» de 14 de octubre); 1 de diciembre de 1981 («Boletín Oficial del Estado» de 20 de enero de 1982), y 9 de octubre de 1985 («Boletín Oficial del Estado» de 15 de noviembre), se establecieron diversos métodos oficiales de análisis de aceites y grasas.

La situación motivada por nuestra entrada en la Comunidad Económica Europea hace necesario armonizar nuestra legislación con la correspondiente comunitaria, especialmente con lo dispuesto en la Directiva de la Comisión 80/891/CEE, de 25 de julio («Diario Oficial de las Comunidades Europeas» número L 254, de 27 de septiembre), relativa al método de análisis comunitario para la determinación del contenido en ácido erúcico en los aceites y grasas destinados como tales a la alimentación humana, y en los productos alimenticios que contengan aceites o grasas añadidos. Esta uniformidad de criterios bastaría por sí sola para conferir el carácter de básica a la presente norma.

Al mismo tiempo la presente Orden pretende dar cumplimiento a las exigencias requeridas por el Tribunal Constitucional en el sentido de qué normas y qué preceptos concretos de las mismas reúnen aquellas características que las confieran el carácter de normas básicas.

En este sentido, «la determinación, con carácter general, de los requisitos sanitarios de las reglamentaciones técnico-sanitarias de los alimentos, servicios o productos, directa o indirectamente relacionados con el uso y consumo humanos» corresponde a la Administración del Estado, en virtud de lo dispuesto en el artículo 40.2 de la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad («Boletín Oficial del Estado» del 29).

Por su parte, el artículo 4.1.g) de la Ley 26/1984, de 19 de julio, General para la Defensa de los Consumidores y Usuarios («Boletín Oficial del Estado» del 24), establece como parte integrante de aquellas reglamentaciones técnico-sanitarias, entre otros extremos, «los métodos oficiales de análisis, toma de muestras, control de calidad e inspección», de los productos citados. Y el artículo 39.1 de la misma Ley establece, entre otras cosas, que «corresponderá a la Administración del Estado elaborar y aprobar ... las reglamentaciones técnico-sanitarias ...».

De estos preceptos, tomados conjuntamente, parece deducirse un apoyo legal suficiente para que el Estado regule los métodos oficiales de análisis otorgándoles el carácter de norma básica.

No obstante y, con independencia de los citados preceptos con rango de ley formal, el conjunto de la jurisprudencia sentada por el propio Tribunal Constitucional relativa, entre otros extremos, a los principios de «unidad de mercado», «a las condiciones básicas que garanticen la igualdad de todos los españoles», y, en particular, en su «derecho a la salud», o a la «libre circulación de bienes en todo el territorio español», se considera que constituye un apoyo legal aún más firme, si se piensa que la sanción de unos métodos únicos y uniformes, que sirvan de pauta aplicable al análisis de los productos alimenticios y a los indirectamente relacionados con ellos por parte de todas las Administraciones Públicas, en todo el territorio nacional y que, al mismo tiempo, permita homologar los resultados obtenidos con el resto de los países comunitarios, debe reservarse al Estado como competencia exclusiva.

En su virtud, a propuesta de los Ministros de Economía y Hacienda, de Industria y Energía, de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo, previo informe preceptivo de la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria y oídos los representantes de los sectores afectados,

Este Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno dispone:

Artículo 1.° Se aprueba el método oficial de análisis de aceites y grasas (ácido erúcico) que se cita en el anejo a la presente Orden.

Art. 2.° Cuando no existan métodos oficiales para determinados análisis y hasta tanto los mismos sean aprobados por el órgano competente y previamente informados favorablemente por la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria, podrán ser utilizados los aprobados por los Organismos nacionales o internacionales de reconocida solvencia.

DISPOSICION ADICIONAL

Lo dispuesto en la presente Orden por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de aceites y grasas (ácido erúcico), se considera norma básica en virtud de lo establecido en el artículo 149.1.1.ª y 16 de la Constitución Española.

DISPOSICION DEROGATORIA

Quedan derogadas cuantas disposiciones de igual o inferior rango se opongan a lo establecido en la presente Orden.

Madrid, 31 de enero de 1989.

ZAPATERO GOMEZ

Excmos. Sres. Ministros de Economía y Hacienda, de Industria y Energía, de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidd y Consumo.

ANEJO

59. Acido erúcico

59.1 *Principio.*-Separación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por cromatografía en la capa fina con nitrato de plata y determinación cuantitativa de los ésteres así separados por cromatografía en fase gaseosa.

Este método permite determinar el contenido en ácido erúcico de:

a) Los aceites y grasas que contengan ácido cetoleico (isómero cis del ácido docosenoico, que se encuentra en los aceites de pescado).

b) Los aceites y grasas hidrogenadas que contengan isómeros cis y trans del ácido docosenoico.

59.2 *Material y aparatos:*

59.2.1 Balanza analítica con una precisión de 0,1 miligramos.

59.2.2 Equipo de cromatografía en capa fina que incluya:

59.2.2.1 Cubetas de desarrollo.

59.2.2.2 Placas de vidrio de 20 × 20 centímetros.

59.2.2.3 Aplicador para depositar las soluciones en forma de banda estrecha o de línea sobre placas TLC.

59.2.3 Unidad de congelación capaz de mantener la cubeta de desarrollo y su contenido a una temperatura entre −20 °C y −25 °C.

59.2.4 Lámpara de rayos U.V.

59.2.5 Columnas de vidrio de 200 milímetros de largo y 10 milímetros de diámetro interno, provistas de filtros de lana de vidrio o vidrio calcinado, o bien pequeños embudos provistos de filtros de vidrio calcinado.

59.2.6 Aparato de cromatografía de gases acoplado a un integrador electrónico, tal como se describe en el punto 2 del apartado A.

59.3 *Reactivos:*

59.3.1 Agua destilada o desmineralizada de pureza equivalente.

59.3.2 Eter etílico recién destilado exento de peróxidos.

59.3.3 n-Hexano, reactivo para análisis.

59.3.4 Gel de sílice G para cromatografía en capa fina.

59.3.5 Gel de sílice para cromatografía en columna.

59.3.6 Solución de nitrato de plata de 200 g/l. Disolver 24 gramos de nitrato de plata en agua y llevar el volumen a 120 mililitros con agua.

59.3.7 Solución de erucato de metilo de 5 mg/ml. Disolver 50 miligramos de erucato de metilo de algunos mililitros de n-Hexano y llevar el volumen a 10 mililitros con n-Hexano.

59.3.8 Solución patrón interno de tetracosaonato de metilo de 0,25 miligramos/mililitros. Disolver 25 miligramos de tetracosaonato de metilo en algunos mililitros de n-Hexano y llevar a 100 mililitros con n-Hexano.

59.3.9 Líquido de desarrollo: Tolueno y n-Hexano 9:1 (v/v).

59.3.10 Solución de 2,7-diclorofluoresceno de 0,5 g/litro. Disolver calentando y agitando 50 miligramos de 2,7-diclorofluoresceno en 100 mililitros de una solución metanol-agua 1:1 (v/v).

59.4 *Procedimiento:*

59.4.1 Preparación de la muestra. La muestra deberá ser homogeneizada antes del análisis. La muestra así preparada deberá conservarse siempre en un recipiente hermético.

59.4.2 Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Tomar una muestra de unos 400 miligramos de la grasa o aceite y preparar una solución que contenga entre 20 y 50 miligramos/mililitro de ésteres metílicos en n-Hexano, siguiendo el método expuesto en el apartado B.

59.4.3 Cromatografía en capa fina:

59.4.3.1 Preparación de las placas: Colocar 60 gramos de gel de sílice (59.3.4) en un matraz de fondo redondo de 50 mililitros de capacidad. Añadir 120 mililitros de solución de nitrato de plata (59.3.6) y agitar durante un minuto para obtener una pasta homogénea. Extender ésta de la manera habitual sobre las placas y ajustar el espesor de la capa a 0,5 milímetros. Dicha cantidad de pasta será suficiente para la preparación de cinco placas de 20 x 20 centímetros. Secar parcialmente las placas al aire en la oscuridad durante treinta minutos y a continuación secarlas completamente y activarlas en un horno a 100 °C durante dos horas treinta minutos.

Las placas deberán utilizarse en cuanto sea posible tras la fase de activación, o bien guardarse cuidadosamente al abrigo de la luz y reactivándolas antes de volverlas a utilizar. Antes de hacer uso de ellas, trazar surcos a través del subtrato a 10 milímetros de los lados y de la parte superior de cada placa, a fin de disminuir los efectos marginales durante el desarrollo (ver nota 2).

59.4.3.2 Aplicación de los ésteres metílicos. Con ayuda del aplicador (59.2.2.3) depositar 50 µl de la solución de ésteres metílicos preparada a partir de la muestra, sobre una fina línea de unos 50 milímetros de largo, a 40 milímetros como mínimo de los lados y a 10 milímetros de la parte inferior de la placa. Aplicar de la misma manera 100 µl de una solución que contenga volúmenes iguales de la solución de ésteres metílicos y de la solución de erucato de metilo (59.3.7). Tras la aplicación de los ésteres metílicos (ver nota 3), colocar la placa en una cubeta con éter dietílico hasta que suba el frente de desarrollo a unos 5 milímetros por encima de la zona de aplicación. Dicha operación concentrará los ésteres metílicos en una banda estrecha.

59.4.3.3 Desarrollo de las placas. Colocar la cubeta conteniendo el líquido (59.3.9) en la unidad de congelación (59.2.3) que se halla a −25 °C aproximadamente (podrá resultar útil proteger la cubeta de la luz con algún tipo de revestimiento). Transcurridas dos horas, colocar la placa en la cubeta con precaución y dejar subir el disolvente hasta que alcance una zona situada entre la mitad y los dos tercios de la altura de la placa. Retirar ésta y evaporar lentamente el disolvente con ayuda de una corriente de nitrógeno. Volver a colocar la placa en la cubeta y dejar que el disolvente alcance la parte superior de la placa. Retirar ésta y secarla de nuevo con la corriente de nitrógeno, revelándola a continuación con la solución de 2,7-diclorofluoresceína (59.3.10) y examinar a la luz U.V. Se podrá localizar la banda de erucato de metilo presente en la muestra por referencia a la banda más intensa de la muestra a la cual se ha añadido el erucato de metilo (ver figura).

59.4.3.4 Separación de las fracciones de ésteres metílicos. Raspar cuantitativamente la banda de erucato de metilo procedente de la muestra y pasarla a un recipiente de 59 mililitros de capacidad (ver nota 7 y figura). Raspar cuantitativamente las bandas que se encuentran por encima y la que se encuentra inmediatamente por debajo de la banda de erucato de metilo y que contienen las demás fracciones de ésteres metílicos de ácidos grasos y pasarlas a otro recipiente de 50 mililitros. En cada uno de los dos recipientes verter 1,0 mililitros de la solución patrón de tetracasaonato de metilo (59.3.8) y 10 mililitros de éter dietílico (59.3.2). Agitar y transferir separadamente el contenido de los recipientes a las correspondientes columnas o embudos (59.2.5), que contendrán aproximadamente 1 gramo de gel de sílice (59.3.5). A continuación extraer 3 ó 4 veces los ésteres con ayuda de 10 mililitros de éter dietílico. Recoger el producto eluido o filtrado si es con embudo, en pequeños matraces. Tras haber evaporado una parte del disolvente con corriente de nitrógeno, transferir los ésteres metílicos a matraces en forma de corazón. Evaporar el resto del disolvente con corriente de nitrógeno, de manera que los ésteres metílicos se concentren en el fondo. Disolver los ésteres metílicos en 25 a 50 µl de n-Hexano (59.3.3).

59.4.4 Cromatografía gas-líquido:

59.4.4.1 Seguir la metódica descrita en el apartado I e inyectar de 1 a 2 µl de las soluciones de ésteres metílicos obtenidos a partir de: a) La fracción que contiene el erucato de metilo, y b) las fracciones que contienen el resto de los ésteres metílicos.

59.4.4.2 Las áreas de los picos suministrados al integrador electrónico son las siguientes:

a) A partir del cromatograma de la fracción que contiene el erucato de metilo:

1) Erucato de metilo (E).
2) Patrón interno (L_1).
3) Areas totales de los picos de los ésteres metílicos, exceptuando el patrón interno (EF).

b) A partir del cromatograma de la fracción que contiene el resto de los ésteres metílicos:

1) Areas totales de los picos, exceptuando el patrón interno (RF).
2) Patrón interno (L_2).

59.5 *Expresión de resultados:*

59.5.1 Fórmula y método de cálculo:

59.5.1.1 El contenido en ácido erúcico de la muestra, expresado en porcentaje de éster metílico de los ésteres metílicos totales, viene dado por la fórmula siguiente:

$$\frac{E}{L_1\left(\frac{EF}{L_1}+\frac{RF}{L_2}\right)}\times 100$$

en donde E, EF, RF, L_1 y L_2 son las áreas de los picos definidos en (59.4.4.2), corregidas, si fuera necesario, por factores de calibración. El contenido de erucato de metilo obtenido mediante esta fórmula es equivalente al contenido de ácido erúcico expresado en porcentaje del contenido total en ácidos grasos.

59.5.1.2 Si el área de los picos está expresada en tanto por ciento, calcular como sigue los valores EF y RF:

$EF = 100 - L_1$.
$RF = 100 - L_2$.

59.5.1.3 El modo de cálculo (59.5.1.1) supone que el contenido de ácido tetracosanoico de la muestra es despreciable; cuando esto no sea así, el valor del contenido del ácido tetracosanoico (L_2) obtenido del cromatograma de las fracciones que contienen los otros ésteres metílicos, se puede reducir a:

$$L_2 - T_2 \text{ ó } T_2 = \frac{T_o P_2}{P_o}$$

en donde:

T_2: Area del pico del éster metílico del ácido tetracosanoico proveniente de la muestra, que constituye una parte de la superficie del pico atribuido al patrón interno del cromatograma de la fracción restante de ésteres metílicos.

P_2: Area del pico del éster metílico del ácido palmítico obtenido del cromatograma de la fracción restante.

T_o: Area del pico del éster metílico del ácido tetracosanoico obtenido del cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales, determinados según el método descrito en el apartado A.

P_o: Area del pico del éster metílico del ácido palmítico obtenido del cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales, determinada según el método descrito en el apartado A.

59.5.1.4 Origen de la fórmula: El contenido en ácido graso de la fracción que contenga el erucato de metilo, expresado en porcentaje del contenido total de ácidos grasos en la muestra, vendrá dada por:

$$\frac{\frac{EF}{L_1}}{\frac{EF}{L_1}+\frac{RF}{L_2}}\times 100 \quad \text{ó} \quad \frac{E}{L_1\left(\frac{EF}{L_1}+\frac{RF}{L_2}\right)}\times 100$$

El contenido en ácido erúcico de la fracción que contenga el erucato de metilo vendrá dada por:

$$\frac{E}{EF}$$

De donde resulta que el contenido en ácido erúcico de la muestra, expresado en porcentaje del contenido total de ácidos grasos, vendrá dado por:

$$\frac{EF}{L_1\left(\frac{EF}{L_1}+\frac{RF}{L_2}\right)}\times\frac{E}{EF}\times 100 \text{ ó } \frac{E}{L_1\left(\frac{EF}{L_1}+\frac{RF}{L_2}\right)}\times 100$$

59.5.1.5 Repetibilidad: La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas simultáneamente en las mismas condiciones por el mismo analista sobre la misma muestra no deberá superar, en valor relativo, el 10 por 100 del resultado obtenido y, en valor absoluto, 0,5 gramos por 100 gramos de muestra tomando el valor más elevado (ver notas 4, 5 y 6).

Notas:

1. El peso de la muestra presentada al laboratorio para su análisis deberá ser normalmente de 50 gramos, a menos que sea necesaria una cantidad mayor.
2. La activación a 110°C durante una hora podrá resultar satisfactoria a condición de que las placas no estén ennegrecidas.

3. Si se deseara podrán aplicarse sobre la placa 50 µl de solución de erucato de metilo, a fin de ayudar a su identificación tras el desarrollo (ver figura).

4. Resultados. El resultado, que se indicará en el informe del analista, será el valor medio obtenido, como mínimo, a partir de dos determinaciones cuya repetibilidad sea satisfactoria.

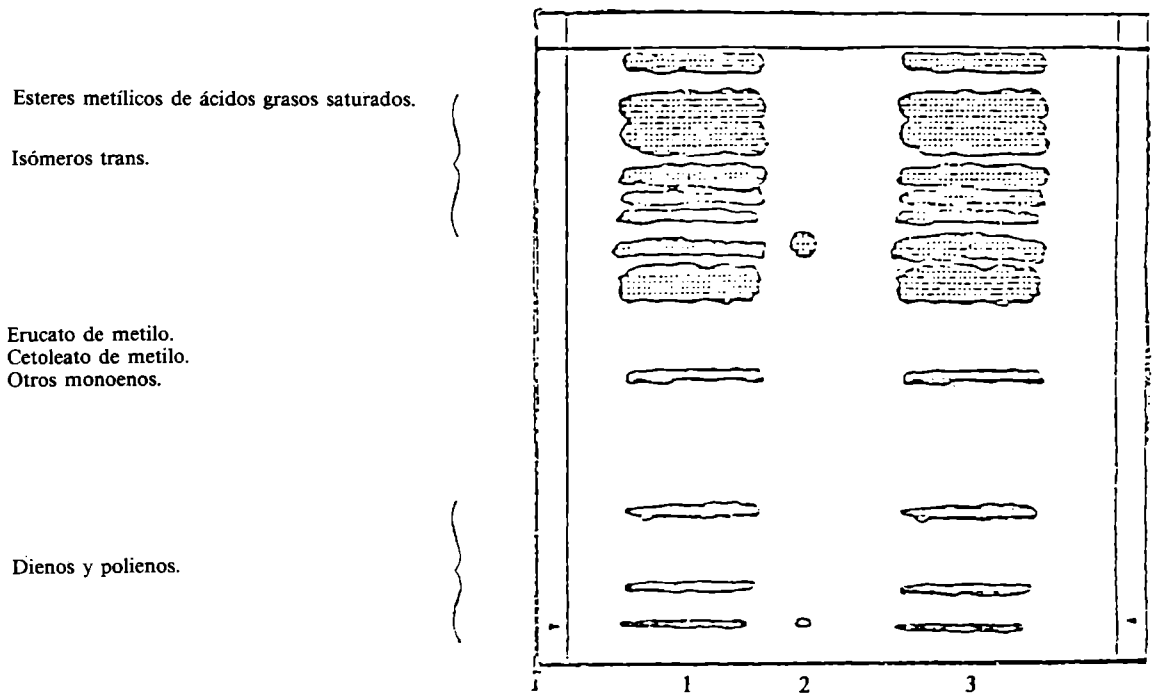
5. Cálculo del porcentaje. Salvo disposición especial, los resultados se expresarán en porcentaje (m/m) de los ácidos grasos totales en la muestra en el estado en que ésta hubiese llegado al laboratorio.

6. Número de cifras significativas. El resultado no deberá incluir más cifras significativas de las que permita la precisión del método.

7. La fracción indicada como erucato de metilo contendrá normalmente ésteres metílicos de otros ácidos monoenoicos, pero deberá estar exenta de cetoleato de metilo.

FIGURA

Típico ejemplo de cromatograma sobre capa delgada que muestra la separación de los ésteres metílicos del ácido erúcico, del ácido cetoleico y de los isómeros trans del ácido docosenoico



1. Muestra.
2. Erucato de metilo.
3. Muestra + erucato de metilo.

Apartado A

CROMATOGRAFÍA EN FASE GASEOSA DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS

1. *Préambulo.*–El presente apartado tiene por objeto dar las líneas directrices básicas para la determinación por cromatografía en fase gaseosa de la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenida según el apartado B. Los ácidos grasos polimerizados no son analizables por este método.

Las indicaciones aportadas se refieren a los equipos normales de cromatografía en fase gaseosa con columna de relleno y detector de ionización de llama (nota 1).

2. *Material:*

2.1 Aparato de cromatografía en fase gaseosa: Cualquier equipo que permita alcanzar el grado de eficacia y la resolución tal como se definen en el punto 4.2.1 es válido.

2.1.1 Dispositivo de inyección: El dispositivo de inyección deberá tener el volumen muerto más pequeño posible. Salvo imposibilidad material, se le llevará a una temperatura superior en 25 a 50 °C a la de la columna.

2.1.2 Horno: El horno deberá ser capaz de llevar las columnas a una temperatura de al menos 220 °C y de mantener la temperatura escogida con precisión de 1 °C.

En caso de utilización de temperaturas programadas, se aconseja escoger un aparato de doble columna.

2.1.3 Columna:

2.1.3.1 Tubo:

Tubo de material inerte respecto a las materias que deban analizarse: Cristal o, en su defecto, acero inoxidable (nota 2).

Longitud: De 1 a 3 metros. Se utilizará una columna relativamente corta en los casos en que estén presentes los ácidos grasos de cadena larga ($>C_{20}$).

En los casos de determinación de los ácidos en C_4 y C_6, se recomienda utilizar una columna de 2 metros.

Diámetro interior: De 2 a 4 milímetros.

2.1.3.2 Relleno:

Soporte: Tierra de diatomeas lavada con ácido y silanizada, o cualquier otro soporte inerte que sea conveniente, con un estrecho intervalo de granulometría (25 µm entre 125 y 200 µm), estando ligado el valor medio al diámetro interior y a la longitud de la columna.

Fase estacionaria: Fase polar de tipo poliéster (por ejemplo polisuccinato de dietilenoglicol, polisuccinato de butanediol, poliadipato de etilenoglicol, etc.) o cualquier otra fase que responda a las exigencias citadas a continuación (por ejemplo, cianosiliconas, etc.). El coeficiente de impregnación estará comprendido entre el 5 y el 20 por 100, para determinadas separaciones podrán utilizarse fases apolares.

2.1.3.3 Acondicionamiento: Después de haber desconectado, si fuera posible, la columna del detector, poner el horno del aparato a 10 °C por encima de la temperatura de trabajo y mantener la columna que acabe de ser preparada bajo una corriente de gas inerte de 20 a 60 mililitros/minuto durante al menos dieciséis horas a dicha temperatura y después durante dos horas a 195 °C.

2.1.4 Detector: El detector deberá, preferentemente, ser adecuado para llegar a una temperatura superior a la de la columna.

Los detalles operatorios dados a continuación se refieren al empleo de un detector de ionización de llama (nota 1).

2.2 Jeringa: Jeringa de 10 µl como máximo, dividida en décimas de µl.

2.3 Aparato registrador: Cuando se utilice la curva registrada para calcular la composición de la mezcla analizada, el aparato registrador deberá ser un aparato electrónico de gran precisión compatible con el equipo utilizado:

Velocidad de respuesta inferior a 1,5 segundos, preferentemente a 1 segundo (la velocidad de respuesta es el tiempo necesario para que la

pluma del aparato registrador vaya del 0 al 90 por 100 al producirse la introducción momentánea de una señal del 100 por 100.

Anchura del papel: 25 centímetros como mínimo.

Velocidad del papel: 25 a 150 centímetros/hora.

2.4 Integrador o calculador (opcional): El empleo de un integrador electrónico o de un calculador permite un cálculo rápido y preciso. Este cálculo deberá suministrar una respuesta lineal, tener una sensibilidad suficiente y la corrección de la desviación de la línea de base deberá ser satisfactoria.

3. *Reactivos:*

Gas portador: Gas inerte (nitrógeno, helio, argón, etc.) muy bien desecado y conteniendo menos de 10 ppm de oxígeno.

Gases auxiliares: Hidrógeno al 99,9 por 100 como mínimo que no contenga productos orgánicos, aire y oxígeno que no contenga productos orgánicos.

Productos patrón: Mezcla de ésteres metílicos o ésteres metílicos de un aceite de composición conocida, a ser posible parecida a la de los cuerpos grasos que deban analizarse.

4. *Método operatorio:*

4.1 Reglaje del aparato:

4.1.1 Determinación de las condiciones óptimas de trabajo: Para escoger las condiciones de trabajo, deberán tenerse en cuenta las siguientes variables:

Longitud y diámetro de la columna.
Naturaleza y cantidad de la fase estacionaria.
Temperatura de la columna.
Caudal del gas portador.
Resolución deseada.
Concentración de la muestra.
Duración del análisis.

La importancia de la cantidad de muestra será escogida de forma tal que el conjunto detector-electrómetro suministre una respuesta lineal.

En general, los siguientes valores serán los que den los resultados deseados, a saber, número de platos teóricos para el estearato de metilo al menos igual a 2.000 y elución de éste en aproximadamente quince minutos:

Diámetro interior de la columna	Velocidad del gas portador
2 milímetros	15-25 mililitros/minuto
3 milímetros	20-40 mililitros/minuto
4 milímetros	40-60 mililitros/minuto

Concentración de la fase estacionaria	Temperatura
5 por 100	175 °C
10 por 100	180 °C
15 por 100	185 °C
20 por 100	185 °C

Cuando el aparato lo permita, estará el inyector a una temperatura cercana a los 200 °C y el detector a una temperatura igual o superior a la de la columna.

El caudal de hidrógeno del detector de ionización de llama es, en general, de cerca de la mitad del gas portador y el de oxígeno es de 5 a 10 veces el del hidrógeno.

4.1.2 Determinación de la eficacia y de la resolución:

Efectuar el análisis de una mezcla de estearato y de oleato de metilo en proporciones sensiblemente equivalentes (por ejemplo, ésteres metílicos de manteca de cacao). La importancia de la concentración de muestra, la temperatura de la columna y el caudal del gas portador se escogerán de manera que el máximo del pico de estearato de metilo se registre alrededor de quince minutos después del pico del disolvente y que dicho pico corresponda aproximadamente a los tres cuartos de la escala total.

Calcular el número de platos teóricos n (eficacia) mediante la fórmula:

$$n = 16 \left(\frac{dR_1}{\omega 1} \right)^2$$

y la resolución R por la fórmula:

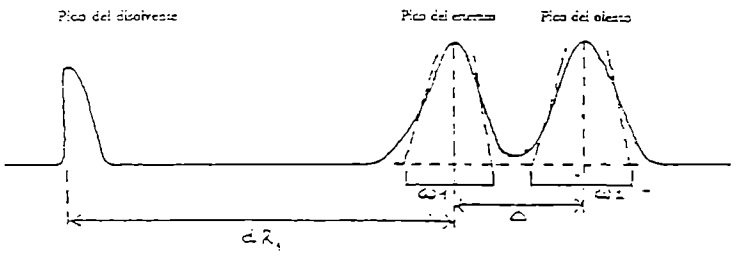
$$R = \frac{2\,\Delta}{\omega 1 + \omega 2}$$

donde:

dR_1 es la distancia de retención en milímetros medida a partir de la introducción hasta el máximo relativo del pico de estearato de metilo.

ω1 y ω2 son las anchuras en milímetros de los picos del estearato y del oleato de metilo medidas entre los puntos de inflexión de la curva.

Δ es la distancia entre los máximos relativos de los picos del estearato y del oleato de metilo.



Las condiciones de operación que se tomarán en consideración serán las que den un número de platos teóricos para el estearato de metilo al menos igual a 2.000 y una resolución de al menos 1,25. Deberán, además, ser tales que el ácido linolénico ($C_{18:3}$) sea separado de los ácidos aráquico ($C_{20:0}$) y gacoleico ($C_{20:1}$)

4.2 Análisis: El volumen de muestra será de 0,1 a 2 µl de la solución heptánica de los ésteres metílicos obtenida en el apartado B. En los casos de ésteres exentos de disolventes, hacer una solución al 10 por 100 aproximadamente en heptano e inyectar de 0,1 a 1 µl de ésta.

Para la búsqueda de componentes presentes en trazas, esta toma de muestras podrá aumentarse hasta 10 veces; en los casos habituales, las condiciones de operación serán las determinadas en el punto 4.1.1. Sin embargo, será posible operar con una temperatura de columna más baja en el caso en que sea necesario dosificar ácidos grasos inferiores a C_{12}, o más elevada en el caso en que fuera necesario dosificar ácidos grasos superiores a C_{20}.

En su caso, es posible operar a una temperatura programada en los dos casos precedentes. Por ejemplo, si la muestra contuviera ésteres metílicos de ácidos grasos de menos de 12 átomos de carbono, inyectar la muestra a 100 °C (o a 50-60 °C si el ácido butírico estuviera presente) y programar inmediatamente a 4-8 °C/minuto hasta la temperatura óptima.

En determinados casos, podrán combinarse los dos procedimientos: Después del período de programación de temperatura, continuar la elución a temperatura constante hasta la elución de todos los constituyentes. Si el aparato no pudiera trabajar a temperatura programada, operar a dos temperaturas fijadas entre 100 y 195 °C.

Si fuera necesario, se recomienda hacer un análisis sobre dos fases fijas de polaridades diferentes para comprobar la ausencia de picos ocultos, por ejemplo para los aceites de pescado o en el caso de la presencia simultánea de $C_{18:3}$ y C_{20} y de $C_{18:3}$ y de $C_{18:2}$ conjugados.

5. *Expresión de los resultados:*

5.1 Análisis cualitativo: En condiciones de operación idénticas a las del ensayo, analizar la mezcla testigo, de composición conocida, y determinar las distancias de retención (o los tiempos de retención) para los ácidos grasos constitutivos. Trazar las curvas que den el logaritmo de la distancia de retención (o del tiempo de retención) en función del número de átomos de carbono; en condiciones isotermas y para los ésteres de cadena recta y un índice de insaturación fijado, dichas curvas trazadas sobre papel semilogarítmico deberán ser rectas notablemente paralelas.

Para la prueba, identificar los picos remitiéndose a dichas rectas, si fuera necesario interpolando.

Deberán evitarse las condiciones operativas en las que existan «picos ocultos», o sea, que dos constituyentes no puedan distinguirse como consecuencia de una resolución insuficiente.

5.2 Análisis cuantitativo:

5.2.1 Determinación de la composición:

Utilizar el método de normalización interna (salvo excepciones), o sea, admitir que la totalidad de los constituyentes presentes en la muestra está representada sobre el cromatograma, y por tanto que la suma de las áreas de los picos representa un 100 por 100 de los constituyentes (elución total).

Si el equipo incluye un integrador, utilizar las cifras suministradas por él. En caso contrario, determinar el área de cada pico por triangulación multiplicando la altura de éste por su anchura a media altura, considerando, si fuera necesario, las diversas atenuaciones utilizadas en el curso del registro.

5.2.1.1 Caso general: A falta de constituyentes importantes inferiores a C_8, calcular el contenido en constituyente, expresado en porcentaje en ésteres metílicos, determinando el porcentaje representado por el área del pico correspondiente con respecto a la suma de la totalidad de los picos:

Porcentaje (m/m) del compuesto i expresado en ésteres metílicos =

$$= \frac{A_i}{\Sigma A_i} \times 100$$

A_i = área del pico correspondiente del compuesto i;
ΣA_i = suma de las áreas de la totalidad de los picos.

5.2.1.2 Empleo de factores de corrección:

En algunos casos, en especial en presencia de ácidos inferiores a C_8 o de ácidos de funciones secundarias y cuando se utilicen detectores de conductibilidad térmica, procederá utilizar factores de corrección para convertir los porcentajes de las áreas de los picos en porcentajes en masa de los constituyentes.

Determinar los factores de corrección con la ayuda de un cromatograma obtenido a partir de una mezcla testigo de ésteres metílicos de composición exactamente conocida en condiciones operativas idénticas a las de la prueba.

Para dicha mezcla testigo:

$$\text{Porcentaje (m/m) del compuesto i} = \frac{B_i}{\Sigma B_i} \times 100$$

B_i = masa del compuesto i en la mezcla testigo,
ΣB_i = suma de las masas de los distintos constituyentes de la mezcla testigo.

El cromatograma obtenido a partir de la mezcla testigo permite calcular:

$$\text{Porcentaje (área/área) del compuesto i} = \frac{C_i}{\Sigma C_i} \times 100$$

C_i = área del pico correspondiente al compuesto i,
ΣC_i = suma de las áreas de la totalidad de los picos.

de donde:

$$\text{Factor de corrección } K_i = \frac{B_i \times \Sigma C_i}{C_i \times \Sigma B_i}$$

Habitualmente, los factores de corrección se refieren al $K_{16} = 1$ y se obtienen los factores relativos:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{16}}$$

Para la muestra, el contenido en cada constituyente está dado por porcentaje (m/m) del compuesto i expresado en ésteres metílicos

$$= \frac{K'_i \times A_i}{\Sigma K'_i \times A_i} \times 100$$

5.2.1.3 Empleo de un patrón interno: En determinados casos (en especial cuantificación de los ácidos C_4 y C_6 y cuantificación de los ácidos en caso de que todos los ácidos grasos no estén eluidos) procederá utilizar un patrón interno (respectivamente C_5 y C_{15} ó C_{17}) y, a continuación, determinar el factor de corrección del mismo.

Porcentaje (m/m) del compuesto i expresado en ésteres metílicos =

$$= \frac{m_s \times K'_i \times A_i}{m \times K'_s \times A_s} \times 100$$

m_s = peso del patrón interno en mg,
m = peso de la muestra en mg,
K_s = factor de corrección del patrón interno,
A_s = área del pico correspondiente al patrón interno,
A_z = área del pico correspondiente al compuesto i.

5.2.2 Expresión de los resultados: Dar el resultado con:

Tres cifras significativas por encima del 10 por 100.
Dos cifras significativas en el 1 y el 10 por 100.
Una cifra signficativa por debajo del 1 por 100.
O sea, en cada caso, con una cifra después de la coma.

5.2.3 Repetibilidad: La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas el mismo día, con el mismo aparato, por la misma persona y sobre los mismos ésteres y para los constituyentes presentes en más del 5 por 100, no deberá exceder en valor relativo del 3 por 100 del valor determinado, con un máximo absoluto del 1 por 100. Para los constituyentes presentes en menos del 5 por 100, la repetibilidad se hace rápidamente menos buena, en valor relativo, a medida que el contenido disminuye.

5.2.4 Reproductibilidad: La diferencia entre los resultados obtenidos en dos laboratorios diferentes para los constituyentes presentes en más del 5 por 100 no deberá exceder en valor relativo del 10 por 100 del valor determinado, con un máximo absoluto del 3 por 100. Para los constituyentes presentes en menos del 5 por 100, la reproductibilidad se hace rápidamente menos buena, en valor relativo, a medida que disminuye el contenido.

6. *Notas:*

1. Podrá emplearse un aparato de cromatografía en fase gaseosa con un detector de conductividad térmica (catarómetro). Las condiciones descritas se modificarán entonces de la siguiente manera:

Tubo: Longitud, 2 a 4 metros; diámetro interior: 4 milímetros.
Soporte: Granulometría entre 160 y 200 µm.
Indice de impregnación: Del 15 al 20 por 100.
Gas portador: Helio o, en su defecto, hidrógeno, con un contenido en oxígeno tan débil como sea posible.
Ningún gas auxiliar.
Temperatura del inyector: 40 a 60 °C superior a la de la columna.
Temperatura de la columna: De 180 a 200 °C.
Caudal del gas portador: Generalmente comprendido entre 60 y 80 ml/min.
Cantidades inyectadas: Generalmente entre 0,5 y 2 µl.

Para el análisis cuantitativo, tomar en consideración los factores de corrección definidos en el punto 5.2.1.2.

2. Si estuvieran presentes constituyentes poliinsaturados de más de 3 dobles enlaces, un tubo de acero inoxidable podría provocar su descomposición.

Apartado B

MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS QUE TENGAN SEIS ÁTOMOS DE CARBONO Y MÁS

En el punto 1 se da un método general de preparación de los ésteres metílicos utilizando el trifluoruro de boro que deberá adoptarse con carácter preferente. Por si no fuere posible utilizar dicho método, se describen métodos alternativos en el punto 2.

1. *Método general utilizando del trifluoruro de boro:*

1.1. Principio: Saponificación de los glicéridos y liberación y esterificación de los ácidos grasos en presencia de trifluoruro de boro.

1.2 Material:

Matraces de 50 a 100 mililitros de cuello esmerilado.
Refrigerante recto, de 20 a 30 centímetros de longitud útil, con esmerilado adaptable al matraz.
Regulador de ebullición, exento de grasa.
Tubo para burbujeo de nitrógeno.
Pipeta graduada de una capacidad al menos igual a 10 mililitros, y perilla para pipeta o pipeta automática.
Tubos de ensayo de tapón esmerilado.
Ampollas de decantación de 250 mililitros.

1.3 Reactivos:

Solución metanólica de hidróxido de sodio de alrededor de 0,5 N: Disolver 2 gramos de hidróxido de sodio en 100 mililitros de metanol que no contenga más del 0,5 por 100 (m/m) de agua. Cuando se deba utilizar la solución durante un período de tiempo considerablemente largo se formará un poco de carbonato de sodio (precipitado blanco); éste no tendrá ninguna influencia sobre la preparación de los ésteres metílicos.

Solución metanólica de trifluoruro de boro de contenido comprendido entre el 12 y 15 por 100 (m/m). (Existen soluciones al 14 y 50 por 100 en el comercio) (nota 2).

Advertencia: El trifluoruro de boro es un compuesto tóxico. Por ello no se recomienda preparar uno mismo la solución a partir de trifluoruro de boro y de metanol (nota 3):

Heptano, para cromatografía (nota 2, nota 4).
Eter de petróleo bidestilado (Eb 40-60 °C), índice de bromo inferior a 1 exento de residuo o hexano (nota 2).
Sulfato de sodio anhidro.
Solución saturada de cloruro de sodio.
Rojo de metilo, en solución al 0,1 por 100 (m/m) en etanol al 60 por 100 (v/v).
Nitrógeno que contenga menos de 5 miligramos de oxigeno por kilogramo.

1.4 Método operatorio: Las operaciones siguientes se efectuarán preferentemente bajo una campana de gases a causa de las propiedades tóxicas del trifluoruro de boro. Todo el material de vidrio se lavará con agua inmediatamente después de su empleo.

En presencia de aceites o de ácidos grasos que contengan ácidos de más de dos dobles enlaces se recomienda eliminar el aire contenido en el metanol y en el matraz por burbujeo de nitrógeno durante algunos minutos.

No es necesaria una pesada exacta. El tamaño de la toma de muestra sólo ha de conocerse para escoger el tamaño del matraz y las cantidades de reactivos según el siguiente cuadro:

Muestra (mg)	Matraz (ml)	NaOH 0,5 N (ml)	Solución metanólica de BF_3 (ml)
100 - 250	50	4	5
250 - 500	50	6	7
500 - 750	100	8	9
750 - 1.000	100	10	12

En caso de que los ésteres metílicos estén destinados al análisis por cromatografía en fase gaseosa, la muestra será preferentemente de alrededor de 350 miligramos. Si fuere más pequeña, convendrá tomar precauciones para que la muestra tomada sea representativa (nota 5).

1.4.1 Para los aceites y grasas:

Introducir la muestra preparada en el matraz. Añadir la cantidad indicada de la solución metanólica de hidróxido de sodio y un regulador de ebullición. Adaptar el refrigerante sobre el matraz. Llevar a ebullición con reflujo hasta que desaparezcan las gotitas de materia grasa (esta operación puede durar de cinco a diez minutos, pero, en algunos casos excepcionales, puede sobrepasar los diez minutos).

Añadir a la mezcla en ebullición por la parte superior del refrigerante y utilizando la pipeta graduada con la pera para pipeta o la pipeta automática la cantidad indicada de la solución metanólica de trifluoruro de boro. Continuar la ebullición durante dos minutos.

Añadir a la mezcla hirviendo de 2 a 5 mililitros de heptano (nota 4) por la parte superior del refrigerante (la cantidad de heptano no tiene importancia en la reacción) y continuar la ebullición durante un minuto.

Quitar la fuente de calor del matraz y después el refrigerante. Añadir algunos mililitros de la solución saturada de cloruro de sodio y agitar suavemente el matraz varias veces por rotación.

Continuar añadiendo solución saturada de cloruro de sodio para llevar el nivel del líquido al cuello del matraz. Trasladar alrededor de 1 mililitro de la capa superior (solución heptánica) a un tubo de ensayo esmerilado y añadir la cantidad de sulfato de sodio anhidro necesaria para eliminar los restos de agua. En el caso de una muestra de 350 miligramos, la solución obtenida contendrá alrededor del 5 al 10 por 100 de ésteres metílicos y podrá inyectarse directamente en la columna de cromatografía en fase gaseosa. En los otros casos diluir la solución heptánica para obtener una concentración del 5 al 10 por 100 en ésteres metílicos (nota 6).

Para obtener la totalidad de los ésteres secos, trasladar la solución y la fase heptánica a una ampolla de decantación de 250 mililitros. Decantar. Extraer la solución salina con 50 mililitros de éter de petróleo (Eb 40-50 °C) o de hexano.

Repetir una segunda vez esta extracción. Reunir la fase heptánica y los dos extractos y lavarlos con porciones de 20 mililitros de agua hasta la desaparición de la acidez (indicador: Rojo de metilo). Secar con sulfato de sodio anhidro y evaporar el disolvente al baño maría bajo corriente de nitrógeno (nota 6 y nota 7). Para muestras inferiores a 500 miligramos, es preferible reducir proporcionalmente los volúmenes de disolvente y de agua.

1.4.2 Para ácidos grasos:

Si la muestra está constituida únicamente por ácidos grasos no se efectúa la saponificación.

Introducir la cantidad deseada de ácidos grasos preparados en el matraz. Añadir la cantidad indicada de la solución metanólica de trifluoruro de boro. LLevar a ebullición durante dos minutos. Proceder a continuación como se indica en el punto 1.4.4 a partir de: «Añadir a la mezcla hirviendo...».

2. Métodos alternativos no utilizando el trifluoruro de boro:

2.1 Para los cuerpos grasos neutros (IA < 2):

2.1.1 Principio: Metanólisis de los glicéridos en medio alcalino.

2.1.2 Material:

Agitador que permita una agitación rápida y dispositivo de calentamiento apropiado (por ejemplo, agitador magnético-calentador).
Erlenmeyer o matraz de 100 mililitros de cuello esmerilado.
Tubo para burbujeo de nitrógeno.
Refrigerante que se adapte al matraz o al erlenmeyer.
Regulador de ebullición, exento de grasa.
Ampollas de decantación de 125 mililitros.
Erlenmeyer, de boca estrecha, de 50 mililitros.

2.1.3 Reactivos:

Metanol que no contenga más de 0,5 por 100 (m/m) de agua.
Solución metanólica de hidróxido de potasio de alrededor de 1 N: Disolver 5,6 gramos de hidróxido de potasio en 100 mililitros de metanol que no contenga más del 0,5 por 100 (m/m) de agua.
Heptano para cromatografía (nota 2 y nota 4).
Sulfato de sodio anhidro.
Nitrógeno que contenga menos de 5 miligramos de oxígeno por kilogramo.

2.1.4 Método operatorio:

En presencia de aceites que contengan ácidos de más de 2 dobles enlaces es recomendable eliminar el aire contenido en el metanol y el matraz mediante burbujeo de nitrógeno durante algunos minutos.

En un erlenmeyer o un matraz de 100 mililitros, introducir alrededor de 4 gramos (nota 5) de cuerpo graso preparado. Añadir alrededor de 40 mililitros de metanol, 0,5 mililitros de la solución de hidróxido de potasio y un regulador de ebullición. Poner bajo refrigerante a reflujo, agitar y llevar a ebullición. La solución debe hacerse límpida. La reacción estará prácticamente terminada al cabo de cinco a diez minutos. En caso de aceites del tipo «aceite de ricino», la limpidez no será el criterio de reacción (nota 8).

Refrigerar bajo corriente de agua y trasvasar a una ampolla de decantación de 125 mililitros. Enjuagar el erlenmeyer o el matraz con 20 mililitros de heptano (nota 4) y verterlos en la ampolla.

Añadir alrededor de 40 mililitros de agua, agitar y dejar decantar. Los ésteres se reunirán en la fase heptánica superior. Extraer la fase acuosa una segunda vez con 20 mililitros de heptano. Reunir los dos extractos y lavarlos dos veces con 20 mililitros de agua. Después de la decantación, secar sobre sulfato de sodio anhidro la solución de ésteres, filtrar sobre algodón y evaporar el disolvente, si fuera necesario, hasta 20 mililitros en baño de agua hirviendo burbujeando nitrógeno en un erlenmeyer de 50 mililitros (nota 6, nota 7).

2.2 Para los cuerpos grasos ácidos (IA > 2) y ácidos grasos:

2.2.1 Principio:

Para los cuerpos grasos ácidos, neutralización de los ácidos grasos libres, metanólisis alcalina de los glicéridos y esterificación posterior de los ácidos grasos en medio ácido.
Para los ácidos grasos, esterificación en medio ácido.

2.2.2 Material:

Agitador que permita una agitación rápida y dispositivo de calentamiento apropiado (por ejemplo, agitador magnético-calentador).
Erlenmeyer o matraz de 250 mililitros de cuello esmerilado.
Tubo para burbujeo de nitrógeno.
Refrigerante que se adapte al erlenmeyer o al matraz.
Regularizador de ebullición, exento de grasa.
Ampollas de decantación de 250 mililitros.
Erlenmeyer de boca estrecha, de 100 mililitros.

2.2.3 Reactivos:

Solución de metilato de sodio obtenida disolviendo 1 gramo de sodio en 100 mililitros de metanol que no contenga más del 0,5 por 100 (m/m) de agua.
Solución metanólica de ácido clorhídrico de alrededor de 1 N (ver observaciones 2.2.6, a) y b).
Heptano para cromatografía (nota 2, nota 4).
Sulfato de sodio anhidro.
Nitrato que contenga menos de 5 miligramos de oxígeno por kilogramo.

2.2.4 Método operatorio para los cuerpos grasos ácidos (IA > 2):

En presencia de aceites que contengan ácidos de más de 2 dobles enlaces es recomendable eliminar el aire contenido en el metanol y en el matraz mediante burbujeo de nitrógeno durante algunos minutos.

En un erlenmeyer o un matraz de 250 mililitros introducir alrededor de 4 gramos (nota 5) de cuerpo graso preparado.

Añadir 40 mililitros de la solución de metilato de sodio (ver observación 2.2.6, c). Poner bajo refrigerante a reflujo, agitar y llevar a ebullición. La solución debe hacerse límpida, lo que se produce generalmente al cabo de una decena de minutos. La reacción estará prácticamente finalizada después de quince minutos.

Introducir a continuación en el erlenmeyer o en el matraz al menos 50 mililitros de la solución clorhídrica, luego llevarla de nuevo a ebullición durante diez minutos (ver observación 2.2.6, d).

Refrigerar bajo corriente de agua, añadir a continuación en el erlenmeyer o en el matraz 100 mililitros de agua, verter luego la mezcla

en una ampolla de decantación de 250 mililitros y añadir 30 mililitros de heptano (ver nota 4). Agitarla vigorosamente y dejarla decantar hasta una separación completa de las dos fases. Recoger la fase heptánica. Extraer la fase acuosa una segunda vez mediante 30 mililitros de heptano. Reunir los dos extractos heptánicos y lavarlos varias veces con agua hasta la neutralidad. Después de la decantación, secar sobre sulfato de sodio. Filtrar sobre algodón y evaporar el disolvente, si fuera necesario, hasta 20 mililitros en baño de agua hirviendo burbujeando nitrógeno en un erlenmeyer de 100 mililitros (nota 6, nota 7).

2.2.5 Método operatorio para los ácidos grasos:

Para los ácidos grasos será conveniente utilizar el método operatorio simplificado siguiente:

En presencia de ácidos grasos que contengan ácidos de más de 2 dobles enlaces es recomendable eliminar el aire contenido en el metanol y en el matraz burbujeando nitrógeno durante algunos minutos. En un erlenmeyer o un matraz de 250 mililitros, introducir alrededor de 4 gramos (nota 5) de cuerpo graso preparado.

Introducir 50 mililitros de la solución clorhídrica y un regulador de ebullición, adaptar el refrigerante, después llevar a ebullición durante diez minutos.

Refrigerar bajo corriente de agua, añadir a continuación en el erlenmeyer o en el matraz 100 mililitros de agua, luego verter la mezcla en una ampolla de decantación de 250 mililitros y añadir 30 mililitros de heptano (nota 4). Agitar vigorosamente y dejarla decantar hasta una separación completa de las dos fases. Decantar la fase acuosa y extraerla una segunda vez mediante 30 mililitros de heptano. Reunir los dos extractos heptánicos y lavarlos varias veces con agua hasta la neutralidad. Después de la decantación, secar sobre sulfato de sodio. Filtrar sobre algodón y evaporar hasta 20 mililitros el disolvente en baño de agua hirviendo burbujeando nitrógeno en un erlenmeyer de 100 mililitros (nota 6, nota 7).

2.2.6 Observaciones:

a) En el laboratorio es fácil preparar pequeñas cantidades de ácido clorhídrico gaseoso anhidro por simple desplazamiento de su solución comercial (d = 1,18), añadiéndole poco a poco ácido sulfúrico concentrado (d = 1,84). El gas que se desprenda será simplemente secado mediante burbujeo en el ácido sulfúrico.

Al ser el metanol muy ávido de gas clorhídrico, será recomendable tomar todas las precauciones de utilización para la disolución, por ejemplo: Efectuar la introducción del gas con la ayuda de un pequeño embudo invertido que llegue hasta la superficie del nivel del metanol. Es posible, además preparar de antemano cantidades importantes de soluciones metanólicas clorhídricas que se conservan perfectamente en frascos esmerilados mantenidos en la oscuridad.

b) Es posible utilizar ácido sulfúrico metanólico de alrededor de 1 N en lugar de ácido clorhídrico metanólico, pero la duración de la esterificación deberá ser de veinte minutos, como mínimo, y los precipitados de sulfato de sodio entorpecen la ebullición e imponen la filtración o el empleo de un agitador magnético.

c) Antes de la introducción de la muestra, también es posible verter 40 mililitros de metanol y añadir 0,4 gramos de sodio, lo que supone una solución de metilato de sodio preparada y administrada al momento,

d) En caso de materias grasas muy ácidas, se produce, habida cuenta de la cantidad relativamente importante de metilato de sodio, una precipitación de cloruro de sodio que puede provocar algunos sobresaltos en el curso de la ebullición que sigue. Es posible filtrar dicho precitado, pero ello no es necesario generalmente debido a la breve duración del calentamiento preconizado.

Notas:

1. Si entorpeciera el insaponificable, se diluirá con agua la solución obtenida después de la saponificación y se eliminará el insaponificable mediante extracción por óxido dietílico, hexano o éter de petróleo en las condiciones acostumbradas.

Acidificar la solución jabonosa acuosa, y separar los ácidos grasos. Preparar sus ésteres metílicos según los procedimientos 1.4.2 ó 2.3.5.

2. Durante la cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos, algunos reactivos y en especial las soluciones metanólicas de trifluoruro de boro pueden llevar a la aparición de picos parásitos (en la región C_{20} C_{22} para las soluciones metanólicas de trifluoruro boro). Como consecuencia, cada nuevo lote de reactivo deberá someterse a prueba preparando ésteres metílicos del ácido oleico puro y después cromatrografiándoles. Si apareciera un pico parásito deberá eliminarse el reactivo utilizado.

Los distintos reactivos no deben dar el pico que interfiera con los de los ésteres metílicos de ácidos grasos en el curso de la cromatografía en fase gaseosa.

3. Si fuera absolutamente indispensable preparar una solución metanólica de trifluoruro de boro, a partir de trifluoruro de boro gaseoso, operar como sigue:

Tarar un matraz de dos litros que contenga un litro de metanol. Enfriar en un baño de agua helada. Estando todavía el matraz en el baño, burbujear con BF_3 procedente de una botella de gas por medio de un tubo de vidrio en el metanol hasta la absorción de 125 gramos, operando bajo una campana de gases. Hacer pasar la corriente de BF_3 al tubo de vidrio antes de sumergirlo en el metanol y hasta que sea retirado para evitar cualquier vuelta de líquido al sistema descompresor de gas. El gas, al escaparse demasiado rápidamente, no debería dar como resultado pequeñas nubes de humo blanco. El reactivo permanece estable durante dos años.

4. El heptano (mezcla de isómeros C_7 puros sometida a prueba por cromatografía en fase gaseosa) puede sustituirse por hexano en ausencia de ácidos grasos de 20 átomos de carbono y más.

5. Si no se dispusiera del peso de muestra prevista, ésta podrá ser reducida hasta 10 miligramos e incluso hasta menos, siempre que disminuyan proporcionalmente los volúmenes de reactivos y la capacidad del equipo.

6. Los ésteres metílicos deberán ser analizados preferentemente lo más rápidamente posible. Si fuera necesario, la solución heptánica que contenga los ésteres metílicos podrá conservarse bajo gas inerte y en el refrigerador. Para un almanecamiento de larga duración será deseable proteger los ésteres metílicos contra la autooxidación por adición a la solución de un antioxidante en una concentración que no interfiera en los análisis ulteriores, por ejemplo, un 0,005 por 100 (m/v) DE BHT (dietibutil-2-6-metil-4 fenol). Si fuera necesario, los ésteres metílicos secos y sin disolvente podrán, en su caso, conservarse veinticuatro horas bajo gas inerte en el refrigerador, o más tiempo, en tubo sellado en vacío en el congelador.

7. Existe un riesgo de perder una parte de los ésteres metílicos más volátiles si la eliminación del disolvente se prolonga o si la corriente de nitrógeno fuera demasiado vigorosa.

Para la espectrofotometría infrarroja dicha eliminación del disolvente deberá ser lo más completa posible. Para la cromatografía en fase gaseosa es deseable no expulsar el disolvente.

COMUNIDAD AUTONOMA DE GALICIA

3420 *LEY 12/1988, de 27 de diciembre, de asignación de recursos para la cooperación local.*

Determinada la liquidación definitiva de la participación que en los ingresos líquidos del Estado, correspondientes al ejercicio económico del año 1987, corresponden a la Comunidad Autónoma de Galicia, se ha producido un exceso sobre la financiación prevista en los Presupuestos Generales aprobados por el Parlamento de Galicia y publicados como Ley 2/1988, de 5 de marzo. Tal exceso es de 3.262.090.000 pesetas.

Por otra parte, tras un examen de los estados de recaudación, los distintos conceptos de ingresos parecen ajustarse a las previsiones presupuestarias, inclusive con una tendencia a la alta, y ello permite que con la financiación propia y la prevista de participación en los ingresos del Estado la Comunidad Autónoma esté en condiciones de atender las previsiones de gastos contenidas en los Presupuestos.

No obstante, el exceso ya mencionado en la participación en los ingresos del Estado puede permitir que, de manera inmediata, se cubran en este ejercicio económico necesidades perentorias de nuestra Comunidad, especialmente mediante aquellas actuaciones que pueden contribuir más directamente a corregir los desequilibrios territoriales más patentes.

Desde las perspectivas señaladas, los motivos que impulsan al Gobierno Gallego a presentar en el Parlamento de Galicia el presente proyecto de Ley son los siguientes:

a) La necesidad de respetar el espíritu y la letra de las normas que rigen las gestiones económica y financiera.

b) Porque es preciso someterse al control parlamentario cuando se produce en los ingresos un incremento que en su día, por la falta de datos fiables sobre su cuantía, no han sido contemplados exactamente en las previsiones presupuestarias, que, por otra parte, han de ser prudentes en el cálculo inicial, sobre todo cuando se trata de medir ingresos de otras Administraciones.

Pero también estima el Gobierno Gallego, además de las anteriores consideraciones formales, que los nuevos recursos con los que ahora se puede contar deben ser destinados a aquellos objetivos que más claramente definen el carácter de los Presupuestos vigentes, tal como lo afirma la exposición de motivos de la Ley 2/1988, de 5 de marzo, al proclamar que «en su aspecto financiero, el Presupuesto se ha elaborado