

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 034**

21 Número de solicitud: 201031186

51 Int. Cl.:
G01N 30/02 (2006.01)
G01N 33/03 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **29.07.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **06.11.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
06.11.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
CAMPUS UNIVERSITARIO-PABELLON DE
GOBIERNO PLAZA DE LA UNIVERSIDAD, 2
02071 ALBACETE, ES**

72 Inventor/es:
**ARAGÓN SERRANO, Álvaro;
CORTES SIMARRO, José Manuel;
TOLEDANO TORRES, Rosa María;
VILLÉN ALTAMIRANO, Jesús y
VÁZQUEZ MOLINI, Ana María**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA ANALIZAR CERAS EN ACEITES VEGETALES.**

57 Resumen:

Procedimiento para analizar ceras en aceites vegetales.

La invención define un procedimiento para analizar ceras en aceites vegetales que comprende las etapas de:

(a) someter la muestra de aceite vegetal a cromatografía líquida de alta eficacia en fase normal para separar la fracción de ceras; y

(b) someter la fracción eluida obtenida en la etapa (a) a cromatografía de gases;

en el que se emplea un inyector automático para inyectar la muestra de aceite vegetal en el cromatógrafo de líquidos, en el que se emplea un detector de índice de refracción en el cromatógrafo de líquidos de la etapa (a), y en el que el acoplamiento entre la cromatografía líquida y la cromatografía de gases se efectúa mediante la interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption). Este procedimiento permite analizar ceras en aceites vegetales de modo rápido, sencillo, reproducible, fiable y sin apenas manipulación de la muestra, y con una repetibilidad satisfactoria del análisis.

ES 2 390 034 A1

DESCRIPCIÓN**PROCEDIMIENTO PARA ANALIZAR CERAS EN ACEITES VEGETALES****CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere al campo de los métodos de análisis aplicados a alimentos. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para analizar ceras en aceites vegetales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Como es conocido en el estado de la técnica, las ceras son ésteres de alto peso molecular constituidos por ácidos grasos de cadena larga y alcoholes de cadena larga, lineales o ramificados, que se encuentran de forma natural en los aceites vegetales. La determinación de la concentración de ceras se ha empleado como indicador de la calidad de dichos aceites vegetales, particularmente del aceite de oliva. Esta determinación, por ejemplo, permite distinguir el aceite de oliva obtenido por presión en frío del obtenido por extracción, ya que las ceras se encuentran concentradas en la superficie de la oliva y apenas son extraídas mediante presión en frío de dicho fruto. Igualmente, la cantidad de ceras extraídas es mayor para el caso de olivas blandas, probablemente degradadas, razón por la que un mayor contenido de ceras sugiere un aceite de peor calidad. La extracción con disolventes de los residuos de la extracción de aceite por presión (orujo) lleva asimismo a una mayor concentración de ceras y, por tanto, se usa para detectar el aceite de orujo que se ha mezclado con aceite de primera presión. Así, se ha establecido un límite legal de contenido de ceras en aceites de oliva virgen (250 mg/kg) y en aceites de oliva refinados (350 mg/kg) (Reglamento CEE 702/2007 de 21 de junio de 2007). Por otro lado, la determinación del contenido de ceras es también útil para detectar aceite de girasol en aceite de cártamo. Así pues, las diferencias en la composición de ceras de los distintos aceites vegetales o en la calidad de un mismo tipo de aceite hacen que sean necesarias

nuevas técnicas de análisis de ceras en aceites vegetales.

El análisis de ceras en aceites vegetales se efectúa habitualmente mediante cromatografía de gases (GC), una vez
5 separada la fracción de ceras de la matriz de triglicéridos mediante cromatografía líquida en columna de gel de sílice (C. Mariani; E. Fedeli: Minor Components of vegetable oils: Non-glyceridic esters. *Riv Ital Sost Grasse* 1986, 63, 3-17);
mediante cromatografía de capa fina (G. Henon; Analysis of
10 sunflower oil waxes by chromatography. *Rev Fr Corp Gras*. 1986, 33, 475-482); mediante extracción en fase sólida (G. Nota, D. Naviglio, R. Romano, V. Sabia, S. S. Muso, C. Improta: Determination of the wax ester content in olive oils. Improvement in the method proposed by ECC Regulation 183/93. *J Agric Food Chem*. 1999, 47, 202-205; B. Reiter, M. Lechner, R. Aichholz: Isolation and characterization of wax ester in fennel and Caraway seed oils by SPE-GC. *J High Resolut Chromatogr*. 1999, 22, 514-520) o bien mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Así, por ejemplo, Amelio et al. (M.
20 Amelio, R. Rizzo, F. Varanzini: Separation of wax esters from olive oils by HPLC. *J Am Oil Chem Soc*. 1993, 70, 793-796) propusieron emplear cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) combinada con cromatografía de gases de alta resolución (HRGC).

25

Para conseguir la automatización del análisis se propuso acoplar en línea la cromatografía líquida de alta resolución con la cromatografía de gases (K. Grob, T. Läubli: Determination of wax esters in olive oil by coupled HPLC-HRGC. *J High Resolut Chromatogr Chromatogr Commun*. 1986, 9, 593-594);
30 y K. Grob, M. Lanfranchi: Determination of free and sterified sterols and of wax esters in oils and fats by coupled liquid chromatography-gas chromatography. *J Chromatogr*. 1989, 471, 397-405) mediante una interfase tipo inyector en columna o una

interfase tipo lazo.

Janssen et al. (H. G. Janssen, W. Boers, H. Steenbergen, R. Horsten, E. Flöter: Comprehensive two-dimensional LC X GC: Evaluation of the applicability for the analysis of edible oils and fats. *J Chromatogr A*. 2003, 1000, 385-400) propusieron un método de cromatografía bidimensional LC x GC para analizar aceites y grasas comestibles en el que el aceite de oliva se fraccionó mediante HPLC en carbohidratos, ceras, ésteres de esteroides, triacilgliceroides y otras clases de componentes y, posteriormente, se separó cada fracción en sus componentes individuales mediante GC.

Por su parte, Grob et al. (K. Grob: Efficiency through combining HPLC and HRGC: Progress 1995-1999. *J Chromatogr A*. 2000, 892, 407-420) y Biedermann et al. (M. Biedermann, K. Grob, F. Munari: Identification of reaction products of BADGE from coatings of food and beverage cans by off-line HPLC-large volume injection GC-MS. *Proceedings 20th Int. Symp. On Capillary Chromatography*, Riva del Garda (Italy) 1998) propusieron el acoplamiento LC-GC en línea mediante una interfase tipo inyector en columna con evaporación simultánea del disolvente para transferir fracciones sin componentes volátiles, como es el caso de las ceras.

25

Asimismo, Biedermann et al. (M. Biedermann, K. Grob, P. Haase-Aschoff: Wax ester fraction of edible oils: Analysis by on-line LC-GC-MS and GC x GC-FID. *Eur J Lipid Sci Technol* 2008, 110, 1084-1094) han propuesto también el acoplamiento LC-GC-MS empleando una interfase tipo inyector en columna, así como un método de cromatografía gaseosa bidimensional GC x GC (*comprehensive*), aunque, como los mismos autores indican en el artículo dicha metodología GC x GC es útil sólo para investigación con el fin de elucidar la composición en ceras,

pero no es aplicable al análisis rutinario.

Sin embargo, los métodos LC-GC citados, que emplean interfases tipo inyector en columna o tipo lazo para acoplar HPLC con HRGC, que están basadas en la evaporación del disolvente y retención de los analitos en un capilar sin fase, presentan numerosos inconvenientes, como son la variabilidad en los tiempos de retención en GC, la corta duración de las columnas cromatográficas y de los capilares empleados para la evaporación del disolvente, o la transferencia de HPLC a HRGC de pequeñas cantidades de triglicéridos en cada análisis que se van acumulando en la interfase o en el cromatógrafo de gases y, al no ser volátiles, dan problemas cuando se intenta analizar un elevado número de muestras. En esta línea, se han publicado igualmente otros métodos de análisis de componentes minoritarios de aceites, aunque la metodología no ha tenido mucha aceptación debido en parte a los inconvenientes comentados. De hecho, en la introducción del artículo "Jongenotter, G.A., Kerkhoff, M.A.T., van der Knaap, H.C.M. y Vandeginste, B.G.M. Automated on-line GPC-GC-FPD involving co-solvent trapping and the on column interface for the determination of organophosphorus pesticides in olive oils. J. High Resolut. Chromatogr. 22 (1999) 17-23", los autores reconocen que el método presenta serios inconvenientes cuando se intenta aplicar de modo rutinario, debido a que una parte del pico de cromatografía de líquidos, llevada a cabo en este como cromatografía de filtración en gel (GPC), que contiene los plaguicidas se superpone con la fracción que contiene los compuestos grasos. Todos estos inconvenientes han impedido que los laboratorios de análisis rutinarios hayan incorporado los distintos métodos de análisis de aceites mediante este sistema de acoplamiento LC-GC, que desde hace ya varios años se han venido desarrollando. Aunque las expectativas que despertó este acoplamiento hicieron que el grupo Thermo sacara al mercado un

equipo para llevar a cabo dicho acoplamiento, los problemas asociados al empleo de estas interfases en el acoplamiento LC-GC, tanto para el análisis de alimentos grasos como para otras matrices, han provocado que dicho equipo haya sido retirado del
5 mercado ante la falta de demanda.

Por todo ello, el método oficial actualmente en vigor (Reglamento CE N° 702/2007) efectúa el análisis de ceras en aceite de oliva fraccionando la materia grasa mediante
10 cromatografía líquida en columna de gel de sílice hidratado; recuperando la fracción de interés e inyectando esta en la columna del cromatógrafo de gases; es decir combinando cromatografía líquida en columna de gel de sílice y cromatografía de gases sin acoplamiento en línea. Este método
15 es bastante preciso y fiable pero presenta una serie de inconvenientes que afectan fundamentalmente a las etapas de extracción y concentración del extracto. En primer lugar, el tiempo requerido para la preparación de la muestra es alto, lo que constituye una desventaja importante, sobre todo si el
20 número de muestras a analizar es elevado. Además, es necesario emplear volúmenes relativamente elevados de disolventes orgánicos tóxicos, con el consiguiente riesgo para la salud del analista y los efectos nocivos que supone en relación con el impacto medioambiental. Concretamente, cuando la determinación
25 se lleva a cabo mediante el método oficial, es necesario emplear algo más de 200 mililitros de disolventes orgánicos por muestra. Por otra parte, durante todo el proceso se pueden introducir impurezas, procedentes del disolvente o de los materiales empleados, que se concentran posteriormente junto a
30 los analitos y dan lugar a interferencias y errores analíticos y, en último término, a análisis deficientes en cuanto a su selectividad y sensibilidad.

Continúa existiendo en el estado de la técnica, por tanto,

la necesidad de un procedimiento sencillo, rápido y sensible para la determinación de ceras en aceites vegetales.

Los presentes inventores han desarrollado un nuevo método
5 para analizar ceras en aceites vegetales que comprende una
etapa de cromatografía líquida y una etapa de cromatografía
gaseosa, estando estas acopladas en línea mediante la interfase
TOTAD y empleando en el cromatógrafo de líquidos un inyector
automático así como un detector de índice de refracción. El
10 empleo de un inyector automático permite llevar a cabo el
análisis de forma totalmente automática, incluyendo la
inyección de la muestra y las etapas de LC y de GC, de modo que
puede realizarse la determinación analítica de numerosas
muestras de un modo totalmente automático sin necesidad de
15 atención del analista.

La interfase TOTAD es un inyector con temperatura
programada (PTV) modificado que permite la inyección de grandes
volúmenes de disolventes, polares o apolares, en cromatografía
20 de gases capilar así como el acoplamiento en línea de
cromatografía de líquidos y cromatografía gaseosa. Así, se ha
utilizado en el análisis de residuos de plaguicidas en agua por
introducción de grandes volúmenes de muestra (J. Alario et al.,
"Very Large Volume Sampling of Water in GC using the TOTAD
25 (Through Oven Transfer Adsorption Desorption) Interface for
Pesticide Residue Analysis", *J. Chromatogr. Sci.*, **2001**, 39, 65-
69) y en el análisis de residuos de plaguicidas en agua por
acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y
cromatografía de gases, una vez sometida la muestra de agua a
30 extracción en fase sólida (M. Pérez et al., "On Line Reversed
Phase LC-GC by using the new TOTAD (Through Oven Transfer
Adsorption Desorption) Interface: Application to Parathion
Residue Analysis", *Journal of Microcol. Sep.* **1999**, 11, 582-89;
M. Pérez et al., "Pesticide Residue Analysis by Off-Line SPE

and On-Line Reversed Phase LC-GC using the New TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption) Interface", *Anal. Chem.* **2000**, 72, 846-852). Igualmente, se ha utilizado en el análisis de residuos de plaguicidas en aceite de oliva donde la muestra se introduce directamente en el cromatógrafo de líquidos tras una simple etapa de filtración como pretratamiento (R. Sánchez et al., "Automated Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption-desorption interface", *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1029, 167-172; R. Sánchez et al., "Determination of organophosphorus and triazine pesticides in olive oil by on-line coupling reversed-phase liquid chromatography/gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and an automated through oven transfer adsorption-desorption interface", *J. AOAC Int.* **2005**, 88, 1255-1260; y Díaz et al., "Automated determination of pesticide residues in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption-desorption interface with electron capture and nitrogen-phosphorus detectors operating simultaneously", *J. Chromatogr. A* **2007**, 1174, 145-150). En dichos análisis, se ha usado la cromatografía líquida en fase inversa. Sin embargo, hasta ahora no se ha usado el acoplamiento de la cromatografía líquida en fase normal (NPLC) y la cromatografía de gases (GC), salvo para inyectar grandes volúmenes de disolventes no polares en el cromatógrafo de gases con el fin de analizar plaguicidas en vegetales (Cortes et al., "Large volume GC injection for the analysis of organophosphorus pesticides in vegetables using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface", *J Agric Food Chem.* **2006** Mar 22;54(6):1997-2002.

Las ceras, a diferencia de los plaguicidas, son compuestos con un elevado peso molecular y su desorción es bastante más

difícil, por lo que, a priori, no cabría esperar unos buenos resultados de análisis de estos compuestos en aceites vegetales mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase normal acoplada a cromatografía de gases mediante la interfase
5 TOTAD, donde tiene lugar dicha desorción. Además, dado que estos compuestos no son fácilmente detectables con el detector ultravioleta-visible de la cromatografía de líquidos, tampoco cabría esperar unos resultados aceptables empleando el método descrito por Sánchez et al. (2004 y 2005, supra) y Díaz et al.
10 (2007, supra). Por otra parte, como se ha comentado previamente, para el desarrollo del presente método de análisis, los autores han incorporado el empleo de un inyector automático que no se ha empleado hasta ahora en análisis en serie.

15

Así pues, los presentes autores proporcionan un procedimiento alternativo para analizar ceras en aceites vegetales que es rápido, sencillo, reproducible, fiable y sin apenas manipulación de la muestra, y con una repetibilidad
20 satisfactoria del análisis.

OBJETO DE LA INVENCIÓN

La presente invención, por tanto, tiene por objeto proporcionar un procedimiento para analizar ceras en aceites
25 vegetales.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra el cromatograma de gases obtenido al analizar mediante el procedimiento de la invención una muestra
30 de 100% de aceite de oliva lampante, donde se observan los picos de las siguientes ceras: C32 (1), C40 (2), C42 (3), C44 (4), C46 (5).

La figura 2 muestra el cromatograma de gases obtenido al

analizar mediante el procedimiento de la invención una muestra de aceite de oliva virgen (a) y una muestra de aceite de oliva refinado (b).

5 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

La presente invención proporciona un procedimiento para analizar ceras en aceites vegetales, en adelante "procedimiento de la invención", que comprende las siguientes etapas:

- 10 (a) someter la muestra de aceite vegetal a cromatografía líquida de alta eficacia en fase normal para separar la fracción de ceras; y
(b) someter la fracción eluida obtenida en la etapa (a) a cromatografía de gases;

15

en el que se emplea un inyector automático para inyectar la muestra de aceite vegetal en el cromatógrafo de líquidos de la etapa (a), en el que se emplea, además, un detector de índice de refracción en el cromatógrafo de líquidos de la etapa (a) y
20 en el que el acoplamiento entre la cromatografía líquida y la cromatografía de gases se efectúa mediante la interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption).

En el contexto de la invención, el término "ceras" se
25 refiere a ésteres de alto peso molecular constituidos por ácidos grasos de cadena larga y alcoholes de cadena larga, lineales o ramificados.

Los aceites vegetales están compuestos principalmente por
30 triglicéridos, ácidos grasos y mezclas complejas de compuestos minoritarios de diferente naturaleza. Estos últimos pueden dividirse en dos grupos: los compuestos derivados de ácidos grasos tales como ceras o ésteres de esteroides, por ejemplo, y compuestos no derivados de ácidos grasos tales como esteroides,

hidrocarburos o tocoferoles, por ejemplo. Tal y como se ha
indicado previamente, el análisis de estos constituyentes
minoritarios es esencial ya que se usan como referencia para la
regulación de los aceites comestibles, así como para la
5 determinación analítica de su calidad, origen, método de
extracción, procedimiento de refinado y posible adulteración de
los mismos.

Las ceras de interés analítico en los aceites vegetales
10 comestibles son aquellas con un número de átomos de carbono que
varía entre 40 y 48. En particular, las ceras que se determinan
en aceites vegetales comestibles según el método oficial son
las ceras C40, C42, C44 y C46, ya que el contenido de otras
ceras es despreciable frente a estas. Así, el contenido total
15 de ceras que se determina es la suma de las concentraciones de
estas ceras particulares. Cada una de ellas es una mezcla de
isómeros que en total suman el número de carbonos que se
indican: Por ejemplo, la cera C42 puede ser un éster de un
ácido de 20 C y un alcohol de 22 C, o al contrario.

20

Los aceites vegetales que pueden ser analizados mediante el
procedimiento de la invención con el fin de determinar su
contenido en ceras pueden ser cualquier aceite vegetal,
particularmente cualquier aceite vegetal comestible. Así, en
25 una realización particular del procedimiento de la invención,
los aceites vegetales comestibles se seleccionan de entre
aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de palma, aceite de
soja, aceite de cacahuete, aceite de pistacho, aceite de
almendra, aceite de colza, aceite de semilla de algodón, aceite
30 de coco, aceite de sésamo, aceite de avellana, aceite de nuez,
aceite de pepita de uva, aceite de arroz, aceite de maíz,
aceite de lino, aceite de cártamo, aceite de cáñamo, aceite de
semillas de calabaza, y mezclas de los mismos. En una
realización preferida, el aceite vegetal comestible analizado

es aceite de oliva.

En la primera etapa del procedimiento de la invención, la muestra de aceite vegetal previamente preparada se somete a cromatografía líquida de alta eficacia en fase normal (NPLC).
5 La preparación de la muestra de aceite vegetal incluye la adición de un patrón interno seguida de la dilución de esta mezcla en un disolvente orgánico adecuado y la filtración de la mezcla diluida.

10

Como patrón interno el experto seleccionará una cera apropiada del estado de la técnica. La empleada más habitualmente es la cera C32 (araquidato de laurilo). Igualmente, el diluyente a emplear será cualquier disolvente orgánico que el experto considere adecuado tal como, por
15 ejemplo, heptano o hexano. Asimismo, el sistema de filtración será cualquier sistema apropiado del estado de la técnica.

La muestra de aceite vegetal así preparada se inyecta directamente en el cromatógrafo de líquidos. La inyección de la muestra se efectúa de modo automático empleando un inyector automático apropiado seleccionado por el experto en la materia, si bien podría emplearse un inyector manual en caso de analizar un número pequeño de muestras. Así pues, se lleva a cabo la
20 determinación automática de numerosas muestras colocando en la bandeja del inyector automático las muestras a las que se les ha sometido a la rápida etapa de preparación anteriormente descrita, mientras que la etapa del método oficial que más tiempo consume es manual, por lo que tiene que ser atendida por
25 un analista.

30

De este modo, mediante la cromatografía de líquidos se separa la fracción que contiene las ceras del resto de los otros componentes del aceite, particularmente de los

triglicéridos.

La fracción que contiene las ceras se transfiere entonces automáticamente mediante la interfase TOTAD al cromatógrafo de gases (GC). Así, las etapas (a) y (b) de análisis son totalmente automáticas lo que, junto con el empleo de un inyector automático, permite el análisis de un elevado número de muestras de un modo totalmente automático.

El procedimiento de la invención emplea el dispositivo de interfase denominada interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption) para el acoplamiento directo de la cromatografía de líquidos y la cromatografía de gases (patente española ES 2 152 153; patente en EE.UU. 6,402,947 licenciada a la empresa KONIK Tech, Sant Cugat del Vallés, Barcelona); o bien el sistema mejorado (patente española ES 2 263 387). Dicha interfase TOTAD es totalmente automática y se maneja desde el software del ordenador.

Finalmente, el cromatógrafo de gases va acoplado a un detector adecuado de modo que se obtiene un cromatograma de la fracción de las ceras que se ha transferido al mismo.

Previamente a la realización del procedimiento de la invención, se procede a determinar la fracción de la cromatografía de líquidos que hay que transferir al cromatógrafo de gases. Igualmente, el experto determinará el tipo de columna de GC y ajustará el programa de temperaturas para conseguir una buena separación, así como otros parámetros habituales en el análisis cromatográfico, en función del tipo de muestra a analizar. Dichos ajustes, en cualquier caso, no será necesario efectuarlos en cada análisis.

Así pues, para determinar la fracción de la cromatografía

de líquidos que hay que transferir al cromatógrafo de gases, se procede a calcular el tiempo de elución de las ceras en la cromatografía de líquidos.

5 Para ello, se trabaja exclusivamente con cromatografía de líquidos y se debe obtener un cromatograma de líquidos que asegure una buena separación entre las ceras y el resto de componentes del aceite vegetal, particularmente, los triglicéridos.

10

 Así, se inyecta en el cromatógrafo de líquidos una mezcla de patrones de ceras con objeto de determinar el tiempo de elución de dichos compuestos. Posteriormente, se inyecta la muestra de aceite vegetal previamente preparada, a la que se ha
15 añadido un patrón interno en una concentración lo suficientemente alta como para ser detectada en cromatografía de líquidos. Con este fin, se habrá seleccionado la columna a utilizar y se habrán optimizado los parámetros de la técnica (disolventes, temperatura, flujos, etc.) que permitan obtener
20 una buena separación cromatográfica entre las ceras y el resto de componentes del aceite vegetal, particularmente, los triglicéridos.

 Finalmente, se aumenta hasta el 100% la proporción del
25 eluyente más polar, manteniéndolo durante un tiempo suficiente para asegurar la eliminación total de los triglicéridos y otros constituyentes del aceite de la columna cromatográfica. A partir del cromatograma obtenido se fija el tiempo de elución de las ceras y la fracción de líquidos a transferir al
30 cromatógrafo de gases.

 Para llevar a cabo el análisis de ceras en aceites vegetales propiamente dicho, se procede a inyectar la muestra de aceite vegetal previamente preparada en la columna del

cromatógrafo de líquidos, tal y como se ha señalado. A continuación, dicha muestra se eluye de la columna de modo que se transfiera a cromatografía de gases la fracción determinada previamente que contiene las ceras del aceite vegetal. En una
5 realización particular del procedimiento de la invención, el eluyente empleado en la cromatografía líquida se selecciona de entre n-hexano, acetato de etilo, metilintercbutiléter, éter dietílico, n-heptano, n-pentano, isooctano, ciclohexano, ciclopentano, tetracloruro de carbono, tolueno, diclorometano,
10 cloroformo, tetrahidrofurano, acetato de metilo y mezclas de los mismos. En una realización preferida, el disolvente empleado en la etapa (a) es una mezcla de hexano y acetato de etilo. El experto en la materia determinará la proporción adecuada de cada eluyente.

15

El caudal al cual se produce la transferencia puede ser diferente al caudal de elución de la etapa de cromatografía de líquidos.

20

Para proceder a dicha transferencia, la columna del cromatógrafo de líquidos se conecta directamente a la válvula de seis vías de la interfase TOTAD mediante un tubo y la válvula de seis vías se conecta mediante un tubo capilar al interior del tubo de vidrio de la interfase TOTAD, de forma que
25 se introduzca una longitud mayor que el extremo de la columna capilar que se introduce por este mismo extremo.

30

El interior del tubo de la interfase, normalmente un tubo de vidrio o de cuarzo, está relleno con un material de retención de una determinada longitud y sujeto por ambos extremos para impedir su desplazamiento. Dicho material de retención puede ser cualquier material de relleno, adsorbente o absorbente, del estado de la técnica que retenga las ceras y que permita el paso del gas portador utilizado en el

cromatógrafo de gases y del eluyente utilizado en el cromatógrafo de líquidos. De este modo, el material de relleno retiene a las ceras y el eluyente es eliminado, tanto en estado líquido como en estado de vapor, arrastrado por la corriente de gas a través del tubo conectado al extremo opuesto del tubo de vidrio. Durante la etapa de retención de las ceras se introducen flujos de gas controlados por ambas entradas de gas de la interfase TOTAD. Una vez eliminado el disolvente, las ceras se desorben térmicamente. Durante esta etapa de desorción, el flujo controlado de gas entra exclusivamente por la entrada convencional de gas en un inyector con temperatura programada (PTV) y este flujo de gas arrastra a las ceras desorbidas conduciéndolas a la columna del cromatógrafo de gases donde tiene lugar el análisis cromatográfico. El control de los tiempos de apertura y cierre de las diferentes válvulas de abrir y cerrar y de la válvula de seis vías, que forman parte de la interfase TOTAD, así como de los flujos de gas por ambas entradas de gas de la interfase TOTAD, es fundamental para el correcto funcionamiento del procedimiento de análisis.

20

En la etapa (a), por tanto, la muestra de aceite vegetal previamente preparada se somete a cromatografía líquida de alta eficacia en fase normal, para lo cual se inyecta en el cromatógrafo de líquidos y el flujo del eluyente se mantiene en el valor fijado con anterioridad hasta que comienza la elución de las ceras. En ese momento, se puede cambiar el flujo con el fin de mejorar la retención de las ceras en el material inerte de relleno y se mantiene dicho flujo hasta que termina la etapa de transferencia.

30

Por último, en la etapa (b) la fracción eluida de la cromatografía de líquidos de la etapa (a) se somete a cromatografía de gases. Para ello, al cromatógrafo de gases se acopla un detector adecuado de modo que se obtiene un

cromatograma de la fracción de las ceras que se ha transferido al mismo. En una realización particular del procedimiento de la invención, el sistema de detección del cromatógrafo de gases es un detector seleccionado entre un detector de ionización de llama (FID) y un espectrómetro de masas.

Durante el análisis se distinguen cuatro etapas en el funcionamiento de la interfase:

1) Estabilización: Antes de iniciar la inyección, se estabiliza la interfase TOTAD a la temperatura a la que se va a llevar a cabo la transferencia, que debe ser la adecuada para que las ceras queden retenidas en el material que rellena el tubo interior de la interfase TOTAD, al tiempo que se elimina el disolvente. El gas circula a través de dicho tubo en modo adsorción. El eluyente procedente del cromatógrafo de líquidos es enviado al desecho.

2) Transferencia: Cuando el principio de la fracción que contiene las ceras alcanza la válvula de seis vías, esta cambia su posición automáticamente. Al mismo tiempo, se puede modificar el flujo de la cromatografía de líquidos. El flujo de gas que atraviesa el material inerte de relleno empuja al eluyente procedente del cromatógrafo de líquidos a través del mismo en el que las ceras son retenidas, mientras que el eluyente es eliminado, total o parcialmente evaporado, por el tubo de salida.

3) Eliminación de los restos del disolvente: Una vez que la etapa de transferencia ha finalizado, la válvula de seis vías cambia automáticamente su posición, con lo que el eluyente procedente del cromatógrafo de líquidos se envía al desecho. Al mismo tiempo se eliminan los restos de eluyente que se encuentran en el interior del tubo de la interfase TOTAD y en

el capilar por el que ha circulado el eluyente desde la válvula de seis vías hasta dicho tubo. Estas condiciones se mantienen el tiempo necesario para que la eliminación del disolvente sea tal que el remanente no interfiera en la cromatografía de gases.

4) Desorción térmica: Pasado el tiempo necesario para la eliminación del eluyente, las electroválvulas de apertura y cierre, que forman parte de la interfase TOTAD, se cierran. Se cierra también la entrada de flujo de helio por la entrada que atraviesa el material inerte de relleno, y se modifica el flujo por la otra entrada al valor adecuado, de modo que la interfase funciona en modo de desorción. En este momento se calienta rápidamente el inyector hasta la temperatura necesaria para producir la desorción térmica de las ceras, que son arrastradas por la corriente de helio a la columna cromatográfica de gases, donde tiene lugar el análisis cromatográfico en las condiciones previamente programadas.

Las ventajas que presenta el procedimiento de la invención son las siguientes:

- El procedimiento de la invención permite el análisis de ceras en muestras de aceites vegetales sin más tratamiento previo de la muestra que una filtración, una vez añadidos el patrón interno y el diluyente adecuados.
- El procedimiento de la invención no requiere el empleo de cantidades elevadas de disolventes orgánicos perjudiciales para la salud del analista y para el medio ambiente.
- El procedimiento de la invención solo necesita manipulación de la muestra por parte del analista en la etapa filtración, por lo que reduce los errores y contaminaciones causados en dicha manipulación.
- El procedimiento de la invención incluye una etapa de

análisis que es totalmente automática, por lo que es especialmente adecuado para el análisis de ceras en controles de rutina.

5 - El procedimiento de la invención permite la inyección en el sistema cromatográfico de volúmenes de extracto superiores a los habitualmente inyectados en cromatografía de gases, que pueden ser variables, lo que da lugar a un aumento de la sensibilidad y a una mejora de los límites de detección.

10 - El procedimiento de la invención permite utilizar numerosas veces el tubo interior de la interfase TOTAD relleno del material inerte, sin que tenga que ser sustituido en cada determinación analítica.

15 - En el procedimiento de la invención no se produce el deterioro del sistema de cromatografía de gases causado por la transferencia de componentes lipídicos de la muestra ya que, en la etapa de cromatografía de líquidos, las ceras se eluyen antes que los lípidos.

20 - En el procedimiento de la invención no se produce el deterioro del sistema de cromatografía de gases causado por la introducción en el mismo de disolventes agresivos para el mismo ya que éstos son previamente eliminados en la interfase.

25 - El procedimiento de la invención permite utilizar diferentes sistemas de detección en cromatografía de gases.

- El tiempo total del análisis por el procedimiento de la invención es significativamente menor que el tiempo que se requiere cuando se utiliza el método convencional.

30

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Análisis de ceras en diversos aceites vegetales comestibles: aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de palma y mezclas.

Materiales

5 Algunos de los aceites fueron suministrados por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, España; (**VG 238**, 100% de aceite de oliva lampante, **BL 597**, 60% de aceite de oliva virgen y 40% de aceite de girasol virgen **RF 429**, 80% de aceite de oliva refinado y 20% de aceite de palma, 10 **PM 371**, 100% de aceite de orujo de oliva refinado). Estos aceites son materiales de referencia certificados que se obtuvieron mediante el estudio de certificación "*Campaña InterOLEO-MRC 2006*", organizado por la Unidad de Cualimetría y Metrología (CMQ) del Departamento de Química Analítica de la 15 Universidad de Granada (España). Otros aceites fueron comprados en el mercado (aceite de oliva virgen, aceite de oliva refinado, aceite de girasol virgen, aceite de girasol refinado).

20 Los patrones de las ceras C32 y C40 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Steinheim-Alemania), y el de la cera C36 fue obtenido de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg-Alemania).

25 El heptano usado para diluir el aceite y el hexano y el acetato de etilo usados como fase móvil, todos de grado HPLC, fueron obtenidos de LabScan (Dublin, Irlanda).

30 Como material adsorbente dentro de la camisa de vidrio en la interfase se usó Tenax TA, 80-100 mesh (Chrompack, Middelburg, Holanda). En la camisa de vidrio se colocó 1 cm de Tenax TA, sujeto a ambos lados por lana de vidrio, y éste se acondicionó bajo una corriente de helio, aumentando la temperatura desde 50 °C hasta 350 °C a 50 °C/10 min y manteniendo esta temperatura final durante 60 minutos.

Preparación de la muestra

Se pesaron 500 mg de las diferentes muestras de aceite y se fortificaron con 0,5 mg del patrón interno araquidato de laurilo (C32) (Sigma-Aldrich), cuando se analizó aceite de orujo de oliva refinado, y con 0,1 mg en el caso de los otros aceites. El aceite de orujo de oliva refinado se diluyó con 30 ml de heptano, y las otras muestras con 10 ml de heptano y después se filtraron a través de un filtro de 0,22 μm (Chromatography Research Supplies, Inc).

10

Instrumentación

Los análisis se realizaron usando un equipo LC-GC con acoplamiento en línea mediante la interfase TOTAD (Patente en EE.UU. 6,402,947 B1 (licenciada a la empresa KONIK-Tech, Sant Cugat del Vallés, Barcelona).

15

El sistema HPLC (modelo Konik 550) estaba compuesto por una bomba cuaternaria, un horno de columna, un inyector automático Konik Robokrom con un volumen de lazo de 20 μl y un detector de índice de refracción (RI) (KONIK RID-560). El cromatógrafo de gases (Konik modelo HRGC 4000B) se equipó con una interfase TOTAD y un detector FID. El software usado para obtener y procesar los datos de LC y GC, así como para automatizar el proceso fue KoniKrom Plus 8519 (Konik, Sant Cugat Del Vallés, Barcelona).

20

25

Condiciones de LC

La preseparación en LC se llevó a cabo en una columna de 250 x 4 mm de diámetro interno empaquetada con sílice modificada (Lichrospher 5 μm Si 60, Hichrom, Berks, Reino Unido) mantenida a 25 °C. Se usó como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo.

30

Para determinar el tiempo de elución de la fracción que se iba a transferir al GC, se inyectaron 20 μ l de distintas disoluciones patrón de las ceras.

5 Las disoluciones patrón se prepararon mediante dilución con diferentes volúmenes de heptano de los patrones cuya concentración era de 1.000 ppm. Así, a partir de estos patrones se prepararon disoluciones patrón de 3,3 ppm cada una de las ceras C32, C36 y C40.

10

La composición inicial del eluyente (hexano/acetato de etilo; 95:5 (v/v)) a un flujo de 0,5 ml/min se mantuvo durante 9 minutos, después se varió el gradiente hasta alcanzar el 100% de acetato de etilo en 1 min y se mantuvo 20 min para asegurar la completa eliminación de los triglicéridos. El detector RI experimentó una diferencia de ángulo de incidencia y de ángulo de refracción proporcional a la concentración y a la diferencia del índice de refracción entre el eluyente (hexano/acetato de etilo; 95:5 (v/v)) y los analitos.

20

En el análisis de las muestras, se inyectaron 20 μ l de las muestras preparadas tal y como se ha indicado. La composición del eluyente 95:5 (v/v) se mantuvo constante durante la elución de la fracción de interés y durante la etapa de transferencia. Tras la transferencia, el flujo se aumentó a 2 ml/min y el gradiente cambió a 100% de acetato de etilo en 1 min y se mantuvo durante 20 min para asegurar la completa eliminación de los triglicéridos.

30 **Transferencia LC-GC**

Durante las cuatro etapas de operación de la interfase TOTAD, las condiciones usadas fueron las siguientes:

◇ Estabilización. La interfase y el horno del cromatógrafo de

gases se estabilizaron a 150 °C y 80 °C, respectivamente. El helio, utilizado como gas portador, entraba en la camisa de vidrio tanto por el lado del horno, como por el lado opuesto a un flujo de 500 ml/min.

5 ◊ Transferencia. El extracto se introdujo en la válvula de inyección. Cuando los compuestos de interés llegaron a la válvula de seis vías, ésta giró automáticamente, transfiriéndose las ceras al GC. El caudal de transferencia utilizado fue de 0,5 ml/min. El tiempo de transferencia fue de
10 2,66 minutos. El helio empujó el extracto a través del adsorbente quedando los analitos retenidos y el disolvente enviado al desecho.

◊ Eliminación de los restos de disolvente. Una vez que la fracción de interés fue transferida, la válvula de seis vías
15 volvió a girar automáticamente de manera que la fase móvil que provenía del HPLC se envió de nuevo al desecho. El disolvente que permanecía en el tubo de transferencia también fue empujado al desecho por el helio. La temperatura de interfase TOTAD se aumentó de 150 °C a 185 °C y se mantuvo durante 2,9 min para
20 asegurar la total eliminación del disolvente restante y para eliminar cualquier impureza que pudiera quedar en el adsorbente y en el tubo de transferencia.

◊ Desorción térmica. Después de la eliminación del disolvente, se cerraron las válvulas de apertura y cierre de la interfase.
25 Se interrumpió el flujo de helio que atravesaba el adsorbente y se cambió la presión por la otra entrada hasta alcanzar una presión por cabeza de columna de 0,23 MPa (34 psig). El PTV se calentó rápidamente hasta 350 °C, manteniéndose esta temperatura durante 5 minutos para asegurar la desorción de los
30 solutos retenidos, que son transferidos a la columna de cromatografía de gases.

Terminado el análisis, las válvulas y los flujos de helio

volvieron a las condiciones iniciales de estabilización, y la interfase se calentó a 350 °C bajo una corriente de helio durante 5 minutos para su limpieza, de modo que se pudiera efectuar un nuevo análisis tras volver a las condiciones
5 iniciales de temperatura (150 °C).

Condiciones de GC

Para la separación en el cromatógrafo de gases, se empleó una columna de 15 m x 0,25 mm d.i. de sílice fundido recubierto
10 de 5% Fenil Metil Silicona (0,25 µm de espesor de film) (Quadrex, Weybridge, Reino Unido).

Durante las etapas de transferencia y de eliminación del disolvente la temperatura del horno fue de 80 °C. Durante el
15 análisis, la temperatura del horno se mantuvo a 80 °C durante 1 minuto, se aumentó a 20 °C/min hasta 325 °C, 5 min y, finalmente, se aumentó a 20 °C/min hasta 335 °C, 15 min. La temperatura del detector FID se mantuvo a 350 °C. Se usó helio como gas portador a una presión de 0,23 MPa (34 psig).

20

Duración y repetibilidad

Se evaluó la duración del análisis y la precisión obtenida cuando se analizó una muestra de 100% de aceite de oliva lampante (muestra certificada **VG 238**) mediante el procedimiento
25 de la invención.

Las ceras fueron eluidas del LC en un periodo de tiempo entre 3,5 y 6,16 min y la transferencia de esta fracción se llevó a cabo en 2,66 min. Las ceras fueron eluidas del GC en
30 unos 24 min, y el análisis completo duró algo menos de 1 hora. Es decir, el tiempo total de análisis fue significativamente menor que el del método oficial, que es del orden de 3 horas si se contabiliza el tiempo de preparación de la muestra (con la etapa de cromatografía líquida en columna clásica de sílice) y

de análisis por cromatografía de gases.

En la **Figura 1** se muestra el cromatograma de gases obtenido. Como puede verse, este es bastante claro considerando que se usó un detector FID. Los picos de las ceras, caracterizadas por su número total de átomos de carbono, se pudieron identificar fácilmente en función de sus tiempos de retención, relacionados con los tiempos de retención de las ceras C32 y C40 según el método oficial de la Unión Europea (Reglamento CE N° 702/2007). Las determinaciones cuantitativas se obtuvieron basadas en el patrón interno C32. Así en la Figura 1 se observan los siguientes picos: C32 (1), C40 (2), C42 (3), C44 (4) y C46 (5).

Por otro lado, la **Tabla 1** muestra los coeficientes de variación (CV) para los tiempos de retención, las áreas absolutas de los picos y las concentraciones obtenidos tras realizar 5 análisis consecutivos de dicha muestra de 100% de aceite de oliva lampante.

Tabla 1. Coeficientes de variación (CV) para los tiempos de retención (Tr), áreas absolutas de los picos y concentraciones obtenidos en el análisis de las ceras de un aceite de oliva lampante diluido en heptano (n=5).

	CV (%)		
	Tr	Área	Concentración
C32	0,08	5,28	
C40	0,18	5,70	2,80
C42	0,23	6,42	4,84
C44	0,28	4,96	2,36
C46	0,30	4,66	2,11

Como puede verse, no se observó variabilidad en los tiempos de retención (CV entre 0,08 y 0,30). Para las áreas absolutas

bajo los picos los coeficientes de variación fueron inferiores al 6,5%. Finalmente, los coeficientes de variación para las concentraciones calculadas a partir del patrón interno fueron inferiores al 5%. Estos resultados se pueden considerar muy buenos, teniendo en cuenta que se corresponden con los del análisis total. Se confirma así que el procedimiento de la invención presenta una alta repetibilidad.

Comparación de los datos de concentraciones de ceras en aceites vegetales obtenidos mediante el procedimiento de la invención y los obtenidos mediante el método oficial.

Se determinó la concentración de ceras en cuatro aceites vegetales comestibles mediante el procedimiento de la invención: **PM 371** (100% de aceite de orujo de oliva refinado), **VG 238** (100% de aceite de oliva lampante), **RF 429** (80% de aceite de oliva refinado y 20% aceite de palma) y **BL 597** (60% de aceite de oliva virgen y 40% de aceite de girasol virgen). Dicha concentración se comparó con la concentración de cuatro muestras certificadas, que se obtuvo como la media de los resultados analíticos del estudio de certificación entre laboratorios llevado a cabo por 14 laboratorios seleccionados entre los acreditados por el Consejo Internacional del Aceite de Oliva (International Olive Oil Council, IOOC). Se aplicaron los métodos de análisis del aceite de oliva oficiales descritos en el Reglamento CE N° 2568/91 y sus posteriores modificaciones (Reglamento CE N° 1989/2003).

La **Tabla 2** muestra los resultados obtenidos en ambos casos y las diferencias entre estos valores.

Tabla 2. Concentraciones en mg/kg calculadas como medias de concentraciones e incertidumbre para el contenido total de ceras siendo K=2 (El valor de incertidumbre se encuentra entre paréntesis).

ES 2 390 034 A1

	PM 371			VG 238			RF 429			BL 597		
	Inv.	UE	%	Inv.	UE	%	Inv.	UE	%	Inv.	UE	%
C40	706,2	656	7,6	55	52,1	5,6	68,6	68	0,9	42	50	16
C42	1125,8	1146,3	1,8	94,3	90,4	4,3	70,4	68	3,5	40,8	43,5	5,1
C44	831,1	810	2,6	104,8	101	3,8	67,4	66,9	0,8	18,1	18	0,6
C46	209,6	194	8,1	31,4	31	1,3	30,7	33	7,0	14,6	16	9,1
Total	2872,7	2800	2,6	285,5	270	5,8	237,1	230	3,1	115,5	118	2,1
	(97)	(150)		(17)	(17)		(2)	(41)		(5)	(30)	

Inv. = Concentración determinada mediante el procedimiento de la invención.

UE = Concentración determinada mediante el método oficial.

5 Los valores muestran buena concordancia tanto para el contenido individual de las ceras como para el contenido total (suma de ceras de C40 a C46). La diferencia entre las ceras individuales es inferior al 10%, variando entre el 0,6 y el 9,1%, excepto para C40 en la muestra **BL597** que es del 16%. No
10 obstante, según el certificado de análisis, los datos para algunas ceras individuales no son muy fiables debido a: (i) el escaso número de resultados; (ii) un valor paramétrico bajo; (iii) una alta desviación de los datos o (iv) una incertidumbre final superior al 25%. Los datos de los valores certificados
15 para las ceras individuales no se dan junto con su correspondiente incertidumbre, sino que esta se da sólo para el valor total de las ceras. Como puede verse en la Tabla 2 para el contenido total de ceras, la diferencia entre los valores certificados y los valores obtenidos mediante el procedimiento
20 de la invención es inferior al 6%. Igualmente, la incertidumbre para estos últimos es siempre igual o inferior a la incertidumbre dada para los valores certificados.

Así pues, los datos de concentraciones de ceras en aceites
25 vegetales obtenidos mediante el procedimiento de la invención

son comparables a los obtenidos mediante el método oficial.

Determinación cuantitativa de ceras en cuatro aceites vegetales comestibles comerciales

5 Se determinó la concentración de ceras (C40-C46) para cuatro aceites vegetales comestibles comerciales diferentes: aceite de oliva virgen (AOV), aceite de oliva refinado (AOR), aceite de girasol virgen (AGV) y aceite de girasol refinado (AGR). Los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

10

Tabla 3. Concentraciones en mg/kg de diferentes aceites vegetales comestibles comerciales

CERA	AOV	AOR	AGV	AGR
C32				
C40	29,06	48,09	16,68	80,20
C42	28,49	72,31	70,74	64,21
C44	20,31	80,31	17,05	35,39
C46	13,14	45,24		
CERAS TOTALES	91,00	245,95	103,47	179,80

15 Como puede observarse, las concentraciones de las ceras fueron mayores para los aceites refinados que para los aceites vírgenes, tal y como se esperaba.

20 La **Figura 2** muestra el cromatograma de gases obtenido para el aceite de oliva virgen (a) y para el aceite de oliva refinado (b), donde se observa que el área de los picos correspondientes a cada cera es mayor para el caso del aceite refinado, lo que permite detectar posibles adulteraciones.

25 El procedimiento de la invención, por tanto, permite el análisis automático, rápido y sencillo de ceras en aceites

vegetales comestibles. Los contenidos de ceras obtenidos por el procedimiento de la invención fueron similares a los dados como valores certificados por el estudio de certificación entre laboratorios llevado a cabo por 14 laboratorios seleccionados
5 entre los acreditados por el Consejo Internacional del Aceite de Oliva (International Olive Oil Council, IOOC). Dado que el número de operaciones necesario es reducido, la aplicación del procedimiento de la invención puede ser muy útil en análisis de rutina.

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para analizar ceras en un aceite vegetal caracterizado porque comprende las etapas de:

5

(a) someter la muestra de aceite vegetal a cromatografía líquida de alta eficacia en fase normal para separar la fracción de ceras; y

10

(b) someter la fracción eluida obtenida en la etapa (a) a cromatografía de gases;

caracterizado porque se emplea un inyector automático para inyectar la muestra de aceite vegetal en el cromatógrafo de líquidos, porque en la cromatografía líquida de la etapa (a) se emplea un detector de índice de refracción y porque el acoplamiento entre la cromatografía líquida y la cromatografía de gases se efectúa mediante la interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption).

20

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el aceite vegetal es un aceite vegetal comestible.

25

3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el aceite vegetal comestible se selecciona de entre aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de palma, aceite de soja, aceite de cacahuete, aceite de pistacho, aceite de almendra, aceite de colza, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de sésamo, aceite de avellana, aceite de nuez, aceite de pepita de uva, aceite de arroz, aceite de maíz, aceite de lino, aceite de cártamo, aceite de cáñamo, aceite de semillas de calabaza, y mezclas de los mismos.

30

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado

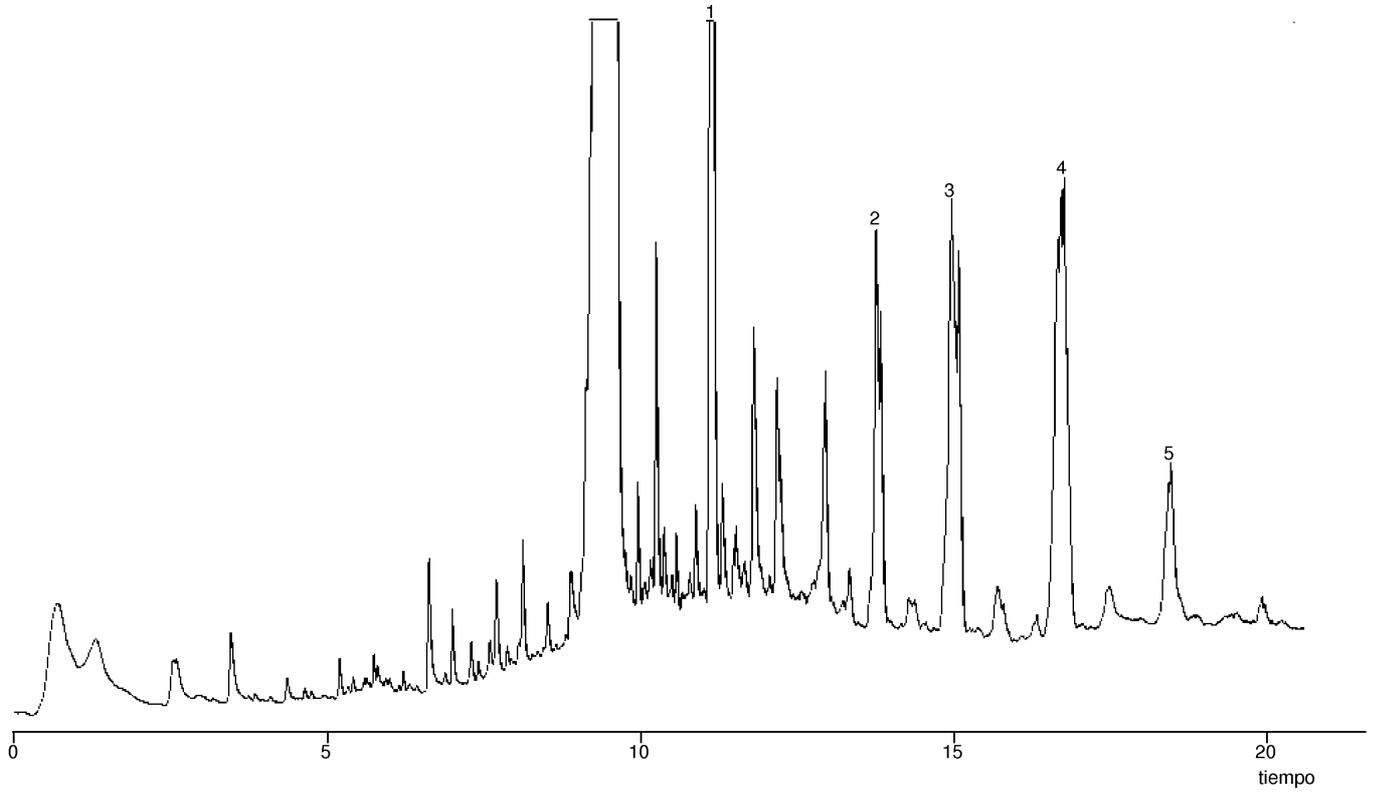
porque el aceite vegetal es aceite de oliva.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el eluyente empleado en la cromatografía líquida de la etapa (a) se selecciona de entre n-hexano, acetato de etilo, metiltercbutiléter, éter dietílico, n-heptano, n-pentano, isooctano, ciclohexano, ciclopentano, tetracloruro de carbono, tolueno, diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, acetato de metilo y mezclas de los mismos.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque el eluyente empleado en la cromatografía líquida de la etapa (a) es una mezcla de hexano y acetato de etilo.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una etapa de preparación de la muestra de aceite vegetal previa a la etapa (a), que comprende: (i) añadir un patrón interno a la muestra de aceite vegetal; (ii) diluir esta mezcla en un disolvente orgánico; y (iii) filtrar la mezcla diluida.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el sistema de detección del cromatógrafo de gases es un detector seleccionado de entre un detector de ionización de llama y un espectrómetro de masas.



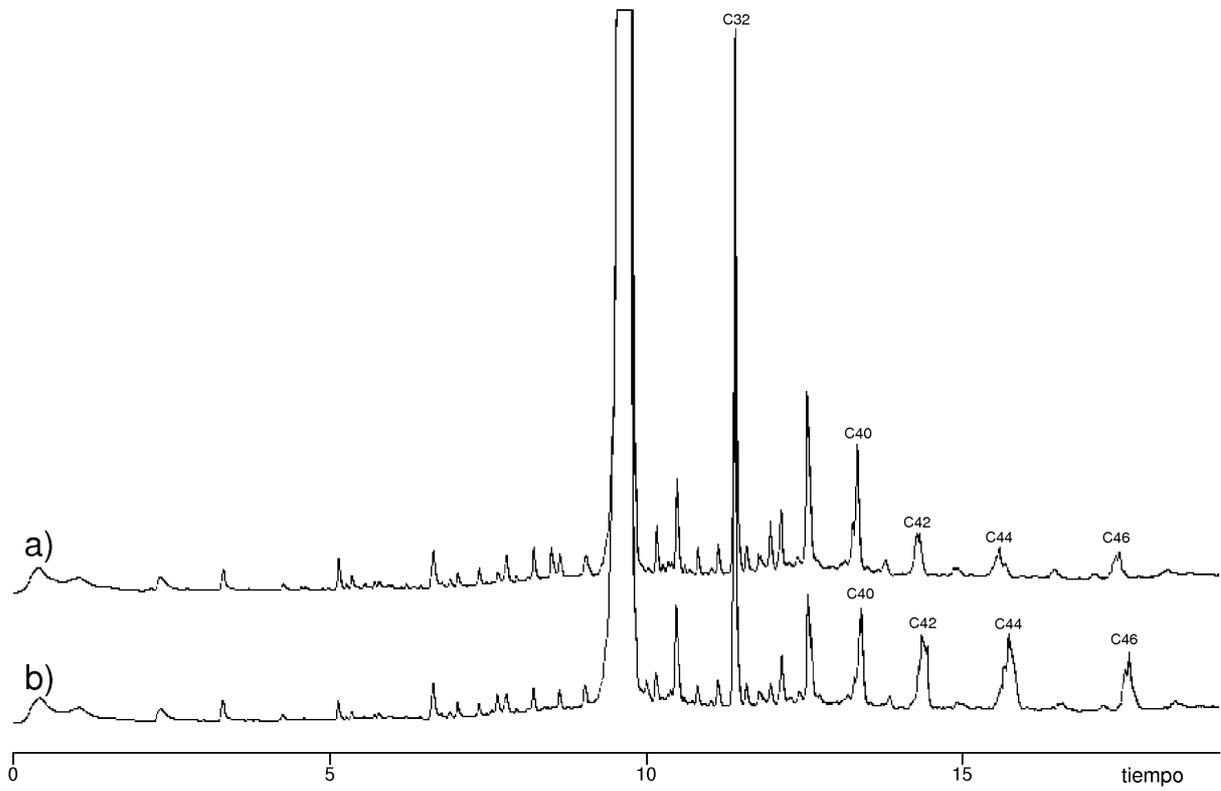


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031186

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.07.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N30/02** (2006.01)
G01N33/03 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CORTES J.M. et al. Large volume gc injection for the analysis of organophosphorus pesticides in vegetables using the Through Oven Transfer Adsorption Desorption (TOTAD) interface. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. doi: 10.1021/jf0524675. Todo el artículo	1-8
A	EP 1935467 A2 (UNIV CASTILLA LA MANCHA) 25.06.2008, párrafos 13-20; resumen.	1-8
A	ES 2222795 A1 (UNIV DE CASTILLA LA MANCHA ULC) 01.02.2005, resumen; descripción; reivindicaciones.	1-8
A	APARICIO R. et al. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC. 31.05.2000. Todo el artículo.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.10.2012

Examinador
I. Abad Gurumeta

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, NPL, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CORTES J.M. et al. Large volume gc injection for the analysis of organophosphorus pesticides in vegetables using the Through Oven Transfer Adsorption Desorption (TOTAD) interface. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. doi: 10.1021/jf0524675. Todo el artículo	2006
D02	EP 1935467 A2 (UNIV CASTILLA LA MANCHA)	25.06.2008
D03	ES 2222795 A1 (UNIV DE CASTILLA LA MANCHA ULC)	01.02.2005
D04	APARICIO R. et al. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC.	31.05.2000

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere a un procedimiento para analizar ceras en un aceite vegetal, comestible y, en concreto, aceite de oliva (reivindicaciones 2-4). La muestra de aceite se somete a cromatografía líquida de alta eficacia en fase normal mediante un inyector automático para separar la fracción de ceras junto con un eluyente, mezcla de hexano y acetato de etilo (reivindicación 5-6), y la fracción eluida se somete a cromatografía de gases usando un detector de índice de refracción, un detector de ionización de llama o un espectrómetro de masas (reivindicación 8), y la interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption) se usa para el acoplamiento entre la cromatografía de líquidos y la de gases (reivindicación 1).

El D01 se refiere a un procedimiento de análisis con acoplamiento de cromatografía de líquidos en fase normal y gases usando la interfase TOTAD para analizar plaguicidas en vegetales.

El D01 se refiere a un procedimiento de análisis con acoplamiento de cromatografía de líquidos en fase normal y gases usando la interfase TOTAD para analizar plaguicidas en vegetales.

El D03 publica un método de análisis de residuos de plaguicidas en aceites vegetales usando la interfase TOTAD para el acoplamiento directo de la cromatografía de líquidos en fase inversa y la de gases.

El D04 se refiere al análisis de ceras en aceites vegetales por cromatografía de líquidos seguido de cromatografía de gases.

1. NOVEDAD (ART. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (ART. 8.1 Ley 11/1986)

Los documentos D01-D04 reflejan el estado de la técnica más cercano. Todos estos documentos, aunque muestran diversos procedimientos de análisis acoplado cromatografía de líquidos y de gases en ninguno de ellos se realiza del modo reivindicado en la presente solicitud para el análisis de ceras en aceites vegetales para determinar la calidad de los aceites.

Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-8 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con el Artículo 6.1 y 8.1 de la Ley 11/1986.