

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 364 565**

21 Número de solicitud: 201030281

51 Int. Cl.:

B01D 15/08 (2006.01)

B01D 15/18 (2006.01)

G01N 30/12 (2006.01)

G01N 30/88 (2006.01)

C07J 9/00 (2006.01)

A23D 9/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **26.02.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **07.09.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.09.2011

71 Solicitante/s: **Universidad de Castilla-La Mancha
Plaza de la Universidad, 2
Campus Universitario Pabellón de Gobierno
02071 Albacete, ES**

72 Inventor/es: **Cortés Simarro, José Manuel;
Toledano Torres, Rosa María;
Villén Altamirano, Jesús y
Vázquez Molini, Ana María**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

54 Título: **Procedimiento para analizar esteroides en aceites comestibles.**

57 Resumen:

Procedimiento para analizar esteroides en aceites comestibles.

La invención define un procedimiento para analizar los esteroides totales en aceites comestibles que comprende las etapas de:

(a) someter la fracción insaponificable del aceite a cromatografía líquida de alta eficacia para separar la fracción de esteroides;

(b) someter a la fracción de esteroides separada en la etapa (a) a una reacción de derivatización, y

(c) analizar la fracción de esteroides derivatizados obtenidos en (b) mediante cromatografía de gases;

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); y en el que la reacción de derivatización de la etapa (b) se efectúa en el material de retención comprendido en dicha interfase. Este procedimiento permite analizar esteroides totales en aceites de modo rápido, sencillo, reproducible, fiable y sin apenas manipulación de la muestra, realizando una etapa de derivatización en línea, con una repetibilidad satisfactoria.

ES 2 364 565 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para analizar esteroides en aceites comestibles.

5 **Campo de la invención**

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 esteroides en aceites comestibles.

10 **Antecedentes de la invención**

Los aceites vegetales están constituidos principalmente por triglicéridos (95-98%) y una mezcla compleja de compuestos minoritarios (2-5%) de diversa naturaleza química. El análisis de estos componentes minoritarios es esencial porque son usados como referencia para regulaciones oficiales de aceites comestibles y para el aseguramiento analítico de su calidad, origen, método de extracción y posible adulteración de los aceites (Grob, K.; Lanfranchi, M. & Mariani, C. Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 626-634).

La Unión Europea ha establecido límites legales (EEC 2568/91) en el contenido de ciertos componentes con el objetivo de evitar adulteraciones. Por ejemplo, el análisis de los diolcoholes triterpénicos, eritrodioleol y uvaol, es usado para distinguir entre aceites de oliva de diferentes calidades, como el obtenido por presión en frío (oliva virgen) y aceites extraídos con disolventes (Grob, K.; Biedermann, M. & Läubli, T. Determination of free erythrodiol in olive oil by coupled LC-GC. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1989**, *12*, 49-50). En aceites obtenidos por extracción con disolventes, la concentración de estos diolcoholes triterpénicos es mayor que en aceites obtenidos por presión. Es por ello que se ha establecido un límite legal para la suma de eritrodioleol y uvaol en aceite de oliva virgen. La fracción de esteroides se analiza normalmente para identificar una grasa o un aceite, para la detección de adiciones fraudulentas de aceites baratos a otros más caros (Grob, *et al.* **1989**, *supra*), para establecer diferentes calidades del mismo tipo de aceite (Blanch, G.P.; Villén, J. & Herraiz, M. Rapid analysis of free erythrodiol and uvaol in olive oils by coupled reversed phase liquid chromatography-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1027-1030) y para tipificar aceites de determinados orígenes geográficos (Rivera del Alamo, R.M.; Fregapane, G.; Aranda, F.; Gómez-Alonso, S. & Salvador, M.D. Sterol and alcohol composition of Cornicabra virgin olive oil: the campesterol content exceeds the upper limit of 4% established by EU regulations. *Food Chem.* **2004**, *84*(4), 533-537; Sánchez-Casas, J.; Osorio-Bueno, E.; Montaña-García, A.M. & Martínez-Cano, M. Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain). *Food Chem.* **2004**, *87*(2), 225-230).

Los métodos analíticos más empleados para el análisis de diferentes fracciones del aceite de oliva comprenden varias etapas: 1) Saponificación del aceite para eliminar triglicéridos; 2) Extracción con disolventes de la fracción insaponificable; 3) Fraccionamiento de la fracción insaponificable en varios grupos de compuestos por cromatografía en capa fina (TLC) o por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC); 4) Derivatización para obtener trimetilsililderivados; y 5) Análisis de los derivatizados por cromatografía de gases empleando columnas capilares apolares, en los que no hay un acoplamiento directo entre la cromatografía de líquidos (LC) y la cromatografía de gases (GC) (Lercker, G. & Rodríguez-Estrada, M.T. Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing foods. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 105-129). Estos métodos están descritos en diferentes regulaciones oficiales (Codex Alimentarius Commission Fats, oils and derivatives, issued by Joint FAO/WHO Food Standards Program, Rome, **1993**; Vol. 8, pp. 41-46; International Olive Oil Council. Norma comercial aplicable al aceite de oliva y al aceite de orujo de oliva. COI/ T. 20/ Documento nº 10, Madrid, Spain. **2001**).

Está ampliamente reconocido que estos métodos convencionales son tediosos, requieren mucho tiempo de dedicación del analista y pueden provocar la pérdida de analitos durante la manipulación, así como introducir sustancias que pueden interferir en el análisis. El acoplamiento directo LC-GC es una técnica que combina la elevada eficiencia de la separación por HPLC, que se emplea como etapa de preparación de la muestra, sustituyendo las etapas de extracción y limpieza, con el alto poder de separación y la elevada sensibilidad de la etapa de cromatografía de gases (Grob, K. On line coupled LC-GC. Hühlig, Heidelberg. **1991**; Vreuls, J.J.; De Jong, G.J.; Ghijsen, R.T. & Brinkman, U.A.Th. Liquid chromatography coupled on-line with gas chromatography: state of the art. *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 306-327; Mondello, L.; Dugo, G. & Bartle, K.D. In-line microbore high performance liquid chromatography-capillary gas chromatography for food and water analyses. A review. *J. Microcol. Sep.* **1996**, *8*, 275-310; Dugo, P.; Dugo, G. & Mondello, L. On-line coupled LC-GC: Theory and application. *LC-GC Europe* **2003**, *16*, 35-43). Esta técnica elimina casi todo el trabajo manual, lo que permite que un analista lleve a cabo un mayor número de determinaciones en menos tiempo, y disminuye sustancialmente la probabilidad de introducir sustancias que pudieran interferir durante la preparación de la muestra.

Grob y colaboradores propusieron métodos de análisis de componentes minoritarios en aceites comestibles mediante acoplamiento directo LC-GC (Grob, K.; Lanfranchi, M. & Mariani, C. Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 626-634; Grob *et al.* **1989**, *supra*; Grob, K.; Lanfranchi, M.; Mariani, C. Determination of free sterols and esterified sterols and wax esters in olive oil by coupled liquid chromatography-gas chromatography. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1989**, *471*, 397-405; Grob, K.; Kaelin, I. & Artho, A. Coupled LC-GC: The capacity of silica gel HPLC columns for retaining fat. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1991**, *14*, 373-376). En estos métodos, la etapa de LC se lleva a cabo en fase normal y los analitos son

previamente derivatizados. El aceite así derivatizado se inyecta, filtrado y diluido, en el sistema LC-GC, en el que los analitos son separados del resto de los componentes del aceite en la etapa de LC, y transferidos a GC, en el que se lleva a cabo su determinación.

5 La interfase empleada en estos métodos, basada en el empleo de un capilar sin fase en el que se produce la eliminación del disolvente (eluyente de LC) y la retención de los analitos, no permitía emplear fase inversa en la etapa de LC debido a la elevada tensión superficial y al elevado volumen de vapor por unidad de volumen de líquido de los disolventes polares empleados en HPLC en fase inversa (Cercaci, L.; Rodríguez-Estrada, M.T. & Lercker, G. Solid-phase extraction-thin-layer chromatography-gas chromatography method for the detection of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols. *J. Chromatogr. A* **2003**, 985, 211-220; Villén, J.; Blanch, G.P.; Ruiz del Castillo, M.L. & Herraiz, M. Rapid and simultaneous analysis of free sterols, tocopherols and Squalene in edible oils by coupled reversed phase liquid chromatography-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1419-1422).

15 Herraiz y colaboradores desarrollaron métodos de análisis de estas fracciones por acoplamiento directo LC-GC en el que la etapa de LC se llevaba a cabo en fase inversa (RPLC-GC), empleando como interfase un inyector PTV. Publicaron tres artículos presentando un método de análisis de esteroides (Señoráns, F.J.; Tabera, J. & Herraiz, M. Rapid separation of free sterols in edible oils by on-line coupled reversed phase liquid chromatography-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 3189-3192), de alcoholes triterpénicos (Blanch, **1998**, *supra*) y de esteroides, tocoferoles y escualeno en una misma determinación cromatográfica (Villén, **1998**, *supra*). El empleo de un inyector PTV como interfase permitió llevar a cabo el acoplamiento RPLC-GC, pero hacía necesario desconectar y conectar la columna de GC en cada análisis, lo que impedía su automatización.

El grupo de investigación cuyos componentes son los autores de la presente invención desarrolló una interfase para el acoplamiento directo LC-GC, que denominó interfase TOTAD en la literatura científica. La interfase TOTAD es un inyector con temperatura programable (PTV) ampliamente modificado que permite la inyección de grandes volúmenes de disolventes, polares o apolares, en cromatografía de gases capilar así como el acoplamiento en línea de cromatografía de líquidos, tanto en fase normal como en fase inversa, y cromatografía gaseosa. Se ha utilizado en el análisis de residuos de plaguicidas en agua por introducción de grandes volúmenes de muestra (Alario, J.; Pérez, M.; Vázquez, A. & Villén, J. Very Large Volume Sampling of Water in GC using the TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption) Interface for Pesticide Residue Analysis. *J. Chromatogr. Sci.*, **2001**, 39(2), 65-69) y en el análisis de residuos de plaguicidas en agua por acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases (Pérez, M.; Alario, J.; Vázquez A. & Villén, J. 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(8), 582-589; Pérez, M.; Alario, J.; Vázquez A. & Villén, J. Pesticide Residue Analysis by Off-Line SPE and On-Line Reversed Phase LC-GC using the Through Oven Transfer Adsorption/Desorption Interface. *Anal. Chem.* **2000**, 72(4), 846-852). Igualmente, se ha utilizado en el análisis de residuos de plaguicidas en aceite de oliva (Sánchez, R.; Vázquez, A.; Andini, J.C. & Villén, J. 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(1-2), 167-172; Sánchez, R.; Cortés, J.M.; Villén J. & Vázquez A. 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(4), 1255-1260 y Díaz-Plaza, E.M.; Cortés, J.M.; Vázquez, A. & Villén, J. 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(1-2), 145-150).

La interfase TOTAD se ha empleado también para el análisis de componentes minoritarios de aceites comestibles (Cortés, J.M.; Sánchez, R.; Villén, J. & Vázquez, A. Analysis of unsaponifiable compounds of edible oils by automated on-line coupling reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54(19), 6963-6968). Como se recoge en este artículo, es posible analizar esteroides libres, escualeno, y eritrodol y uvaol en un sólo análisis, o bien analizar esteroides libres junto con tocoferoles, o bien escualeno, eritrodol y uvaol. No se necesita otra preparación previa de la muestra que una simple filtración del aceite como la que se realiza previamente a la inyección de cualquier muestra en LC. La muestra se inyecta en LC. En esta etapa se separan los compuestos minoritarios del aceite de los triglicéridos. La fracción en la que se eluyen los compuestos de interés es transferida a GC, empleando para ello la interfase TOTAD. En la interfase se elimina el disolvente que ha sido empleado como eluyente en LC (metanol:agua) y se retienen los analitos, que son posteriormente transferidos a la columna de GC. Se emplea un detector de ionización de llama. El método es totalmente automático: la muestra se inyecta en LC y, en menos de 60 minutos, se obtiene el cromatograma de GC y el sistema está preparado para un nuevo análisis.

No obstante, el citado método analítico desarrollado por el grupo de investigación de la Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM) sólo permite la determinación de los esteroides libres, mientras que en el método oficial se determinan los esteroides totales, es decir, la suma de los esteroides libres y los esteroides esterificados.

65 Los presentes autores proponen ahora un método de análisis de esteroides totales en aceites comestibles que supone una disminución sustancial de la laboriosidad del método oficial. Dicho método consiste en llevar a cabo una etapa de obtención de la fracción insaponificable, mediante saponificación seguida de extracción de los insaponificables, por ejemplo. Este extracto, sin concentrar, se inyecta después en el sistema LC-GC y la derivatización de los esteroides se

ES 2 364 565 A1

lleva a cabo cuando estos se encuentran en el material de retención que se encuentra en el interior de la camisa de vidrio de la interfase TOTAD empleada en el acoplamiento directo LC-GC.

5 Dicha reacción de derivatización se produce en fase heterogénea, ya que el disolvente se elimina en la interfase antes de añadir el agente derivatizante. Sin embargo, en contra de lo que cabría esperar, la reacción se produce con un rendimiento cuantitativo, lo que resulta corroborado al desaparecer del cromatograma los picos correspondientes a los esteroides sin derivatizar, que son sustituidos por los picos correspondientes a los esteroides derivatizados. Además, la reacción es prácticamente instantánea, por lo que el tiempo total del análisis apenas se alarga un par de minutos al incorporar esta reacción. Otra ventaja del método es el bajo consumo tanto de muestra como de disolventes y de reactivo derivatizante. Por último, también hay que indicar que los resultados concuerdan con los datos de muestras de aceite certificadas, que han sido analizadas por numerosos laboratorios siguiendo el método oficial, permitiendo así el análisis rápido, económico y fiable de los esteroides totales.

15 Así pues, los presentes autores han desarrollado un procedimiento alternativo de análisis de los esteroides totales en aceites comestibles que es más rápido, sencillo, reproducible, fiable, con menos manipulación de la muestra, y que proporciona resultados cuantitativos coherentes con una repetibilidad satisfactoria.

20 Por otra parte, el procedimiento de la invención permite analizar otros componentes minoritarios de los aceites comestibles como son los dialcoholes triterpénicos y, en particular, el eritrodol y el uvaol. De este modo el procedimiento de la invención, además de las ventajas previamente mencionadas, es un método versátil adecuado para el control de adulteraciones de los aceites comestibles (para distinguir entre aceites de oliva de diferentes calidades o para detectar adiciones fraudulentas de aceites baratos a otros más caros, por ejemplo), así como para la tipificación de aceites de determinados orígenes geográficos o para el establecimiento de diferentes calidades del mismo tipo de aceite.

25 **Objeto de la invención**

La presente invención, por tanto, tiene por objeto proporcionar un procedimiento para analizar los esteroides totales en un aceite comestible.

30 **Descripción de las figuras**

35 La Figura 1a muestra el cromatograma de gases obtenido al analizar una muestra de aceite comestible, consistente en un 60% de aceite de oliva virgen y un 40% de aceite de girasol, mediante el procedimiento de la invención pero sin la etapa de derivatización.

La Figura 1b muestra el cromatograma de gases obtenido al analizar una muestra de aceite comestible, consistente en un 60% de aceite de oliva virgen y un 40% de aceite de girasol, mediante el procedimiento de la invención.

40 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona un procedimiento para analizar los esteroides totales en un aceite comestible, en adelante "procedimiento de la invención", que comprende las etapas de:

- 45 (a) someter la fracción insaponificable del aceite a cromatografía líquida de alta eficacia para separar la fracción de esteroides;
- (b) someter a la fracción de esteroides separada en la etapa (a) a una reacción de derivatización, y
- 50 (c) analizar la fracción de esteroides derivatizados obtenidos en (b) mediante cromatografía de gases;

55 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); y en el que la reacción de derivatización de la etapa (b) se efectúa en el material de retención comprendido en dicha interfase.

60 La cromatografía líquida de alta eficacia puede efectuarse en fase normal o en fase inversa, si bien es preferible llevarla a cabo en fase normal para facilitar la derivatización posterior, ya que los reactivos derivatizantes se descomponen en presencia de agua.

En una realización particular del procedimiento de la invención, la fracción insaponificable del aceite se obtiene mediante las etapas de:

- 65 (i) saponificar el aceite comestible mediante la adición de una base;
- (ii) someter el producto de reacción de la etapa (i) a extracción con disolventes para separar la fracción insaponificable.

ES 2 364 565 A1

Así pues, en una realización preferida del procedimiento de la invención, este comprende las siguientes etapas:

- (1) saponificar el aceite comestible mediante la adición de una base;
- 5 (2) someter el producto de reacción de la etapa (1) a extracción con disolventes para separar la fracción insaponificable;
- (3) someter el extracto obtenido en la etapa (2) a cromatografía líquida de alta eficacia en fase normal;
- 10 (4) someter el extracto eluido obtenido en la etapa (3) a derivatización en línea mediante la adición de un reactivo derivatizante, y
- (5) someter los componentes derivatizados en la etapa (4) a cromatografía gaseosa;

15 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), al igual que la derivatización, que tiene lugar en el material de retención comprendido en la misma.

20 Los aceites comestibles que pueden ser analizados mediante el procedimiento de la invención con el fin de determinar su contenido en esteroides pueden ser cualquier aceite comestible conocido. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, el aceite comestible se selecciona de entre distintos materiales de referencia: aceite de oliva lampante (100%), mezcla de aceite de oliva refinado (aproximadamente un 80%) y aceite de palma (aproximadamente un 20%), aceite de orujo refinado, y mezcla de aceite de oliva virgen extra (aproximadamente un 60%) y aceite de girasol (aproximadamente un 40%). En una realización preferida, el aceite comestible a analizar es una mezcla de
25 aceite de oliva virgen extra (aproximadamente un 60%) y aceite de girasol (aproximadamente un 40%).

Antes de llevar a cabo la etapa (a) se obtiene la fracción insaponificable del aceite. Así en una realización preferida del procedimiento de la invención, el aceite es sometido a una saponificación con una base, preferiblemente una
30 solución etanólica de hidróxido potásico, liberando de este modo los esteroides que se encontraban esterificados. Posteriormente a esta saponificación, es necesario realizar varias extracciones con un disolvente adecuado, preferiblemente éter dietílico, seguidas de lavados del extracto y eliminación de humedad con un desecante.

El extracto obtenido, una vez filtrado, se somete después a la cromatografía líquida de alta eficacia de la etapa (a).
35 Así, el extracto filtrado se inyecta directamente en el cromatógrafo de líquidos de modo que se separe la fracción que contiene los esteroides del resto de los otros componentes del aceite extraídos.

La fracción que contiene los esteroides se transfiere entonces automáticamente mediante la interfase TOTAD al cromatógrafo de gases (GC), una vez efectuada la derivatización de la etapa (b), donde finalmente se efectúa el análisis
40 cromatográfico de la etapa (c). Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, las etapas (a), (b) y (c) de análisis son totalmente automáticas.

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
45 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
50 de la fracción de los esteroides derivatizados 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
55 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 los esteroides en la cromatografía de líquidos.
60

Para ello, se trabaja exclusivamente con cromatografía de líquidos y se debe obtener un cromatograma de líquidos que asegure una buena separación entre los esteroides y el resto del material insaponificable del aceite.

Así, se inyecta en el cromatógrafo de líquidos distintos patrones de esteroides a una concentración lo suficientemente
65 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 una buena separación cromatográfica entre los esteroides y el resto del material insaponificable del aceite.

ES 2 364 565 A1

A partir del cromatograma obtenido se fija el tiempo de elución de los esteroides y la fracción de líquidos a transferir al cromatógrafo de gases.

Para llevar a cabo el análisis de esteroides en aceites comestibles propiamente dicho, se procede a la preparación del insaponificable. Para ello, en una realización preferida del procedimiento de la invención, en la etapa (1) se saponifica el aceite comestible en cuestión mediante la adición al mismo de una base adecuada (una solución etanólica de hidróxido potásico, por ejemplo). Con ese fin se toma una cantidad suficiente de muestra de aceite que permita la representatividad de la misma. Una vez saponificado el aceite, se procede a la extracción del material insaponificable. Para ello, en la etapa (2) se realizan varias extracciones con un disolvente orgánico adecuado tal como, por ejemplo, éter dietílico, y después se lava dicho extracto hasta obtención de pH neutro. De esta manera se separa el material insaponificable de los ácidos grasos y el glicerol.

Después, en la etapa (3) se procede a inyectar el extracto obtenido en la etapa (2) en la columna del cromatógrafo de líquidos para someterlo a cromatografía líquida de alta eficacia en fase normal (NPLC), tal y como se ha señalado. A continuación, dicho extracto se eluye de la columna de modo que se transfiera a cromatografía de gases la fracción determinada previamente que contiene los esteroides. En una realización particular del procedimiento de la invención, el eluyente empleado en la cromatografía líquida se selecciona de entre n-hexano, acetato de etilo, terc-butilmetileter, éter dietílico, n-heptano, n-pentano, isooctano, ciclohexano, ciclopentano, tetracloruro de carbono, tolueno, diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, acetato de metilo y mezclas de los mismos. En una realización preferida, el eluyente empleado en la cromatografía líquida de la etapa (a) es una mezcla de n-hexano y acetato de etilo. El experto en la materia determinará la proporción adecuada de cada eluyente.

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

Para proceder a dicha transferencia, el detector del cromatógrafo de líquidos se conecta directamente a otra válvula de inyección, donde se inyectará el agente derivatizante, y ésta se conecta a la válvula de seis vías de la interfase TOTAD mediante un tubo, y la válvula de seis vías se conecta mediante otro tubo al interior de la camisa de vidrio de la interfase TOTAD, de forma que se introduzca una longitud mayor que el extremo de la columna capilar que se ha introducido por este mismo extremo.

El interior del tubo de la interfase, normalmente un tubo de vidrio, 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 del estado de la técnica que retenga los esteroides y que permita el paso del gas portador utilizado en el cromatógrafo de gases y del eluyente utilizado en el cromatógrafo de líquidos. En una realización particular, dicho material de retención se selecciona de entre un material inerte, un material adsorbente y un material absorbente. En una realización preferida, se selecciona de entre fibra de vidrio, volaspher y chromosorb (entre otros materiales inertes), tenax, carbón activo, gaschrom (entre otros materiales adsorbentes), polidimetilsiloxano sobre volaspher, OV-17 sobre volaspher y polietilenglicol sobre chromosorb (entre otros materiales absorbentes). En una realización más preferida, el material de retención de la interfase TOTAD es tenax TA.

De este modo, el material de retención de la interfase retiene a los esteroides y el eluyente es eliminado, tanto en estado líquido como en estado de vapor, arrastrado por la corriente de gas a través del tubo o capilar conectado al extremo opuesto del tubo de vidrio. Una vez que los esteroides se encuentran retenidos, se introduce el agente derivatizante que “empapa” el material de relleno en el que se encuentran los esteroides produciéndose la reacción de derivatización. Durante la etapa de retención de los esteroides y de derivatización de los mismos se introducen flujos de gas controlados por ambas entradas de gas de la interfase TOTAD. Una vez eliminado el disolvente, los esteroides derivatizados 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 programable (PTV) y este flujo de gas arrastra a los esteroides derivatizados desorbidos conduciéndolos 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 apertura y cierre 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.

En la etapa (3), por tanto, el extracto obtenido en la etapa (2) 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 los esteroides. En ese momento, se puede cambiar el flujo con el fin de mejorar la retención de los esteroides en el material inerte de relleno y se mantiene dicho flujo hasta que termina la etapa de transferencia.

En la etapa (4) el extracto eluido de la cromatografía de líquidos de la etapa (3) se somete a derivatización. Para ello se añade un agente derivatizante adecuado, particularmente un agente de sililación, preferiblemente un reactivo derivatizante que se selecciona de entre hexametildisilazano, trimetilclorosilano, N,O-bis(trimetilsilil)acetamida, N,O-bis(trimetilsilil)trifluoro-acetamida, N-trimetilsililimidazol, clorometildimetil-clorosilano, N-metil-N-trimetilsililheptafluorobutiramida, dimetilclorosilano y mezclas de los mismos y, más preferiblemente, una mezcla de hexametildisilazano y trimetilclorosilano disueltos en piridina. La reacción de derivatización se lleva a cabo a una temperatura adecuada durante un tiempo apropiado. Así, en una realización particular, la reacción de derivatización se efectúa a una

ES 2 364 565 A1

temperatura de 30-200°C durante un tiempo de 0,1 a 10 min. En una realización preferida, la reacción de derivatización se efectúa a una temperatura de 125°C durante un tiempo de 0,8 min.

5 Por último, en la etapa (5) los componentes ya derivatizados se someten 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 los esteroides, ya derivatizados, 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 de entre un detector de ionización de llama y un espectrómetro de masas.

10 Como se ha indicado previamente, el procedimiento de análisis de la invención permite realizar el análisis de distintas fracciones del aceite, siendo posible determinar conjuntamente los esteroides y los dialcoholes triterpénicos (eritrodiool y uvaol). Dependiendo del tipo de análisis que se quiera llevar a cabo, se modifica la fracción de líquidos que hay que transferir, así como los tiempos de apertura y cierre de las válvulas que componen la interfase.

15 Durante el análisis se distinguen cinco 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 los esteroides queden retenidos en el material de retención que rellena el tubo interior de la interfase TOTAD. 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 los esteroides 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 de retención empuja al eluyente procedente del cromatógrafo de líquidos a través del mismo en el que los esteroides son retenidos, mientras que el eluyente es eliminado, total o parcialmente evaporado, por el tubo de salida.

3) *Derivatización*: Cuando los esteroides han alcanzado el material de retención que rellena el tubo de la interfase, se acciona la válvula que contiene el agente derivatizante, de modo que éste también alcance el material de retención que rellena el tubo de la interfase donde se encuentran retenidos los esteroides, produciéndose en ese instante la reacción de derivatización.

4) *Eliminación de los restos del disolvente*: Una vez que la etapa de transferencia ha finalizado, y el agente derivatizante ha alcanzado el material de relleno, 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 y de derivatizante 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.

5) *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 de retención, 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 los esteroides derivatizados, que son arrastrados por la corriente de helio a la columna cromatográfica de gases, donde tiene lugar el análisis cromatográfico en las condiciones previamente programables.

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

- El procedimiento de la invención puede ser utilizado para el análisis de diferentes aceites.
- El procedimiento de la invención permite el análisis de esteroides en aceites sin más tratamiento previo que la saponificación, extracción con disolventes y lavados.
- 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 de saponificación, extracción y lavados, por lo que reduce los errores y contaminaciones causados en dicha manipulación.
- El procedimiento de la invención incluye una etapa de saponificación que es rápida y una etapa de análisis que es totalmente automática, por lo que es especialmente adecuado para el análisis de esteroides en controles de rutina.

ES 2 364 565 A1

- El procedimiento de la invención permite la inyección en el sistema cromatográfico de volúmenes de extracto saponificado superiores a los habitualmente inyectados en cromatografía de gases, que pueden ser variables, lo que permite eliminar la etapa de concentración del extracto sin pérdida de sensibilidad.
- 5 - El procedimiento de la invención permite utilizar numerosas veces el tubo interior de la interfase TOTAD relleno del material de retención, sin que tenga que ser sustituido.
- En el procedimiento de la invención no se produce el deterioro del sistema de cromatografía de gases que en otros sistemas es causado por la transferencia de componentes lipídicos de la muestra.
- 10 - 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 ya que éstos son previamente eliminados en la interfase.
- 15 - 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, que consume mucho tiempo en las etapas de cromatografía en capa fina, raspado de la muestra, redisolución, concentración y derivatización.
- 20

El siguiente ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

25 Ejemplo 1

Análisis de esteroides totales en una mezcla de aproximadamente un 60% de aceite de oliva virgen y aproximadamente un 40% de aceite de girasol

30 *Materiales*

La mezcla de aceites fue facilitada por el laboratorio agroalimentario de Córdoba.

35 Los patrones de los esteroides fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, (Steinheim, Alemania). Los esteroides usados para la experimentación fueron: estigmasterol, β -sitosterol y colesterol.

40 El n-hexano y el acetato de etilo, usados como eluyentes, el etanol, usado para saponificar los aceites, y el éter dietílico y el agua, usados como agentes de lavado, fueron de grado HPLC (LabScan, Dublín, Irlanda). El sulfato de sodio anhidro, usado como agente desecante y el hidróxido de potasio, usado para saponificar los aceites, fue obtenido de Merck (Darmstadt, Alemania).

45 El agente derivatizante empleado fue Silan-esterol-1-GC (piridina:hexametildisililazano:trimetilclorosilano; 9:3:1) que se obtuvo de Panreac (Montcada, España).

50 Como material de retención 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, éste se acondicionó bajo una corriente de helio, aumentando la temperatura 50°C/10 min hasta 350°C manteniendo esta temperatura final durante una hora.

Preparación de la muestra

55 Se pesaron 500 mg de colestanol (patrón interno) al 0,2% en peso/volumen, se evaporó el disolvente bajo una corriente de nitrógeno y se pesaron 5 g de la mezcla de aceites en el mismo matraz. Se añadieron 50 ml de disolución etanólica de hidróxido potásico 2N, se puso en marcha el refrigerante de reflujo y se calentó al baño María con ligera ebullición, en agitación hasta que se produce la saponificación (la solución se vuelve límpida). Después se añadió por cabeza de reflujo 50 ml de agua. Se llevó todo el volumen a un embudo de extracción añadiendo otros 50 ml de agua, y se realizaron tres extracciones con 80, 60 y 60 ml de éter dietílico, respectivamente. Luego se lavó el extracto con 60 50 ml de agua hasta pH neutro, se eliminaron humedades con sulfato de sodio anhidro. Se recogió el extracto etéreo y se filtró a través de un filtro de 0,20 μ m (Millex-GN SLGN 013 NL). Este extracto obtenido fue el que se introdujo en el cromatógrafo de líquidos para realizar el análisis por NPLC-GC.

65 *Instrumentación*

Los análisis se realizaron por acoplamiento NPLC-GC realizando una derivatización en línea.

ES 2 364 565 A1

Para ello se empleó un inyector automático (Konik Robokrom) con dos válvulas de inyección, una para la muestra y la otra para el agente derivatizante, con volúmenes de lazo de 2,5 y 10 μl respectivamente, un sistema HPLC (modelo Konik 550) compuesto por una bomba cuaternaria, un horno de columna, y un detector diodo-array ultravioleta (UV).

5 El cromatógrafo de gases fue Konik 4000B (Konik-Tech, Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España) equipado con una interfase TOTAD (patentada, con derechos exclusivos asignados a Konik-Tech) y un detector FID (detector de ionización de llama).

10 El software usado para obtener y procesar los datos de LC y GC, así como para automatizar el proceso fue Konikrom Plus (Konik-Tech, Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España).

La preseparación en LC se llevó a cabo en una columna Lichrospher 5 μm Si 60 (Hichrom, Berks, Reino Unido) de 250 x 4,0 mm de diámetro interno mantenida a 25°C.

15 La columna utilizada en GC, fue 5% Fenil Metil Silicona (60 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μm de espesor) (Hichrom, Berks, Reino Unido), con helio como gas portador (presión en cabeza de columna 53 psi (0,36 MPa)).

Condiciones de LC

20 Para determinar el tiempo de elución de los esteroides que se iban a transferir al GC, se inyectaron 20 μl de una disolución en éter a 1000 mg/l de colesterol, estigmasterol y β -sitosterol. El eluyente (hexano:acetato de etilo; 80:20 (v/v)) a un flujo de 2 ml/min se mantuvo durante 15 minutos. El detector UV se mantuvo a 205 nm. En el análisis por NPLC-GC, la composición inicial del eluyente, hexano:acetato de etilo (80:20), se mantuvo constante. El flujo
25 inicial fue de 2 ml/min hasta que comenzó a eluir la fracción de interés. Durante la etapa de transferencia, el flujo cambió a 0,5 ml/min y se mantuvo constante hasta que terminó la transferencia, tanto de los esteroides como del agente derivatizante. Después de la transferencia el flujo cambió a 2 ml/min y la composición de la fase móvil al 100% acetato de etilo en 1 minuto y se mantuvo durante quince minutos para asegurar la eliminación de los compuestos retenidos en la columna.

30

Transferencia LC-GC

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

35

◇ *Estabilización.* La interfase y el horno del cromatógrafo de gases se estabilizaron a 125°C y 80°C respectivamente. El helio, utilizado como gas portador entraba en el PTV modificado de la interfase tanto por el lado del horno como por el lado opuesto, a un flujo de 500 ml/min.

40 ◇ *Transferencia.* El inyector automático introdujo la muestra en el sistema. Cuando los compuestos de interés llegaron a la válvula de seis vías, ésta giró automáticamente, transfiriéndose los compuestos de interés al GC. El caudal de transferencia utilizado fue de 0,5 ml/min. El tiempo de transferencia fue de 12 minutos. El helio empujó el extracto a través del adsorbente quedando los analitos retenidos y el disolvente enviado al desecho.

45 ◇ *Derivatización.* Una vez transcurridos los 12 minutos de la etapa anterior, la válvula que contenía el agente derivatizante giró, con lo que dicho agente derivatizante fue empujado por el eluyente de LC hasta la camisa de vidrio, donde se encontraban los esteroides retenidos en el adsorbente. El agente derivatizante fue empujado por el mismo eluyente empleado en la transferencia. Se mantuvo durante 50 segundos. El caudal de transferencia utilizado fue de 0,5 ml/min.

50

◇ *Eliminación de los restos de disolvente.* Una vez que terminó la introducción del agente derivatizante, la válvula de seis vías 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. Estas condiciones se mantuvieron durante dos minutos para asegurar la completa eliminación de los restos de disolvente y
55 del agente derivatizante tanto de la interfase TOTAD como del tubo de transferencia.

◇ *Desorción térmica.* Después de la eliminación del disolvente, se cerraron las válvulas de apertura y cierre de la interfase. Se interrumpió el flujo de helio que atravesaba el adsorbente y se cambió el flujo por la otra entrada a una presión de 53 psi (0,36 MPa). El PTV se calentó rápidamente hasta 350°C, manteniéndose esta temperatura durante
60 5 minutos para asegurar la desorción de los solutos retenidos, que son transferidos a la columna de cromatografía de gases.

Condiciones de GC

65

Durante las etapas de transferencia y de eliminación de disolvente la temperatura del horno fue de 80°C. Durante el análisis, la temperatura del horno se mantuvo a 80°C durante 1 minuto, se calentó a 40°C/min hasta 220°C, después a 20°C/min hasta 295°C durante 25 min. La temperatura del detector FID fue de 330°C.

ES 2 364 565 A1

La Figura 1 muestra el cromatograma de gases obtenido, en el que se identifican los picos indicados correspondientes a los esteroides totales de la mezcla de aceites: (1) colesterol, (2) colestanol (patrón interno), (3) 24-metilencolesterol, (4) campesterol, (5) campestanol, (6) estigmasterol, (7) Δ -7-campesterol, (8) Δ -5,23-estigmastadienol, (9) clerosterol, (10) β -sitosterol, (11) sitostanol, (12) Δ -5-avenasterol, (13) Δ -5,24-estigmastadienol, (14) Δ -7-estigmastanol, (15) Δ -7-avenasterol.

La Figura 1a muestra el cromatograma de gases de la muestra cuando no fue derivatizada previamente al análisis mediante cromatografía de gases. La Figura 1b muestra el cromatograma de gases de la muestra cuando fue derivatizada previamente al análisis mediante cromatografía de gases (procedimiento de la invención).

Los picos que aparecen en el cromatograma presentado en la Figura 1b se corresponden con los esteroides totales de la muestra de aceite analizada. La cuantificación de cada uno de los esteroides se realiza comparando el área del pico correspondiente al patrón interno (colestanol, indicado con el número 2). Los datos obtenidos se compararon con las concentraciones de la muestra de referencia analizada. Dichas concentraciones de la muestra de referencia corresponden a la media de los resultados obtenidos por numerosos laboratorios que analizaron dicha muestra mediante el método oficial, eliminando aquellos datos que se desviaban excesivamente de los restantes valores. Los resultados se expresan como porcentaje de cada uno de los esteroides del total de todos los esteroides, como suelen presentarse los resultados de estas determinaciones. Los resultados obtenidos son coherentes con los valores certificados de la muestra de referencia analizada. En efecto, la concentración de colesterol obtenida por el presente método fue el 0,25%, mientras que el indicado en la muestra certificada era 0,12%. Para el 24-metilencolesterol, dichas concentraciones eran 0,13% y 0,15% respectivamente. Para el campesterol, 5,99% y 6,4%. Para el campestanol, 0,35% y 0,1%. Para el estigmasterol, 3,99% y 4,5%. Para el Δ -7-campesterol, 0,78% y 1,6%. Para el Δ -5,23-estigmastadienol, 1,06 y 0,22%. Para el clerosterol, 0,79% y 0,9%. Para el β -sitosterol, 71,48% y 68,26%. Para el sitostanol, 1,01% y 0,5%. Para el Δ -5-avenasterol, 4,35% y 4,3%. Para el Δ -5,24-estigmastadienol, 1,45% y 1,2%. Para el Δ -7-estigmastanol, 7,30% y 8,5%. Y para el Δ -7-avenasterol 1,21% y 2,9%. Por otra parte, en cuanto a la suma de concentraciones de todos los esteroides, empleando el presente método se obtiene un resultado de 2242, 3 mg/l mientras que el valor certificado es de 1940 mg/l totales. Si bien a primera vista parece que los resultados obtenidos para algunos esteroides difieren mucho, hay que tener en cuenta que aquellos en los que se encuentran diferencias elevadas corresponden a esteroides que se encuentran en muy baja concentración, por lo que la integración de los picos para calcular el área provoca errores, pero que son de magnitud semejante a los que se producen cuando la muestra se analiza siguiendo el método oficial, por lo que se puede considerar que los resultados son satisfactorios.

En cuanto a la repetibilidad, la desviación estándar relativa (RSD) de las áreas absolutas de los picos cromatográficos, que por tanto no están corregidos en relación al patrón interno, obtenida tras 5 inyecciones consecutivas del mismo extracto, varía entre el 3,7% y el 16,1%. Sin embargo, es de resaltar que los valores más altos corresponden a los picos de los esteroides que se encuentran en menor concentración, a los que les afecta el problema de integración relacionado con el tamaño del pico anteriormente comentado. En efecto, el mayor RSD (16,1%) corresponde al campestanol, cuya concentración certificada es el 0,1%, seguido del colesterol (RSD 13,4%) que tiene el mismo valor certificado. El valor más bajo de RSD (3,7%) corresponde al 24-metilencolesterol, cuya concentración certificada también es muy baja (0,15%), pero obviamente se trata de una casualidad. Si se tienen en cuenta sólo los picos cuya concentración certificada supera el 2%, los valores del RSD oscilan entre 4,9% del β -sitosterol, el esteroide que se encuentra en mayor concentración, y el 6,5% del campesterol. Si además se tiene en cuenta que se trata del RSD de las áreas absolutas y que esta variabilidad incluye la separación por HPLC de los esteroides del resto de componentes coextraídos, la derivatización y el análisis por GC, se puede afirmar que el presente método tiene una excelente repetibilidad, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que todo este proceso se lleva a cabo de modo automático.

Además, la derivatización se produce con un rendimiento cuantitativo ya que en dicha Figura 1b no aparecen los picos correspondientes a los esteroides sin derivatizar (mostrados en la Figura 1a).

Si se analiza el tiempo total que necesita todo el análisis, habría que distinguir entre el tiempo necesario para la preparación de la muestra, y el tiempo necesario para el análisis cromatográfico en el equipo LC-GC. La preparación de la muestra requiere aproximadamente una hora y media, si bien en esta etapa no es necesaria una atención continua, por lo que es posible realizar la preparación de una batería de muestras. Por otra parte el tiempo de análisis cromatográfico, que incluye cromatografía de líquidos, derivatización en línea y cromatografía de gases es inferior a 45 minutos. Por tanto, se puede afirmar que el método de análisis es muy rápido, sobre todo si se compara con el método oficial.

Así pues, puede concluirse que el procedimiento de la invención ilustrado es un método sencillo, reproducible, fiable, con menos manipulación de la muestra, y que proporciona resultados cuantitativos coherentes y con una repetibilidad satisfactoria.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para analizar los esteroides totales en un aceite comestible **caracterizado** porque comprende las etapas de:

(a) someter la fracción insaponificable del aceite a cromatografía líquida de alta eficacia para separar la fracción de esteroides;

10 (b) someter a la fracción de esteroides separada en la etapa (a) a una reacción de derivatización, y

(c) analizar la fracción de esteroides derivatizados obtenidos en (b) mediante cromatografía de gases;

15 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); y en el que la reacción de derivatización de la etapa (b) se efectúa en el material de retención comprendido en dicha interfase.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la fracción insaponificable del aceite se obtiene mediante las etapas de:

(i) saponificar el aceite comestible mediante la adición de una base;

25 (ii) someter el producto de reacción de la etapa (i) a extracción con disolventes para separar la fracción insaponificable.

30 3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el material de retención de la interfase TOTAD se selecciona de entre materiales inertes, materiales adsorbentes y materiales absorbentes.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el material de retención de la interfase TOTAD se selecciona de entre fibra de vidrio, volaspher, chromosorb, tenax, carbón activo, gaschrom, polidimetilsiloxano sobre volaspher, OV-17 sobre volaspher y polietilenglicol sobre chromosorb.

35 5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el material de retención de la interfase TOTAD es tenax TA.

40 6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el reactivo derivatizante se selecciona de entre hexametildisilazano, trimetilclorosilano, N,O-bis(trimetilsilil)acetamida, N,O-bis(trimetilsilil)trifluoro-acetamida, N-trimetilsililimidazol, clorometildimetil-clorosilano, N-metil-N-trimetilsililheptafluorobutiramida, dimetilclorosilano y mezclas de los mismos.

45 7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el reactivo derivatizante es una mezcla de hexametildisilazano y trimetilclorosilano disueltos en piridina.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la reacción de derivatización se efectúa a una temperatura de 30-200°C durante un tiempo de 0,1 a 10 min.

50 9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la reacción de derivatización se efectúa a una temperatura de 125°C durante un tiempo de 0,8 min.

55 10. 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.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el eluyente empleado en la cromatografía líquida de la etapa (a) es una mezcla de n-hexano y acetato de etilo.

60 12. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las etapas (a) a (c) son totalmente automáticas.

13. 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.

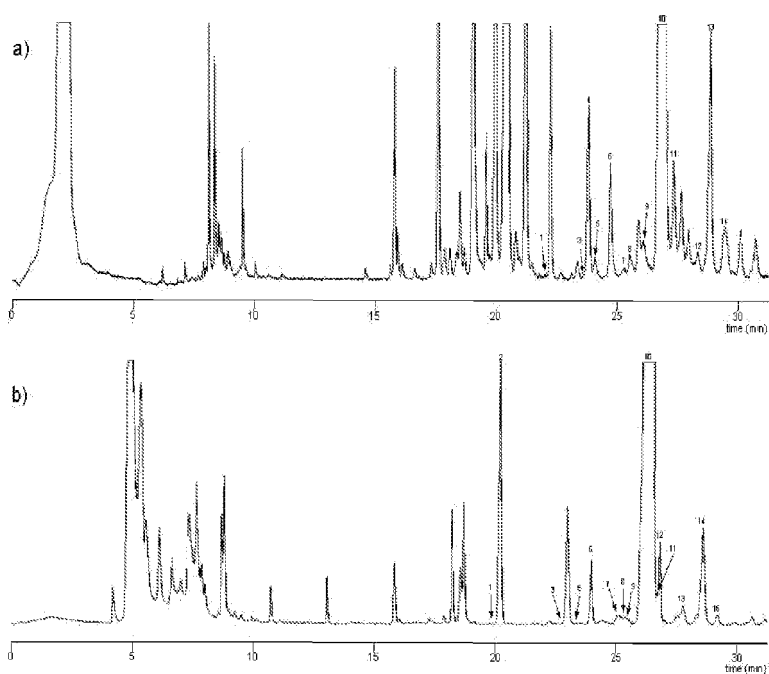


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:201030281

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.02.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CORTES SIMARRO, J. M. "Empleo de la interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption) en el desarrollo de métodos de análisis." Tesis doctoral de la Universidad de Castilla La Mancha (España) 11.03.2009 [Recuperado el 30.11.2010] Recuperado de internet URL: https://www.educacion.es/teseo/mostrarRef.do?ref=624126# Páginas 32-, 66-68 y 107-11 y figuras 15-20 y 34-37	1-13
X	CORTÉS J. M., SÁNCHEZ R., VILLÉN J. AND VÁZQUEZ A. "Analysis of unsaponifiable compounds of edible oils by automated on-line coupling reversed-phase liquid chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface." Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 54 (2006) pages 6963-6968. Página 6964 y figura 1.	1-5, 12-13
A	ES 2327198 B1 (UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA) 26/10/2009 Resumen, páginas 3, 5, 7-8 y reivindicaciones.	1-13
A	2276622 B1 (UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA) 16/06/2007 Resumen.	1-13
A	2265284 B1 (UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA) 01/02/2007 Resumen.	1-13

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
30.11.2010

Examinador
M. García Bueno

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:201030281

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.02.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	2152153 B1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS – UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA – UNIVERSIDAD DE ALCALÁ) 16/01/2001. Resumen.	1-13

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
30.11.2010

Examinador
M. García Bueno

Página
2/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

B01D15/08 (2006.01)

B01D15/18 (2006.01)

G01N30/12 (2006.01)

G01N30/88 (2006.01)

C07J9/00 (2006.01)

A23D9/00 (2006.01)

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

B01D, G01N, C07J, A23D

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, NPL, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.11.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 6-11	SI
	Reivindicaciones 1-5, 12-13	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-13	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 SIMARRO, J. M. "Empleo de la interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption) en el desarrollo de métodos de análisis." Tesis doctoral de la Universidad de Castilla La Mancha (España) 11.03.2009 [Recuperado el 30.11.2010] Recuperado de internet URL: https://www.educacion.es/teseo/mostrarRef.do?ref=624126#	11/03/2009
D02	CORTÉS J. M., SÁNCHEZ R., VILLÉN J. AND VÁZQUEZ A. "Analysis of unsaponifiable compounds of edible oils by automated on-line coupling reversed-phase liquid chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface." Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 54 (2006) pages 6963-6968.	2006
D03	ES 2327198 B1 (UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA)	26.10.2009
D04	2276622 B1 (UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA)	16.06.2007
D05	2265284 B1 (UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA)	01.02.2007
D06	2152153 B1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS – UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA – UNIVERSIDAD DE ALCALÁ)	16.01.2001

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 solicitud de invención consiste en un procedimiento para analizar los esteroides en aceites comestibles que consiste en someter la fracción insaponificable, la cual se obtiene mediante saponificación del aceite mediante adición de una base y separando dicha fracción mediante extracción con disolventes, a una cromatografía líquida de alta eficacia para extraer los esteroides, someter dichos esteroides a una reacción de derivatización y analizar la fracción de esteroides derivatizados mediante cromatografía de gases donde el sistema de detección es un detector de ionización de llama o un espectrómetro de masas, y donde el acoplamiento entre ambas cromatografías (HPLC y CG) se efectúa mediante la interfase TOTAD y son totalmente automáticas, y la fase de derivatización se efectúa en el material de retención comprendido en dicha interfase (reivindicación 1-2 y 12-13).

El material de retención de la interfase TOTAD se selecciona de entre materiales inertes, adsorbentes o absorbentes, entre ellos el tenax TA (reivindicaciones 3-5).

La reacción de derivatización se efectúa a una temperatura de 30-200°C durante un tiempo de 0,1 a 10 minutos (reivindicaciones 8-9), y el reactivo derivatizante se selecciona de entre un grupo entre los que se encuentra una mezcla de hexametildisilazano y trimetilclorosilano disueltos en piridina (reivindicaciones 6-7).

Por último, el eluyente empleado en la HPLC se selecciona de entre un grupo de eluyentes entre los que destaca una mezcla de n-hexano y acetato de etilo (reivindicaciones 10-11).

El documento D01 consiste en una tesis doctoral sobre el desarrollo de métodos de análisis por inyección de grandes volúmenes de muestra en cromatografía de gases y por acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases utilizando la interfase TOTAD.

El documento D02 consiste en un método automático para el análisis de compuestos insaponificables mediante el acoplamiento inverso de cromatografía líquida y cromatografía de gases utilizando la interfase TOTAD.

El documento D03 consiste en un procedimiento para analizar plaguicidas en frutos secos que comprende la extracción con disolventes de los plaguicidas del fruto seco, someter dicho extracto a HPLC en fase inversa y someter el extracto eluido a cromatografía de gases; en el que el acoplamiento entre la fase líquida y la cromatografía de gases se efectúa mediante la interfase TOTAD (ver resumen, páginas 3, 5, 7-8 y reivindicaciones).

El documento D04 consiste en un sistema y método de cromatografía de gases para el acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases, o para la introducción de grandes volúmenes de muestra configurado para trabajar selectivamente en un modo de retención (ver resumen).

El documento D05 consiste en un método de análisis de residuos de plaguicidas en muestras vegetales, que utiliza el dispositivo de interfase TOTAD para el acoplamiento directo de cromatografía de gases (ver resumen).

El documento D06 consiste en un dispositivo de interfase para el acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases (ver resumen).

1.- NOVEDAD (art. 6 Ley 11/1986).

1.1.- Reivindicaciones 1-5 y 12-13.

El documento D01 se considera el más próximo al estado de la técnica al objeto de las reivindicaciones 1-13, y divulga un procedimiento para analizar los esteroides en aceites comestibles que consiste en someter la fracción insaponificable, la cual se obtiene mediante saponificación del aceite mediante adición de una base y separando dicha fracción mediante extracción con disolventes, a una cromatografía líquida de alta eficacia para extraer los esteroides, someter dichos esteroides a una reacción de derivatización y analizar la fracción de esteroides derivatizados mediante cromatografía de gases donde el sistema de detección es un detector de ionización de llama, y donde el acoplamiento entre ambas cromatografías (HPLC y CG) se efectúa mediante la interfase TOTAD y son totalmente automáticas, y la fase de derivatización se efectúa en el material de retención comprendido en dicha interfase (ver páginas 32-, 66-68 y 107-11 y figuras 15-20 y 34-37).

El documento D02 divulga un procedimiento para analizar los esteroides en aceites comestibles que consiste en someter la fracción insaponificable, la cual se obtiene mediante saponificación del aceite mediante adición de una base y separando dicha fracción mediante extracción con disolventes, a una cromatografía líquida de alta eficacia para extraer los esteroides, someter dichos esteroides a una reacción de derivatización y analizar la fracción de esteroides derivatizados mediante cromatografía de gases donde el sistema de detección es un detector de ionización de llama, y donde el acoplamiento entre ambas cromatografías (HPLC y CG) se efectúa mediante la interfase TOTAD y son totalmente automáticas, y la fase de derivatización se efectúa en el material de retención comprendido en dicha interfase (ver página 6964 y figura 1).

Las características de las reivindicaciones 1-5 y 12-13 ya son conocidas de los documentos D01-D02. Por lo tanto esas reivindicaciones no son nuevas a las vista del estado de la técnica conocido.

1.2.- Reivindicaciones 6-11.

Las reivindicaciones 6-11 se consideran nuevas según el artículo 6 de la Ley 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (art. 8 de Ley 11/1986).

2.1.- Reivindicaciones 1-5 y 12-13.

Las reivindicaciones 1-5 y 12-13 al no ser nuevas, no implican actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley 11/1986.

2.2.- Reivindicaciones 6-11.

El documento D01 divulga que la reacción de derivatización se realiza con trimetilsililderivados (ver página 32) y que la estabilización del cuerpo de la interfase, donde se realiza la derivatización, se realiza a 125 °C. Por último, el eluyente empleado en la HPLC se selecciona de entre un grupo de eluyentes entre los que destaca acetato de etilo (ver páginas 55 y 58).

Se consideran que las características de diseño divulgadas en las reivindicaciones dependientes 6-11 son meras ejecuciones particulares obvias para un experto en la materia.

Por tanto, la invención reivindicada en las reivindicaciones 6-11 no implica actividad inventiva, según el artículo 8 de la Ley 11/1986.