

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 803**

21 Número de solicitud: 201831256

51 Int. Cl.:

**B01J 20/14** (2006.01)

**B01J 20/16** (2006.01)

**B01J 20/28** (2006.01)

**C11B 7/00** (2006.01)

**A23D 9/04** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**20.12.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**08.07.2020**

Fecha de concesión:

**30.11.2020**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**09.12.2020**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)  
C/ Serrano, 117  
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**PÉREZ CAMINO, M<sup>a</sup> Carmen y  
LEÓN CAMACHO, Manuel**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DE ACEITES O GRASAS MEDIANTE EXTRACCIÓN LÍQUIDA SOPORTADA**

57 Resumen:

Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas mediante extracción líquida soportada.

El objeto de la invención es un procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas comestibles mediante una columna de extracción líquida soportada (ESL), y la posterior purificación de las diferentes fracciones mediante cromatografía líquida de alta eficacia preparativa y su análisis mediante cromatografía de gases. La principal ventaja es que permite el empleo de pequeñas cantidades de muestra y la rápida extracción de la fracción insaponificable utilizando un volumen de disolvente mucho menor que las técnicas hasta ahora descritas a tal fin.

ES 2 772 803 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

### PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DE ACEITES O GRASAS MEDIANTE EXTRACCIÓN LÍQUIDA SOPORTADA

5

#### SECTOR DE LA TÉCNICA Y OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca dentro del sector de la química analítica instrumental y en particular en la preparación de columnas empleadas para la separación de compuestos, específicamente para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas comestibles mediante extracción líquida soportada.

El objeto de la invención es un procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas mediante una columna de extracción líquida soportada (ESL), y la posterior purificación de las diferentes fracciones mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) preparativa y su análisis mediante cromatografía de gases. La principal ventaja es que permite el empleo de pequeñas cantidades de muestra y la rápida extracción de la fracción insaponificable utilizando un volumen de disolvente mucho menor que las técnicas descritas a tal fin.

20

#### ESTADO DE LA TÉCNICA

La autenticación de los alimentos ha ido desarrollándose en función de las tendencias del mercado y las técnicas analíticas han ido evolucionando para solucionar las adulteraciones de cada momento.

En el caso concreto de los aceites y grasas comestibles la materia insaponificable es una fuente de información para su caracterización y autenticación. Más concretamente, la determinación de esteroides se ha usado frecuentemente para detectar contaminaciones y adulteraciones en este tipo de materiales.

La composición de esteroides de un aceite o grasa es muy característica y se ha convertido, por ello, en una herramienta muy útil para la detección de mezclas con otros aceites vegetales.

35

En numerosas ocasiones el análisis por cromatografía de gases de ciertas fracciones de compuestos de una matriz más o menos compleja, como es el caso de la fracción insaponificable, presenta ciertas dificultades, especialmente cuando estas fracciones poseen un número elevado de compuestos [Señoráns, F.J., Tabera, I y 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].

Además, existe un problema añadido si resulta imposible realizar sobre la matriz reacciones químicas y derivatizaciones para separar la fracción deseada, debido a la alteración, contaminación o pérdida de esta. En tal caso el aislamiento previo de la fracción mediante la extracción líquido-líquido, a pesar de ser el procedimiento estandarizado u oficial [European Union Commission Regulation EEC 183/93, Off. J. Eur. Commun L22 (1993) 58], es un procedimiento poco adecuado, muy tedioso y largo de llevar a cabo; es necesario emplear una gran cantidad de muestra (entre 5 y 20 g) y de disolventes para la extracción (del orden de 300 ml), el tiempo requerido también resulta excesivo, sobre todo si se forman emulsiones como de hecho suele ocurrir. Finalmente, es preciso eliminar todo el disolvente empleado en la extracción; a continuación, ha de efectuarse una purificación por lo que, antes de efectuarse el análisis por cromatografía de gases, hay que realizar separaciones previas empleando usualmente cromatografía en capa fina (CCF), en columna (CC) [Brewington C.R., Caress, E.A. y Schwartz D.P. (1979). “Isolation and identification of new milk fat”. *J. of Lipid Research* 11, 355-361], extracción en fase sólida (SPE) [Amelio M., Rizzo, R. y Varazini F. (1992). “Determination of sterols, erythrodiol, uvaol and alkanols in olive oils using combined solid-phase extraction, high-performance liquid chromatographic and high-resolution gas chromatographic techniques.” *J. Chromatography*, **606**, 179-185] o las técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) [EEC, 1993; Cert, A., Moreda, W y García-Morena, J. (1997). Determinación de esteroides y dialcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. *Grasas y Aceites*. 48, 207-218]. En resumen, para obtener la fracción del insaponificable de un aceite o grasa y purificarla por un procedimiento convencional se requiere emplear gran cantidad de muestra, disolventes orgánicos y tiempo. Todo esto conlleva que con frecuencia ocurran pérdidas o contaminaciones.

En el caso de utilizar como técnica de separación previa, la HPLC puede ser off-line u on-line, requiriéndose en ambos casos un cromatógrafo líquido donde realizar la separación previa. En la primera modalidad se recolecta la fracción deseada por algún procedimiento,

se elimina la fase móvil y se transfiere la fracción al cromatógrafo de gases mediante algunas de las técnicas de inyección conocidas [ León Camacho M. y Morales M.T., Handbook of Olive OH Análisis and Properties; Chapter 7 (2000) Ed Aspen Publishers, Inc.159-208]. Cuando se emplean técnicas de acoplamiento on-line, es necesario una interfase de transferencia más o menos complicada [Grob, K. (1995). Development of the transfer techniques for on-line high-performance liquid chromatography-capillary gas chromatography. *J.Chromatogr. A*, **703**, 265-276]; [ Vreuls, J.J., de Jong. G.J.; Ghijsen, R.T. y Brinkman, U.A.Th. (1994). LC coupled on-line with GC: state of the art. *J. AOAC. Int.*, **77**, 306-327] que permita pasar la fracción en estado líquido y alta presión a una fase gaseosa y de baja presión, además, las interfaces son muy diferentes dependiendo de si la cromatografía líquida es de absorción o de reparto [ Señoráns F.J., Herraiz M. y Tabera J. (1995a). "On-line reversed-phase liquid chromatography-capillary gas chromatography using a programmed temperature vaporizer as interface." *Journal of Separation Science*, **18**, 433-438]; [ Señoráns, F.J.; Reglero, G.; Herraiz, M. (1995b) "Use of a Programmed Temperature Injector for On-Line Reversed-Phase Liquid Chromatography-Capillary Gas Chromatography". *Journal of Chromatographic Science*. **33**, 446-450]; [Homborg E. (1993). Vitamin D-Bestimmung in Lebertram. *Fat Sci. Technol.* **95**, 228-230].

El aislamiento de los compuestos de interés del insaponificable, mediante las técnicas mencionadas es un paso crítico, específicamente en el caso de los aceites de oliva donde esteroides y alcoholes triterpénicos coeluyen en las mismas zonas cromatográficas llevando a resultados erróneos. También lo es el paso previo, el aislamiento de la materia insaponificable de la fracción saponificada y, para ello, Hadorn y Zürcher en 1973 [Hadorn H.; Zürcher (1973). *Der Scheidetrichter, ein mangelhaftes Gerät im analytischen Labor. Gordian* **73**, 198–204] publicaron uno de los primeros intentos de aislamiento utilizando sistemas de columnas con mezcla de adsorbentes, gel en tetrahidrofurano sobre gel S-832.

Se han desarrollado métodos de extracción líquida soportada (ESL) como es el caso de la patente US2018188142 que describe un cartucho que incluye dos compartimentos separados, uno de los cuales comprende una fase de adsorción sólida que es de tierra de diatomeas y la otra comprende al menos una sal. En este caso el método se utiliza para la separación de analitos en muestras biológicas.

Se han desarrollado otras técnicas para la separación de la fracción insaponificable mediante una extracción líquida soportada utilizando para ello cartuchos de tierra de diatomeas (Chem Elut, 20 ml, no tamponado, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)

seguida de una filtración a través de sulfato sódico anhidro y aislamiento de las fracciones mediante extracción de fase sólida (SPE) utilizando cartuchos de sílice (Agilent Mega BE-1, 1 g, 6 ml, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) activada con potasa y eluyendo las fracciones con disoluciones de diferentes proporciones de hexano/ éter dietílico. Las fracciones de esteroides y dialcoholes se silanizaron y se analizaron mediante cromatografía de gases [Mathison, B. and Holstege, D. A "Rapid Method to Determine Sterol, Erthyrodiol, and Uvaol Concentrations in Olive Oil". *J. Agric. Food Chem.*, (2013), 61, 4506-4513].

La empresa Phenomenex ha desarrollado unos cartuchos para este fin [Determination of Sterols in Olive Oil using Supported Liquid Extraction (SLE), Solid Phase Extraction (SPE) and GC-FID] en el que utiliza un cartucho de tierra de diatomeas, Strata®-DE, adaptado a un cartucho de sulfato de sodio anhidro para la separación del insaponificable y otro de sílice activada, Strata Si-1, para la purificación de estos. En este caso, no hace falta la purificación mediante HPLC para la separación de los esteroides y alcoholes triterpénicos, sino que a partir de la columna de Si activada con potasa y utilizando una fase móvil de hexano/éter se consigue la separación.

### **BREVE EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

Constituye el objeto de la presente invención un procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas que comprende:

- saponificar el aceite o grasa mediante la adición de una base y aplicación de temperatura en un rango comprendido entre 75 y 80 °C
- someter el saponificado procedente de la etapa anterior a una extracción líquida soportada para el aislamiento de la fracción insaponificable
- eliminar los ácidos grasos libres de la fracción insaponificable aislada en la etapa anterior mediante una extracción en fase sólida.

La extracción líquida soportada se realiza haciendo pasar el saponificado a través de una columna con un material de relleno que comprende:

- un filosilicato que se selecciona entre sepiolita y atapulgita en proporción comprendida entre un 20% y un 35%
- un material desecante que selecciona entre sílica gel y sulfato sódico en proporción comprendida entre un 30% y un 50%
- tierra de diatomeas en proporción comprendida entre un 20% y un 35%.

En realizaciones preferentes de la presente invención:

- el filosilicato es sepiolita, particularmente sepiolita de granulometría comprendida entre 0,30 y 0,13 mm.
- el filosilicato es atapulgita, particularmente atapulgita calcinada de granulometría  
5 comprendida entre 1,21 y 0,60 mm.
- el material desecante es  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro.
- la tierra de diatomeas es una tierra de diatomeas calcinada con un tamaño de malla de entre 0,25 mm y 3,35 mm, más preferentemente entre 0,3 mm y 1 mm.
- la eliminación de los ácidos grasos libres de la fracción insaponificable aislada en la etapa  
10 de extracción líquida soportada se realiza en columna de  $\text{SiO}_2$  impregnada en KOH o rellena de un soporte ligado al grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ).

La elución en la columna de extracción líquida soportada puede hacerse con disolventes como éter etílico o una mezcla de hexano y acetato de etilo.

15

Cuando la elución se hace con éter etílico, se añade  $\text{CaCl}_2$  al material de relleno en proporción comprendida entre un 10 y un 15 %.

Cuando la elución en la columna se hace con una mezcla de hexano y acetato de etilo, la  
20 proporción empleada es preferentemente 87:13 v/v.

Opcionalmente, se añade un patrón interno a la muestra de aceite o grasa de la que se va a aislar la fracción insaponificable.

## 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** Esquema general de la columna de ELS que comprende los siguientes elementos:

- Reservorio de la columna (1)
- Disco filtrante (2)
- 30 - Disco fritado (3)
- Relleno de la columna (4)

**Figura 2:** Esquema general del sistema de eliminación de ácidos grasos libres que comprende:

- 35 - Columna de vidrio (5)
- Sílice impregnada en potasa (6)

- Colector ("Manifold") para recoger el eluido de la columna (7)

El insaponificable eluido de la columna presentada en la figura 1 se concentra, se redisuelve y se pasa por la columna presentada en la figura 2 para eliminar los ácidos grasos libres.

5 **Figura 3:** Cromatograma de HPLC del insaponificable obtenido en el ejemplo de un modo de realización de la invención.

**Figura 4:** Cromatograma de gases de la fracción de los derivados de silicio de los esteroides recuperados previamente mediante HPLC en el ejemplo de un modo de realización de la invención. 1: Colesterol; I.S.: Patrón Interno; 2: Campesterol; 3: Estigmasterol; 4: Clerosterol; 10 5:  $\beta$ -Sitosterol; 6: Sitostanol; 7:  $\Delta^5$ -Avenasterol; 8:  $\Delta^{5,24}$ -Estigmastadienol; 9:  $\Delta^7$ -Estigmastenol; 10:  $\Delta^7$ -Avenasterol; 11: Eritrodiol.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE UN EJEMPLO DE REALIZACION DE LA INVENCION

15

El objeto de la presente invención es un material de relleno para una columna de extracción líquida soportada (ELS) y el uso de dicha columna para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites y grasas libre de ácidos grasos. En la figura 1 se representa el esquema general de la columna de ELS que comprende los siguientes elementos:

- 20 - Reservorio de la columna (1)
- Disco filtrante (2)
- Disco fritado (3)
- Relleno de la columna (4)

El insaponificable eluido de la columna presentada en la figura 1 se concentra, se redisuelve 25 y se pasa por el sistema esquematizado en la figura 2 para eliminar los ácidos grasos libres.

### Ejemplo: determinación de esteroides en aceite de oliva

Se vierten 80  $\mu$ l de un patrón interno (el que corresponda según la determinación) de 30 concentración 1 mg/ml en un vial de 4 ml. Se lleva a sequedad con nitrógeno y se pesa con exactitud del mg entre 0,2-0,4 g de muestra. Se añade 1,5 ml de KOH 1M en etanol, se cierra el vial y se calienta a 80C° durante 45 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo se añaden 3 ml de agua para detener la reacción y se vierte 35 en la columna de ESL.

**Preparación de la columna de ESL de 50 ml:** la columna se rellena con 36 g de una mezcla homogénea compuesta de un 33,3% de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, 11,1% de CaCl<sub>2</sub> 27,8% de atapulgita 15/30 y 27,8% de diatomea calcinada 0,3/1 mm.

- 5 Una vez añadida la muestra a la columna se esperan 10 minutos. Transcurrido el tiempo se pasan por la columna 55 ml de éter etílico y se colecta.

La disolución recogida se lleva a sequedad en rotavapor y se redisuelve en 1 ml de mezcla hexano/acetato de etilo 87:13 v, se pasa por una columna de 1 g de sílica gel 60 (0,063-10 0,200 mm) impregnada en KOH 0,2M en etanol y secada, se desecha una primera fracción que eluye con 10 ml de la mezcla hexano/acetato de etilo 87:13 v/v, y finalmente se pasan 6 ml de éter etílico que es recogido. La fracción insaponificable se lleva a sequedad en el rotavapor.

- 15 Para monitorizar el perfil de la fracción seleccionada y recuperada mediante HPLC, se opera en las siguientes condiciones:

- El insaponificable obtenido se redisuelve en 500 µl de la fase móvil del HPLC. Se inyectan 300 µl en el cromatógrafo líquido. Este paso es fundamental, dado que, como se ha comentado, hay importantes interferencias entre las familias de compuestos del insaponificable, especialmente en el caso de aceites de oliva, si este se inyecta sin un aislamiento previo.
- 20

**Condiciones del HPLC y del cromatógrafo de gases:** Fase móvil hexano:acetato de etilo 87/13 v/v; fase estacionaria: Columna de Si 60 de 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partículas, temperatura de la columna 20C°, flujo de fase móvil 0,6 ml/min en régimen isocrático, detector de índice de refracción a 30C°, tiempo del cromatograma 40 minutos. El cromatograma resultante se muestra en la Figura 3. Para recoger la fracción de esteroides, por ejemplo, se recolecta entre los 16 y 31 minutos, se lleva a sequedad en el rotavapor y se añaden 150 µl de reactivo de silanización, se esperan 15 minutos y se inyecta en el cromatógrafo de gases de acuerdo con las siguientes condiciones: columna cromatográfica DB-5 de 30 metros, 250 µm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de fase. Gas portador hidrógeno a flujo constante de 1 ml/min. Inyección en modo Split con una relación de 10, temperatura del inyector 310C°. Condiciones de operación del horno cromatográfico:

35

<b>T. Horno</b>	<b>Rampa °C/min</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Tiempo final</b>
275	0	30	30

Detector de ionización de llama a 320°C y gas auxiliar nitrógeno a 25 ml/min.

El cromatograma resultante se muestra en la figura 4.

## REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas que comprende:

- 5 - saponificar el aceite o grasa mediante la adición de una base y aplicación de temperatura en un rango comprendido entre 75 y 80 °C
- someter el saponificado procedente de la etapa anterior a una extracción líquida soportada para el aislamiento de la fracción insaponificable
- eliminar los ácidos grasos libres de la fracción insaponificable aislada en la etapa anterior mediante una extracción en fase sólida
- 10 caracterizado porque la extracción líquida soportada se realiza haciendo pasar el saponificado a través de una columna con un material de relleno que comprende:
- un filosilicato que se selecciona entre sepiolita y atapulgita en proporción comprendida entre un 20% y un 35% en peso.
- 15 - un material desecante que selecciona entre sílica gel y sulfato sódico en proporción comprendida entre un 30% y un 50% en peso.
- tierra de diatomeas en proporción comprendida entre un 20% y un 35% en peso.

2.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según la reivindicación 1, donde el filosilicato es sepiolita.

20

3.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según la reivindicación 2, donde la sepiolita es sepiolita de granulometría comprendida entre 0,30 y 0,13 mm.

25

4.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según la reivindicación 1, donde el filosilicato es atapulgita.

5.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según la reivindicación 4, donde la atapulgita es atapulgita calcinada de granulometría comprendida entre 1,21 y 0,60 mm.

30

6.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el material desecante es Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro.

35

7.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la tierra de diatomeas es una tierra de diatomeas calcinada con un tamaño de malla de entre 0,25 mm y 3,35 mm.

5 8.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según la reivindicación 7, donde la tierra de diatomeas presenta un tamaño de malla entre 0,3 mm y 1 mm.

9.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas  
10 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la elución en la columna de extracción líquida soportada se hace con éter etílico.

10.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según la reivindicación 9, donde el material de relleno comprende adicionalmente  $\text{CaCl}_2$  en  
15 proporción comprendida entre el 10 y el 15% en peso.

11.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la elución en la columna de extracción líquida soportada se hace con una mezcla de hexano y acetato de etilo.  
20

12.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la eliminación de los ácidos grasos libres de la fracción insaponificable aislada en la etapa de extracción líquida soportada se realiza en columna de  $\text{SiO}_2$  impregnada en KOH o rellena de un soporte ligado  
25 al grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ).

13.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde se añade un patrón interno a la muestra de aceite o grasa de la que se va a aislar la fracción insaponificable.  
30

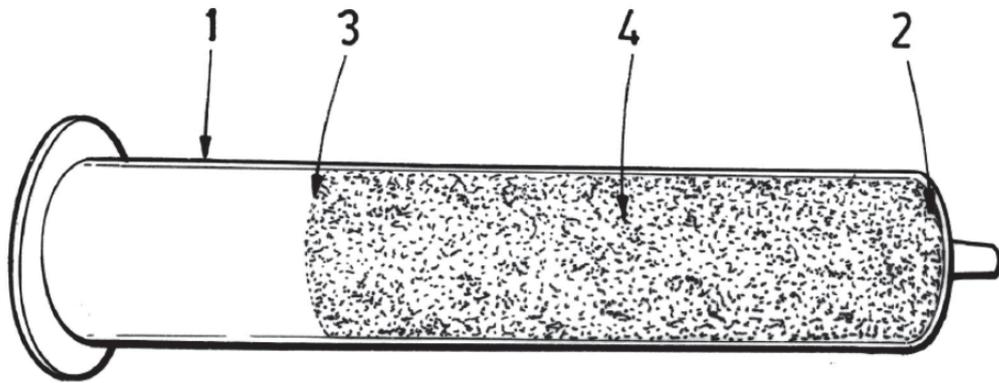


FIG. 1

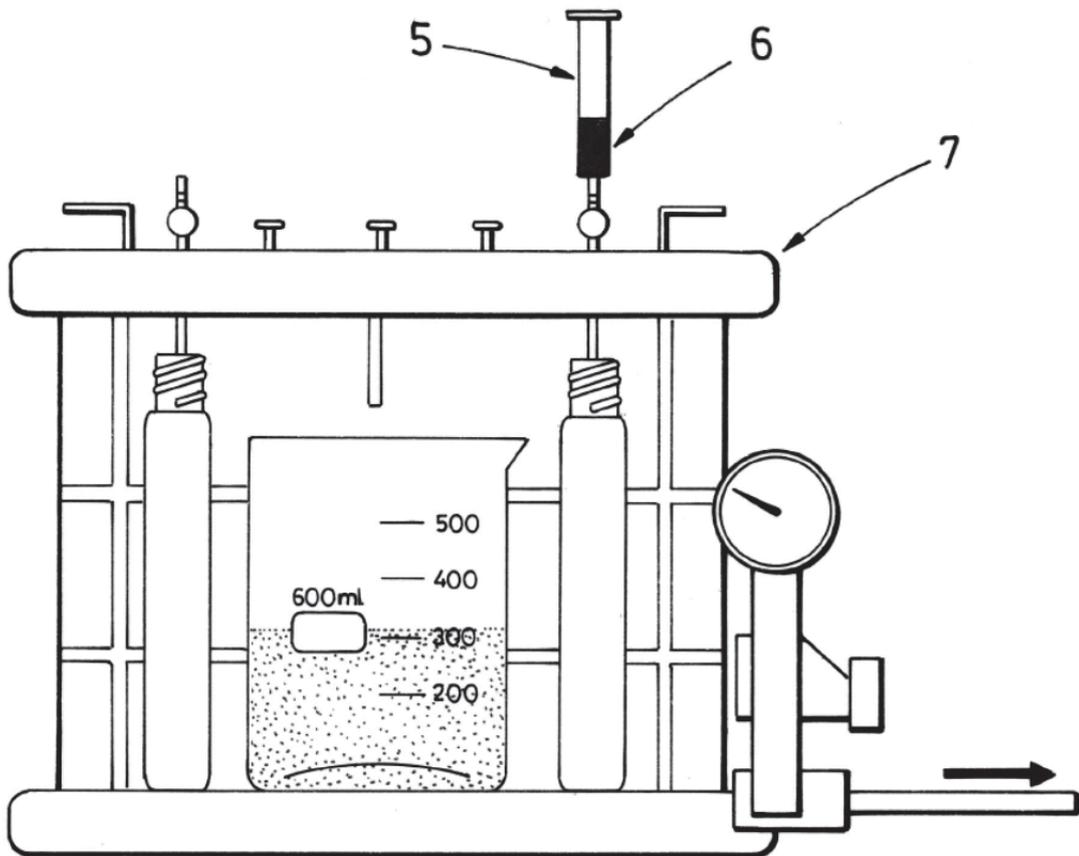


FIG. 2

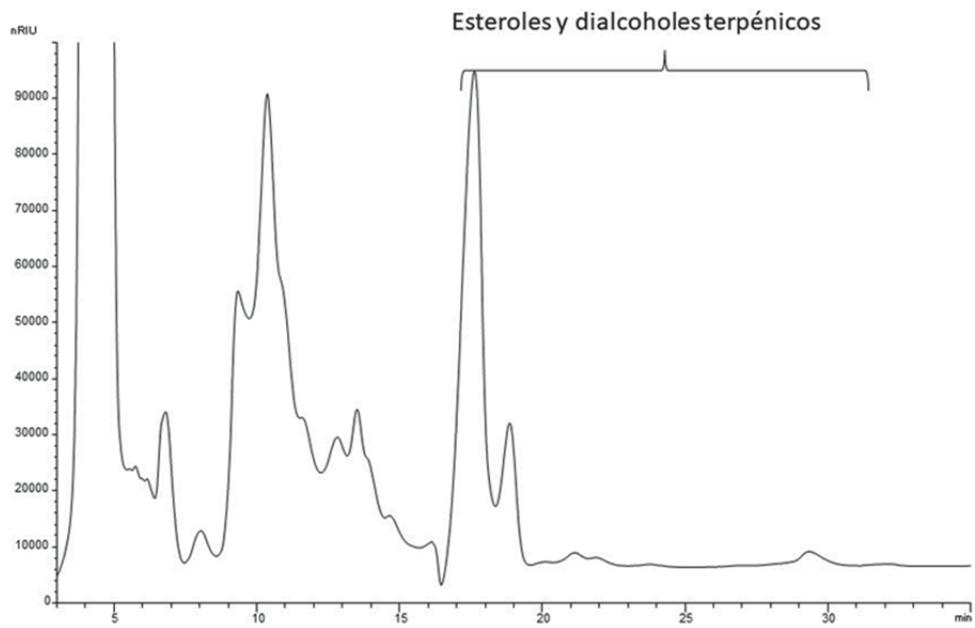


FIG. 3

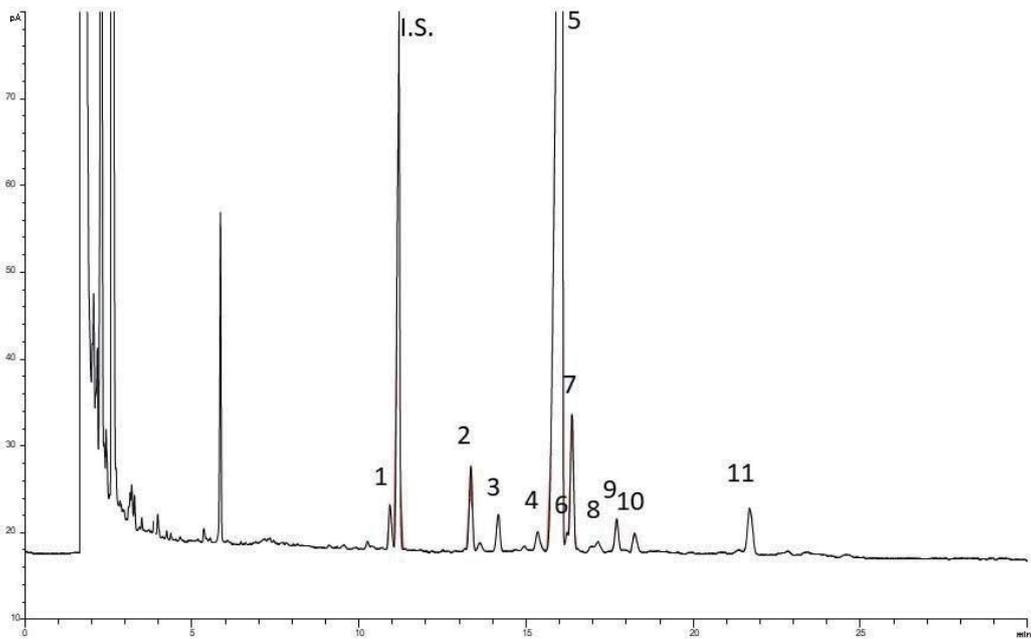


FIG. 4