

NOTA IMPORTANTE:

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

ININ/ Oficina Nacional de Normalización

NORMA CUBANA

NC

ISO 7609: 2005
(Publicada por la ISO, 1985)

**ACEITES ESENCIALES—ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA
DE GASES EN COLUMNAS CAPILARES — MÉTODO
GENERAL
(ISO 7609: 1985, IDT)**

Essentials oils – Analysis by gas chromatography on capillary columns –
General method

ICS: 71.100.60

1. Edición Noviembre 2005
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana. Cuba. Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

NC–ISO 7609: 2005

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba que representa al país ante las Organizaciones Internacionales y Regionales de Normalización.

La preparación de las Normas Cubanas se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. La aprobación de las Normas Cubanas es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en evidencia de consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el NC/CTN 104 Aceites Esenciales integrado por representantes de las siguientes entidades:

Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia	Suchel-Fragancia
Instituto Nacional de Higiene de los Alimentos	Alimentos Río Zaza
Instituto de Investigaciones de Frutas Tropicales	Quimimport
Oficina Nacional de Normalización	Cubacontrol
Ministerio de Comercio Interior	Laboratorios Biofarmaceuticos

- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la versión en inglés de la norma internacional *ISO 7609: 1985 Essentials oils – Analysis by gas chromatography on capillary columns – General method*

© NC, 2005

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

ACEITES ESENCIALES — ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES EN COLUMNAS CAPILARES—MÉTODO GENERAL

1 Objeto

Esta norma establece un método general de análisis de los aceites esenciales y otros productos aromatizantes por cromatografía de gases con columnas capilares, con el fin de determinar un compuesto específico y/o establecer un perfil característico.

Esta norma se aplica también para otros productos aromáticos naturales y sintéticos.

2 Referencias normativas

Los documentos que se mencionan seguidamente son indispensables para la aplicación de esta Norma Cubana. Para las referencias fechadas sólo es aplicable la edición citada.

NC – ISO 212: 2003 Aceites Esenciales. Muestreo.

NC – ISO 356: 2003 Aceites Esenciales. Preparación de la muestra de ensayo.

3 Definiciones

Análisis por cromatografía de gases, en condiciones especificadas, de una pequeña cantidad¹⁾ de aceite esencial y otro producto aromatizante con una columna capilar, cuya pared interna haya sido previamente recubierta con una fase estacionaria, o bien con un soporte impregnado (columna interiormente recubierta con un soporte impregnado).

Si es necesario, se identifican los diferentes componentes a través de sus índices de retención.

Se realiza la determinación cuantitativa de componentes específicos por medición del área de sus picos, con o sin corrección por factor de respuesta.

4 Reactivos

Durante el análisis y salvo indicaciones diferentes, se deberán usar sólo reactivos de reconocida calidad analítica y productos recientemente destilados.

4.1 Gas portador. Hidrógeno²⁾, helio o nitrógeno, según el tipo de detector que se utilice. Si se utilizan detectores que requieran el empleo de gases portadores distintos de los mencionados, se debe especificar el gas portador que se utilizará.

4.1.1 Gases auxiliares. Cualquier gas adecuado para el detector utilizado. En el caso del detector de ionización de llama, se debe utilizar aire e hidrógeno de gran pureza.

4.2 Productos para el control de la inercia química de la columna. Acetato de linalilo, con una pureza mínima del 98 %.

¹⁾ Se debe tener cuidado de asegurar que la porción de ensayo inyectada no sature la columna.

²⁾ Respetar estrictamente las normas de seguridad en caso de uso de este gas.

4.3 Productos para el control de la eficiencia de la columna. Pueden emplearse, además de los citados a continuación, otros productos para determinar la eficiencia de la columna, los cuales deben ser especificados en cada norma particular.

4.3.1 Linalol, con una pureza mínima del 99 %, determinada por cromatografía de gases.

4.3.2 Metano, con una pureza mínima del 99 %, determinada por cromatografía de gases.

4.4 Sustancia de referencia, correspondiente al componente a determinar o localizar. Se indicará en cada norma particular.

4.5 Patrón interno. Se indicará en cada norma particular, y deberá separarse lo más cerca posible del componente a determinar y no superponerse con ninguno de los picos correspondientes a los componentes del aceite esencial.

4.6 Alcanos normales, con una pureza mínima del 95 % determinada por cromatografía de gases. La gama de los alcanos normales que deben utilizarse en una determinada norma depende del índice de retención de los componentes en cuestión en las condiciones del ensayo³⁾.

4.7 Mezcla de ensayo. Se prepara una mezcla con proporciones más o menos iguales de:

- limoneno,
- acetofenona,
- linalol,
- acetato de linalilo,
- naftaleno,
- alcohol cinámico.

Todos estos reactivos deben tener una pureza mínima del 95 % determinada por cromatografía de gases. Podrán utilizarse otros productos, los que se indicarán en cada norma particular.

5 Aparatos

5.1 Cromatógrafo, provisto de un inyector especial para columnas capilares, que permita la inyección de cantidades del orden de 1 microlitro, con un adecuado detector y un programador de temperatura. Los sistemas de inyección y de detección deben estar dotados de dispositivos que permitan un control independiente de sus respectivas temperaturas.

5.2 Columna, de un material inerte (vidrio, acero inoxidable, sílice o sílice fundida), con un diámetro interior entre 0,2 mm y 0,5 mm, así como una longitud entre 15 m y 100 m.

La naturaleza de la fase estacionaria se deberá indicar en cada norma particular. En la actualidad, las fases estacionarias utilizadas con más frecuencia son: los polisiloxanos metílicos o fenílicos, o los polietilenglicoles cuyas funciones alcohol terminales pueden estar libres o esterificadas.

5.3 Registrador e integrador de prestaciones compatibles con el conjunto del equipo

³⁾ Los alcanos normales se utilizan solamente cuando se quiere determinar los índices de retención.

6 Muestreo

Es importante que el laboratorio reciba una muestra representativa, la cual no haya sido dañada o modificada durante la transportación o almacenamiento.

El muestreo no es parte del método especificado en esta norma. El método de muestreo recomendado está dado en la NC-ISO 212.

7 Procedimiento

7.1 Preparación de la muestra de ensayo

Se preparará la muestra de ensayo de acuerdo con la NC-ISO 356.

7.2 Condiciones operativas

7.2.1 Temperatura. Las temperaturas del horno, inyector y detector se indicarán en cada norma particular.

7.2.2 Régimen de gas portador. Se ajusta el régimen para conseguir la eficiencia necesaria (véase apartado 8.2).

7.2.3 Régimen de gases auxiliares. Se deben consultar las instrucciones del fabricante del aparato, con el fin de conseguir las condiciones óptimas de respuesta del detector.

7.3 Desempeño de la columna

7.3.1 Prueba de inercia química. Se inyecta una cantidad de acetato de linalilo en las condiciones de análisis (ver apartado 7.1). Se debe conseguir un único pico (en el margen de pureza definido).

7.3.2 Eficiencia de la columna. Se determina la eficiencia de la columna en el pico del linalol a una temperatura isotérmica de 130 °C. Se determina el número de platos efectivos, N, que debe ser como mínimo igual a 25 000, por medio de una de las fórmulas siguientes:

Fórmula nº 1 (ver Figura 1)

$$N = 16 \left(\frac{d'_r}{\omega} \right)^2$$

Fórmula nº 2

$$N = 5,54 \left(\frac{d'_r}{b} \right)^2$$

donde:

d_r es la distancia de retención reducida, en unidades de longitud (distancia de retención del pico del linalol, menos la distancia de retención del pico del aire o del pico del metano a 130 °C, comparable al pico del aire);

ω es la distancia, en las mismas unidades de longitud que la distancia de retención, entre los dos puntos de intersección de la línea de base con las dos tangentes en los puntos de inflexión del pico de linalol;

b es el ancho, en las mismas unidades de longitud que la distancia de retención del pico del componente especificado (linalol) a media altura del pico.

La velocidad de avance del papel del registrador se debe adecuar para que ω sea como mínimo igual a 10 mm, o para que b sea como mínimo igual a 5 mm, con el fin de conseguir una precisión suficiente. Todas las distancias de retención se deben medir hasta el vértice del pico.

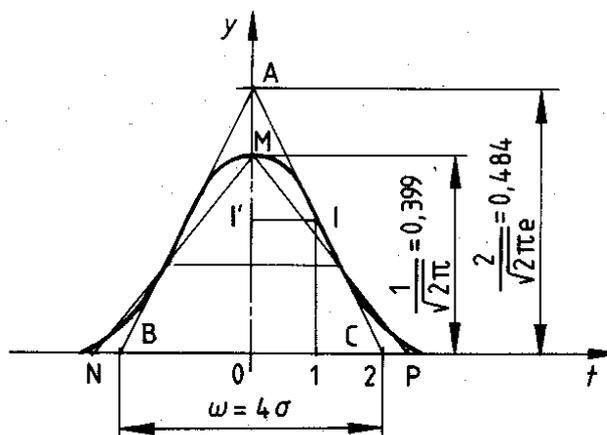


Figura 1

7.4 Resolución y separación. Para determinar la resolución y/o la separación, se inyecta una cantidad adecuada de mezcla de ensayo (ver apartado 4.7) en las condiciones del ensayo.

7.4.1 Determinación de la resolución. Se calcula el factor de resolución, R, de dos picos colindantes I y II, por medio de la fórmula siguiente:

$$R = 2 \frac{d_{r(II)} - d_{r(I)}}{\omega_{(I)} + \omega_{(II)}}$$

donde:

$d_{r(I)}$ es la distancia de retención del pico I;

$d_{r(II)}$ la distancia de retención del pico II;

$\omega_{(I)}$ el ancho de la base del pico I;

$\omega_{(II)}$ el ancho de la base del pico II.

Para que la resolución sea total, la distancia entre los dos picos debe ser igual o mayor a 1,5 (ver Figura 2).

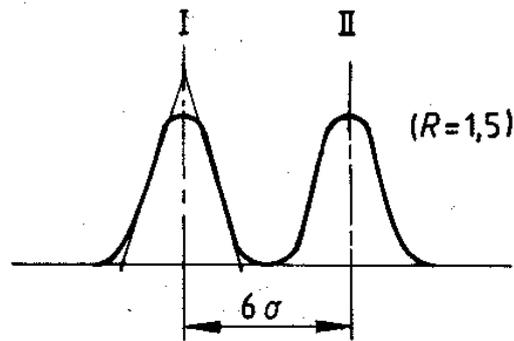
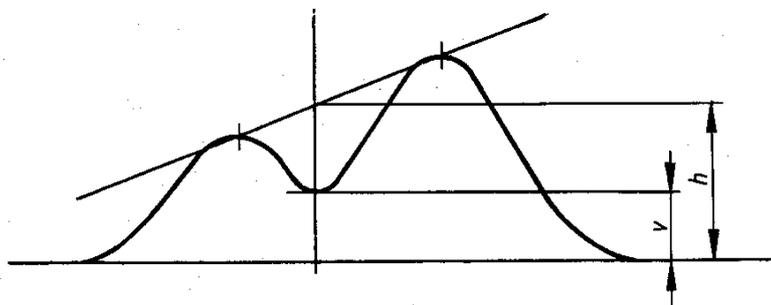


Figura 2

7.4.2 Determinación de la separación (ver Figura 3). Se traza una línea recta que conecta la punta superior de los picos en cuestión. Desde la línea base, se traza una perpendicular a través del mínimo entre los dos picos. Se mide la distancia, h , a lo largo de esta perpendicular, entre la línea de base y su punto de intersección con la línea recta que conecta la parte superior de los picos en cuestión.

Se mide la distancia, v , en la perpendicular entre la línea de base y el punto mínimo entre ambos picos. Calcular la separación, p , en porcentaje, por medio de la fórmula siguiente:

$$p = \frac{100 (h - v)}{h}$$



7.4.3 Control de la separación con temperatura programada. Se opera bajo las condiciones siguientes:

- columna de dimetilpolisiloxano o polietilenglicol 20 000;
- temperatura programada desde 80 °C a 220 °C, a razón de 2 °C/min ó 3 °C/min.

El régimen del gas portador debe permitir la separación de todos los componentes de la mezcla de ensayo (ver apartado 4.7) y de los alcanos normales (ver apartado 4.6) necesarios para la determinación de sus índices de retención, antes del final de la programación de temperaturas.

7.4.3.1 Se inyecta una cantidad apropiada de la mezcla de ensayo (ver 4.7). En el cromatograma obtenido:

- a) en las columnas de dimetilpolisiloxano, los picos de limoneno y acetofenona deben tener una separación de al menos 95 % (ver 7.4.2);
- b) en las columnas de polietilenglicol 20 000, los picos de linalol y acetato de linalilo deben tener una separación de al menos 95 % (ver 7.4.2).

Si se especifica otra fase estacionaria en la norma particular, los requisitos se deben especificar en ésta.

7.4.3.2 Se inyecta una cantidad adecuada de mezcla de ensayo (ver 4.7). Se calculan los índices de retención (ver apartado 7.5) de los componentes de la mezcla de ensayo.

Se utilizan los alcanos C10 a C16 en las columnas de dimetilpolisiloxano.

Se utilizan los alcanos C11 a C24 en las columnas de polietilenglicol 20 000.

Los resultados obtenidos en columnas distintas con la misma fase estacionaria con el mismo equipo e idénticas condiciones de trabajo son comparables si los índices de retención de los componentes de la mezcla de ensayo solo difieren ligeramente (en menos de 3 %) entre las distintas columnas.

7.5 Determinación de los índices de retención

Si es necesario determinar los índices de retención, se prepara una mezcla de la muestra patrón con alcanos normales que contengan el n-pentano. Se eligen los alcanos normales según el rango de índices de retención esperados. Se inyecta una cantidad apropiada de dicha mezcla y se realiza el análisis en las condiciones indicadas en el apartado 7.6.1.

Se obtiene el cromatograma "B".

7.5.1 Medida de los índices de retención

Se comparan los cromatogramas "A" (ver apartado 7.6.1) y "B" (ver apartado 7.5) y se marcan en el cromatograma "B" los picos correspondientes a los alcanos normales.

En el cromatograma "B" se efectúan las medidas siguientes:

7.5.1.1 Procedimiento que utiliza condiciones isotérmicas. Se calcula la diferencia entre las distancias de retención de cada pico en cuestión y el pico del metano. Dicha diferencia, d'_r , se indica en milímetros.

Se calcula la diferencia entre las distancias de retención del pico del metano y el del pico del alcano normal que aparece inmediatamente antes que el pico en cuestión. Esta diferencia, d'_n , se indica en milímetros.

Se calcula la diferencia entre las distancias de retención del pico del metano y el del pico del alcano normal que aparece inmediatamente después que el pico en cuestión. Esta diferencia, d'_{n+1} , se indica en milímetros.

7.5.1.2 Procedimiento que utiliza programación de temperatura lineal desde la inyección. Se mide la distancia en la línea de base entre el vértice del pico cuyo índice de retención se va a determinar, y el vértice del pico del alcano normal (n átomos de carbono) que aparece inmediatamente antes que el pico en cuestión. Esta distancia, D_x , se indica en milímetros.

Se mide la distancia en la línea de base entre los vértices de los picos del alcano normal inferior colindante (n átomos de carbono) y del alcano normal ($n+1$ átomos de carbono) cuyo tiempo de retención es inmediatamente superior al del pico en cuestión (que aparece inmediatamente después del pico en cuestión). Esta distancia, D_y , se indica en milímetros.

7.5.2 Cálculo del índice de retención

7.5.2.1 Procedimiento que utiliza condiciones isotérmicas. Se calcula el índice de retención, I , por medio de la fórmula siguiente:

$$I = 100 \frac{\log d'_x - \log d'_n}{\log d'_{n+1} - \log d'_n} + 100n$$

donde:

d'_x la distancia, en milímetros, entre el vértice del pico cuyo índice de retención se va a calcular, y el vértice del pico del metano (ver 7.5.1.1);

d'_n la distancia, en milímetros, entre el vértice del pico del alcano normal con n átomos de carbono, y el vértice del pico del metano (ver 7.5.1.1);

d'_{n+1} la distancia, en milímetros, entre el vértice del pico del alcano normal con $(n+1)$ átomos de carbono, y el vértice del pico del metano (ver 7.5.1.1).

NOTA Para que los cálculos sean válidos es necesario que $d'_{n+1} > d'_x > d'_n$.

7.5.2.2 Procedimiento que utiliza programación de temperatura lineal desde la inyección. Este cálculo es solamente válido para los componentes cuyos tiempos de retención están comprendidos dentro de la zona lineal de programación de temperatura.

Se calcula el índice de retención, I, por medio de la fórmula siguiente:

$$I = 100 \frac{D_x}{D_y} + 100 n$$

donde:

D_x la distancia, en milímetros, entre el vértice del pico cuyo índice de retención debe calcularse, y el vértice del pico del alcano normal con n átomos de carbono (ver apartado 7.5.1.2);

D_y la distancia, en milímetros, entre el vértice del pico del alcano con n átomos de carbono, y el vértice del pico del alcano normal con (n+1) átomos de carbono (ver 7.5.1.2).

NOTA Si se han llevado a cabo diferentes programas de temperatura, no es posible calcular el índice de retención.

7.6 Métodos de cuantificación

7.6.1 Requisitos generales

7.6.1.1 Cromatograma del aceite esencial. Se registra el cromatograma como indica la norma particular.

Los requisitos de temperatura y de velocidad lineal promedio tienen que ser los mismos que los que se utilizaron para la prueba de eficiencia de la columna (ver 7.3.2).

Para las determinaciones de ciertos componentes específicos, la norma del producto aromatizante en particular puede especificar el uso de condiciones isotérmicas, a una temperatura especificada. En estos casos, se debe controlar la velocidad lineal promedio de manera que la separación obtenida sea aquella especificada en la norma particular.

Se inyecta una cantidad apropiada de la muestra de ensayo (del orden de 1 μ L). Se obtiene el cromatograma "A".

7.6.2 Método del patrón interno

Se registran, por separado, el cromatograma del producto aromatizante y el del patrón interno (ver 4.5), empleando las mismas condiciones operativas. Se verifica en los cromatogramas, por un lado, que los productos a cuantificar estén separados de los otros componentes del producto aromatizante y, por otro, que el patrón interno no interfiera con ninguno de los componentes del producto aromatizante.

7.6.2.1 Determinación del factor de respuesta. En caso de que, para determinaciones cuantitativas, haya que determinar el factor de respuesta de un compuesto en relación con el patrón interno, se prepara una mezcla pesando cantidades adecuadas del patrón interno (ver 4.5) y de la sustancia de referencia (ver 4.4) en tales proporciones que las correspondientes áreas de los picos sean más o menos iguales.

Si hay que utilizar un disolvente, se debe indicar en la norma del producto aromatizante en particular.

Se inyecta una cantidad adecuada de esta mezcla y se lleva a cabo el análisis en las condiciones mencionadas en el apartado 10.1.1. Se obtiene el cromatograma "F".

Se calcula el factor de respuesta, K, del componente en relación con el patrón interno, por medio de la fórmula siguiente:

$$K = \frac{A_E \cdot m_R}{A_R \cdot m_E}$$

donde:

A_R el área del pico, en unidades de integrador, correspondiente a la sustancia de referencia cuyo factor de respuesta debe calcularse;

A_E el área del pico, en unidades de integrador, correspondiente al patrón interno;

M_R la masa, en miligramos, de la sustancia de referencia;

M_E la masa, en miligramos, del patrón interno.

7.6.2.2 Cuantificación. Cuando la norma particular prescribe el uso de un patrón interno, se prepara una mezcla pesando, con una precisión de 0,001 g, cantidades apropiadas del aceite esencial y del patrón interno. Se elige la cantidad de patrón interno de tal forma que el área del pico del componente a cuantificar y la del patrón interno sean aproximadamente iguales.

Se inyecta una cantidad adecuada de esta mezcla (del orden de 1 microlitro) y se efectúa el análisis en las condiciones indicadas en el apartado 7.6.1.1.

Se obtiene el cromatograma "C".

7.6.3 Método por adición

Si, para una determinación particular, no se puede utilizar el método del patrón interno, se utiliza el método por adición.

Con este fin, se inyecta una cantidad adecuada del aceite esencial en cuestión, en la cual X es el componente a cuantificar e Y un componente que da un pico próximo a X en el cromatograma "D" obtenido.

Se prepara, pesando con una precisión de 0,001 g, una mezcla de m gramos de aceite esencial y mR gramos de sustancia de referencia (ver apartado 4.4) correspondiente al componente X a cuantificar.

Se inyecta esta mezcla y se obtiene el cromatograma "E".

7.6.4 Método de normalización interna

Este método permite solamente una estimación aproximada de las concentraciones relativas de los diversos componentes separados de una mezcla por medio de la comparación de las áreas de sus picos, pero no su determinación como porcentaje de masa. Para este método, se supone que todos los componentes de la muestra son detectados y que la respuesta del detector es igual para cada uno de ellos, lo que normalmente no ocurre.

8 Expresión de los resultados

8.1 Método del patrón interno

Se calcula el contenido C_x , expresado como porcentaje de masa, del componente a cuantificar, por medio de la fórmula siguiente:

$$C_x = \frac{A_x \cdot m_E \cdot K}{A_E \cdot m} 100$$

donde:

A_x el área del pico, en unidades de integrador, correspondiente al componente a cuantificar (ver apartado 7.6.2.2);

A_E el área del pico, en unidades de integrador, correspondiente al patrón interno (ver 7.6.2.2);

m la masa del producto aromatizante, en miligramos;

m_E la masa del patrón interno, en miligramos;

K el factor de respuesta del componente a cuantificar en relación con el patrón interno (ver 7.6.2.1).

8.2 Método por adición

Se calcula el contenido C_x , expresado como porcentaje de masa, del componente a determinar, por medio de la fórmula siguiente:

$$C_x = \frac{m_R}{m} \cdot \frac{r}{r' - r} \quad (r' > r)$$

donde:

m_R la masa de la sustancia de referencia, en gramos (ver apartado 4.4);

m la masa del producto aromatizante, en gramos.

y

$$r = \frac{A_x}{A_y}$$

donde:

A_x el área del pico correspondiente al componente X en el cromatograma "D" (ver apartado 7.6.3);

A_y el área del pico correspondiente al componente Y, próximo a X en el cromatograma "D".

y

$$r' = \frac{A'_x}{A'_y}$$

donde:

A'_x el área del pico correspondiente al componente X en el cromatograma "E" (ver 7.6.3);

A'_y el área del pico correspondiente al componente Y, próximo a X en el cromatograma "E".

8.3 Método de normalización interna

Cuando la muestra es completamente volátil (aceite esencial sin residuo) bajo las condiciones de ensayo y el cromatograma obtenido no presenta demasiados picos pequeños, se calcula el contenido C_x , expresado como porcentaje, del componente a determinar mediante la fórmula siguiente:

$$C_x = \frac{A_x}{\sum A} \cdot 100$$

donde:

A_x es el área del pico, en unidades de integrador, correspondiente al componente a cuantificar;

$\sum A$ es la sumatoria de las áreas, en unidades de integrador, de la totalidad de los picos.

8.4 Resultados y repetibilidad

Se toman como resultados para el factor de respuesta K y el contenido del componente a determinar C_x los valores medios de por lo menos tres determinaciones efectuadas con la misma muestra. Los distintos valores considerados para el cálculo de estas medias no deben alejarse más allá de un determinado porcentaje de tales medias (normalmente, $\pm 2,5$ %). Dicho porcentaje así como el número de determinaciones tienen que estar especificados en los diversos métodos o normas particulares.

9 Informe del ensayo

El informe debe incluir la siguiente información:

- a) identificación de la muestra;
- b) referencia a esta norma;
- c) tipo de aparato;
- d) características de la columna (material; longitud; diámetro interior; fase estacionaria; espesor de la película, temperatura de la columna o programación de temperatura);
- e) características del sistema de inyección (tipo y temperatura);
- f) características del detector (tipo y temperatura);
- g) tipo y flujo del gas portador;
- h) características del registrador (amplitud máxima de la señal, velocidad de avance del papel);
- i) resultados obtenidos.