

Santa Marta, 29 de Octubre de 2010.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-149589- -00004-0000

Fecha: 2010-11-02 16:20:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 449 RESPUESOPOSICI Folios: 63

Señores:

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Ciudad.

REF: Solicitud de Patente de Invención ODIN ENERGY SANTA MARTA CORPORATION S.A.

RAD: 09-149589

MAURICIO ALVAREZ GOMEZ, mayor de edad, residente en la Ciudad de Santa Marta, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 91.492.140 de Bucaramanga, y portador de la T.P. No. 105.211 del C.S. de la J., actuando en calidad de apoderado judicial de ODIN ENERGY SANTA MARTA CORPORATION S.A., por medio del presete escrito me permito ALLEGAR escrito de contestación a la Oposición presentada por la FEDERACION NACIONAL DE BIOCOMBUSTIBLES DE COLOMBIA.

Atentamente,

MAURICIO ALVAREZ GOMEZ

C.C. No. 91.492.140 de Bucaramanga

T.P. 105.211 del C.S. de la J.

Carrera 1 No. 22-58, Edificio Bahía Centro, Of. 406

Santa Marta

320-5748076 / (5) 4313233 Ext. 105.

Santa Marta DTCH, Octubre 25 de 2010.

INFORME DE RESPUESTA A OPOSICIÓN

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

**TÍTULO: "MÉTODO DE DETERMINACION DE FAMES EN BIODIESEL
POR CROMATOGRAFÍA DE GAS".**

A continuación se presentan explicaciones técnicas que responden a la actuación de oposición interpuesta por Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia a la solicitud de patente de invención *"Método de determinación de FAMES en Biodiesel por cromatografía de gas"*.

El fundamento alegado en la oposición se basa en el argumento de la existencia de la norma ISO 5508:1990 *"Animal and vegetable fats and oils – Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids"*, esto se traduce como "Grasas y aceites animales y vegetales- Análisis por cromatografía de gas de metil ésteres de ácidos grasos".

La norma ISO 5508:1990 es una revisión de la norma ISO 5508:1978 y fue preparada por un comité técnico denominado "Agricultural food products" (productos agrícolas alimenticios). Esta técnica se desarrolló en función del estudio de grasas y aceites en el sector agrícola alimenticio, el alcance de esta norma es proporcionar una guía general para la aplicación de la cromatografía de gas, usando columnas empacadas o capilares, para determinar cuantitativa y cualitativamente la composición de una mezcla de metil ésteres de ácidos grasos obtenidos en concordancia al método de la norma ISO 5509.

La aplicación de la norma ISO 5508:1990 se enmarca en el área de grasas alimenticias, mientras que en el caso de la invención el campo es el de los

métodos de análisis en el área de los biocombustibles, en especial en Biodiesel. La norma ISO 5508:1990 se ha usado internacionalmente como guía general para el análisis cromatográfico de metil ésteres. Siendo así ésta última, una de las referencias de la norma EN 14103, la cual se ha empleado como antecedente a la invención del *"Método de Determinación de FAMES en Biodiesel por Cromatografía de Gas"*. Donde las siglas FAMES significan Fatty Acids Methyl Esters (Metil Ésteres de Ácidos Grasos).

En el Anexo 1, se adjunta fotocopia de la norma ISO 5508:1990, para efectos de revisión de la Superintendencia de Industria y Comercio, en la cual se puede examinar y verificar que no se puede considerar como igual a la invención. Se puede constatar muchas diferencias en todas las secciones de la norma, entre estas se tienen; el rango de tamaño de cadena de metil ésteres a determinar el cual no está especificado, la forma de cálculo del porcentaje de metil éster de forma general, en la repetibilidad el valor de la desviación estándar no debe ser mayor de 1%, mientras en el método de la invención se obtiene una repetibilidad con una desviación estándar calculada menor o igual a 0,2% para el porcentaje másico de metil ésteres, ver Tabla 1. En la ISO 5508:1990 también se pueden encontrar recomendaciones generales para la construcción de columnas empacadas y capilares para el análisis, así como también inherentes al gas de arrastre inerte, una temperatura en el detector de aproximadamente 200°C y un horno capaz de calentar la columna a una temperatura de por lo menos 260°C.

Tabla 1. Comparación de valores de Repetibilidad en el método de determinación de metil ésteres EN 14103 y método de la invención.

Repetibilidad	Norma EN 14103:2003	Método Mejorado
Contenido de metil éster, (% m/m)	1.6	0.20
Contenido de metil éster del ácido linoleico, (% m/m)	0.1	0.01

El oponente también se refiere a la Norma Técnica Colombiana NTC 5013 de título *"Grasas y aceites vegetales y animales. Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por cromatografía de gas"*, en el Anexo 2 se adjunta fotocopia de esta norma para efectos demostrativos para la SIC. La norma NTC 5013 fue estudiada por el *"Comité Técnico 311501 Aceites y Grasas Animales y Vegetales Comestibles"* y ratificada por el Consejo Directivo del ICONTEC de fecha 2001-11-28. En su contenido se puede observar que el alcance es el mismo de la norma ISO 5508:1990 y muchas de sus secciones están relacionadas a esta norma, sólo que se presenta en forma resumida.

La norma NTC 5013 es una guía general de aplicación de la cromatografía de gas para determinar esteres de ácidos grasos bajo las indicaciones de la ISO 5508:1990 a la cual incluyen en las referencias bibliográficas. Por ser una guía general de aplicación de una técnica analítica como lo es la cromatografía de gas para el análisis en forma cualitativa y cuantitativa en mezclas de metil ésteres, no se considera igual a la invención *"Método de Determinación de FAMES en Biodiesel por Cromatografía de Gas"*, para la cual se ha solicitado patente. En este último método, se establece claramente el área de aplicación, el rango de tamaño de cadena carbonada en el que es aplicable el método, se presenta la preparación e inyección de muestras y estándar interno y fórmula (ver Anexo 3), de una forma que se traduce en un método con una desviación estándar satisfactoria para los resultados (Tabla 1).

El oponente alega que las casas fabricantes de equipos de cromatografía de gas al comercializar los equipos entregan recomendaciones sobre el método a seguir para la determinación de FAMES en Biodiesel. Al respecto se tiene que las casas fabricantes suelen elaborar Notas de Aplicación donde ajustan las condiciones operacionales del equipo que están ofreciendo, para que

cumpla con una norma referida. Ejemplo de esto es la aplicación de la casa *Perkin Elmer* que el oponente adjuntó, la cual esta basada en la norma europea EN 14103, ver Anexo 4. En adición, en el Anexo 5 se presenta fotocopia de una nota de aplicación de la casa *Agilent Technologies* de la norma europea EN 14103, un equipo de esta marca fue el empleado en el desarrollo de la invención "*Método de Determinación de FAMES en Biodiesel por Cromatografía de Gas*".

En este orden de ideas, en el Anexo 6 se adjunta fotocopia de la norma EN 14103 "*Productos derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación de los contenidos de éster y éster metílico de ácido linoléico*". Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico "*AEN/CTN 34 Productos Alimentarios*", versión en español de Septiembre 2003. Esta es una norma europea donde se establece una metodología de determinación de FAMES por cromatografía de gas y precisamente se incluye en la sección de Antecedentes del informe técnico de la solicitud de patente de invención. Esto debido a que se empleó como referencia para el desarrollo del método de la invención la cual proporciona un avance tecnológico para la metodología expuesta en la EN 14103 aplicable en análisis de Biodiesel.

En la norma EN 14103 se establece un rango de aplicación de determinación de metil ésteres de cadena de C_{14} a C_{24} , mientras que el método de la invención refiere un rango de aplicación de C_8 a C_{24} , de esta forma se están incluyendo cadenas de C_8 , C_{10} y C_{12} que antes no eran cuantificables en la norma europea. Este es uno de los avances más importantes debido a que dependiendo de la naturaleza del aceite o grasa empleado en la elaboración de Biodiesel, este puede contener en su mezcla de metilésteres componentes de cadenas C_8 a C_{12} , los cuales no eran cuantificables con la norma existente para esta aplicación y que deben ser incluidos ya que

forman parte de la mezcla Biocombustible. En efectos de cumplimiento de parámetros como por ejemplo el Contenido de metiléster mayor o igual a 96,5%, puede marcar diferencia el hecho de no cuantificar estas cadenas carbonadas más cortas. En las Figuras 1, 2 y 3, se presentan los cromatogramas de un material de referencia, una mezcla de metil ésteres de aceite de palma y una mezcla de metil ésteres de aceite de palmiste, respectivamente, en estos se constata la presencia de compuestos de cadena C₈, C₁₀ y C₁₂. Por otra parte, en diferentes países se están realizando investigaciones para tratar de emplear tipos de aceites vegetales no comestibles, en la producción de Biodiesel y cada aceite tiene una distribución de porcentajes de ácidos grasos de diferentes tamaños de cadena.

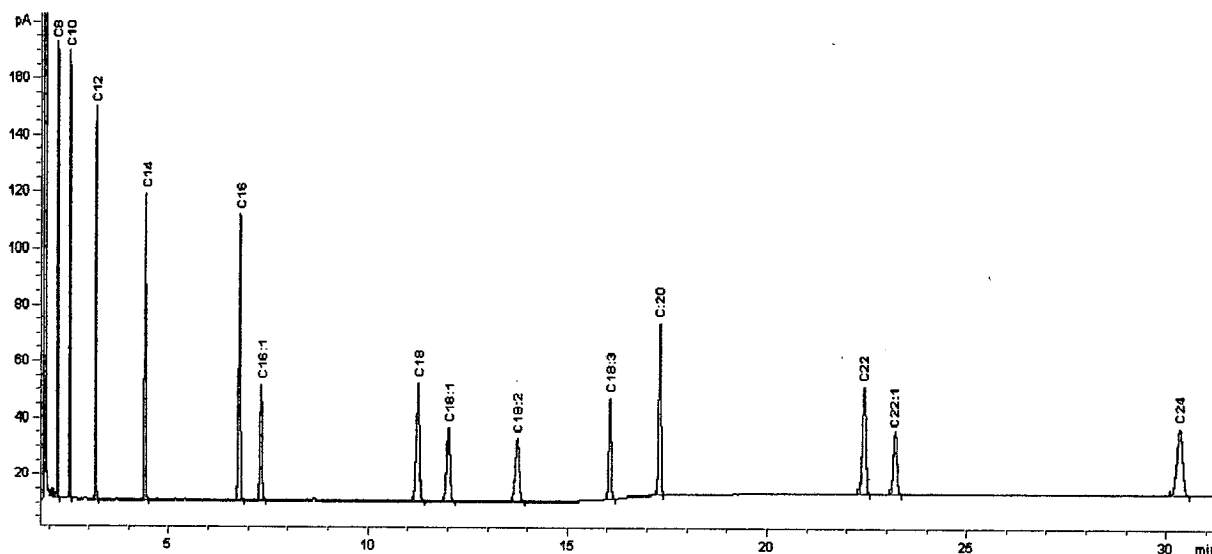


Figura 1. Perfil cromatográfico del material de referencia, ver ficha en Anexo 7.

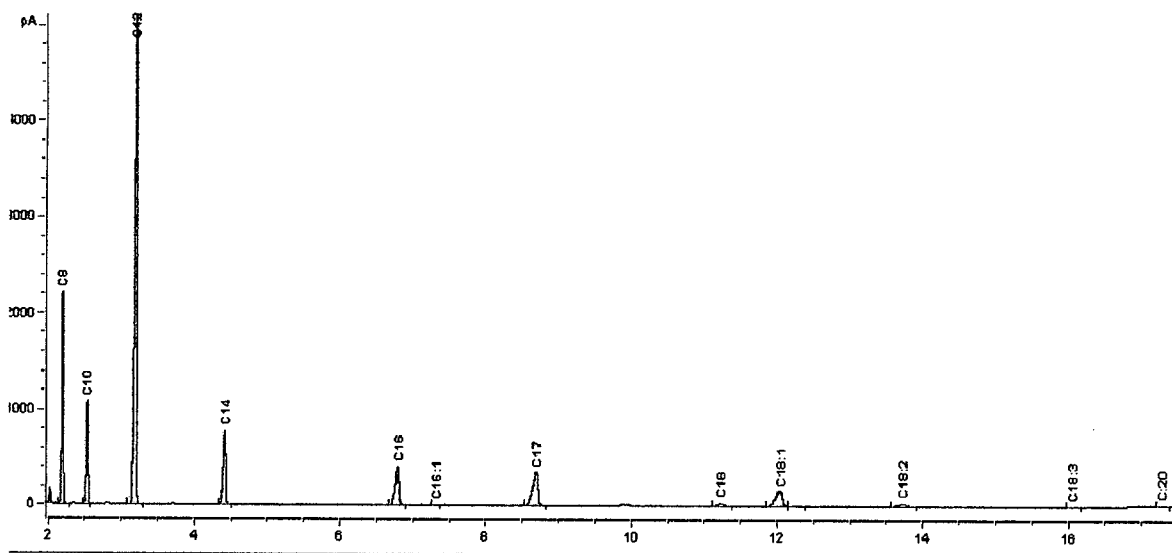


Figura 2. Perfil cromatográfico de un biodiesel obtenido del aceite de palmiste.

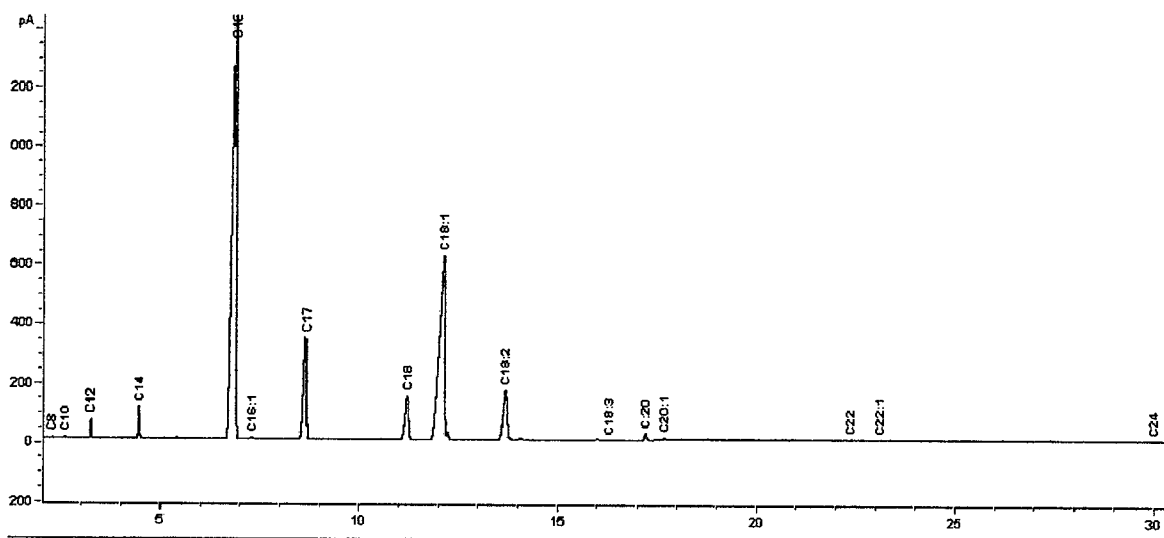


Figura 3. Perfil cromatográfico de un biodiesel obtenido de aceite de palma.

En la norma EN 14103 la preparación de la muestra y su representación en la fórmula de cálculo del porcentaje másico contenido de metiléster, se hace en forma volumétrica, mientras que en la invención se toman los datos de masa para introducirlos en la ecuación. Con este cambio fundamental, se ha logrado una mejora en la desviación estándar de los resultados obtenidos para una misma muestra, misma inyección y equipo. Ver Tabla 1 y detalles en Anexo 3.

Por otra parte, se encuentran las condiciones de aplicación del ensayo de cromatografía de gas, las cuales se presentan claramente en el informe técnico de la invención. Adicionalmente, se puede observar en la Figura 4, una gráfica de las curvas de calentamiento en el equipo de cromatografía, en el caso de las notas de aplicación anexadas de Perkin Elmer y Agilent Technologies, de la norma EN 14103 y de la invención, las cuales son notoriamente diferentes.

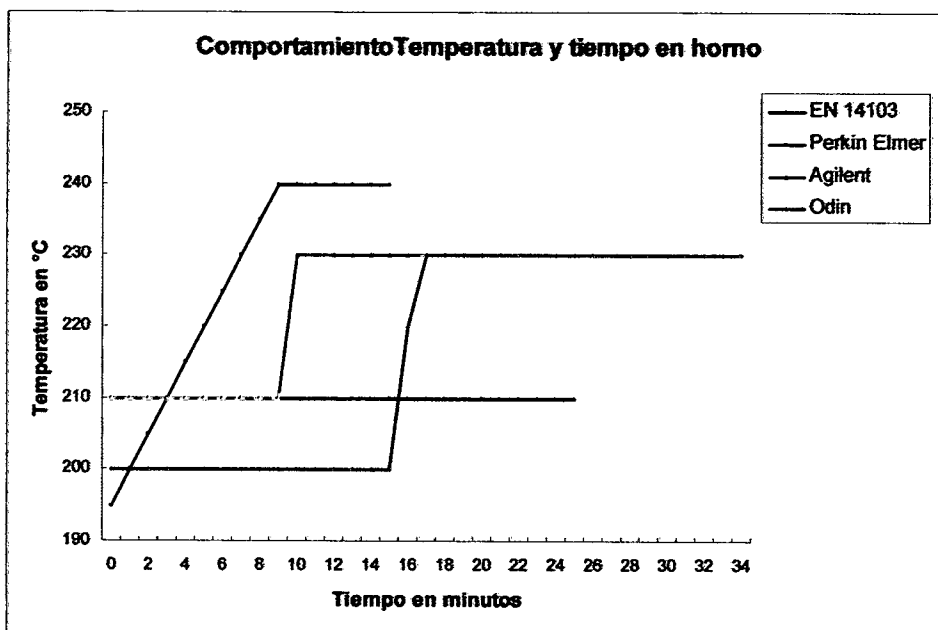


Figura 4. Comparación de gráfico de comportamiento de temperatura en el tiempo en el horno de Cromatografía de Gas para determinación de metil ésteres.

El argumento final de oponente se refiere la utilización del método en el análisis de Biodiesel por un espacio de tiempo ajustado a la norma NTC 5013 por parte de algunos productores nacionales de Biodiesel. Este hecho se compara a la experiencia del Laboratorio de Odin Energy Santa Marta Corp. S.A., empresa solicitante de la patente de invención y cuya planta fue la primera en obtener el registro del Ministerio de Minas y Energía como productor nacional de Biodiesel, en Abril de 2008 y en ese entonces contaba con el laboratorio mas completo para el análisis de Biodiesel en Colombia. Desde el inicio de las operaciones se ha empleado la metodología de la norma EN 14103 en el análisis de Contenido de metil éster en Biodiesel, según resoluciones vigentes a la fecha del Ministerio de Minas y Energía. En la invención de la solicitud de patente titulada "*Método de Determinación de FAMES en Biodiesel por Cromatografía de Gas*", se presenta un avance tecnológico para la aplicación de la cromatografía de gas en este análisis de Biodiesel, siendo mas completo al presentado en la EN 14103.

Por todo lo anterior, no se encuentran validos los argumentos presentados por la Federación Nacional de Biocombustibles y en concordancia a este hecho, no se considera procedente la actuación de oposición.

Estamos disponibles para atender cualquier duda de la SIC en cuanto a la invención o las aclaraciones que se están presentando en este informe.

ANEXO 1. ESTANDAR INTERNACIONAL ISO 5508:1990.

INTERNATIONAL STANDARD

**ISO
5508**

Second edition
1990-09-15

Animal and vegetable fats and oils — Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids

*Corps gras d'origines animale et végétale — Analyse par
chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras*



Copyright © 1990 by International Organization for Standardization
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced
without the prior written permission of the ISO Central Secretariat.

Reference number
ISO 5508:1990(E)

u

Foreword

ISO (the International Organization for Standardization) is a worldwide federation of national standards bodies (ISO member bodies). The work of preparing International Standards is normally carried out through ISO technical committees. Each member body interested in a subject for which a technical committee has been established has the right to be represented on that committee. International organizations, governmental and non-governmental, in liaison with ISO, also take part in the work. ISO collaborates closely with the International Electrotechnical Commission (IEC) on all matters of electrotechnical standardization.

Draft International Standards adopted by the technical committees are circulated to the member bodies for voting. Publication as an International Standard requires approval by at least 75 % of the member bodies casting a vote.

International Standard ISO 5508 was prepared by Technical Committee ISO/TC 34, *Agricultural food products*.

This second edition cancels and replaces the first edition (ISO 5508:1978), of which it constitutes a technical revision.

© ISO 1990

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying and microfilm, without permission in writing from the publisher.

International Organization for Standardization
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Switzerland

Printed in Switzerland

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION
15, rue du Prince Royal, 1000 Bruxelles
15, rue du Prince Royal, 1000 Bruxelles
15, rue du Prince Royal, 1000 Bruxelles

Animal and vegetable fats and oils — Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids

1 Scope

This International Standard gives general guidance for the application of gas chromatography, using packed or capillary columns, to determine the qualitative and quantitative composition of a mixture of fatty acid methyl esters obtained in accordance with the method specified in ISO 5509.

The method is not applicable to polymerized fatty acids.

2 Normative reference

The following standard contains provisions which, through reference in this text, constitute provisions of this International Standard. At the time of publication, the edition indicated was valid. All standards are subject to revision, and parties to agreements based on this International Standard are encouraged to investigate the possibility of applying the most recent edition of the standard indicated below. Members of IEC and ISO maintain registers of currently valid International Standards.

ISO 5509:1978, *Animal and vegetable fats and oils — Preparation of methyl esters of fatty acids*.

3 Reagents

3.1 Carrier gas

Inert gas (nitrogen, helium, argon, hydrogen, etc.), thoroughly dried and with an oxygen content of less than 10 mg/kg.

NOTE 1 Hydrogen, which is used as a carrier gas only with capillary columns, can double the speed of analysis but is hazardous. Safety devices are available.

3.2 Auxiliary gases

3.2.1 Hydrogen (purity $\geq 99,9\%$), free from organic impurities.

3.2.2 Air or oxygen, free from organic impurities.

3.3 Reference standard

A mixture of methyl esters of pure fatty acids, or the methyl esters of a fat of known composition, preferably similar to that of the fatty matter to be analysed.

Care shall be taken to prevent the oxidation of polyunsaturated fatty acids.

4 Apparatus

The instructions given relate to the usual equipment used for gas chromatography, employing packed and/or capillary columns and a flame-ionization detector. Any apparatus giving the efficiency and resolution specified in 5.1.2 is suitable.

4.1 Gas chromatograph.

The gas chromatograph shall comprise the following elements.

4.1.1 Injection system.

Use an injection system either

- with packed columns, having the least dead-space possible (in this case the injection system shall be capable of being heated to a temperature $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ higher than that of the column), or
- with capillary columns, in which case the injection system shall be specially designed for use with such columns. It may be of the split type or it may be of the splitless on column injector type.

NOTE 2 In the absence of fatty acids with less than 16 carbon atoms, a moving needle injector may be used.

4.1.2 Oven.

The oven shall be capable of heating the column to a temperature of at least 260 °C and of maintaining the desired temperature to within 1 °C with a packed column and within 0,1 °C with a capillary column. The last requirement is particularly important when a fused silica tube is used.

The use of temperature-programmed heating is recommended in all cases, and in particular for fatty acids with less than 16 carbon atoms.

4.1.3 Packed column.

4.1.3.1 Column, constructed of a material inert to the substances to be analysed (i.e. glass or stainless steel) having the following dimensions.

a) Length: 1 m to 3 m. A relatively short column should be used when long-chain fatty acids (above C₂₀) are present. When analysing acids with 4 or 6 carbon atoms, it is recommended that a column 2 m in length is used.

b) Internal diameter: 2 mm to 4 mm.

NOTES

3 If polyunsaturated components with more than three double bonds are present, they may be decomposed in a stainless steel column.

4 A system with packed twin columns may be used.

4.1.3.2 Packing, comprising the following elements.

a) Support: Acid-washed and silanized diatomaceous earth, or other suitable inert support with a narrow range of grain size (25 µm range between the limits 125 µm to 200 µm), the average grain size being related to the internal diameter and length of the column.

b) Stationary phase: Polyester type of polar liquid (e.g. diethylene glycol polysuccinate, butanediol polysuccinate, ethyleneglycol polyadipate, etc.), cyanosilicones or any other liquid permitting the chromatographic separation required (see clause 5). The stationary phase should amount to 5 % (m/m) to 20 % (m/m) of the packing. A non-polar stationary phase can be used for certain separations.

4.1.3.3 Conditioning of the column.

With the column disconnected, if possible, from the detector, gradually heat the oven to 185 °C and pass a current of inert gas through the freshly prepared column at a rate of 20 ml/min to 60 ml/min for at least 16 h at this temperature, and for a further 2 h at 195 °C.

4.1.4 Capillary column.

4.1.4.1 Tube, made of a material inert to the substances to be analysed (usually glass or fused silica). The internal diameter shall be between 0,2 mm and 0,8 mm. The internal surface shall undergo an appropriate treatment (e.g. surface preparation, inactivation) before receiving the stationary phase coating. A length of 25 m is sufficient in most cases.

4.1.4.2 Stationary phase, usually of the type polyglycol [poly(ethylene glycol) 20 000], polyester (butanediol polysuccinate) or polar polysiloxane (cyanosilicones). Bonded (cross-linked) columns are suitable.

NOTE 5 There is a risk of polar polysiloxanes giving rise to difficulties in the identification and separation of linolenic acid and C₂₀ acids.

The coatings shall be thin, i.e. 0,1 µm to 0,2 µm.

4.1.4.3 Assembly and conditioning of the column.

Observe the normal precautions for assembling capillary columns, i.e. arrangement of the column in the oven (support), choice and assembly of joints (leak tightness), positioning of the ends of the column in the injector and the detector (reduction of dead-spaces). Place the column under a flow of carrier gas [e.g. 0,3 bar (30 kPa) for a column of length 25 mm and internal diameter 0,3 mm].

Condition the column by temperature programming of the oven at 3 °C/min from ambient temperature to a temperature 10 °C below the decompose limit of the stationary phase. Maintain the oven at this temperature for 1 h until stabilization of the baseline. Return it to 180 °C to work under isothermal conditions.

NOTE 6 Suitably pre-conditioned columns are available commercially.

4.1.5 Detector, preferably capable of being heated to a temperature above that of the column.

4.2 Syringe.

The syringe shall have a maximum capacity of 10 µl, and be graduated in 0,1 µl divisions.

4.3 Recorder.

If the recorder curve is to be used to calculate the composition of the mixture analysed, an electronic recorder of high precision, compatible with the apparatus used, is required. The recorder shall have the following characteristics:

a) rate of response, below 1,5 s, preferably 1 s (the rate of response is the time taken for the re-

ording pen to pass from 0 % to 90 % following the sudden introduction of a 100 % signal);

- b) width of the paper, 20 cm minimum;
- c) paper speed, adjustable to values between 0,4 cm/min and 2,5 cm/min.

4.4 Integrator or calculator (optional).

Rapid and accurate calculation can be performed with the help of an electronic integrator or calculator. This shall give a linear response with adequate sensitivity, and the correction for deviation of the base-line shall be satisfactory.

5 Procedure

The operations described in 5.1 to 5.3 relate to the use of a flame-ionization detector.

As an alternative a gas chromatograph employing a catharometer detector (working on the principle of thermal conductivity changes) may be used. The operating conditions are then modified as described in clause 7.

5.1 Test conditions

5.1.1 Selection of optimum operating conditions

5.1.1.1 Packed column

In the selection of the test conditions, the following variables should be taken into account:

- a) the length and diameter of the column;
- b) the nature and amount of the stationary phase;
- c) the temperature of the column;
- d) the carrier gas flow;
- e) the resolution required;
- f) the size of the test portion, selected in such a way that the assembly of the detector and electrometer gives a linear response;
- g) the duration of analysis.

In general, the values given in table 1 and table 2 will lead to the desired results, i.e. at least 2000 theoretical plates per metre of column length for methyl stearate and its elution within about 15 min.

Where the apparatus allows it, the injector should be at a temperature of about 200 °C and the detector

at a temperature equal to or higher than that of the column.

As a rule, the ratio of the flow-rate of the hydrogen supplied to the flame-ionization detector to that of the carrier gas varies from 1:2 to 1:1 depending on the diameter of the column. The flow of oxygen is about 5 to 10 times that of the hydrogen.

Table 1

Internal diameter of column mm	Carrier gas flow ml/min
2	15 to 25
3	20 to 40
4	40 to 60

Table 2

Concentration of stationary phase % (m/m)	Column temperature °C
5	175
10	180
15	185
20	185

5.1.1.2 Capillary column

The properties of efficiency and permeability of capillary columns mean that the separation between constituents and the duration of the analysis are largely dependent on the flow-rate of the carrier gas in the column. It will therefore be necessary to optimize the operating conditions by acting on this parameter (or more simply on the headloss of the column), according to whether one wishes to improve the separations or to make a rapid analysis.

5.1.2 Determination of the number of theoretical plates (efficiency) and resolution

(See figure 1.)

Carry out the analysis of a mixture of methyl stearate and methyl oleate in about equivalent proportions (for example, methyl esters from cocoa butter).

Choose the temperature of the column and the carrier gas flow so that the maximum of the methyl stearate peak is recorded about 15 min after the solvent peak. Use a sufficient quantity of the mixture of methyl esters that the methyl stearate peak occupies about three-quarters of the full scale.

Calculate the number of theoretical plates, n (efficiency), using the formula

$$n = 16 \left(\frac{d_{r(I)}}{w_{(I)}} \right)^2$$

and the resolution, R , using the formula

$$R = \frac{2\Delta}{w_{(I)} + w_{(II)}}$$

where

$d_{r(I)}$ is the retention distance, in millimetres, from the start of the chromatogram to the maximum of the peak for methyl stearate;

$w_{(I)}$ and $w_{(II)}$ are the widths, in millimetres, of the peaks for methyl stearate and methyl oleate respectively, measured between the points of intersection of the tangents at the points of inflexion of the curve with the base-line;

Δ is the distance, in millimetres, between the peak maxima for methyl stearate and methyl oleate.

The operating conditions to be selected are those which will afford at least 2000 theoretical plates per metre of column length for methyl stearate and a resolution of at least 1,25.

5.2 Test portion

Using the syringe (4.2), take 0,1 μl to 2 μl of the solution of methyl esters prepared according to ISO 5509 and inject them into the column.

In the case of esters not in solution, prepare a solution of approximately 100 mg/ml in heptane of chromatographic quality, and inject 0,1 μl to 1 μl of this solution.

If the analysis is for constituents present only in trace amounts, the size of the test portion may be increased (up to ten-fold).

5.3 Analysis

Generally, the operating conditions shall be those defined in 5.1.1.

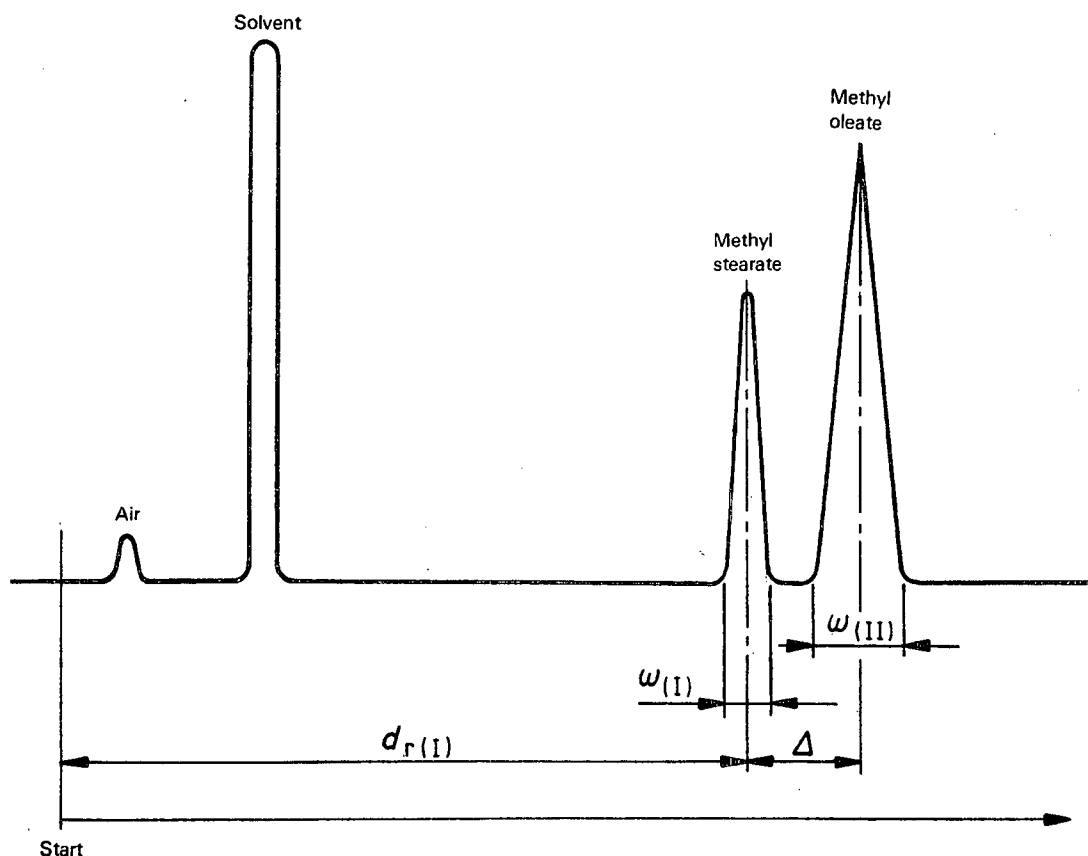


Figure 1 — Chromatogram for determining the number of theoretical plates (efficiency) and resolution

Nevertheless, it is possible to work with a lower column temperature when the determination of fatty acids with fewer than 12 carbon atoms is required, or at a higher temperature when determining fatty acids with more than 20 carbon atoms. On occasion, it is possible to employ temperature programming in both these cases. For example, if the sample contains the methyl esters of fatty acids with fewer than 12 carbon atoms, inject the sample at 100 °C (or at 50 °C to 60 °C if butyric acid is present) and immediately raise the temperature at a rate of 4 °C/min to 8 °C/min to the optimum. In certain cases, the two procedures can be combined.

After the programmed heating, continue the elution at a constant temperature until all the components have been eluted. If the instrument does not have programmed heating, use it at two fixed temperatures between 100 °C and 195 °C.

If necessary, it is recommended that an analysis be carried out on two fixed phases with different polarities to verify the absence of masked peaks, for example for fish oils or in the case of the simultaneous presence of C_{18:3} and C_{20:0}, or C_{18:3} and C_{18:2} conjugated.

5.4 Preparation of the reference chromatogram and reference graphs

Analyse the reference standard mixture (3.3), using the same operating conditions as those employed for the sample, and measure the retention times or retention distances for the constituent fatty acids. Construct on semi-logarithmic paper, for any degree of unsaturation, the graphs showing the logarithm of retention time or distance as a function of the number of carbon atoms. In isothermal conditions, the graphs for straight-chain acids of the same degree of unsaturation should be straight lines. These lines should be approximately parallel.

It is necessary to avoid conditions such that "masked peaks" exist, i.e. where the resolution is insufficient to separate two constituents.

6 Expression of results

6.1 Qualitative analysis

Identify the methyl ester peaks for the sample from the graphs prepared in 5.4, if necessary by interpolation.

6.2 Quantitative analysis

6.2.1 Determination of the composition

Apart from exceptional cases, use the internal normalization method, i.e. assume that the whole of the components of the sample are represented on the

chromatogram, so that the total of the areas under the peaks represents 100 % of the constituents (total elution).

If the equipment includes an integrator, use the figures obtained therefrom. If not, determine the area under each peak by multiplying the height of the peak by its width at mid-height, and where necessary take into account the various attenuations used during the recording.

6.2.2 Method of calculation

6.2.2.1 General case

Calculate the content of a given component *i*, expressed as a percentage by mass of methyl esters, by determining the percentage represented by the area of the corresponding peak relative to the sum of the areas of all the peaks, using the following formula:

$$\frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

where

A_i is the area under the peak corresponding to component *i*;

$\sum A$ is the sum of the areas under all the peaks.

Give the result to one decimal place.

NOTE 7 In this general case, the result of the calculation based on relative areas is considered to represent a percentage by mass. For the cases in which this assumption is not allowed, see 6.2.2.2.

6.2.2.2 Use of correction factors

In certain cases, for example in the presence of fatty acids with fewer than 8 carbon atoms or of acids with secondary groups, when using thermal conductivity detectors or where the highest degree of accuracy is particularly required, correction factors should be used to convert the percentages of peak areas into mass percentages of the components.

Determine the correction factors with the help of a chromatogram derived from the analysis of a reference mixture of methyl esters of known composition, carried out under operating conditions identical with those used for the sample.

For this reference mixture, the percentage by mass of component *i* is given by the formula

$$\frac{m_i}{\sum m} \times 100$$

where

m_i is the mass of component i in the reference mixture;

$\sum m$ is the total of the masses of the various components of the reference mixture.

From the chromatogram of the reference mixture (5.4), calculate the percentage (area/area) for component i as follows:

$$\frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

where

A_i is the area under the peak corresponding to component i ;

$\sum A$ is the sum of the areas under all the peaks.

The correction factor is then calculated as

$$K_i = \frac{m_i \times \sum A}{A_i \times \sum m}$$

Commonly, the correction factors are expressed relative to K_{C16} , so that the relative factors become

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

For the sample, the content of each component i , expressed as a percentage by mass of methyl esters, is

$$\frac{K'_i \times A_i}{\sum (K'_i \times A_i)} \times 100$$

Give the results to one decimal place.

6.2.2.3 Use of an internal standard

In certain analyses (for example where not all of the fatty acids are quantified, such as when acids with 4 and 6 carbons are present alongside acids with 16 and 18 carbons, or when it is necessary to determine the absolute amount of a fatty acid in a sample) it is necessary to use an internal standard. Fatty acids with 5, 15 or 17 carbons are frequently used. The correction factor (if any) for the internal standard should be determined.

The percentage by mass of component i , expressed as methyl esters, is then given by the formula

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

where

A_i is the area under the peak corresponding to component i ;

A_s is the area under the peak corresponding to the internal standard;

K'_i is the correction factor for component i (relative to K_{C16});

K'_s is the correction factor for the internal standard (relative to K_{C16});

m is the mass, in milligrams, of the test portion;

m_s is the mass, in milligrams, of the internal standard.

Give the results to one decimal place.

6.2.3 Precision

The values for repeatability and reproducibility given below cover the preparation of the methyl esters according to ISO 5509, together with the gas chromatographic analysis described in this International Standard. The figures have been accepted historically.

6.2.3.1 Repeatability

The difference between the values of two determinations, carried out in rapid succession by the same operator using the same apparatus on the same test sample and for constituents present in excess of 5 % (m/m), shall not exceed 3 % (relative) of the determined value, with a maximum of 1 % (m/m). For constituents present in smaller quantities, the difference shall not exceed a value of 0,2 % (m/m).

6.2.3.2 Reproducibility

The difference between the values of the final result obtained by two different laboratories, using this method for the analysis of the same laboratory sample for constituents present in excess of 5 % (m/m), shall not exceed 10 % (relative) of the determined value, with a maximum of 3 % (m/m). For constituents present in smaller quantities, this difference shall not exceed a value of 0,5 % (m/m).

7 Special case — Use of a catharometer detector (working on the principle of thermal conductivity changes)

A gas chromatograph employing a detector working on the principle of thermal conductivity changes (a catharometer) may also be used for the determination of the qualitative and quantitative composition of a mixture of fatty acid methyl esters. If it is

used, the conditions specified in clause 4 and clause 5 should be modified as shown in table 3.

For quantitative analysis, use the correction factors defined in 6.2.2.2.

Table 3

Variable	Value/condition
Column	Length: 2 m to 4 m Internal diameter: 4 mm
Support	Grain size between 160 μm and 200 μm
Concentration of stationary phase	15 % (m/m) to 25 % (m/m)
Carrier gas	Helium or, failing this, hydrogen, with as low an oxygen content as possible
Auxiliary gases	None
Injector temperature	From 40 °C to 60 °C above that of the column
Column temperature	180 °C to 200 °C
Flow of carrier gas	Usually between 60 ml/min and 80 ml/min
Size of test portion injected	Usually between 0,5 μl and 2 μl

8 Test report

The test report shall specify the methods used for the preparation of the methyl esters and for the gas chromatographic analysis, and the results obtained. It shall also mention all operating details not specified in this International Standard, or regarded as optional, together with details of any incidents which may have influenced the results.

The test report shall include all information necessary for the complete identification of the sample.

This page intentionally left blank

This page intentionally left blank

UDC [664.3 + 665.2/.3]:665.12:543.544.25:661.73

Descriptors: agricultural products, fats, animal fats, vegetable fats, oils, animal oils, vegetable oils, fatty acids, methyl ester, gas phase chromatography.

Price based on 7 pages

ANEXO 2. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 5013.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA

NTC
5013

2001-11-28

GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES. ANÁLISIS DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRFÍA DE GASES



E: ANIMAL AND VEGETABLE FATS AND OILS. ANALYSIS BY
GAS CHROMATOGRAPHY OF METHYL ESTERS OF
FATTY ACIDS

CORRESPONDENCIA:

DESCRIPTORES: análisis cromatografía ésteres
metílicos.

I.C.S.: 67.200.10

Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC)
Apartado 14237 Bogotá, D.C. - Tel. 6078888 - Fax 2221435

PRÓLOGO

El Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, **ICONTEC**, es el organismo nacional de normalización, según el Decreto 2269 de 1993.

ICONTEC es una entidad de carácter privado, sin ánimo de lucro, cuya Misión es fundamentalmente brindar soporte y desarrollo al productor y protección al consumidor. Colabora con el sector gubernamental y apoya al sector privado del país, para lograr ventajas competitivas en los mercados interno y externo.

La representación de todos los sectores involucrados en el proceso de Normalización Técnica está garantizada por los Comités Técnicos y el período de Consulta Pública, este último caracterizado por la participación del público en general.

La NTC 5013 fue ratificada por el Consejo Directivo del 2001-11-28.

Esta norma está sujeta a ser actualizada permanentemente con el objeto de que responda en todo momento a las necesidades y exigencias actuales.

A continuación se relacionan las empresas que colaboraron en el estudio de esta norma a través de su participación en el Comité Técnico 311501 Aceites y Grasas Animales y Vegetales Comestibles.

ACEGRASAS S.A.
CARULLA VIVERO S.A.
CENIPALMA
COMESTIBLES RICOS
COMPAÑÍA NACIONAL DE LEVADURAS S.A.
LEVAPAN
CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL
FÁBRICA DE GRASAS Y PRODUCTOS
QUÍMICOS GRASCO S.A.
FIRMENICH

GRASAS S.A.
INDUSTRIAS DEL MAÍZ S.A.
IVONNE BERNIER LABORATORIO LTDA
IBLAB
NULAB LTDA
SANTANDEREANA DE ACEITES
SOCIEDAD INDUSTRIAL DE GRASAS
VEGETALES-SIGRA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Además de las anteriores, en Consulta Pública el Proyecto se puso a consideración de las siguientes empresas:

ASOCIACIÓN NACIONAL DE
INDUSTRIALES ANDI
COLOMBINA S.A.
COMPAÑÍA NACIONAL DE CHOCOLATES
S.A.
DISA S.A.
FABRICA DE ACEITES Y MARGARINAS
DEL MAGDALENA

FABRICAS UNIDAS DE ACEITES Y
GRASAS VEGETALES
FEDERACIÓN NACIONAL DE
CULTIVADORES DE PALMA
FUNDACIÓN UNIVERSITARIA DEL ÁREA
ANDINA
GRASAS VEGETALES S.A.
INDUSTRIAS ALIMENTICIAS NOEL - ZENU

INSTITUTO NACIONAL DE VIGILANCIA DE
MEDICAMENTOS Y ALIMENTOS INVIMA
COLOMBIA GRASAS S.A.
COMERCIO DE ALIMENTOS DE
COLOMBIA S.A.
MINISTERIO DE AGRICULTURA
MINISTERIO DE DESARROLLO
ECONÓMICO
MINISTERIO DE SALUD
NESTLÉ DE COLOMBIA
PRODUCTOS ALIMENTICIOS CRONCH
S.A.

SGS COLOMBIA S.A.
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y
COMERCIO
UNILEVER ANDINA S.A.
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
UNIVERSIDAD DE CALDAS
UNIVERSIDAD DEL VALLE
UNIVERSIDAD INCCA DE COLOMBIA
UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO

ICONTEC cuenta con un Centro de Información que pone a disposición de los interesados
normas internacionales, regionales y nacionales.

DIRECCIÓN DE NORMALIZACIÓN

**GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES.
ANÁLISIS DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE LOS ÁCIDOS
GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES**

1. OBJETO

Esta norma establece pautas generales para la aplicación de la cromatografía de gases, usando columnas empacadas o capilares, para determinar la composición cuantitativa y cualitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos de conformidad con el método especificado en la NTC 4967.

El método no es aplicable a los ácidos grasos polimerizados.

2. REFERENCIA NORMATIVA

La siguiente norma contiene disposiciones que, a través de referencias hechas en el presente texto, se constituyen la integridad del mismo. En el momento de la publicación, era válida la edición indicada. Todas las normas están sujetas a revisión y se invita a las partes de convenios basados en la presente norma a investigar la posibilidad de aplicación de la edición más reciente de la norma indicada más adelante. Los miembros de IEC e ISO mantienen registros de las Normas Internacionales vigentes.

NTC 4967: Grasas y aceites vegetales y animales. Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos. (ISO 5509:2000).

3. REACTIVOS

3.1 GAS TRANSPORTADOR Ó FASE MÓVIL

Gas inerte (nitrógeno, helio, argón, hidrógeno, etc.), completamente seco y con un contenido de oxígeno inferior a 10 mg/kg.

ADVERTENCIA El hidrógeno que se usa como gas de arrastre solamente con columnas capilares, puede duplicar la velocidad del análisis pero es peligroso. Hay dispositivos de seguridad disponibles.

3.2 GASES AUXILIARES

3.2.1 Hidrógeno (pureza $\geq 99,9\%$), libre de impureza orgánicas.

3.2.2 Aire u oxígeno libre de impurezas orgánicas.

3.3 PATRÓN DE REFERENCIA

Una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos puros, o los ésteres metílicos de una grasa de composición conocida, preferiblemente similar a la de la materia grasa que se va a analizar.

Es necesario tener cuidado para prevenir la oxidación de ácidos grasos polinsaturados.

4. APARATOS

Las instrucciones suministradas hacen referencia al equipo usualmente utilizado para cromatografía de gases. Puede utilizarse cualquier equipo que proporcione la eficiencia y resolución adecuados para la separación de ésteres metílicos de ácidos grasos a analizar.

4.1 CROMATÓGRAFO DE GASES

El cromatógrafo de gases debe estar equipado de:

- Un sistema de inyección de acuerdo a la columna empleada.
- Un detector de ionización de llama (FID)
- Un horno
- Un sistema de adquisición de datos

4.2 COLUMNAS

Las columnas empleadas para el análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos pueden ser empacadas o capilares.

4.2.1 Columna empacada

Columna, construida de un material inerte a las sustancias que se van a analizar (es decir, vidrio o acero inoxidable) y con las siguientes características:

- a) Longitud: 1 m - 3 m. Debe usarse una columna relativamente corta cuando estén presentes ácidos grasos de cadena larga (por encima de C_{20}). Cuando se analicen ácidos con 4 átomos o 6 átomos de carbono, se recomienda usar una columna de 2 m de longitud.
- b) Diámetro interno: 2 mm - 4 mm.

- c) Soporte: Tierras de diatomáceas lavada por ácido y silanizada u otro soporte inerte adecuado con un rango estrecho de tamaño de grano ($25\mu\text{m}$ rango entre los límites de $125\mu\text{m}$ - $200\mu\text{m}$), ya que el tamaño promedio de grano está relacionado con el diámetro interno y la longitud de la columna.
- d) Fase estacionaria: Tipo poliéster de líquido polar (por ejemplo: polisuccinato de dietilenglicol, polisuccinato de butanediol, poliadipato de etilenglicol, etc.), cianosiliconas o cualquier otro tipo de líquido que permita la separación cromatográfica requerida. La cantidad de fase estacionaria debe ser igual a 5 % (m/m) a 20 % (m/m) del empaque. En el caso de ciertas separaciones puede usarse una fase estacionaria no polar.

Notas:

- 1) Si se encuentran presentes componentes polinsaturados con más de tres dobles enlaces, estos pueden descomponerse en una columna de acero inoxidable.
- 2) Puede usarse un sistema con dos columnas empacadas.

4.2.2 Columna capilar

Columna, construida de un material inerte, debe ser flexible de silica fundida, de una longitud de 25 m o más, de 0,20 mm a 0,35 mm de diámetro interno.

Los recubrimientos deben ser delgados entre $0,1\mu\text{m}$ y $0,2\mu\text{m}$.

Usualmente se emplean columnas de tipo polar, cuya fase estacionaria pueden ser de:

Metil polisiloxano, metil fenil polisiloxano, cianopropil polisiloxano, polietilenglicol, tales como CPTH-Sil 88, SP-2340, BPX-70, HP-1, HP-5, Carbowax-20 m¹

Nota 3. Existe riesgo de que polisiloxanos polares generen dificultades para la identificación y separación del ácido linoléico y de los ácidos C₂₀.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 MUESTRA DE ENSAYO

El volumen de la muestra de ensayo a aplicar es de $0,2\mu\text{l}$ a $2\mu\text{l}$ de la solución de ésteres metílicos preparados de conformidad con la NTC 4967. La cantidad depende del tipo de columna y del sistema de inyección.

Se mencionan estas marcas comerciales para dar una orientación al usuario de la norma, pero esto no constituye un compromiso del ICONTEC para limitar el uso de estos productos.

5.2 CONDICIONES GENERALES PARA EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Tabla 1. Condiciones generales para el análisis cromatográfico

Variable	Valor/condición
Columna	Empacada o capilar
Fase estacionaria	Polar
Gas transportador o fase móvil	Helio, nitrógeno, o en su defecto, hidrógeno con el menor contenido posible de oxígeno
Temperatura del inyector y del detector	a 50 °C por encima de la temperatura máxima de la columna
Temperatura de columna	Depende de la fase estacionaria y el tipo de análisis
Flujo de gas portador o fase móvil	Usualmente entre 1 ml/min y 80 ml/min
Tamaño de la muestra de ensayo inyectada	Usualmente entre 0,2 µl y 2 µl

Es necesario determinar las condiciones de operación (Flujo de fase móvil, velocidad de calentamiento de la columna, composición de la muestra de ensayo), según se desee mejorar la separación o efectuar un análisis rápido. Las condiciones de análisis se consideran adecuadas si se consigue al menos 2000 platos teóricos por metro de longitud de columna para el estearato de metilo y su elusión en un tiempo no mayor de 15 min, donde el número de platos teóricos es:

$$n = 16 \cdot t'_R / L$$

Donde:

- n = número de platos teóricos
- t'_R = tiempo de retención corregido para el patrón de estearato de metilo
- L = longitud de columna, en metros.

Es importante considerar que es posible trabajar con una temperatura más baja de columna cuando se requiere determinar ácidos grasos con menos de 12 átomos de carbono, o con temperatura más alta cuando se determinen ácidos grasos con más de 20 átomos de carbono. Ocasionalmente se puede programar la temperatura para estos dos casos.

5.3 ANÁLISIS DEL PATRÓN DE REFERENCIA

El patrón de referencia (Véase el numeral 3.3) se analiza bajo las mismas condiciones de operación usadas para la muestra de ensayo y se miden los tiempos de retención para los ácidos grasos constituyentes.

5.4 ANÁLISIS CUALITATIVO

Se identifican los ésteres metílicos para la muestra de ensayo por comparación de los tiempos de retención de cada componente con los tiempos de retención de los ésteres metílicos conocidos del patrón de referencia.

5.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO

Determinación de la composición

Fuera de casos excepcionales, se utiliza el método de normalización interna, es decir, se asume que la totalidad de componentes de la muestra están representados en el cromatograma, de manera que el total de áreas bajo los picos represente el 100 % de los constituyentes (elución total), suponiendo que el factor de respuesta para cada uno de los constituyentes es el mismo.

Es necesario tener en cuenta eliminar el área representada por el solvente.

6. INFORME DE ENSAYO

El informe de ensayo debe especificar los métodos usados para la preparación de ésteres metílicos y para el análisis de la cromatografía de gases, así como los resultados obtenidos. El informe también debe mencionar todos los detalles, junto con detalles de cualquier incidente que pueda haber tenido influencia sobre los resultados.

El informe de ensayo debe incluir toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra.

7. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

AOCS Official Methods Ce 11-96 Trans Fatty Acids in oils and Fats by Capillary GLC.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Animal and Vegetable Fats and Oils. Analysis by Gas Chromatography of Methyl Esters of Fatty Acids 1990, 7 p, (Norma ISO 5508:1990(E)).

ANEXO 3. PREPARACION DE MUESTRAS, FÓRMULAS Y CÁLCULOS. "MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE FAMES EN BIODIESEL POR CROMATOGRAFÍA DE GAS".

1. Preparación de la solución de estándar interno de fracción másica conocida entre 0.014 y 0.015, utilizando como soluto heptadecanoato de metilo y n-heptano como solvente.

La preparación de la solución del estándar interno en las normas EN 14103 y en las notas de aplicación de Agilent Technologies y Perkin Elmer esta dada por:

$$C_{std} = M_{C17}/V_{sln}$$

C_{std} = Concentración del heptadecanoato de metilo, mg/mL.

M_{C17} = Masa del heptadecanoato de metilo, mg.

V_{sln} = Volumen final de aforo al adicionarse el n-Heptano, mL.

En la invención la preparación del estándar interno se hace en función de las masas, y cuando se prepara la solución de heptadecanoato de metilo en n-Heptano esta se realiza según la fórmula:

$$X_{C17} = M_{C17}/(M_{C17} + M_{nC7})$$

X_{C17} = Fracción másica de la solución del heptadecanoato de metilo.

M_{C17} = Masa del Heptadecanoato de metilo.

M_{nC7} = Masa del n-Heptano.

2. Preparación de la muestra para análisis adicionando a 250 mg de la muestra de biodiesel entre 600mg y 1500mg de la solución de estándar interno y determinación del contenido de estándar interno adicionado, multiplicando el peso de la solución de estándar interno por la fracción másica del mismo.

En las técnicas analíticas para la determinación del contenido de metil ésteres como la EN 14103, los métodos sugeridos por Perkin Elmer y Agilent Technologies, utilizan la siguiente relación para determinar el contenido de metil ésteres:

$$Aa/Ma = Aistd/Mistd$$

Aa= Área del analito.

Ma= Masa del analito.

Aistd= Área del estándar interno.

Mistd= Masa del estándar.

Debido a que lo que se desea determinar es una concentración del analito, para este caso metil esterres la relación se lleva así:

$$\% \text{ de Metil ésteres} = (Masa \text{ del analito} / Masa \text{ de la Muestra}) * 100$$

Reemplazando se tiene que:

$$\% \text{ de Metil ésteres} = (Aa/Aistd) * (Mistd/M) * 100$$

M= Masa de la Muestra

La diferencia fundamental con las metodologías presentadas es la determinación del parámetro **Mistd**.

Según la norma EN 14103, este valor se obtiene de multiplicar la concentración de la solución preparada del estándar interno por el volumen adicionado de estándar interno.

$$M_{std} = C_{std} \cdot V_{std}$$

Por consiguiente sin importar la temperatura de la solución, siempre para efectos del cálculo se asume que se adiciona la misma cantidad de estándar interno. Sin embargo, esto es una fuente de error, debido a que la densidad de una solución depende de la temperatura y para un mismo volumen a temperaturas diferentes, las masas son diferentes, esto conlleva a que los resultados del método tengan una dispersión muy alta. De ahí el valor de repetibilidad reportado en la norma EN 14103.

Por esto, en el método de la invención la masa de estándar interno adicionado a los 250 mg de la muestra se obtiene de multiplicar la fracción másica de la solución de heptadecanoato de metilo X_{C17} por la masa de la solución de heptadecanoato de metilo adicionada a los 250 mg de muestra.

$$M_{stda} = X_{C17} \cdot M_{sc17}$$

M_{stda} = Masa de estándar interno adicionado a los 250 mg de muestra.

M_{sc17} = Masa de la solución del estándar interno adicionado a los 250 mg de muestra.

3. Determinación el contenido de metil ésteres en biodiesel.

En las normas EN 14103, y los métodos sugeridos por fabricantes la determinación se hace de la siguiente manera:

$$C = \frac{(\sum A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100\%$$

Donde C_{EI} y V_{EI} Son la concentración de la solución de estándar interno y el volumen adicionado de la solución del estándar interno. En el método de la invención la masa de estándar interno se determina directamente por la relación mostrada y por consiguiente la determinación queda de la siguiente forma:

$$\%FAMES = (A_F * M_{ISTD} / A_{ISTD} * M_m) * 100,$$

**ANEXO 4. NOTA DE APLICACIÓN DE LA NORMA EN 14103 DE PERKIN
ELMER.**

① Dr. Santos.

Fatty Acid Methyl Esters in B100 Biodiesel by Gas Chromatography (Modified EN 14103)

Introduction

The production and consumption of biofuels continues to increase as more attention is paid to the environment and the depletion of fossil-fuel resources. Biodiesel, a fuel from natural oils such as soybean oil, rapeseed oil or animal fats, is a substitute for petroleum-diesel fuel. The quality criteria for the production of biodiesel are specified in EN 14214.

Within EN 14214, method EN 14103 specifies the fatty acid methyl ester (FAME) and linolenic acid methyl ester content (Figure 1), which is used to profile the vegetable or animal oil feedstock used in biodiesel production. EN 14103 calls for calibration of all FAME components by relative response to a single compound, methyl heptadecanoate. This requires the measurement of accurate weights for each sample and the addition of an internal standard. The range of FAMES for which the method is intended lies between $C_{14:0}$ and $C_{24:1}$.

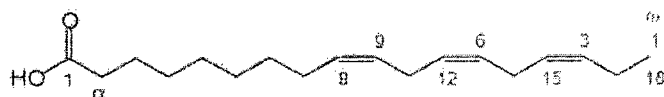


Figure 1. Linolenic acid.

This application note will discuss the analysis according to method EN 14103. In addition to the methodology specified in EN 14103, a simpler and more accurate method will be presented. The modified method uses commercially-available calibration and test mixtures for precise peak identification and quantitative accuracy, while streamlining the sample preparation and calculations. Reporting is based on area % of all components after the solvent – as a result, the sample weight does not impact the calculations.

Authors

Timothy Ruppel
Timon Huybrighs

PerkinElmer, Inc.
710 Bridgeport Avenue
Shelton, CT USA

Experimental

The FAME analysis is carried out with a split injection onto an analytical column with a polar stationary phase and an FID detector. The configuration used here is the PerkinElmer® Clarus® 600 Gas Chromatograph (GC), fitted with a capillary split/splitless injector and FID. It is very important to choose the appropriate liner; otherwise, the response, reproducibility and resolution of the analysis will be compromised. Fatty acid methyl esters are known to be active and thermally-labile components. Incorrect injection conditions and liner choice will result in a non-linear response; the late-eluting FAMES (longer carbon chains) show a lower response than the early-eluting FAMES. This problem is overcome by packing the inlet liner with glass wool, greatly improving uniformity and reproducibility over the boiling-point range. Deactivated liners (with wool) are available. The surface of the liner is deactivated to minimize bleed and to enhance the inertness of the liner.

The analytical column used in this work is the PerkinElmer Elite-Famewax column (Crossbond® polyethylene glycol), which demonstrates good resolution and peak shape (Figure 2). Table 1 provides an overview of all the instrument parameters.

Table 1. Instrument Parameters EN 14103.

Gas Chromatograph:	PerkinElmer Clarus 600 GC
Inlet Temperature:	250 °C
Column Flow:	1 mL/min
Split Flow:	50 mL/min
Injection Volume:	0.5 µL
Oven Program Initial Temp:	210 °C
Hold Time 1:	13.00 min
Ramp 1:	5 °C/min
Oven Program Final Temp:	230 °C
Hold Time 2:	15.00 min
Equilibration Time:	0.0 min
Column:	Elite-Famewax, 30 m x 320 µm x 0.25 µm film
Carrier Gas:	Helium
FID Temperature:	250 °C
H ₂ Flow:	45 mL/min
Air Flow:	450 mL/min
Range:	1
Attenuation:	-5

In order to determine the retention times of the fatty acid methyl esters, a FAME standard needs to be run. These are available commercially either separately or as a standard reference mixture. The analysis of a commercial FAME standard is shown in Figure 2.

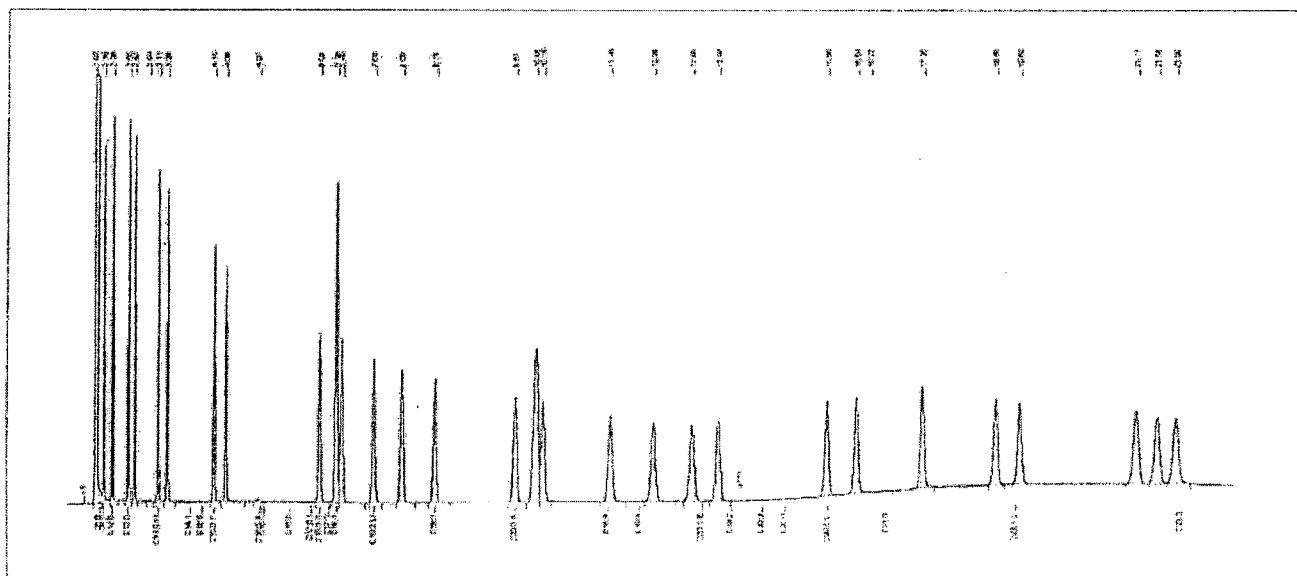


Figure 2. The analysis of a mixture of C_{14:0}-C_{24:1} FAMES.

The modified method of analysis uses a FAME mixture at known concentration and determines the response and retention time of each component experimentally. The reporting is then based on an area % rather than a mass %, simplifying the calculations. The calibration is verified by the analysis of a calibration-check standard – typically, this is commercial mix of FAMES from a second source with a certificate of analysis. This standard would be analyzed after the calibration of the response. The results of the analysis are then compared with the certificate of analysis, verifying the quality of the calibration. The standard preparation for this technique consists of the dilution of the FAME standard into 4 mL of n-heptane. The sample preparation is also quite simple with 100 µL of biodiesel feedstock into 4 mL of n-heptane. In both cases, a 1-µL injection at a split of 50:1 is performed. The full instrument conditions are presented in Table 2.

Table 2. Modified Parameters for the Analysis of FAMES in Biodiesel.

Gas Chromatograph:	PerkinElmer Clarus 600 GC
Inlet Temperature:	240 °C
Column Flow:	2 mL/min
Split Flow:	50 mL/min
Injection Volume:	1 µL
Oven Program Initial Temp:	195 °C
Hold Time 1:	0 min
Ramp 1:	5 °C/min
Oven Program Final Temp:	240 °C
Hold Time 2:	6 min
Column:	Carbowax 20 M, 30 m x 320 µm x 0.25 µm film
Carrier Gas:	Helium
FID Temperature:	240 °C
H ₂ Flow:	45 mL/min
Air Flow:	450 mL/min

Results

In EN 14103, the result for the fatty acid methyl ester content is expressed as a mass fraction in percent using methyl heptadecanoate (C₁₇) as the internal standard. Total FAME content should be greater than 90%. Linolenic acid (C_{18:3}) content should be greater than 1% and less than 15%. The following formula is used:

$$C = \frac{\Sigma A - A_{IS}}{A_{IS}} \times \frac{C_{IS} \times V_{IS}}{m} \times 100\%$$

Where:

ΣA = total peak area C_{14:0} – C_{24:1}

A_{IS} = internal standard (methyl heptadecanoate) peak area

C_{IS} = concentration of the internal standard solution, in mg/mL

V_{IS} = volume of the internal standard solution used, mL

m = mass of the sample, in mg

Linolenic acid methyl ester content is also expressed as a mass fraction in percent and methyl heptadecanoate (C₁₇) is used as the internal standard. The following formula applies:

$$L = \frac{A_L}{\Sigma A - A_{IS}} \times 100\%$$

Where:

ΣA = total peak area C_{14:0} – C_{24:1}

A_{IS} = internal standard (methyl heptadecanoate) peak area

A_L = linolenic acid methyl ester peak area

The result of the mass fraction calculation is then used to calculate the sample's iodine value, which is the sum of the individual contributions of each methyl ester, obtained by multiplying the methyl ester percentage by its respective factor. The following formula applies:

$$\text{Iodine value} = \sum X \text{ g iodine} / 100 \text{ g sample}$$

Table 3 (Page 4) shows an example calculation for the iodine factor.

Table 3. Iodine Factor Example.

Methyl Ester of Following Acids in Sample (as example)	Amount in % Mass	Iodine Factor	Contribution
Myristic C _{14:0}	0.3	0	0.00
Palmitic C _{16:0}	4.0	0	0.00
Palmitoleic C _{16:1}	1.1	0.950	1.05
Stearic C _{18:0}	2.0	0	0.00
Oleic C _{18:1}	60.5	0.860	52.03
Linoleic C _{18:2}	19.8	1.732	34.29
Linolenic C _{18:3}	9.4	2.616	24.59
Eicosanoic C _{20:0}	0.4	0	0.00
Eicosenoic C _{20:1}	0.7	0.785	0.55
Docosanoic C _{22:0}	0.7	0	0.00
Docosenoic C _{22:1}	1.1	0.723	0.80
Calculated Iodine Value			113.3

Conclusion

Method EN 14103 is used to determine the fatty acid methyl ester (FAME) between C_{14:0} and C_{24:1} and linolenic acid methyl ester content of oil feedstock used in biodiesel production. EN 14103 calls for calibration of all FAME components by relative response to a single compound – methyl heptadecanoate. This application note has demonstrated the analysis according to method EN 14103. Additional methodology presented a simple analysis using commercially-available calibration and test mixtures.

PerkinElmer, Inc.
940 Winter Street
Waltham, MA 02451 USA
Phone: (800) 762-4000 or
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com



For a complete listing of our global offices, visit www.perkinelmer.com/globaloffices

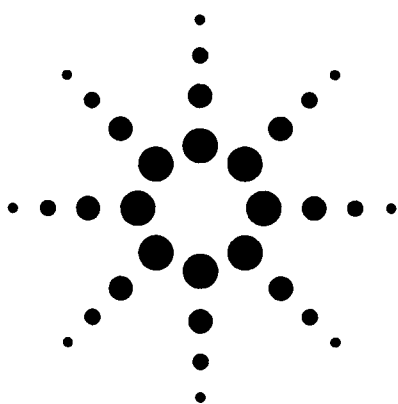
©2003 PerkinElmer, Inc. All rights reserved. The PerkinElmer logo and design are registered trademarks of PerkinElmer, Inc. Clarus and PerkinElmer are registered trademarks of PerkinElmer, Inc. or its subsidiaries in the United States and other countries. Crossbond is a registered trademark of Restek Corporation. All other trademarks not owned by PerkinElmer, Inc. or its subsidiaries that are depicted herein are the property of their respective owners. PerkinElmer reserves the right to change this document at any time without notice and disclaims liability for editorial, pictorial or typographical errors.

608392_01

**ANEXO 5. NOTA DE APLICACIÓN DE LA NORMA EN 14103 DE AGILENT
TECHNOLOGIES.**

Determining the Ester and Linoleic Acid Methyl Ester Content to Comply with EN14103

Application



HPI

Authors

Chun-Xiao Wang
Agilent Technologies (Shanghai) Co. Ltd.
412 Ying Lun Road
Waigaoqiao Free Trade Zone
Shanghai 200131
P.R. China

James McCurry
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington DE 19808
USA

Abstract

Gas chromatography with a split/splitless inlet and FID is used to determine the ester and linoleic acid methyl ester content of fatty acid methyl esters (FAME) intended for use as pure biofuel or as a blending component for heating and diesel fuels. The method is suitable for FAME containing methyl esters between C14 and C24. This application used the Agilent 6850 System and HP-INNOWax column; calibration was achieved with internal standards of methyl heptadecanoate. After analyzing several different types of biodiesel, excellent precision was obtained, exceeding the EN14103 method specifications.

Introduction

Biodiesel fuel is produced when a vegetable oil or an animal fat reacts with methanol in the presence of a catalyst to yield fatty acid methyl esters (FAME) and glycerin, which is removed. FAME is a pure biodiesel fuel called B100. A "green" fuel, biodiesel is biodegradable, nontoxic, and is essentially free of sulfur and aromatics. It is rapidly gaining momentum worldwide as an alternative fuel source for diesel engines.

Only biodiesel fuel meeting the specifications of ASTM D6751 or EN14214 is acceptable for use as a motor fuel. Several GC methods have been developed to determine if a biodiesel meets the specification. For example, EN14103 determines the ester and linoleic acid methyl ester content; EN14105 and ASTM D6584 determine free and total glycerin and mono-, di-, and triglyceride content; and EN14110 is for methanol. EN14106, which determines free glycerol, is not commonly used since 14105/ASTM D6584 provides more complete results.

Three major GC biodiesel solutions—EN14103, EN14105/ASTM D6584, and EN14110—were developed for the Agilent GC platform. This application describes the performance of EN14103 on the Agilent 6850 GC.

Experimental

The application was conducted with the Agilent 6850 GC with FID, split/splitless inlet, and



Agilent Technologies

HP-INNOWax column (30 m × 320 µm id × 0.25 µm film of polyethylene glycol). A solution of methyl heptadecanoate in heptane (10 mg/mL or 5 mg/mL) was used as a calibration for quantification.

Gas Chromatographic Conditions

Inlet Temperature: 250°C
 Split ratio: 80:1
 Injection volume: 1 µL
 Column flow (He): 1.5 mL/min, constant flow mode
 FID temperatures: 300°C
 H₂ flow: 40 mL/min
 Air flow: 400 mL/min
 Make up (N₂): 40 mL/min
 Oven program: 210 °C hold 9 min, to 230 °C at 20°C/min, hold 10 min
 Column: 30m x 320mm x 0.25 µm HP-INNOWax (Part no. 19091N-113)
 Calibration standard: Solution of methyl heptadecanoate in heptane (5 mg/mL)

Sample Preparation

Accurately weigh approximately 250mg of sample in 10-mL vial, and then add 5 mL of methyl heptadecanoate solution using a pipette.

Results and Discussion

Several samples of B100 biodiesel made from vegetable oils and animal oils were analyzed. Figure 1 and Figure 2 are the chromatograms of rapeseed oil and pork oil, respectively.

The HP-INNOWax column exhibits excellent separation for the methyl esters between C14 and C24, which obtain baseline separation. To achieve a satisfactory compromise between resolution and analysis time, esters between C14 and C20 were separated isothermally at 200 °C; esters between C22 and C24 were separated at 230 °C.

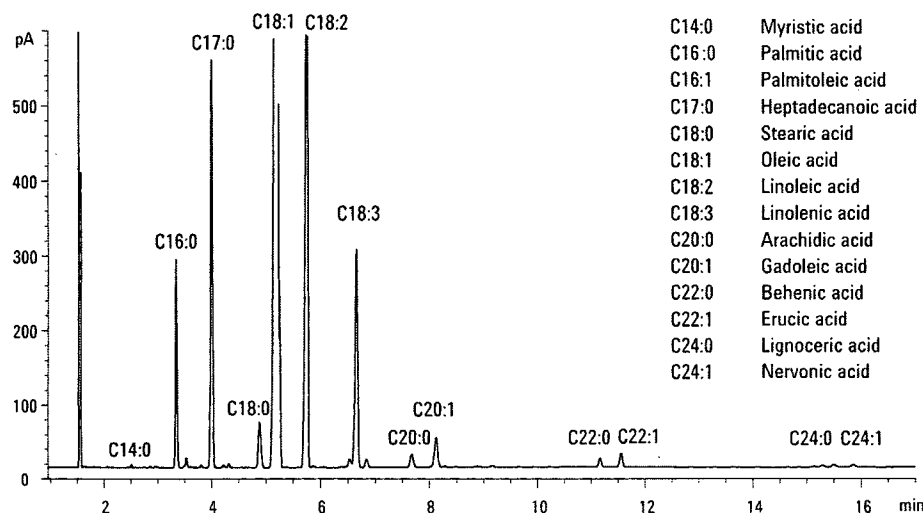


Figure 1. Chromatogram of rapeseed methyl esters.

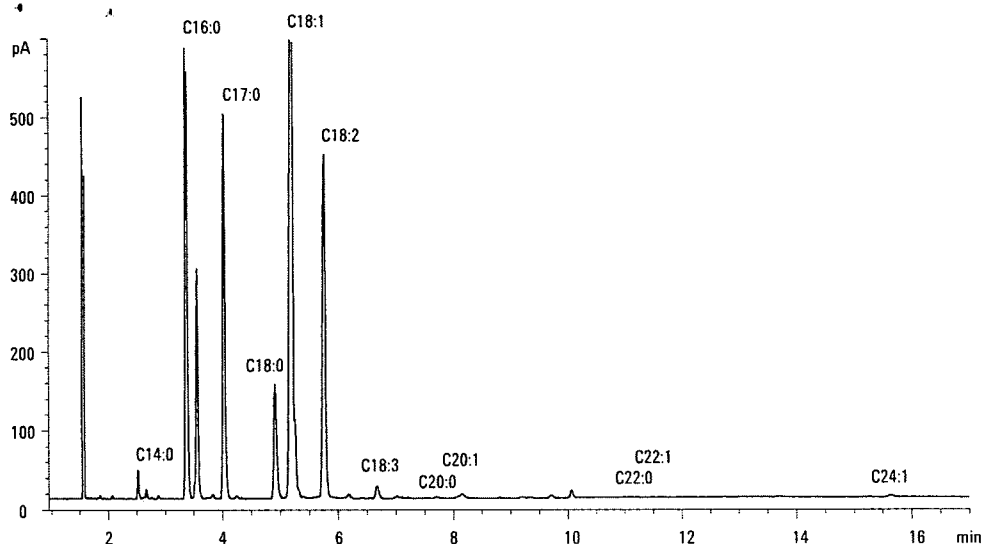


Figure 2. Chromatogram of pork methyl esters.

Quantitative results for different types of biodiesel fuel, such as rapeseed oil, soybean oil, chicken oil and pork oil are shown in Table 1. It can be seen that rapeseed oil contains a higher concentration of C18:1 (55.68% m/m) and soybean oil contains a higher concentration of C18:2 (48.66% m/m). The animal oils (chicken and pork) contain a higher

concentration of C18:1; however, compared with vegetable oil, animal oil contains a higher concentration of C16:0.

Table 2 shows excellent repeatability, exceeding the specification of EN14103. The data in Table 3 demonstrate that most RSD% is within 1%.

Table 1. Observed FAME Composition in % (m/m) of Different Type Oil

Component FAME		Average, % (m/m)			
		Rapeseed oil	Soybean oil	Chicken oil	Pork oil
Myristic acid	C14:0	0.04	0.07	1.12	0.43
Palmitic acid	C16:0	4.12	9.90	17.63	15.62
Palmitoleic acid	C16:1	0.05	0.02	2.15	5.28
Stearic acid	C18:0	1.57	4.27	9.91	3.93
Oleic acid	C18:1	55.68	22.54	34.32	28.48
Linoleic acid	C18:2	17.82	48.66	7.38	11.87
Linolenic acid	C18:3	7.61	7.27	0.37	0.48
Arachidic acid	C20:0	0.56	0.32	0.14	0.05
Gadoleic acid	C20:1	1.31	0.18	0.73	0.29
Behenic acid	C22:0	0.32	0.32		
Erucic acid	C22:1	0.51			
Lignoceric acid	C24:0	0.15		0.08	
Nervonic acid	C24:1	0.16	0.16	0.15	0.15

Table 2. Repeatability* for Different Type Biodiesel

	Observed				
	EN14103 Spec (m/m)	Soybean (m/m)	Rapeseed (m/m)	Chicken (m/m)	Pork (m/m)
Ester content	1.6%(m/m)	0.065%(m/m)	0.254%(m/m)	0.021%(m/m)	0.098%(m/m)
C18:3 content	0.1%(m/m)	0.005%(m/m)	0.018%(m/m)	0.002%(m/m)	0.012%(m/m)

*The absolute difference between two independent single test results, obtained using the same method on identical test material in the same laboratory by the same operator using the same equipment with a short time interval.

Table 3. Relative Standard Deviation Data (RSD%) for FAME Analysis

Component FAME		RSD%, %(m/m) (Average=5)			
		Rapeseed oil	Soybean oil	Chicken oil	Pork oil
Myristic acid	C14:0	0.38	0.34	0.17	0.16
Palmitic acid	C16:0	0.05	0.01	0.05	0.03
Palmitoleic acid	C16:1	0.17	1.02	0.16	0.11
Stearic acid	C18:0	0.16	0.49	0.06	0.23
Oleic acid	C18:1	0.14	0.04	0.03	0.10
Linoleic acid	C18:2	0.14	0.02	0.03	0.47
Linolenic acid	C18:3	0.11	0.03	0.28	0.95
Arachidic acid	C20:0	0.35	0.16	0.32	1.55
Gadoleic acid	C20:1	0.46	1.05	0.20	0.63
Behenic acid	C22:0	0.34	0.49		
Erucic acid	C22:1	0.23			
Lignoceric acid	C24:0	1.31		1.14	
Nervonic acid	C24:1	1.15	1.31	1.49	0.89

Conclusions

The ester and linoleic acid methyl ester content present in the different types of biodiesel fuel produced from rapeseed, soybean, chicken, and pork were quantitatively analyzed using the Agilent 6850 System equipped with a split/splitless inlet, FID, and HP-INNOWax column. Calibration was achieved with internal standards, methyl heptadecanoate. The results show excellent repeatability, exceeding the specification of EN14103. The relative standard deviation is less than 1% for almost all methyl esters.

References

1. EN14103, "Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl esters (FAME) Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents."
2. ASTM D6751-03, "Standard specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels."

For More Information

For more information on our products and services, visit our Web site at www.agilent.com/chem.

The information contained in this publication is intended for research use only and is not to be followed as a diagnostic procedure.

Agilent shall not be liable for errors contained herein or for incidental or consequential damages in connection with the furnishing, performance, or use of this material.

Information, descriptions, and specifications in this publication are subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in the USA
December 7, 2006
5989-5924EN



Agilent Technologies

ANEXO 6. LA NORMA EUROPEA EN 14103.

norma española

UNE-EN 14103

Septiembre 2003

TÍTULO

Productos derivados de aceites y grasas

Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)

Determinación de los contenidos de éster y de éster metílico de ácido linoleico

Fat and oil derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents.

Produits dérivés des corps gras. Esters méthyliques d'acides gras (EMAG). Détermination de la teneur en ester et en ester méthylique de l'acide linoléique.

CORRESPONDENCIA

Esta norma es la versión oficial, en español, de la Norma Europea EN 14103 de abril de 2003.

OBSERVACIONES

ANTECEDENTES

Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico AEN/CTN 34 *Productos Alimentarios* cuya Secretaría desempeña FIAB.

Versión en español

Productos derivados de aceites y grasas
Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)
Determinación de los contenidos de éster y de éster metílico de ácido linoleico

Fat and oil derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents.

Produits dérivés des corps gras. Esters méthyliques d'acides gras (EMAG). Détermination de la teneur en ester et en ester méthylique de l'acide linoléique.

Erzeugnisse aus pflanzlichen und tierischen Fetten und Ölen. Fettsäure-Methylester (FAME). Bestimmung des Ester-Gehaltes und des Gehaltes an Linoleinsäure-Methylester.

Esta norma europea ha sido aprobada por CEN el 2003-01-02. Los miembros de CEN están sometidos al Reglamento Interior de CEN/CENELEC que define las condiciones dentro de las cuales debe adoptarse, sin modificación, la norma europea como norma nacional.

Las correspondientes listas actualizadas y las referencias bibliográficas relativas a estas normas nacionales, pueden obtenerse en la Secretaría Central de CEN, o a través de sus miembros.

Esta norma europea existe en tres versiones oficiales (alemán, francés e inglés). Una versión en otra lengua realizada bajo la responsabilidad de un miembro de CEN en su idioma nacional, y notificada a la Secretaría Central, tiene el mismo rango que aquéllas.

Los miembros de CEN son los organismos nacionales de normalización de los países siguientes: Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, Eslovaquia, España, Finlandia, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Islandia, Italia, Luxemburgo, Malta, Noruega, Países Bajos, Portugal, Reino Unido, República Checa, Suecia y Suiza.

CEN
COMITÉ EUROPEO DE NORMALIZACIÓN
European Committee for Standardization
Comité Européen de Normalisation
Europäisches Komitee für Normung
SECRETARÍA CENTRAL: Rue de Stassart, 36 B-1050 Bruxelles

ÍNDICE

	Página
ANTECEDENTES	5
1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN	6
2 NORMAS PARA CONSULTA.....	6
3 PRINCIPIO	6
4 MATERIAL DE VIDRIO	6
5 REACTIVOS.....	6
6 APARATOS	7
7 TOMA DE MUESTRAS	7
8 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	7
9 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	7
10 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.....	7
11 PRECISIÓN	8
12 INFORME DEL ANÁLISIS	9
ANEXO A (Informativo) RESUMEN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS DE LOS ÉSTERES METÁLICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN FASE GASEOSA	10
ANEXO B (Informativo) RESULTADO DE UN ENSAYO INTERLABORATORIOS	13
BIBLIOGRAFÍA.....	14

ANTECEDENTES

Esta Norma Europea EN 14103:2003 ha sido elaborada por el Comité Técnico CEN/TC 307 *Semillas oleaginosas y productos grasos de origen animal y vegetal y subproductos. Métodos de muestreo y análisis*, cuya Secretaría desempeña AFNOR.

Esta norma europea debe recibir el rango de norma nacional mediante la publicación de un texto idéntico a la misma o mediante ratificación antes de finales de octubre de 2003, y todas las normas nacionales técnicamente divergentes deben anularse antes de finales de octubre de 2003.

Esta norma europea ha sido elaborada bajo un Mandato M/245 sobre ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) dirigido a CEN por la Comisión Europea y por la Asociación Europea de Libre Cambio.

Los anexos A y B son informativos.

De acuerdo con el Reglamento Interior de CEN/CENELEC, están obligados a adoptar esta norma europea los organismos de normalización de los siguientes países: Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, Eslovaquia, España, Finlandia, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Islandia, Italia, Luxemburgo, Malta, Noruega, Países Bajos, Portugal, Reino Unido, República Checa, Suecia y Suiza.

1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

El propósito de esta norma europea es determinar el contenido de éster de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) destinados al uso como biocombustible puro o como un componente de mezclas destinadas a calefacción o a combustibles diesel. También permite determinar el contenido de ésteres metílicos del ácido linolénico.

Permite verificar que el contenido de ésteres de los FAME es superior al 90% (m/m) y que el contenido en el ácido linolénico está comprendido entre el 1% (m/m) y el 15% (m/m).

El método resulta adecuado para FAME que contengan ésteres metílicos de longitud comprendida entre C_{14} y C_{24} .

2 NORMAS PARA CONSULTA

Esta norma europea incorpora disposiciones de otras publicaciones por su referencia, con o sin fecha. Estas referencias normativas se citan en los lugares apropiados del texto de la norma y se relacionan a continuación. Para las referencias con fecha, no son aplicables las revisiones o modificaciones posteriores de ninguna de las publicaciones. Para las referencias sin fecha, se aplica la edición en vigor del documento normativo al que se haga referencia (incluyendo sus modificaciones).

EN ISO 5508 – *Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Análisis por cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de ácidos grasos.* (ISO 5508:1990).

3 PRINCIPIO

Determinación del porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos presente en la muestra mediante cromatografía en fase gaseosa realizada de acuerdo con la Norma EN ISO 5508, utilizando calibración interna (heptadecanoato metílico).

Determinación del porcentaje del éster metílico del ácido linolénico presente en la muestra mediante cromatografía en fase gaseosa realizada de acuerdo con la Norma EN ISO 5508.

4 MATERIAL DE VIDRIO

4.1 Viales con tapón de rosca con membranas de separación recubiertas de PTFE, de 10 ml de capacidad.

4.2 Matraz aforado, de 50 ml de capacidad.

4.3 Pipeta, de 5 ml de capacidad, y de una precisión de 0,02 ml.

5 REACTIVOS

Salvo que se especifique lo contrario, se utilizan exclusivamente reactivos de grado analítico reconocido.

5.1 Heptano

5.2 Heptadecanoato metílico de pureza conocida (como mínimo, del 99%).

5.3 Heptadecanoato metílico, disolución a 10 mg/ml: se pesan con precisión unos 500 mg de heptadecanoato metílico (5.2), se llevan a un matraz aforado de 50 ml (4.2), y se enrasa con heptano (5.1).

6 APARATOS

Los aparatos comunes de laboratorio, y en particular, los aparatos descritos en la Norma EN ISO 5508.

7 TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras no es parte del método descrito en esta norma europea. En la Norma EN ISO 5555 [1] se expone un método de toma de muestras recomendado.

8 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se pesan con precisión unos 250 mg de muestra y se introducen en un vial de 10 ml (4.1), a continuación se añaden 5 ml de la disolución de heptadecanoato metílico (5.3) utilizando una pipeta (4.3).

9 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Consúltense la Norma EN ISO 5508 y al anexo A que describen, de forma indicativa, las condiciones de análisis que pueden emplearse.

Las condiciones cromatográficas deben ajustarse (cantidades inyectadas, temperatura del horno, presión del gas de transporte, y velocidad de flujo de inyección discriminada) de manera que se visualicen correctamente los picos de los ésteres metílicos de los ácidos lignocérico (C_{24}) y nervónico ($C_{24:1}$).

La integración debe realizarse desde el pico del miristato metílico (C_{14}) hasta el del éster metílico del $C_{24:1}$, considerando todos los picos, incluyendo los minoritarios.

NOTA – Si aparecen picos desconocidos entre el ácido linolénico ($C_{18:3}$) y el nervónico ($C_{24:1}$) (diferentes de los de los FAME saturados y monoinsaturados), se puede sospechar la presencia de aceite de pescado en la muestra.

10 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

10.1 Determinación del contenido de éster

El contenido de éster, C , expresado como fracción de masa en tanto por ciento, se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{(\sum A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100\%$$

donde

$\sum A$ es el área total de los picos desde el del éster metílico de C_{14} hasta el del $C_{24:1}$;

A_{EI} es el área del pico correspondiente al heptadecanoato metílico;

C_{EI} es la concentración de la disolución de de heptadecanoato metílico (5.3) utilizada, en miligramos por mililitro;

V_{EI} es el volumen de la disolución de heptadecanoato metílico (5.3) utilizada, en mililitros;

m es la masa de la muestra, en miligramos.

NOTA 1 – Para los aceites vegetales, se considera que el resultado de los cálculos basados en las áreas relativas representa el porcentaje en masa.

NOTA 2 – Si el promedio de dos determinaciones es mayor que 100,8%, dichos resultados se descartan y se verifican las condiciones experimentales, así como la pureza del patrón interno, mediante la aplicación del método para determinar el contenido de ésteres de una mezcla comercial o de una mezcla preparada.

Los resultados se expresan indicando una cifra decimal.



10.2 Determinación del éster metílico del ácido linolénico

El contenido del éster metílico del ácido linolénico, L , expresado como fracción de masa en tanto por ciento, se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$L = \frac{A_L}{(\sum A) - A_{EI}} \times 100\%$$

donde

$\sum A$ es el área total de los picos desde el del éster metílico del C_{14} hasta el del $C_{24:1}$;

A_{EI} es el área del pico correspondiente al heptadecanoato metílico;

A_L es el área del pico correspondiente al éster metílico del ácido linolénico.

Los resultados se expresan indicando una cifra decimal.

11 PRECISIÓN

Un análisis interlaboratorios organizado a nivel europeo en el año 2000 con la participación de once laboratorios, cada uno de los cuales realizó dos determinaciones sobre cada muestra, mostró los resultados estadísticos indicados en el anexo B.

11.1 Repetibilidad

La diferencia absoluta entre los resultados de dos análisis individuales independientes, obtenidos empleando el mismo método sobre idéntico material de análisis en un mismo laboratorio, por el mismo analista, utilizando el mismo equipamiento y realizados dentro de un corto intervalo de tiempo, no debe ser superior a:

Para el contenido de ésteres	1,6% (m/m)
Para el contenido del éster metílico del ácido linolénico	0,1% (m/m)

en más de un caso por cada 20 determinaciones.

11.2 Reproducibilidad

La diferencia absoluta entre los resultados de dos análisis individuales, obtenidos empleando el mismo método sobre idéntico material de análisis en laboratorios diferentes por analistas distintos utilizando un equipamiento diferente, no debe ser superior a:

Para el contenido de ésteres	3,1% (m/m)
Para el contenido del éster metílico del ácido linolénico (L)	$0,311 \times L + 0,02\%$ (m/m)

en más de un caso por cada 20 determinaciones.

12 INFORME DEL ANÁLISIS

El informe del análisis debe especificar:

- toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra;
- el método de toma de muestras empleado, si se conoce;
- el método de análisis utilizado, haciendo referencia a esta norma europea;
- todos los detalles experimentales no descritos en esta norma europea, o considerados opcionales, junto con los detalles de todo tipo de incidencias que pudieran haber afectado al(los) resultado(s) del análisis;
- el(los) resultado(s) obtenidos, o, si se ha comprobado la repetibilidad, el resultado global final obtenido.

56

ANEXO A (Informativo)**RESUMEN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS DE LOS ÉSTERES METÍLICOS
MEDIANTE CROMATOGRFÍA EN FASE GASEOSA**

A.1 Columna capilar recubierta de una fase estacionaria de polietilenglicol (Carbowax 20M, DBwax, CPwax, etc.).

- Longitud: 30 m;
- diámetro interno: 0,32 mm;
- grosor de película: 0,25 μ m.

A.2 Inyector de flujo discriminado variable

- Velocidad de flujo discriminado: desde 20 ml/min hasta 100 ml/min;
- temperatura: 250 °C.

A.3 Gas de transporte: hidrógeno o helio

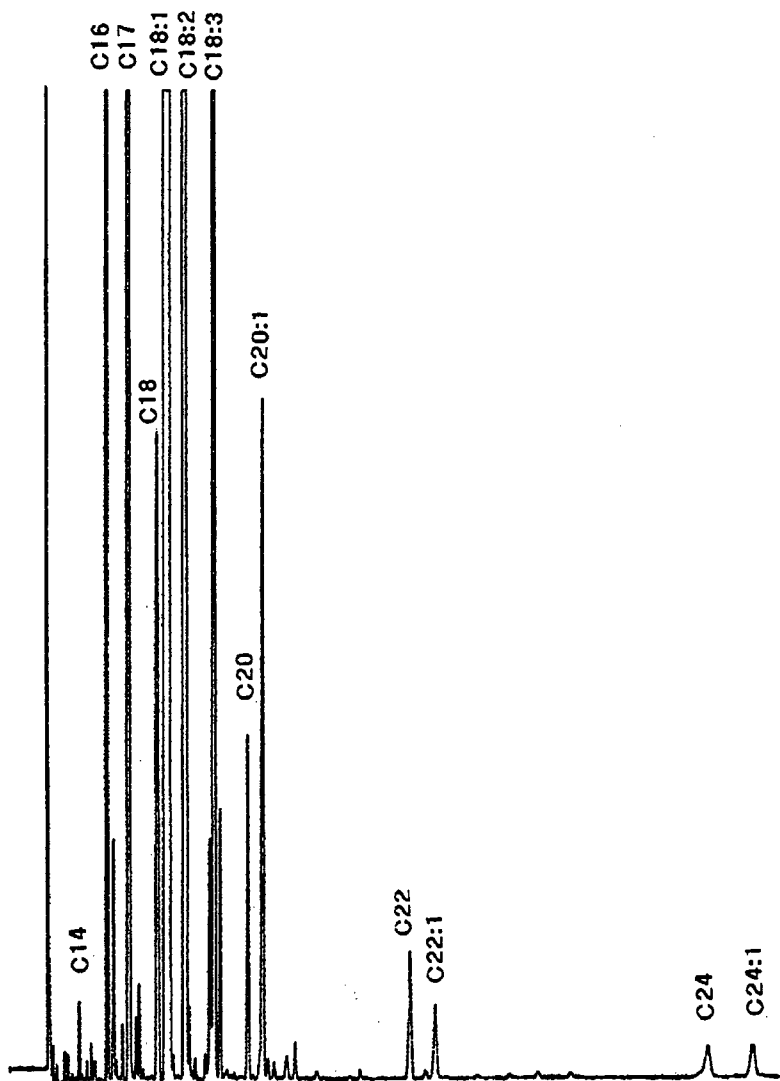
- Presión: desde 30 kPa hasta 100 kPa;
- velocidad de flujo: desde 1 ml/min hasta 2 ml/min (en función de las características de la columna utilizada).

A.4 Detector de ionización de llama

- Temperatura: 250 °C.

A.5 Horno

- Temperatura: 200 °C.



Leyenda

C_{16}	Ácido palmítico	C_{20}	Ácido araquídico
$C_{16:1}$	Ácido palmitoleico	$C_{20:1}$	Ácido gadoleico
C_{17}	Ácido heptadecanoico (Patrón Interno)	C_{22}	Ácido behénico
C_{18}	Ácido esteárico	$C_{22:1}$	Ácido erúxico
$C_{18:1}$	Ácido oleico	C_{24}	Ácido lignocérico
$C_{18:2}$	Ácido linoleico	$C_{24:1}$	Ácido nervónico
$C_{18:3}$	Ácido linolénico		

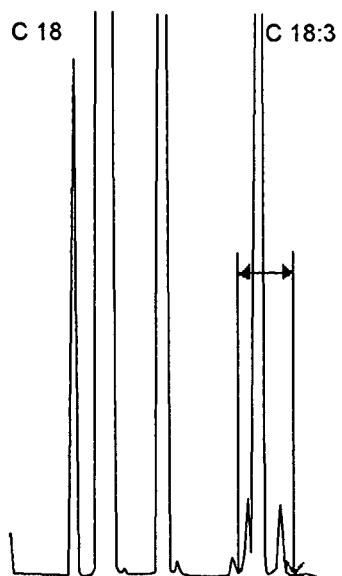
Condiciones analíticas

Columna capilar DBWAX (30 m – 0,25 mm – 0,25 μ m) – Temp. del horno: 210 °C.

Temp. de expulsión del inyector: 250 °C – Temp. del FID: 250 °C – Presión de hidrógeno: 80 kPa.

Velocidad de flujo discriminado: 50 ml/min – Tiempo de análisis: 25 min.

Fig. A.1 – Cromatograma de una mezcla de ésteres metílicos procedentes de colza



Leyenda

C_{18} Ácido esteárico

$C_{18:3}$ Ácido linolénico

Fig. A.2 – Detalle de un cromatograma que muestra los ácidos linolénicos

ANEXO B (Informativo)

RESULTADO DE UN ENSAYO INTERLABORATORIOS

Se realizó un análisis en colaboración europeo en el que participaron 11 laboratorios de 5 países sobre 5 muestras:

Muestra 1: FAME preparados a partir de aceite de colza y de aceite de girasol;

Muestra 2: FAME preparados a partir de aceite de girasol;

Muestra 3: FAME preparados a partir de aceite de colza con la adición de aceite de colza en FAME;

Muestra 4: FAME preparados a partir de aceite de colza;

Muestra 5: FAME preparados a partir de aceite de colza con la adición de aceite de colza en FAME;

El análisis se organizó en el año 2000 por CEN TC 307/WG1 y los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadístico realizado de acuerdo con la Norma EN ISO 4259 [2], obteniéndose los datos de precisión mostrados en las tablas B.1 y B.2.

Tabla B.1
Contenido de éster

Muestra	1	2	3	4	5
Número de laboratorios participantes	11	11	11	11	11
Número de laboratorios participantes tras eliminar a los discrepantes	9	6	9	9	9
Valor medio, % (m/m)	98,14	99,68	90,97	97,73	92,61
Desviación estándar de la repetibilidad, % (m/m)	0,35	0,36	0,36	0,69	0,56
Desviación estándar de la reproducibilidad, % (m/m)	0,99	0,32	0,98	0,90	1,00
Límite de repetibilidad, <i>r</i> , % (m/m)	1,11	1,24	1,16	2,21	1,78
Límite de reproducibilidad, <i>R</i> , % (m/m)	3,15	1,11	3,14	2,88	3,22

Tabla B.2
Éster metílico del ácido linolénico

Muestra	1	2	3	4	5
Número de laboratorios participantes	11	11	11	11	11
Número de laboratorios participantes tras eliminar a los discrepantes	11	11	10	11	9
Valor medio, % (m/m)	3,85	0,12	9,07	9,28	9,00
Desviación estándar de la repetibilidad, % (m/m)	0,04	0,01	0,03	0,08	0,03
Desviación estándar de la reproducibilidad, % (m/m)	0,32	0,06	1,13	0,86	0,75
Límite de repetibilidad, <i>r</i> , % (m/m)	0,13	0,03	0,09	0,26	0,09
Límite de reproducibilidad, <i>R</i> , % (m/m)	1,00	0,18	3,57	2,68	2,41

BIBLIOGRAFÍA

- [1] EN ISO 5555 – *Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Toma de muestras.* (ISO 5555:2001).
- [2] EN ISO 4259 – *Productos petrolíferos. Determinación y aplicación de los datos de precisión en relación con los métodos de ensayo.* (ISO 4259:1992/Corrigendum 1:1993).

ANEXO NACIONAL (Informativo)

Las normas europeas o internacionales que se relacionan a continuación, citadas en esta norma, han sido incorporadas al cuerpo normativo UNE con los códigos siguientes:

Norma Europea	Norma UNE
EN ISO 5508	UNE-EN ISO 5508

AENOR Asociación Española de
Normalización y Certificación

Dirección C Génova, 6
28004 MADRID-España

Teléfono 91 432 60 00

Fax 91 310 40 32

**ANEXO 7. FICHA TÉCNICA DE MATERIAL DE REFERENCIA EMPLEADO PARA
EL DESARROLLO DEL MÉTODO.**

Certificate of Analysis							
DESCRIPTION: F.A.M.E. Mix CR-C24							
CATALOG NO.: 18918-LAMP		MFG. DATE: Sep 2007					
LOT NO.: LB-51390		EXP. DATE: Sep 2010					
ANALYTE	CAS NO.	PURITY (1)	WEIGHT (2)	ANALYTICAL (3)	STD. DEV.	SUPELCO	LOT NO.
METHYL OCTANOATE	111-11-5	99.9	0.01	7.53	+/- 0.56	LB48663	
METHYL DECANOATE (CAPRATE)	110-63-9	99.9	0.01	7.65	+/- 0.47	LB48662	
METHYL LAURATE	111-82-0	99.7	0.01	7.59	+/- 0.39	LB32645	
METHYL MYRISTATE	124-10-7	99.9	0.01	7.58	+/- 0.55	LB45398	
METHYL PALMITATE	112-39-0	99.9	0.01	10.27	+/- 0.40	LB40132	
METHYL STEARATE	112-61-8	99.9	0.01	7.31	+/- 0.24	LB43502	
METHYL BEHENATE	929-77-1	99.7	0.01	7.14	+/- 0.22	LB34422	
METHYL PALMITOLEATE (METHYL CI	1120-25-8	99.5	0.01	4.60	+/- 0.19	LB51328	
CIS-9-OLEIC METHYL ESTER	112-52-9	99.7	0.01	4.56	+/- 0.15	LB47283	
METHYL LINOLEATE	112-63-0	99.7	0.01	4.60	+/- 0.16	LB38596	
METHYL ERUCATE (CIS-13-DOCOSEN	1120-34-9	99.7	0.01	4.47	+/- 0.13	LB43037	
METHYL ARACHIDATE	1120-28-1	99.8	0.01	7.20	+/- 0.21	LB43042	
METHYL LIGNOCERATE	2442-49-1	99.9	0.01	7.11	+/- 0.25	LB34669	
METHYL LINOLENATE	301-00-8	99.6	0.01	4.58	+/- 0.16	LB43568	

(1) Determined by GC-FID unless otherwise noted.

(2) NIST traceable weights are used to verify balance calibration with the preparation of each lot. Concentration of analyte in solution in wt / vol %, uncertainty based upon balance and Class A volumetric glassware. Weights are corrected for analytes less than 98% pure.

(3) Determined by chromatographic analysis against an independently prepared reference lot. Mean of replicate injections. Analytical values are within +/- 10% of weight concentrations.

Elwood Doughty
Elwood Doughty
QA Manager

Supelco warrants that its products conform to the information contained in this publication. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Please see the latest catalog or order invoice and packing slip for additional terms and conditions of sale.

SUPELCO
Analytical
505 North Emerson Road
Bellefonte, PA 16823-0338 USA
Phone (717) 550-3441