

Este documento es un instrumento de documentación y no compromete la responsabilidad de las instituciones

► **B****REGLAMENTO (CEE) Nº 2568/91 DE LA COMISIÓN**

de 11 de julio de 1991

relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis

(DO L 248 de 5.9.1991, p. 1)

Modificado por:

		Diario Oficial		
		nº	página	fecha
► <u>M1</u>	Reglamento (CEE) nº 3682/91 de la Comisión de 17 de diciembre de 1991	L 349	36	18.12.1991
► <u>M2</u>	Reglamento (CEE) nº 1429/92 de la Comisión de 26 de mayo de 1992	L 150	17	2.6.1992
► <u>M3</u>	Reglamento (CEE) nº 1683/92 de la Comisión de 29 de junio de 1992	L 176	27	30.6.1992
► <u>M4</u>	Reglamento (CEE) nº 1996/92 de la Comisión de 15 de julio de 1992	L 199	18	18.7.1992
► <u>M5</u>	Reglamento (CEE) nº 3288/92 de la Comisión de 12 de noviembre de 1992	L 327	28	13.11.1992
► <u>M6</u>	Reglamento (CEE) nº 183/93 de la Comisión de 29 de enero de 1993	L 22	58	30.1.1993
► <u>M7</u>	modificado por el Reglamento (CEE) nº 826/93 de la Comisión de 6 de abril de 1993	L 87	6	7.4.1993
► <u>M8</u>	Reglamento (CEE) nº 620/93 de la Comisión de 17 de marzo de 1993	L 66	29	18.3.1993
► <u>M9</u>	Reglamento (CE) nº 177/94 de la Comisión de 28 de enero de 1994	L 24	33	29.1.1994
► <u>M10</u>	Reglamento (CE) nº 2632/94 de la Comisión de 28 de octubre de 1994	L 280	43	29.10.1994
► <u>M11</u>	Reglamento (CE) nº 656/95 de la Comisión de 28 de marzo de 1995	L 69	1	29.3.1995
► <u>M12</u>	Reglamento (CE) nº 2527/95 de la Comisión de 27 de octubre de 1995	L 258	49	28.10.1995
► <u>M13</u>	Reglamento (CE) nº 2472/97 de la Comisión de 11 de diciembre de 1997	L 341	25	12.12.1997
► <u>M14</u>	Reglamento (CE) nº 282/98 de la Comisión de 3 de febrero de 1998	L 28	5	4.2.1998
► <u>M15</u>	Reglamento (CE) nº 2248/98 de la Comisión de 19 de octubre de 1998	L 282	55	20.10.1998
► <u>M16</u>	Reglamento (CE) nº 379/1999 de la Comisión de 19 de febrero de 1999	L 46	15	20.2.1999
► <u>M17</u>	Reglamento (CE) nº 455/2001 de la Comisión de 6 de marzo de 2001	L 65	9	7.3.2001
► <u>M18</u>	Reglamento (CE) nº 2042/2001 de la Comisión de 18 de octubre de 2001	L 276	8	19.10.2001
► <u>M19</u>	Reglamento (CE) nº 796/2002 de la Comisión de 6 de mayo de 2002	L 128	8	15.5.2002
► <u>M20</u>	Reglamento (CE) nº 1989/2003 de la Comisión de 6 de noviembre de 2003	L 295	57	13.11.2003
► <u>M21</u>	Reglamento (CE) nº 702/2007 de la Comisión de 21 de junio de 2007	L 161	11	22.6.2007
► <u>M22</u>	Reglamento (CE) nº 640/2008 de la Comisión de 4 de julio de 2008	L 178	11	5.7.2008
► <u>M23</u>	Reglamento (UE) nº 61/2011 de la Comisión de 24 de enero de 2011	L 23	1	27.1.2011
► <u>M24</u>	Reglamento de Ejecución (UE) nº 661/2012 de la Comisión de 19 de julio de 2012	L 192	3	20.7.2012

Rectificado por:

- **C1** Rectificación, DO L 347 de 28.11.1992, p. 69 (2568/91)
- **C2** Rectificación, DO L 176 de 20.7.1993, p. 30 (2568/91)
- **C3** Rectificación, DO L 63 de 4.3.1998, p. 34 (2568/91)
- **C4** Rectificación, DO L 67 de 5.3.2004, p. 34 (1989/2003)
- **C5** Rectificación, DO L 78 de 24.3.2011, p. 69 (61/2011)

**REGLAMENTO (CEE) Nº 2568/91 DE LA COMISIÓN****de 11 de julio de 1991****relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Visto el Reglamento nº 136/66/CEE del Consejo, de 22 de septiembre de 1966, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de las materias grasas ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 3577/90 ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 35 *bis*,

Considerando que en el Anexo del Reglamento nº 136/66/CEE se establecen las denominaciones y definiciones de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva comercializados dentro de cada Estado miembro, así como en los intercambios intracomunitarios y con terceros países;

Considerando que, para poder distinguir los diferentes tipos de aceite, procede definir las características fisicoquímicas de cada uno de ellos, así como las características organolépticas de los aceites vírgenes, a fin de garantizar así la pureza y calidad de estos productos, sin perjuicio de otras disposiciones existentes en la materia;

Considerando que conviene determinar de manera uniforme en toda la Comunidad la presencia de las características de los diferentes tipos de aceite; que, para ello, procede establecer los métodos comunitarios de análisis químico y de valoración organoléptica; que conviene, sin embargo, permitir que durante un periodo transitorio se utilicen otros métodos de análisis que sean aplicados en los Estados miembros, estableciendo al mismo tiempo que en caso de presentarse resultados divergentes prevalezcan los obtenidos a través del método común;

Considerando que la definición de las características fisicoquímicas de los aceites de oliva y de sus métodos de análisis comporta la adaptación de las notas complementarias del capítulo 15 de la nomenclatura combinada;

Considerando que el método de valoración de las características organolépticas de los aceites vírgenes requiere la creación de unos paneles de catadores seleccionados y especialmente adiestrados; que conviene, por lo tanto, prever el plazo necesario para instaurar una estructura de este tipo; que, dadas las dificultades a las que se enfrentarán determinados Estados miembros para crear dichos paneles, procede autorizar que se recurra a paneles existentes en otros Estados miembros;

⁽¹⁾ DO nº 172 de 30.9.1966, p. 3025/66.

⁽²⁾ DO nº L 353 de 17.12.1990, p. 23.

▼B

Considerando que, para garantizar el correcto funcionamiento del sistema de las exacciones reguladoras aplicables a la importación de orujo de oliva, es conveniente prever un método único para la determinación del contenido en aceite de estos productos;

Considerando que, para no perjudicar el comercio, resulta oportuno prever un período limitado para la salida al mercado del aceite que haya sido envasado antes de la entrada en vigor del presente Reglamento;

Considerando que procede derogar el Reglamento (CEE) n° 1058/77 de la Comisión ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) n° 1858/88 ⁽²⁾;

Considerando que el Comité de gestión de las materias grasas no ha emitido dictamen alguno en el plazo establecido por su presidente,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

▼M20*Artículo 1*

1. Se considerarán aceites de oliva vírgenes, con arreglo a las letras a) y b) del punto 1 del anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, los aceites cuyas características se ajusten a las indicadas, respectivamente, en los puntos 1 y 2 del anexo I del presente Reglamento.

2. Se considerará aceite de oliva lampante, con arreglo a la letra c) del punto 1 del anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 3 del anexo I del presente Reglamento.

3. Se considerará aceite de oliva refinado, con arreglo al punto 2 del anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 4 del anexo I del presente Reglamento.

▼C4

4. Se considerará aceite de oliva que contiene exclusivamente aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes, con arreglo al punto 3 del anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 5 del anexo I del presente Reglamento.

▼M20

5. Se considerará aceite de orujo de oliva crudo, con arreglo al punto 4 del anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 6 del anexo I del presente Reglamento.

6. Se considerará aceite de orujo de oliva refinado, con arreglo al punto 5 del anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 7 del anexo I del presente Reglamento.

7. Se considerará aceite de orujo de oliva, con arreglo al punto 6 del anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 8 del anexo I del presente Reglamento.

⁽¹⁾ DO n° L 128 de 24.5.1977, p. 6.

⁽²⁾ DO n° L 166 de 1.7.1988, p. 10.

▼ B*Artículo 2*

1. Las características de los aceites, previstas en el Anexo I, se determinarán empleando los métodos de análisis siguientes:

- para determinar los ácidos grasos libres, expresados en porcentaje de ácido oleico, el método recogido en el Anexo II,
- para determinar el índice de peróxidos, el método recogido en el Anexo III,

▼ M19

- para determinar el contenido de ceras, el método recogido en el anexo IV,

▼ B

- para determinar el contenido de esteroides, el método recogido en el Anexo V,
- para determinar el eritrodiol + uvaol, el método recogido en el Anexo VI,

▼ M21

- para determinar el porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo, el método recogido en el anexo VII,

▼ M20

▼ B

- para el análisis espectrofotométrico, el método recogido en el Anexo IX,
- para determinar la composición de ácidos grasos, el método recogido en los Anexos X «A» y X «B»,
- para determinar los solventes halogenados volátiles, el método recogido en el Anexo XI,
- para la valoración de las características organolépticas de los aceites de oliva vírgenes, el método recogido en el Anexo XII, que se aplicará de conformidad con el apartado 2,

▼ M20

▼ M11

- para determinar los estigmastadienos, el método recogido en el Anexo XVII,

▼ M13

- para determinar la composición de los triglicéridos de ECN42, el método que figura en el Anexo XVIII,

▼ M19

- para determinar el contenido de alcoholes alifáticos, el método recogido en el anexo XIX,

▼ M23

- para la determinación del contenido en ceras y en ésteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases con columna capilar, el método previsto en el anexo XX.

▼ M19

2. La comprobación de las características organolépticas de los aceites de oliva vírgenes por parte de las autoridades nacionales o sus representantes correrá a cargo de paneles de catadores autorizados por los Estados miembros.

Las características organolépticas del aceite de oliva mencionado en el apartado 1 se considerarán conformes a la categoría declarada si un panel de catadores autorizado por el Estado miembro interesado confirma dicha clasificación.

En caso de que el panel autorizado no confirme tal declaración en lo que respecta a las características organolépticas de la categoría de aceite de oliva declarada, las autoridades nacionales o sus representantes ordenarán que se proceda, a petición del interesado, a dos análisis contradictorios por otros paneles autorizados; al menos uno de ellos deberá ser realizado por un panel de cata autorizado por el Estado miembro productor. Las características en cuestión se considerarán conformes a las declaradas si ambos análisis contradictorios confirman la clasificación declarada. En caso contrario, los gastos generados por los análisis contradictorios, sin perjuicio de otras posibles sanciones, correrán por cuenta del interesado.

▼ M17

3. En lo tocante a la comprobación por las autoridades nacionales o sus representantes de las características de los aceites previstas en el apartado 1, la toma de muestras se efectuará de acuerdo con las normas internacionales EN ISO 661 y EN ISO 5555 relativas a la preparación de las muestras y al muestreo. Ahora bien, no obstante lo dispuesto en el punto 6.8 de la norma EN ISO 5555, respecto de los lotes compuestos por esos aceites, presentados en envases inmediatos de una capacidad igual o inferior a 100 litros, la toma de muestras se realizará de acuerdo con el anexo I *bis* del presente Reglamento.

▼ M19

Sin perjuicio de lo dispuesto en la norma EN ISO 5555 y en el capítulo 6 de la norma EN ISO 661, las muestras deberán guardarse lo antes posible en un lugar protegido de la luz y de las elevadas temperaturas y enviarse al laboratorio para la realización de los análisis a más tardar:

— el décimo día hábil siguiente al de la toma de la muestra, durante los meses de octubre a mayo, y

— el quinto día hábil siguiente al de la toma la muestra, durante los meses de junio a septiembre.

▼ M17

4. ► **M20** Para la comprobación prevista en el apartado 3, los análisis a que se refieren los anexos II, III, IX, X y XII, así como, en su caso, los segundos análisis previstos por las legislaciones nacionales, se efectuarán antes de la fecha de caducidad mínima. En caso de que la toma de la muestra se efectúe más de cuatro meses antes de la fecha de caducidad mínima, dichos análisis se realizarán a más tardar el cuarto mes siguiente al de la toma de la muestra. No se aplicará ningún plazo a los demás análisis previstos por el citado Reglamento. ◀

▼ M17

Excepto si la toma de muestras se ha efectuado menos de un mes antes de la fecha de caducidad mínima, en caso de que los resultados de los análisis no se ajusten a las características de la categoría de aceite de oliva o de orujo de oliva declarada, se notificará este extremo al interesado como muy tarde un mes antes de que finalice el plazo mencionado en el párrafo primero.

▼ M19

5. Con vistas a la determinación de las características de los aceites de oliva efectuada con arreglo a los métodos contemplados en el apartado I, los resultados de los análisis se compararán directamente con los límites fijados en el presente Reglamento.

▼ M20*Artículo 2 bis*

La comprobación por las autoridades nacionales o sus representantes de la conformidad de una muestra de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva con la categoría declarada podrá efectuarse:

- a) mediante la realización, en cualquier orden, de los análisis contemplados en el anexo I, o bien
- b) según el orden establecido en el anexo I *ter* del esquema de decisiones, hasta la adopción de una de las decisiones mencionadas en dicho esquema.

▼ M19**▼ M5***Artículo ► M19 3 ◀*

En caso de que se compruebe que las características organolépticas de un aceite son distintas de las correspondientes a su denominación, el Estado miembro interesado aplicará sanciones económicas administrativas, cuyo importe se determinará en función de la gravedad de la irregularidad comprobada, sin perjuicio de otras posibles sanciones.

Para la evaluación de las irregularidades se tendrá sobre todo en cuenta la evolución natural de las características del aceite de oliva conservado en condiciones normales.

Al principio de cada semestre, los Estados miembros informarán a la Comisión del número y la naturaleza de las irregularidades observadas, así como de las sanciones impuestas durante el semestre anterior.

*Artículo 4***▼ M19**

1. Para la apreciación y el control de las características organolépticas por parte de las autoridades nacionales o sus representantes, los Estados miembros podrán constituir paneles de catadores autorizados.

Las condiciones de autorización serán establecidas por los Estados miembros con los objetivos siguientes:

- cumplir las condiciones del punto 4 del anexo XII,
- asegurar que la formación del jefe del panel de catadores se efectúa en un establecimiento y en condiciones reconocidos a tal efecto por el Estado miembro,

▼ M19

- someter la validez de la autorización a los resultados obtenidos en el sistema de control anual implantado por el Estado miembro.

Todos los Estados miembros comunicarán a la Comisión la lista de los paneles de catadores autorizados, así como las demás medidas adoptadas de conformidad con el presente apartado.

▼ M5

2. En caso de que un Estado miembro tenga dificultades para crear un panel de catadores en su territorio, podrá recurrir a un panel de degustadores autorizado de otro Estado miembro.

3. Cada Estado miembro elaborará la lista de los paneles de catadores creados por organizaciones profesionales o interprofesionales en las condiciones fijadas en el apartado 1 y velará por el cumplimiento de esas condiciones.

▼ M19**▼ B***Artículo 6*

1. El contenido en aceite de orujo de aceituna y demás residuos de la extracción del aceite de oliva (códigos NC 2306 90 11 y 2306 90 19) se determinará con arreglo al método recogido en el Anexo XV.
2. El contenido de aceite mencionado en el apartado 1 se expresará como porcentaje del extracto seco en peso.

▼ M20*Artículo 7*

Serán aplicables las disposiciones comunitarias sobre la presencia de contaminantes.

En lo que respecta al contenido de disolventes halogenados, los límites para todas las categorías de aceites de oliva son los siguientes:

- Contenido máximo de cada disolvente halogenado detectado: 0,1 mg/kg
- Contenido máximo de la suma de los disolventes halogenados detectados: 0,2 mg/kg.

▼ B*Artículo 8*

1. Cada Estado miembro comunicará a la Comisión las medidas adoptadas en aplicación del presente Reglamento.
2. Cada Estado miembro comunicará a la Comisión, al inicio de cada semestre una recapitulación de los datos analíticos de las determinaciones efectuadas durante el semestre precedente.

▼B

Estos resultados serán examinados por el Comité de gestión de las materias grasas con arreglo al procedimiento previsto en el artículo 39 del Reglamento nº 136/66/CEE.

Artículo 9

Queda derogado el Reglamento (CEE) nº 1058/77.

Artículo 10

1. El presente Reglamento entrará en vigor el tercer día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

No obstante, el método que figura en el Anexo XII se aplicará a partir del ►**M1** 1 de noviembre de 1992 ◀, excepto en lo que se refiere a las operaciones relacionadas con la intervención.

▼M5

Dicho método no se aplicará a los aceites de oliva vírgenes envasados antes del 1 de noviembre de 1992.

▼B

El presente Reglamento no se aplicará a los aceites de oliva y de orujo de oliva envasados antes de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento y comercializados hasta el 31 de octubre de 1992.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

▼ B*ANEXOS***Índice**

Anexo I:	Características de los aceites de oliva
Anexo I <i>bis</i> :	Muestreo de lotes de aceite de oliva o aceite de orujo de oliva presentado en envases inmediatos de 100 litros como máximo
Anexo I <i>ter</i> :	Esquema de decisiones
Anexo II:	► M21 Determinación de los ácidos grasos libres, método en frío ◀
Anexo III:	Determinación del índice de peróxidos
Anexo IV:	► M6 Determinación del contenido de ceras mediante cromatografía de gases con columna capilar ◀
Anexo V:	Determinación de la composición y del contenido de esteroides mediante cromatografía de gases con columna capilar
Anexo VI:	Determinación del eritrodíol y uvaol
Anexo VII:	► M21 Determinación del porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo ◀

▼ M20**▼ B**

Anexo IX:	Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta
Anexo X «A»:	Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases
Anexo X «B»:	Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos
Anexo XI:	Determinación del contenido en ► C1 disolventes ◀ halogenados volátiles en el aceite de oliva
Anexo XII:	Valoración organoléptica del aceite de oliva virgen

▼ M20**▼ M19****▼ B**

Anexo XV:	Contenido de aceite de los orujos de aceituna
Anexo XVI:	Determinación del índice de yodo
Anexo XVII:	Método para la determinación de estigmastadienos en los aceites vegetales
Anexo XVIII:	Método para la determinación de la composición de los triglicéridos de ECN42
Anexo XIX:	Método de determinación del contenido de alcoholes alifáticos

▼ M23

Anexo XX:	Método para la determinación del contenido en ceras y en ésteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases con columna capilar
-----------	--

CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

Categoría	Ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs) y ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxidos mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmas-ta- dieno mg/kg (1)	Diferencia ECN42 (HPLC) y ECN42 (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación organoléptica Mediana del atributo frutado (Mf) (*)
1. Aceite de oliva virgen extra	Σ FAMEs + FAEEs ≤ 75 mg/kg o 75 mg/kg < Σ FAMEs + FAEEs ≤ 150 mg/kg y (FAEEs/FAMEs) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Aceite de oliva virgen	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	► C5 Md ≤ 3,5 ◀	Mf > 0
3. Aceite de oliva lampante	—	> 2,0	—	≤ 300 (2)	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	► C5 Md > 3,5 (2) ◀	—
4. Aceite de oliva refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % ácido palmítico total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—

▼ M23

Categoría	Ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) y ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxidos mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigma-ta- dieno mg/kg (1)	Diferencia ECN42 (HPLC) y ECN42 (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación organoléptica Mediana del atributo frutado (Mf) (*)
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Aceite de orujo de oliva bruto	—	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Aceite de orujo de oliva refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Aceite de orujo de oliva	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Suma de isómeros que podrían separarse (o no) mediante columna capilar.

(2) O cuando la mediana de los defectos es inferior o igual a 3,5 y la mediana del atributo frutado es igual a 0.

(3) Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de oliva lampante si los alcoholes alifáticos totales son inferiores o iguales a 350 mg/kg o si el porcentaje de eritrodil y uvaol es inferior o igual a 3,5.

(4) Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva crudo si los alcoholes alifáticos totales son superiores a 350 mg/kg y si el porcentaje de eritrodil y uvaol es superior a 3,5.

▼ M23

Categoría	Contenido de ácidos ⁽¹⁾						Sumas de los isómeros transoleicos (%)	Sumas de los isómeros translinoleicos + translinoleicos (%)	Composición de los esteroides					Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodíol y uvaol (%) (**)	
	Mirístico (%)	Linoléico (%)	Araquídico (%)	Eicoenoico (%)	Behénico (%)	Lignocénico (%)			Colesterol (%)	Brasica-terol (%)	Campe-terol (%)	Estigma-terol (%)	Betasito-terol (%) ⁽²⁾			Delta-7-estig-mastenol (%)
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Aceite de oliva virgen	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Aceite de oliva lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Aceite de orujo de oliva bruto	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Contenido de otros ácidos grasos (%): palmítico: 7,5 - 20,0; palmitoleico: 0,3 - 3,5; heptadecanoico: ≤ 0,3; heptadecenoico: ≤ 0,3; esteárico: 0,5 - 5,0; oleico: 55,0 - 83,0; linoleico: 3,5 - 21,0.

⁽²⁾ Suma de: delta-5,23-estigmastadienol + cleroesterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

⁽³⁾ Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de oliva lampante si el contenido de alcoholes alifáticos totales es inferior o igual a 350 mg/kg o si el porcentaje de eritrodíol y uvaol es inferior o igual a 3,5.

⁽⁴⁾ Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva bruto si el contenido de alcoholes alifáticos totales es superior a 350 mg/kg y si el porcentaje de eritrodíol y uvaol es superior a 3,5.

Notas:

a) Los resultados de los análisis deben expresarse indicando el mismo número de decimales que el previsto para cada característica.

La última cifra expresada deberá redondearse hacia arriba si la cifra siguiente es superior a 4.

b) Es suficiente con que una sola de las características no se ajuste a los valores indicados para que el aceite cambie de categoría o se declare no conforme en cuanto a su pureza.

c) Las características indicadas con un asterisco (*), relativas a la calidad del aceite, implican lo siguiente:

— en el caso del aceite de oliva lampante, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes;

— en el caso de los aceites de oliva vírgenes, el incumplimiento de al menos uno de estos límites supondrá un cambio de categoría, aunque seguirán clasificándose en una de las categorías de los aceites de oliva vírgenes.

d) Las características indicadas con dos asteriscos (**), relativas a la calidad del aceite, implican que, en el caso de todos los aceites de orujo de oliva, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes.

▼ **M20***ANEXO I bis***Muestreo de aceite de oliva o aceite de orujo de oliva entregado en envases inmediatos de 100 litros como máximo**

El presente método de muestreo se aplicará a las entregas de aceite de oliva o de orujo de oliva de 125 000 litros como máximo, presentados en envases inmediatos de 100 litros como máximo.

Cuando la entrega consista en más de 125 000 litros, se dividirá en lotes de cantidades iguales o inferiores a 125 000 litros. Cuando la entrega sea inferior a 125 000 litros, ésta constituirá un lote. El presente método se aplicará entonces a cada lote.

En función del tamaño del lote se determinará el número mínimo de muestras elementales, con arreglo al cuadro que figura en el punto 1.

El volumen de la muestra elemental se establecerá en función de la capacidad de los envases inmediatos, de acuerdo con el cuadro que figura en el punto 2.1.

Las definiciones contempladas en la norma EN ISO 5555 se aplicarán a «entrega», «muestra elemental» y «muestra de laboratorio».

Se entenderá por «lote» un conjunto de unidades de venta que se hayan producido, fabricado y envasado en circunstancias tales que el aceite contenido en cada una de dichas unidades de venta se considere homogéneo en lo que se refiere a sus características analíticas.

1. NÚMERO DE MUESTRAS ELEMENTALES

El número mínimo de muestras elementales se determinará en función del tamaño del lote, con arreglo al cuadro siguiente:

Tamaño del lote (litros) inferior a	Número mínimo de muestras elementales
7 500	2
25 000	3
75 000	4
125 000	5

Los envases inmediatos de una misma muestra elemental deberán escogerse entre envases contiguos del lote.

En caso de duda, el Estado miembro aumentará el número de muestras elementales que deban tomarse.

2. CONTENIDO DE UNA MUESTRA ELEMENTAL**2.1 Cada muestra elemental consistirá en lo siguiente:**

En caso de que los envases inmediatos tengan una capacidad:	La muestra elemental se extraerá del aceite de:
a) superior o igual a 5 litros	a) tres envases inmediatos
b) superior o igual a 3 litros e inferior a 5 litros	b) tres envases inmediatos
c) superior o igual a 2 litros e inferior a 3 litros	c) tres envases inmediatos
d) superior o igual a 1 litro e inferior a 2 litros	d) seis envases inmediatos
e) superior o igual a 0,75 litros e inferior a 1 litro	e) seis envases inmediatos
f) inferior a 0,75 litros	f) tres veces el aceite del número mínimo de envases cuya capacidad total supere 1,5 litros

▼M20

2.2 Las muestras elementales se mantendrán en los envases inmediatos hasta el momento de los análisis. A continuación, el aceite de las muestras elementales se subdividirá, en su caso, en tres muestras de laboratorio con el fin de efectuar:

- a) los análisis mencionados en los anexos II, III, IX y X;
- b) el análisis mencionado en el anexo XII;
- c) los demás análisis.

2.3 Los envases que constituyan una muestra elemental se subdividirán de acuerdo con los procedimientos de control previstos por las legislaciones nacionales.

3. ANÁLISIS Y RESULTADOS

a) Cada una de las muestras elementales contempladas en el punto 1 se subdividirá en muestras de laboratorio con arreglo al punto 2.5 de la norma EN ISO 5555, para someterlas a los análisis siguientes:

- determinación de ácidos grasos libres, como se contempla en el primer guión del apartado 1 del artículo 2,
- determinación del índice de peróxidos, como se contempla en el segundo guión del apartado 1 del artículo 2,
- análisis espectrofotométrico, como se contempla en el octavo guión del apartado 1 del artículo 2,
- composición de ácidos grasos, como se contempla en el noveno guión del apartado 1 del artículo 2.

b) En caso de que los resultados de los análisis mencionados en la letra a) de al menos una de las muestras elementales tomadas del mismo lote no se ajusten a las características de la categoría de aceite declarada, el conjunto del lote de que se trate se declarará no conforme.

En caso de que no sean homogéneos todos los resultados de los análisis mencionados en la letra a) de cada una de las muestras elementales tomadas del mismo lote, habida cuenta de las características de repetibilidad de los métodos de que se trate, el conjunto del lote se declarará no homogéneo y cada muestra elemental deberá someterse a los demás análisis exigidos. En caso contrario, sólo una de las muestras elementales de dicho lote se someterá a los demás análisis exigidos.

c) En caso de que uno de los resultados de los análisis mencionados en el segundo párrafo de la letra b) no se ajuste a las características de la categoría de aceite declarada, el conjunto del lote de que se trate se declarará no conforme.

En caso de que todos los resultados de los análisis mencionados en el segundo párrafo de la letra b) se ajusten a las características de la categoría de aceite declarada, todo el lote se declarará conforme.

▼ M20*ANEXO I ter***ESQUEMA DE DECISIONES PARA LA COMPROBACIÓN DE LA CONFORMIDAD DE UNA MUESTRA DE ACEITE DE OLIVA CON LA CATEGORÍA DECLARADA**

El análisis de la conformidad de un aceite de oliva o de orujo de oliva con la categoría declarada podrá efectuarse:

- a) mediante la realización, en cualquier orden, de los análisis previstos para comprobar que se reúnen las características mencionadas en el anexo I, o bien
- b) mediante la realización, según el orden indicado en el esquema de decisiones, de los análisis previstos en el mismo, hasta la adopción de una de las decisiones mencionadas en dicho esquema.

Los análisis relativos a los contaminantes, necesarios para comprobar la conformidad con las normas de la Comunidad Europea, se realizarán por separado.

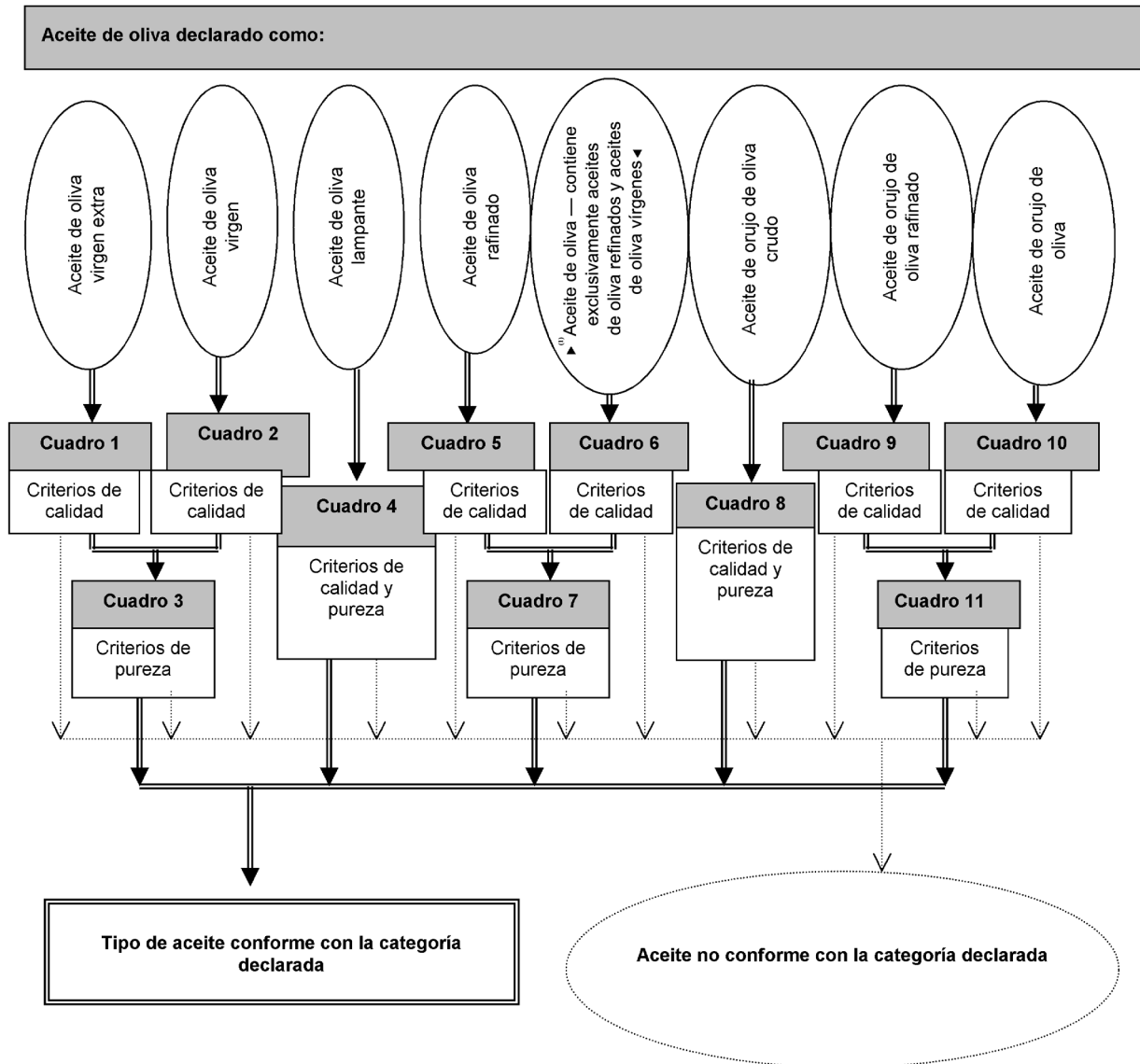
El esquema de decisiones se aplicará a todas las categorías de aceite de oliva y de orujo de oliva. Se compone de cuadros numerados del 1 al 11, que deberán seguirse en el orden indicado en el cuadro general en función de la categoría de aceite declarada.

Para la lectura de los cuadros general a 11:

- la línea doble (=) indica el camino que debe seguirse en caso de conformidad (respuesta positiva) con las condiciones previstas en la casilla anterior; la línea de puntos (...) indica, por el contrario, el camino que debe seguirse en caso de no conformidad,
- los títulos de las casillas que figuran en los cuadros 1 a 11 se refieren a los análisis previstos en el presente Reglamento, según las correspondencias mencionadas en el apéndice 1 del presente anexo,
- las letras que figuran en los círculos de decisión negativa de los cuadros 1 a 11 remiten a datos indicativos mencionados en el apéndice 2 del presente anexo y no implican por sí mismas ninguna obligación de continuar los análisis o la certeza de la mencionada presunción.

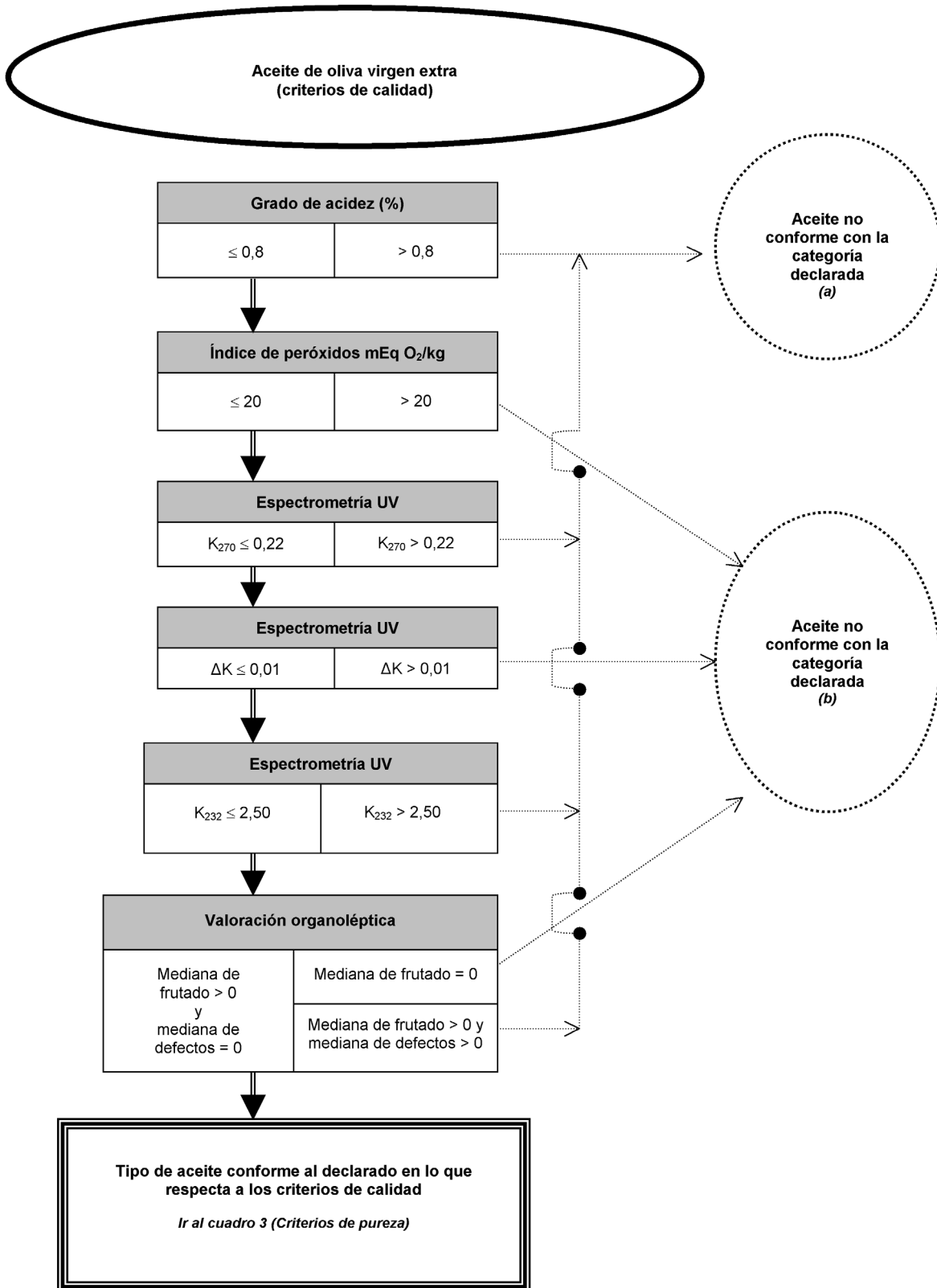
▼ **M20**

Cuadro general



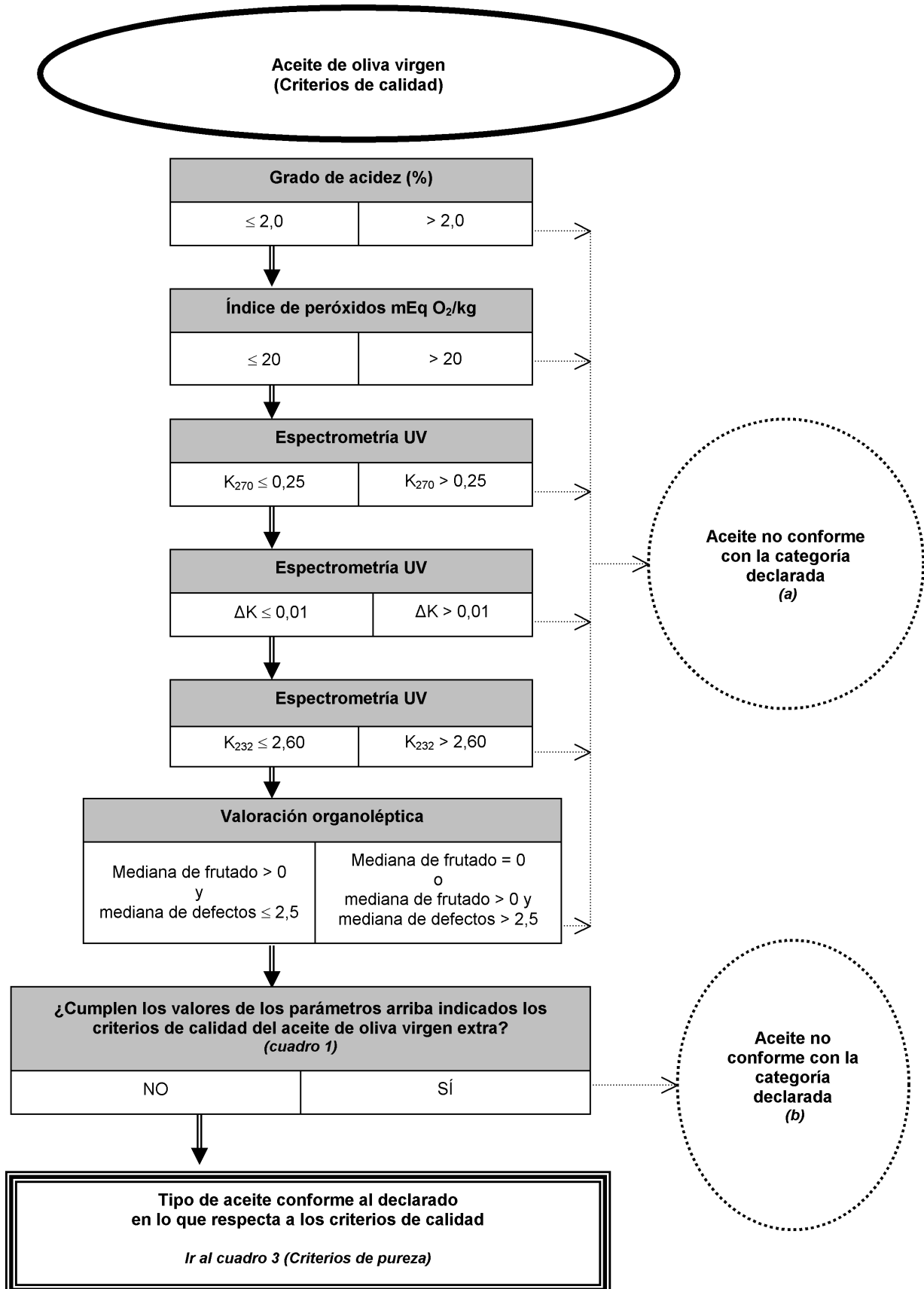
▼ **M20**

Cuadro 1



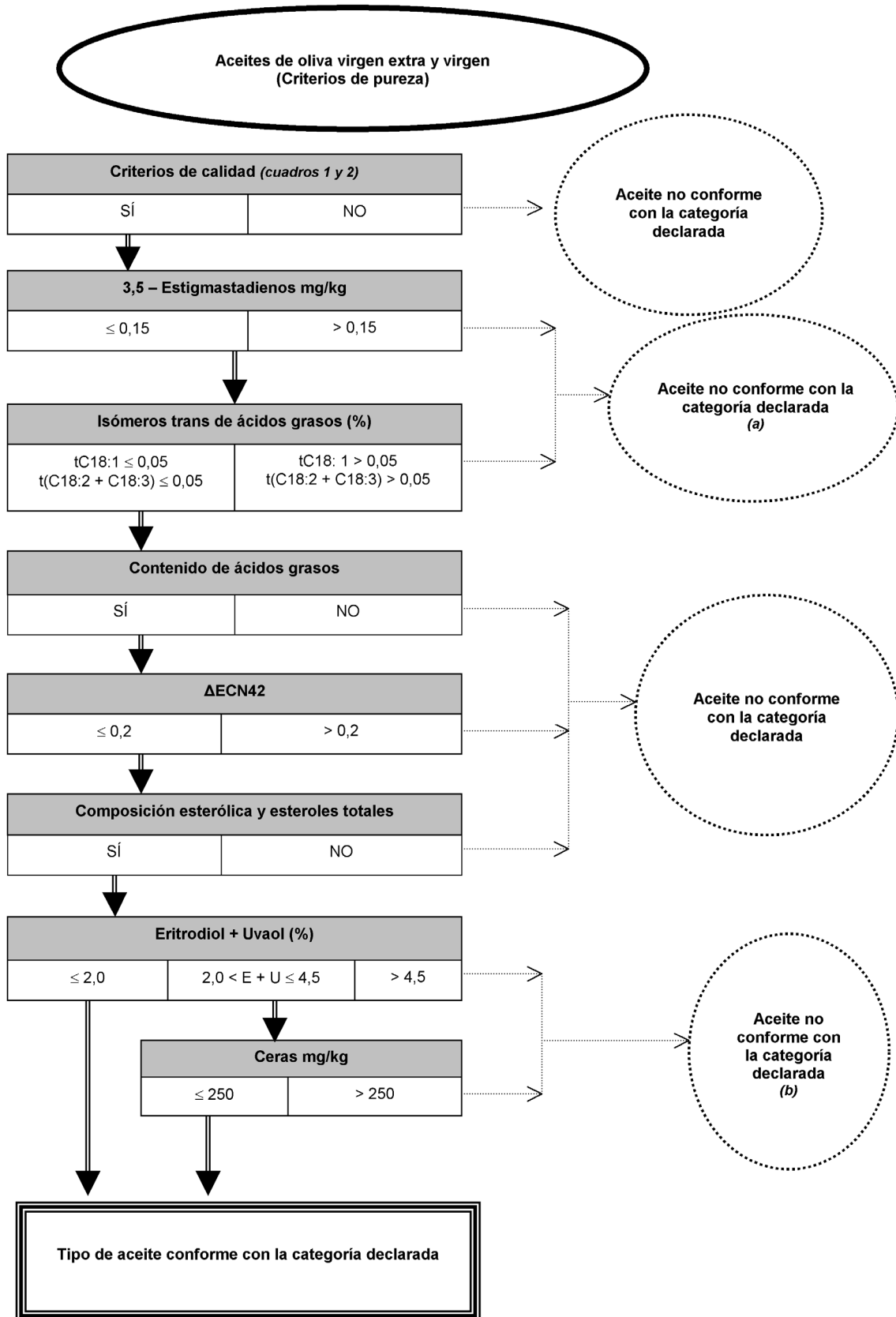
▼ M20

Cuadro 2



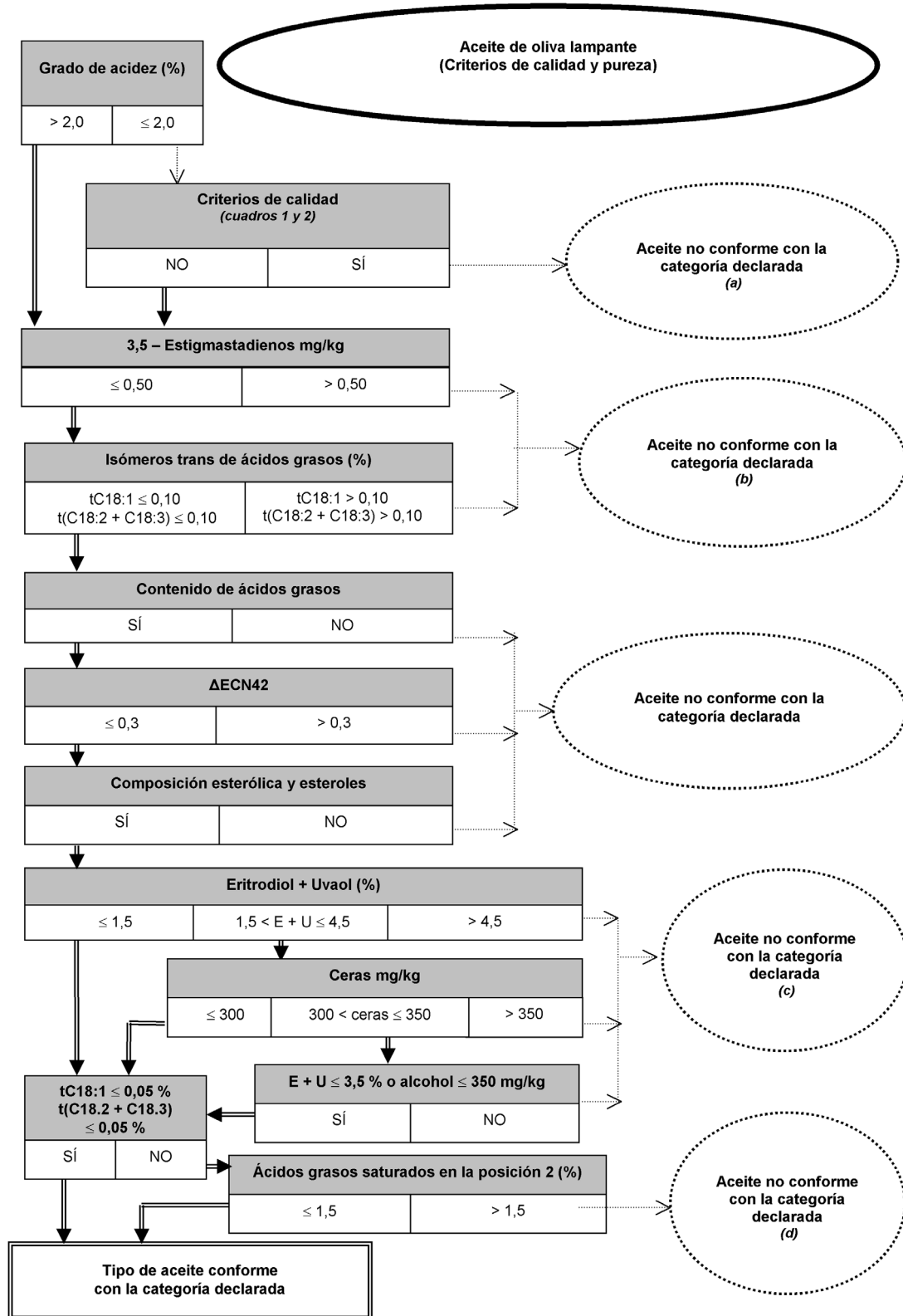
▼ **M20**

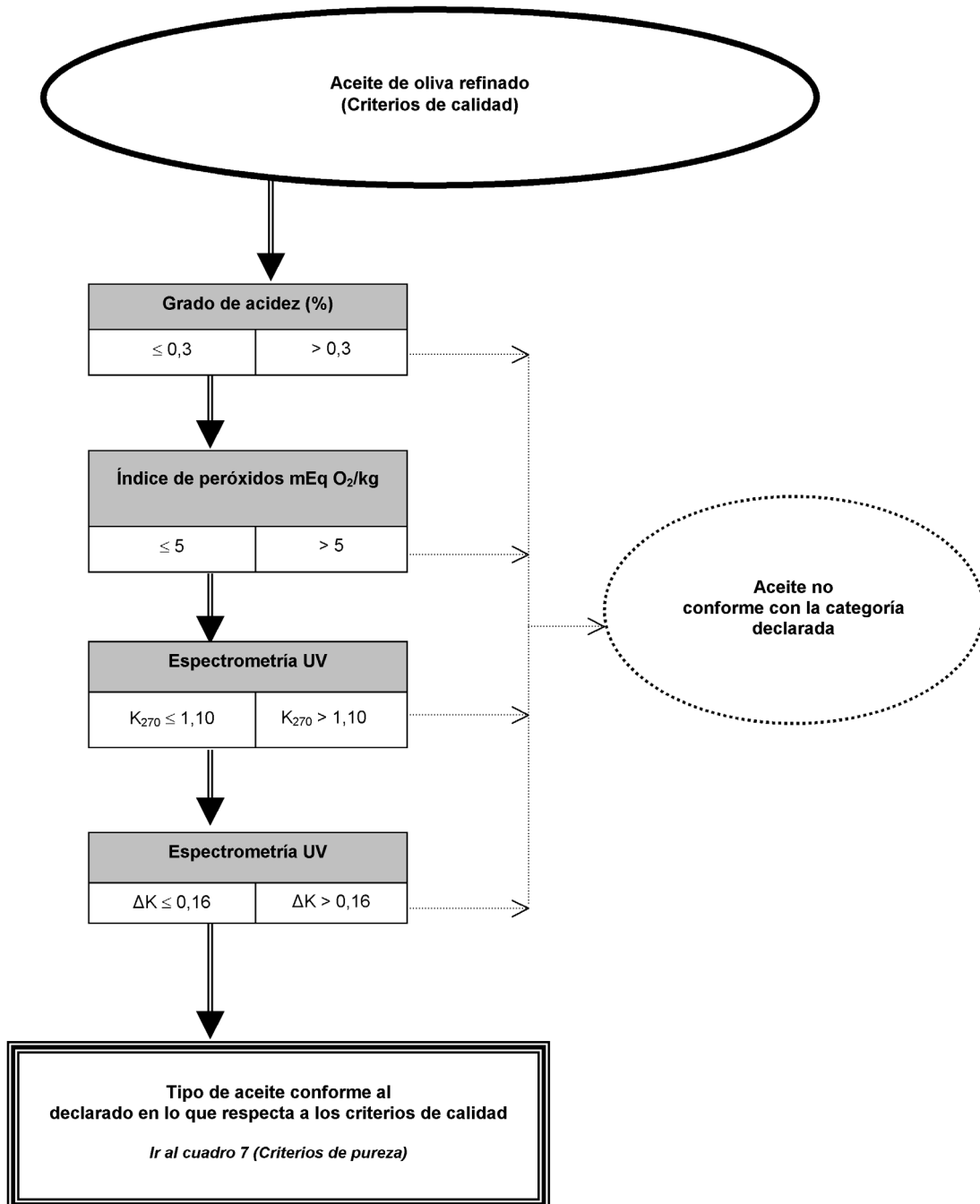
Cuadro 3

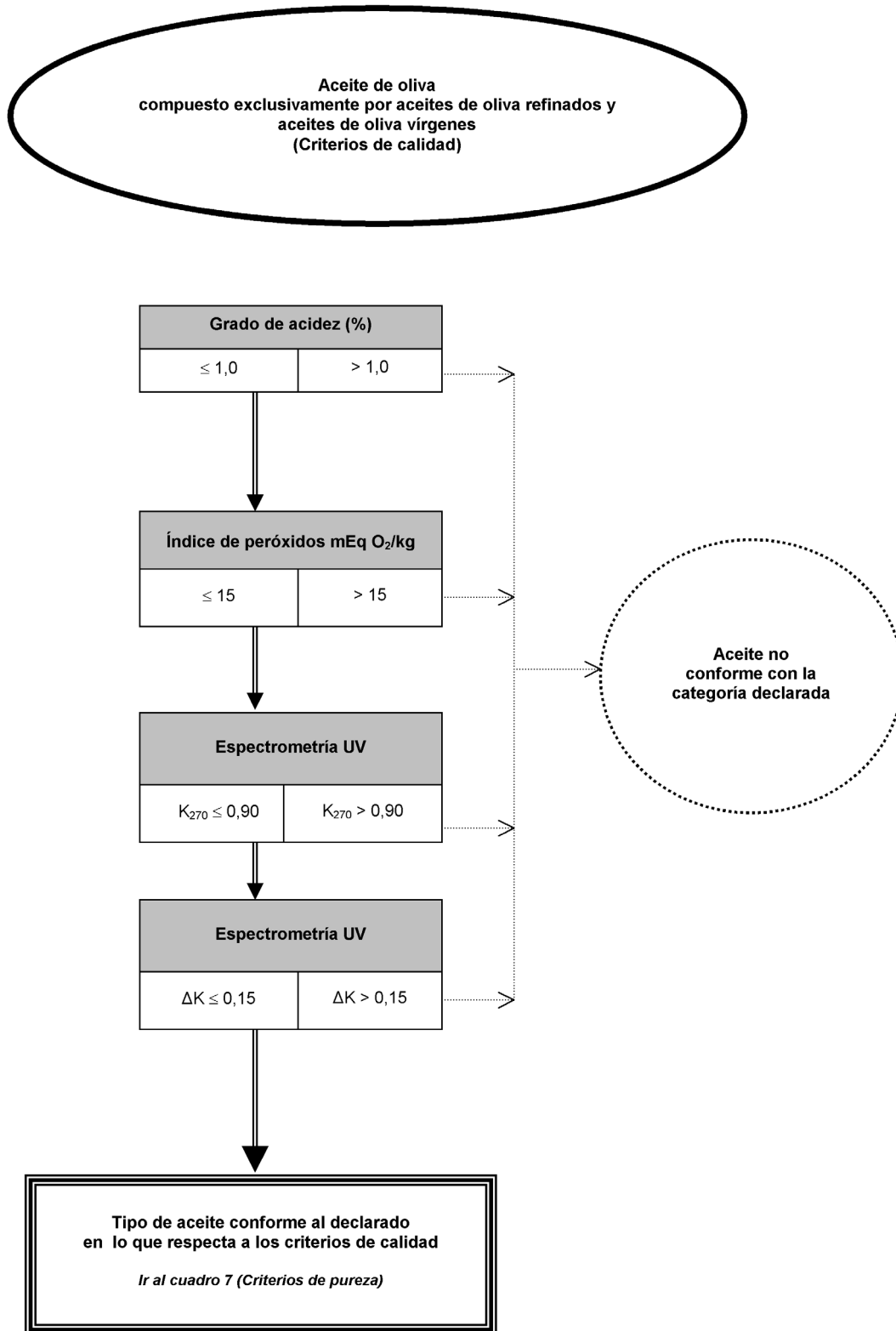


▼ M20

Cuadro 4

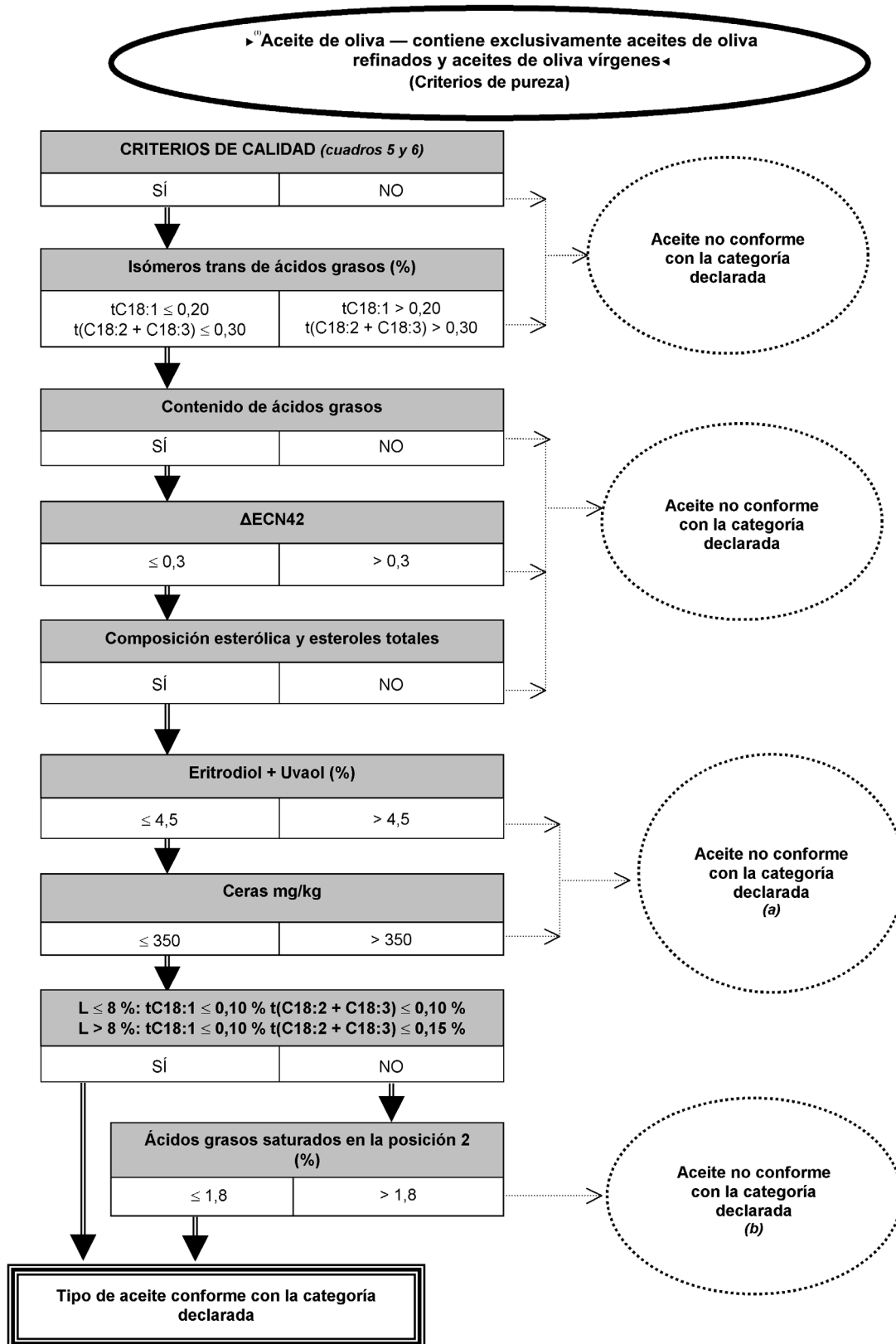


▼ **M20****Cuadro 5**

▼ **M20****Cuadro 6**

▼ **M20**

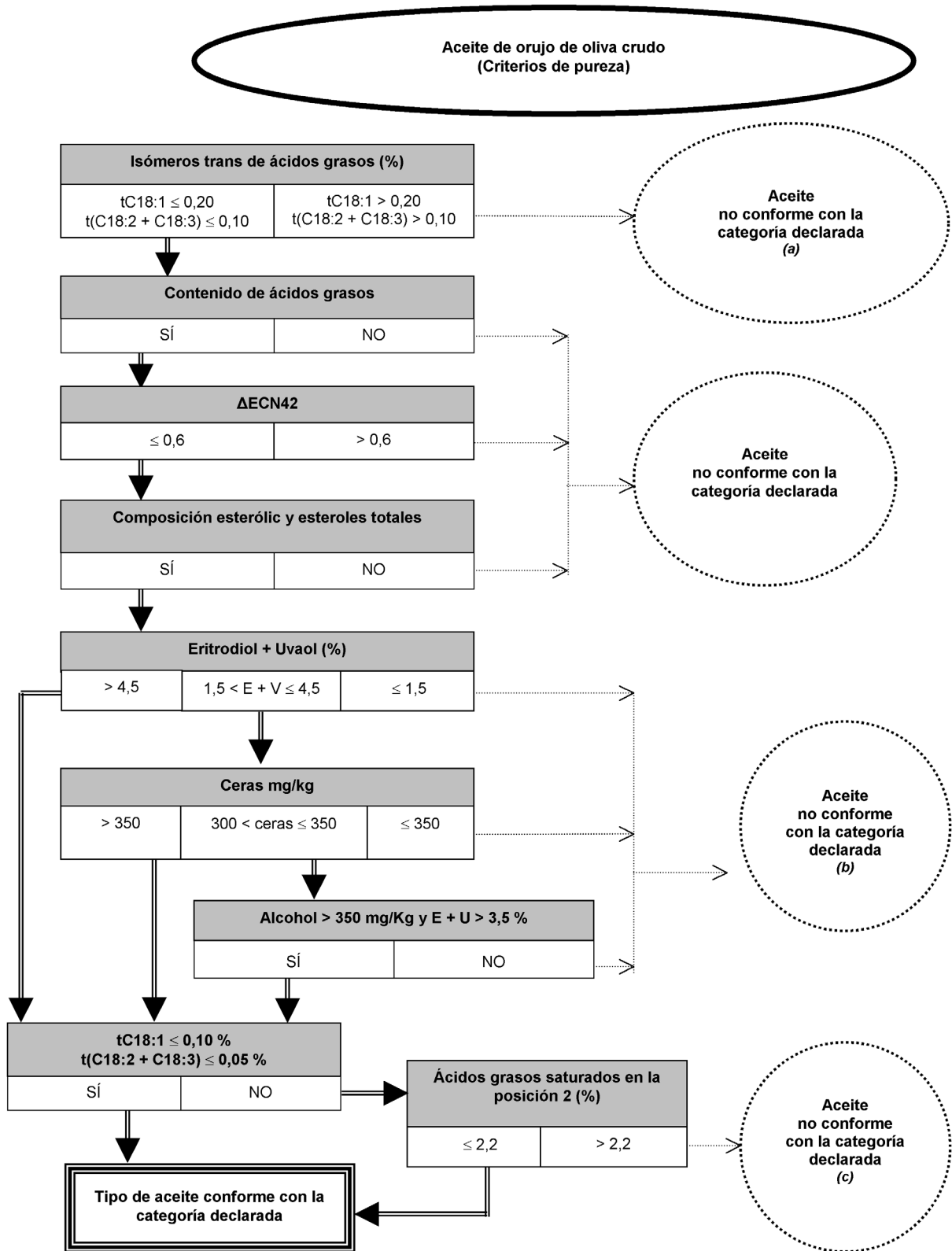
Cuadro 7

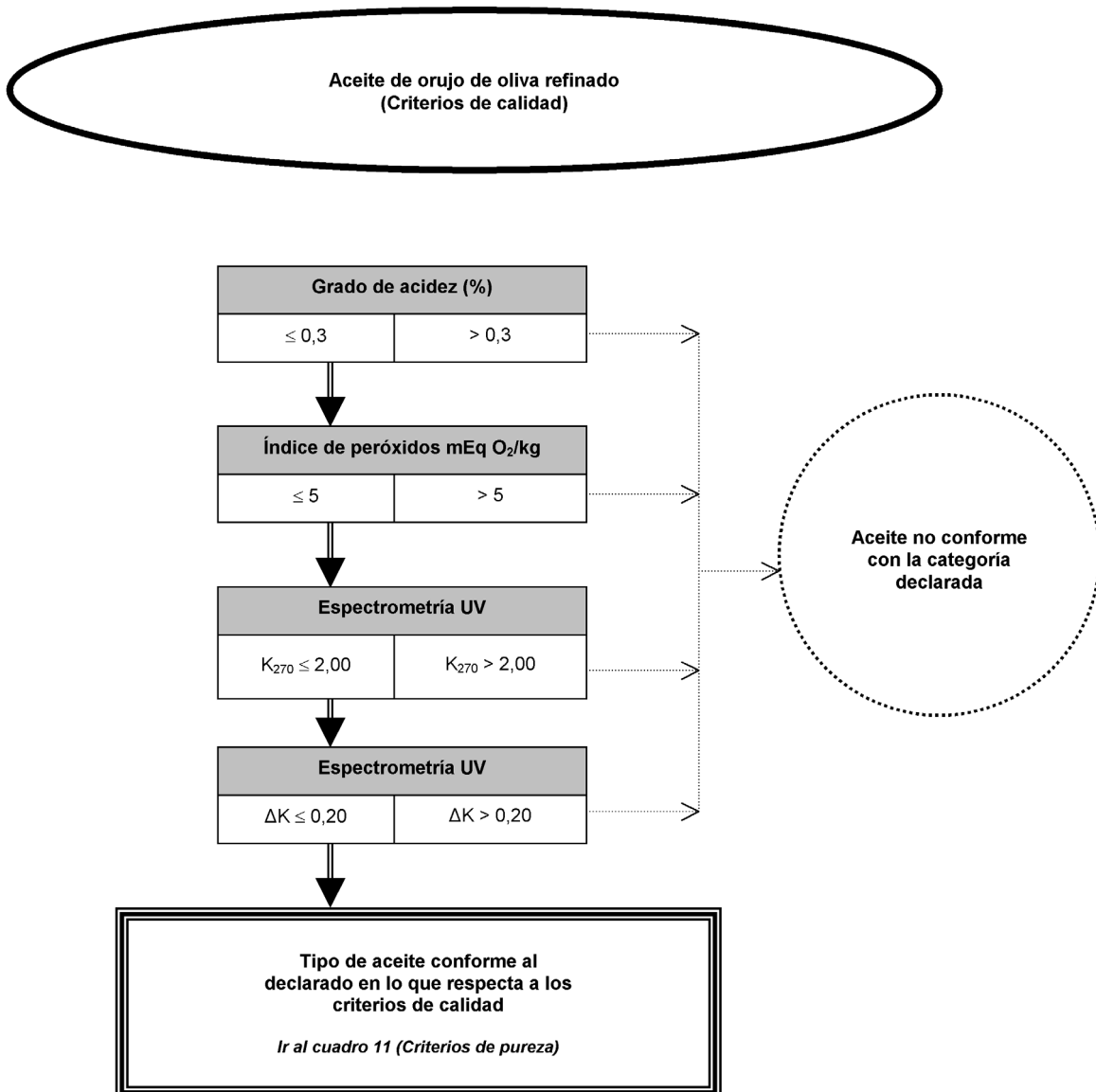


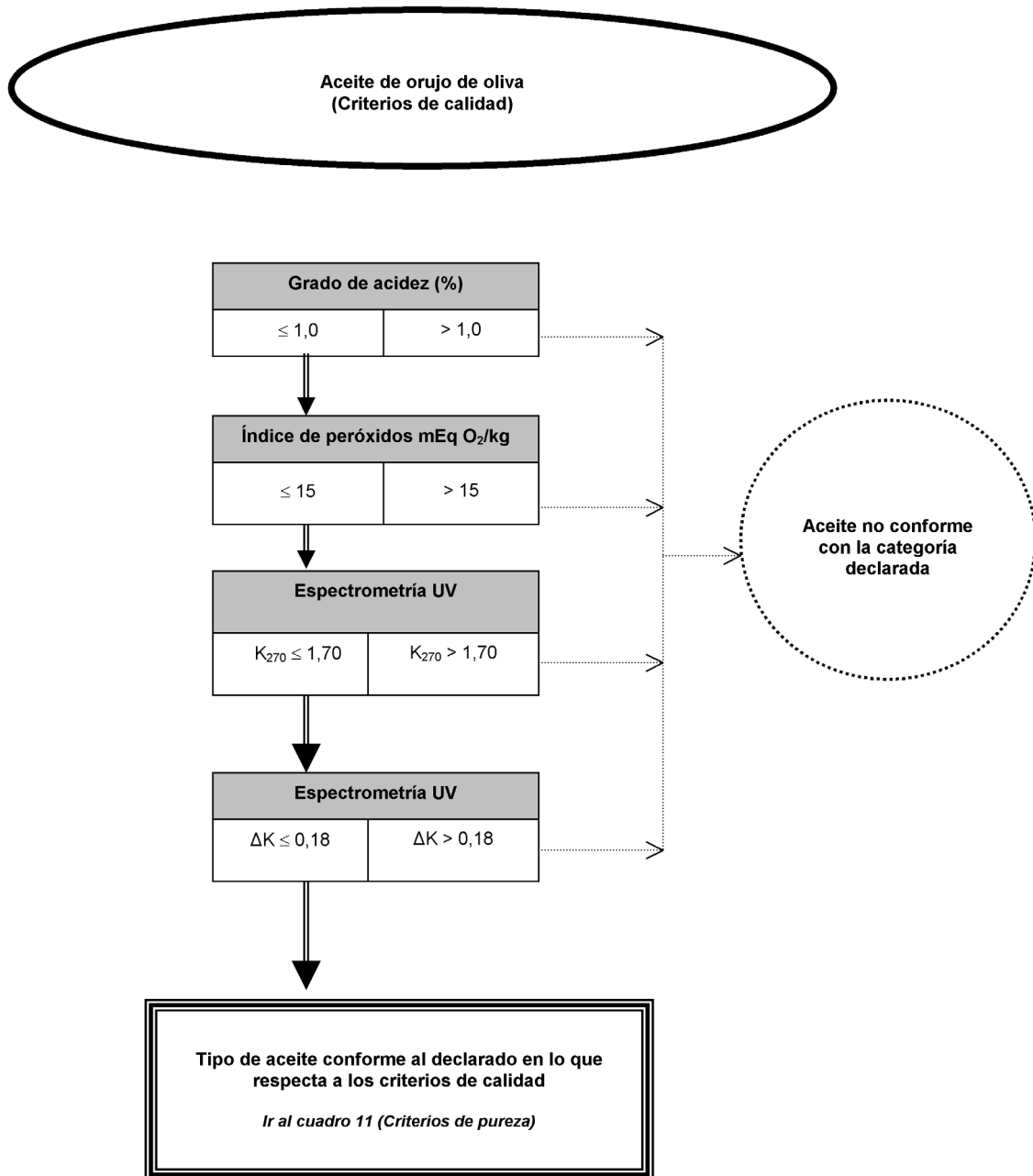
► ⁽¹⁾ **C4**

▼ M20

Cuadro 8

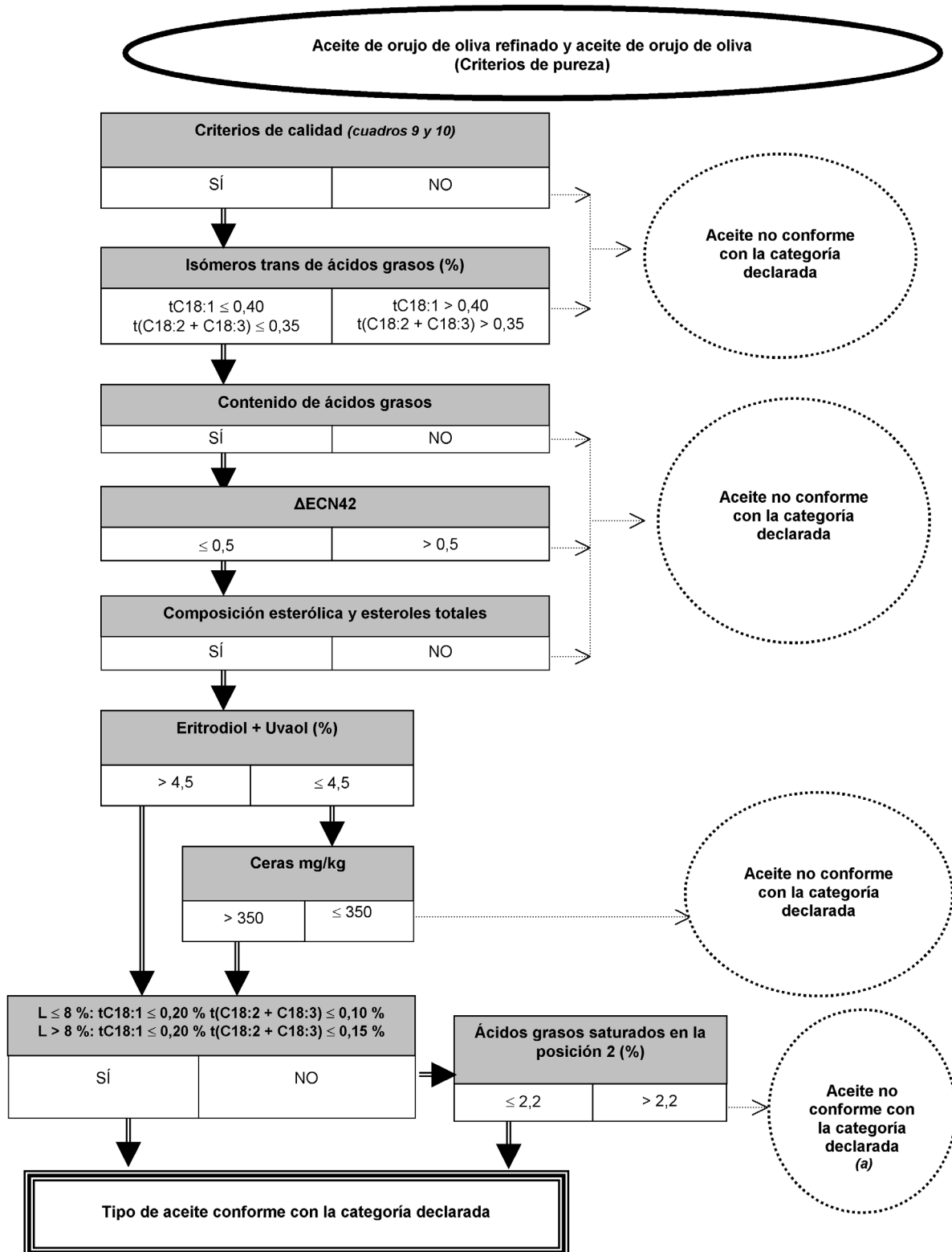


▼ **M20****Cuadro 9**

▼ **M20****Cuadro 10**

▼ M20

Cuadro 11



▼ **M20***Apéndice 1***Correspondencia entre los anexos del presente Reglamento y los análisis previstos en el procedimiento decisorio**▼ **M21**

— Grado de acidez	Anexo II	Determinación de los ácidos grasos libres, método en frío
-------------------	----------	---

▼ **M20**

— Índice de peróxidos	Anexo III	Determinación del índice de peróxidos
— Espectrofotometría en el ultravioleta	Anexo IX	Prueba espectrofotométrica
— Valoración organoléptica	Anexo XII	Valoración organoléptica de los aceites de oliva vírgenes
— Estigmasta-3,5-dieno en mg/kg	Anexo XVII	Método para la determinación de los estigmastadienos en los aceites vegetales
— Isómeros trans de ácidos grasos	Anexo X a y	Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases
	Anexo X b	Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos
— Composición de ácidos grasos	Anexo X a y	Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases
	Anexo X b	Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos
— ΔECN42	Anexo XVIII	Determinación del contenido de triglicéridos con ECN42 (diferencia entre composición real y composición teórica)
— Composición esterólica y esteroides totales	Anexo V	Determinación de la composición y del contenido de esteroides mediante cromatografía de gases con columna capilar
— Eritrodiol y Uvaol (%)	Anexo VI	Determinación del Eritrodiol y Uvaol
— Ceras mg/kg	Anexo IV	Determinación del contenido de ceras mediante cromatografía de gases con columna capilar
— Alcoholes	Anexo XIX	Determinación del contenido de alcoholes alifáticos mediante cromatografía de gases con columna capilar

▼ **M21**

— Ácidos grasos saturados en la posición 2	Anexo VII	Determinación del porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo
--	-----------	--

▼ M20*Apéndice 2***Cuadro 1**

- a) Véase el aceite de oliva virgen o lampante (criterios de calidad del *cuadro 2* o criterios de calidad y pureza del *cuadro 4*)
- b) Véase el aceite de oliva lampante (criterios de calidad y pureza del *cuadro 4*)

Cuadro 2

- a) Véase el aceite de oliva lampante (criterios de calidad y pureza del *cuadro 4*)
- b) Véase el aceite de oliva virgen extra (criterios de calidad del *cuadro 1*)

Cuadro 3

- a) Presencia de aceite refinado (de oliva u otros)
- b) Presencia de aceite de orujo de oliva

Cuadro 4

- a) Véase el aceite de oliva virgen extra y el aceite de oliva virgen (criterios de calidad del *cuadro 1* y del *cuadro 2*)
- b) Presencia de aceite refinado (de oliva u otros)
- c) Presencia de aceite de orujo de oliva
- d) Presencia de aceites esterificados

Cuadro 7

- a) Presencia de aceite de orujo de oliva
- b) Presencia de aceites esterificados

Cuadro 8

- a) Presencia de aceite refinado (de oliva u otros)
- b) Véase el aceite de oliva lampante (criterios de calidad y pureza del *cuadro 4*)
- c) Presencia de aceites esterificados

Cuadro 11

- a) Presencia de aceites esterificados

▼B

ANEXO II

▼M21**DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES, MÉTODO EN FRÍO****▼B**

1. OBJETO

Determinar los ácidos libres en los aceites de oliva. El contenido en ácidos grasos libres se expresa mediante la acidez calculada según el método convencional.

1.1. Principio

Disolución de la muestra en una mezcla de disolventes y valoración de los ácidos grasos libres mediante una solución etanólica de hidróxido potásico.

1.2. Reactivos

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica reconocida y el agua utilizada debe ser agua destilada o de una pureza equivalente.

1.2.1. Mezcla de éter dietílico y etanol de 95 % (V/V), en proporción de volumen 1:1.

Nota: El éter dietílico es muy inflamable y puede formar peróxidos explosivos. Debe utilizarse tomando especiales precauciones.

Debe neutralizarse exactamente en el momento de su utilización con la solución de hidróxido potásico (1.2.2) en presencia de 0,3 ml de la solución de fenoltaleína (1.2.3) por cada 100 ml de mezcla.

Nota: Si no es posible utilizar éter dietílico, puede sustituirse por una mezcla de disolventes formada por etanol y tolueno. Si fuera necesario, el etanol podría sustituirse, a su vez, por 2-propanol.

1.2.2. Solución etanólica valorada de hidróxido potásico, = 0,1 M o, en caso necesario, = 0,5 M. Nota 1.

Debe conocerse, y comprobarse inmediatamente antes de su utilización, la concentración exacta de la solución etanólica de hidróxido potásico. Debe utilizarse una solución que haya sido preparada por lo menos cinco días antes y decantada en un frasco de vidrio marrón cerrado con tapón de goma. La solución debe ser incolora o de color amarillo paja.

Nota: Se puede preparar una solución incolora y estable de hidróxido potásico de la manera siguiente: Llevar a ebullición, y mantener ésta a reflujo durante una hora, 1 000 ml de etanol con 8 g de hidróxido potásico y 0,5 g de virutas de aluminio. Destilar inmediatamente. Disolver en el destilado la cantidad requerida de hidróxido potásico. Dejar reposar durante varios días y decantar el líquido claro sobrenadante, separándolo del precipitado de carbonato potásico.

La solución también puede prepararse de la manera siguiente sin efectuar la destilación: añadir 4 ml de butilato de aluminio a 1 000 ml de etanol y dejar reposar la mezcla durante algunos días. Decantar el líquido sobrenadante y disolver en él la cantidad necesaria de hidróxido potásico. La solución está lista para ser utilizada.

1.2.3. Solución de 10 g/l de fenoltaleína en etanol de 95-96 % (V/V) o solución de 20 g/l de azul alcalino (en caso de aceites de oliva muy coloreados) en etanol de 95-96 % (V/V).

1.3. Material

Material habitual de laboratorio, y en particular:

▼B

- 1.3.1. Balanza analítica
- 1.3.2. Matraz erlenmeyer de 250 ml de capacidad
- 1.3.3. Bureta de 10 ml de capacidad, con graduación de 0,05 ml

1.4. Procedimiento

- 1.4.1. Preparación de la muestra para la prueba

La determinación se efectuará en una muestra filtrada. Si el contenido global de humedad e impurezas es inferior al 1 %, se utilizará la muestra tal cual.

- 1.4.2. Muestra para la prueba

Tomar la muestra, según el grado de acidez previsto, de acuerdo con el cuadro siguiente:

Grado de acidez previsto	Peso de la muestra (en g)	Precisión de la pesada de la muestra (en g)
< 1	20	0,05
1 a 4	10	0,02
4 a 15	2,5	0,01
15 a 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Pesar la muestra en el matraz erlenmeyer (1.3.2)

- 1.4.3. Determinación

Disolver la muestra (1.4.2) en 50 a 150 ml de la mezcla de éter dietílico y etanol (1.2.1), previamente neutralizada.

Valorar, agitando, con la solución de hidróxido potásico de 0,1 M (1.2.2) (véase nota 2) hasta el viraje del indicador (la coloración rosa de la fenolftaleína debe permanecer al menos durante 10 segundos).

Nota 1: La solución etanólica valorada de hidróxido potásico (1.2.2) puede sustituirse por una solución acuosa de hidróxido potásico o sódico siempre que el volumen de agua añadido no provoque una separación de las fases.

Nota 2: Si la cantidad necesaria de la solución de hidróxido potásico de 0,1 M supera los 10 ml, debe utilizarse una solución de 0,5 M.

Nota 3: Si la solución se enturbia durante la valoración, añadir una cantidad suficiente de la mezcla de disolventes (1.2.1) para que la solución se aclare.

- 1.5. **Expresión de la acidez en porcentaje de ácido oleico**

La acidez, expresada en porcentaje de ácido oleico es igual a:

$$V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{P} = \frac{V \times c \times M}{10 \times P}$$

▼B

siendo:

V: volumen en ml de la solución valorada de hidróxido potásico utilizada.

c: concentración exacta, en moles por litro, de la solución de hidróxido potásico utilizada.

M: peso molecular del ácido en que se expresa el resultado (ácido oleico = 282).

P: peso en gramos de la muestra utilizada.

Se tomará como resultado la media aritmética ►**M6** de dos determinaciones ◀.



ANEXO III

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS

1. OBJETO

La presente norma describe un método para la determinación del índice de peróxidos de los aceites y grasas.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

La presente norma es aplicable a los aceites y grasas animales y vegetales.

3. DEFINICIÓN

El índice de peróxidos es la cantidad (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones de trabajo descritas.

4. PRINCIPIO

La muestra problema, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con solución de yoduro potásico. El yodo liberado se valora con solución valorada de tiosulfato sódico.

5. APARATOS

Todo el material utilizado estará exento de sustancias reductoras u oxidantes.

Nota: No engrasar las superficies esmeriladas.

5.1. Navecilla de vidrio de 3 ml

5.2. Matraces con cuello y tapón esmerilados, de 250 ml de capacidad aproximadamente, previamente secados y llenos de gas inerte puro y seco (nitrógeno o, preferiblemente, dióxido de carbono).

5.3. Bureta de 25 o 50 ml, graduada en 0,1 ml.

6. REACTIVOS

6.1. Cloroformo para análisis, exento de oxígeno por borboteo de una corriente de gas inerte puro y seco.

6.2. Ácido acético glacial para análisis, exento de oxígeno por borboteo de una corriente de gas inerte puro y seco.

6.3. Solución acuosa saturada de yoduro potásico, recién preparada, exenta de yodo y yodatos.

6.4. Solución acuosa de tiosulfato sódico 0,01 N o 0,002 N valorada exactamente; la valoración se efectuará inmediatamente antes del uso.

6.5. Solución de almidón, en solución acuosa de 10 g/l, recién preparada con almidón soluble.

7. MUESTRA

La muestra se tomará y almacenará al abrigo de la luz, y se mantendrá refrigerada dentro de envases de vidrio totalmente llenos y herméticamente cerrados con tapones de vidrio esmerilado o de corcho.

▼B

8. PROCEDIMIENTO

El ensayo se realizará con luz natural difusa o con luz artificial. Pesar con precisión de 0,001 g en una navecilla de vidrio (5.1) o, en su defecto, en un matraz (5.2) una cantidad de muestra en función del índice de peróxidos que se presuponga, con arreglo al cuadro siguiente:

Índice de peróxidos que se supone (meq de O ₂ /kg)	Peso de la muestra problema (en g)
de 0 a 12	de 5,0 a 2,0
de 12 a 20	de 2,0 a 1,2
de 20 a 30	de 1,2 a 0,8
de 30 a 50	de 0,8 a 0,5
de 50 a 90	de 0,5 a 0,3

Abrir un matraz (5.2) e introducir la navecilla de vidrio que contenga la muestra problema. Añadir 10 ml de cloroformo (6.1). Disolver rápidamente la muestra problema mediante agitación. Añadir 15 ml de ácido acético (6.2) y, a continuación, 1 ml de solución de yoduro potásico (6.3). Cerrar rápidamente el matraz, agitar durante 1 minuto y mantenerlo en la oscuridad durante 5 minutos exactamente, a una temperatura comprendida entre 15 y 25 °C.

Añadir 75 ml aproximadamente de agua destilada. Valorar (agitando al mismo tiempo vigorosamente) el yodo liberado con la solución de tiosulfato sódico (6.4) (solución 0,002 N si se presuponen valores inferiores a 12 y solución 0,01 N si se presuponen valores superiores a 12), utilizando la solución de almidón (6.5) como indicador.

Efectuar dos determinaciones por muestra.

Realizar simultáneamente un ensayo en blanco. Si el resultado del ensayo en blanco sobrepasa 0,05 ml de la solución de tiosulfato sódico 0,01 N (6.4), sustituir los reactivos.

9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El índice de peróxidos (I.P.), expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$IP = \frac{V \times N \times 1000}{P}$$

siendo:

V: ml de solución valorada de tiosulfato sódico (6.4) empleados en el ensayo, convenientemente corregidos para tener en cuenta el ensayo en blanco.

N: normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico (6.4) empleada.

P: peso, en gramos de la muestra problema.

El resultado será la media aritmética de las dos determinaciones efectuadas.

▼ **M21***ANEXO IV***DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CERAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON COLUMNA CAPILAR****1. OBJETO**

El presente método describe un procedimiento para la determinación del contenido de ceras en los aceites de oliva. Las ceras se separan en función del número de átomos de carbono. El método puede utilizarse, en particular, para distinguir el aceite de oliva obtenido por presión del obtenido mediante extracción (aceite de orujo de oliva).

2. PRINCIPIO

La materia grasa, a la que se habrá añadido un patrón interno adecuado, se fracciona mediante cromatografía en columna de gel de sílice hidratado; se recupera la fracción eluida en primer lugar en las condiciones de ensayo (cuya polaridad es inferior a la de los triglicéridos) y, a continuación, se analiza directamente mediante cromatografía de gases en columna capilar.

3. MATERIAL

- 3.1. Matraz Erlenmeyer de 25 ml.
- 3.2. Columna de vidrio para cromatografía de gases, de 15,0 mm de diámetro interior, entre 30 y 40 cm de longitud, y provista de una llave.
- 3.3. Cromatógrafo de gases adecuado para utilizarse con columna capilar, dotado de un sistema de introducción directa en la columna, que incluya los siguientes elementos:
 - 3.3.1. Recinto termostático para las columnas, provisto de un programador de temperatura.
 - 3.3.2. Inyector en frío para introducción directa en la columna.
 - 3.3.3. Detector de ionización de llama y convertidor-amplificador.
 - 3.3.4. Registrador-integrador que pueda funcionar con el convertidor-amplificador (3.3.3), con un tiempo de respuesta inferior o igual a un segundo y velocidad variable del papel. (También se pueden utilizar sistemas informatizados que contemplen la obtención de los datos de cromatografía de gases mediante un ordenador.)
 - 3.3.5. Columna capilar de vidrio o sílice fundida, de 8 a 12 m de longitud y de 0,25 a 0,32 mm de diámetro interior, recubierta interiormente de fase estacionaria, con un espesor uniforme que oscile entre 0,10 y 0,30 μm . (Se encuentran en el comercio fases estacionarias adecuadas listas para su empleo, del tipo de la SE-52 o SE-54.)
- 3.4. Microjeringa para introducción directa en columna, de 10 μl de capacidad, provista de una aguja cementada.
- 3.5. Vibrador eléctrico.
- 3.6. Rotavapor.
- 3.7. Horno de mufla.
- 3.8. Balanza analítica con una precisión de $\pm 0,1$ mg.
- 3.9. Material de vidrio normal de laboratorio.

4. REACTIVOS

- 4.1. Gel de sílice de una granulometría comprendida entre 60 y 200 μm

El gel de sílice debe mantenerse durante un mínimo de 4 horas en el horno a 500 °C. Tras su enfriamiento, se añade un 2 % de agua respecto a la cantidad de gel de sílice tomada. Se agita bien para homogeneizar la masa. Se mantiene al abrigo de la luz durante al menos 12 horas antes de su uso.

▼ M21

- 4.2. n-hexano, de calidad para cromatografía.
- 4.3. Éter etílico, de calidad para cromatografía.
- 4.4. n-heptano, de calidad para cromatografía.
- 4.5. Solución patrón de araquidato de laurilo al 0,1 % (m/v) en hexano (patrón interno). (También puede utilizarse palmitato de palmitilo o estearato de miristilo).
 - 4.5.1. *Sudán 1 (1-fenil-azo-2-naftol)*.
- 4.6. Gas portador: hidrógeno o helio puro, de calidad para cromatografía de gases.
- 4.7. Gases auxiliares:
 - hidrógeno puro, de calidad para cromatografía de gases,
 - aire puro, de calidad para cromatografía de gases.

5. PROCEDIMIENTO**5.1. Preparación de la columna cromatográfica**

Suspender 15 g de gel de sílice (4.1) en n-hexano (4.2) e introducirlo en la columna (3.2). Completar la sedimentación espontánea con ayuda de un vibrador eléctrico (3.5), a fin de obtener una capa cromatográfica más homogénea. Hacer pasar 30 ml de n-hexano para eliminar las posibles impurezas. Pesar exactamente con ayuda de la balanza (3.8) 500 mg de la muestra en el matraz Erlenmeyer de 25 ml (3.1) y añadir la cantidad adecuada del patrón interno (4.5), en función del contenido previsto de ceras; por ejemplo, añadir 0,1 mg de araquidato de laurilo si se trata de aceite de oliva y de 0,25 a 0,50 mg si se trata de aceite de orujo. Transferir la muestra así preparada a la columna cromatográfica, con ayuda de dos porciones, cada una de 2 ml, de n-hexano (4.2).

Dejar fluir el disolvente hasta que se sitúe a 1 mm por encima del nivel superior del absorbente, y a continuación hacer pasar 70 ml más de n-hexano para eliminar los n-alcanos presentes de forma natural. Comenzar entonces la elución cromatográfica recogiendo 180 ml de la mezcla de n-hexano/éter etílico en la proporción 99:1, manteniendo un flujo aproximado de 15 gotas cada 10 segundos. La elución de la muestra debe efectuarse a una temperatura ambiente de $22\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$.

Notas: — La mezcla n-hexano/éter etílico (99:1) debe prepararse cada día.

- Para controlar visualmente la elución correcta de las ceras, es posible añadir a la muestra en solución 100 µl de Sudán al 1 % en la mezcla de elución. Como el colorante tiene una retención intermedia entre las ceras y los triglicéridos, cuando la coloración llega al fondo de la columna cromatográfica hay que suspender la elución por haberse eluido ya todas las ceras.

Secar la fracción resultante en el rotavapor (3.6) hasta que se haya eliminado prácticamente todo el disolvente. Eliminar los dos últimos mililitros del disolvente con ayuda de una débil corriente de nitrógeno; añadir a continuación de 2 a 4 ml de n-heptano.

5.2. Cromatografía de gases**5.2.1. Operaciones preliminares**

Instalar la columna en el cromatógrafo de gases (3.3), conectando el terminal de entrada al sistema en columna y el terminal de salida al detector. Efectuar los controles generales del cromatógrafo de gases (funcionamiento de los circuitos de gas, eficacia del detector y del registrador, etc.).

▼ **M21**

Si la columna se utiliza por vez primera, es conveniente acondicionarla. Hacer pasar a través de la columna una corriente ligera de gas y, a continuación, encender el cromatógrafo de gases. Calentar gradualmente hasta alcanzar, al cabo de unas 4 horas, la temperatura de 350 °C. Mantener esta temperatura durante al menos 2 horas y, a continuación, ajustar el aparato a las condiciones de trabajo [regulación del flujo del gas, encendido de la llama, conexión con el registrador electrónico (3.3.4), regulación de la temperatura del recinto para la columna, regulación del detector, etc.] y registrar la señal con una sensibilidad al menos dos veces superior a la prevista para efectuar el análisis. La línea de base deberá ser lineal, sin picos de ningún tipo ni deriva.

Una deriva rectilínea negativa indica que las conexiones de la columna no son correctas; una deriva positiva indica que la columna no ha sido acondicionada adecuadamente.

5.2.2. *Elección de las condiciones de trabajo*

En general, las condiciones de trabajo deben ser las siguientes:

— temperatura de la columna:

	20 °C/ minuto		5 °C/ minuto		20 °C/ minuto	
al inicio 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— temperatura del detector: 350 °C;

— cantidad inyectada: 1 µl de la solución (2-4 ml) de n-heptano,

— gas portador: helio o hidrógeno a la velocidad lineal óptima para el gas seleccionado (véase el apéndice),

— sensibilidad del instrumento: capaz de responder a las condiciones siguientes:

Estas condiciones pueden modificarse en función de las características de la columna y del cromatógrafo de gases, de modo que se obtenga la separación de todas las ceras, una resolución satisfactoria de los picos (véase la figura) y un tiempo de retención del patrón interno C₃₂ de 18 ± 3 minutos. El pico más representativo de las ceras debe haber medido al menos el 60 % del fondo de la escala.

Determinar los parámetros de integración de los picos de manera que se obtenga una evaluación correcta de las áreas de los picos considerados.

Nota: Ante lo elevado de la temperatura final, se admite una deriva positiva que no debe ser superior al 10 % del fondo de la escala.

5.3. **Realización del análisis**

Tomar 1 µl de la solución con la microjeringa de 10 µl; sacar el émbolo de la jeringa hasta que la aguja esté vacía. Introducir la aguja en el sistema de inyección e inyectar rápidamente después de 1 o 2 segundos; dejar pasar unos 5 segundos y extraer lentamente la aguja.

Llevar a cabo el registro hasta que las ceras se hayan eluido completamente.

▼ M21

La línea de base debe satisfacer siempre las condiciones exigidas.

5.4. Identificación de los picos

Identificar los distintos picos sobre la base de los tiempos de retención, comparándolos con mezclas de ceras analizadas en las mismas condiciones y cuyos tiempos de retención sean conocidos.

La figura presenta un cromatograma de las ceras de un aceite de oliva virgen.

5.5. Determinación cuantitativa

Calcular con ayuda del integrador las áreas de los picos correspondientes al patrón interno y a los ésteres alifáticos de C₄₀ a C₄₆.

Determinar el contenido en ceras de cada uno de los ésteres, en mg/kg de materia grasa, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{éster, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

siendo:

A_x = el área del pico de cada éster, en milímetros cuadrados

A_s = el área del pico del patrón interno, en milímetros cuadrados

m_s = la masa del patrón interno que se ha añadido, en miligramos

m = la masa de la muestra tomada para la determinación, en gramos.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

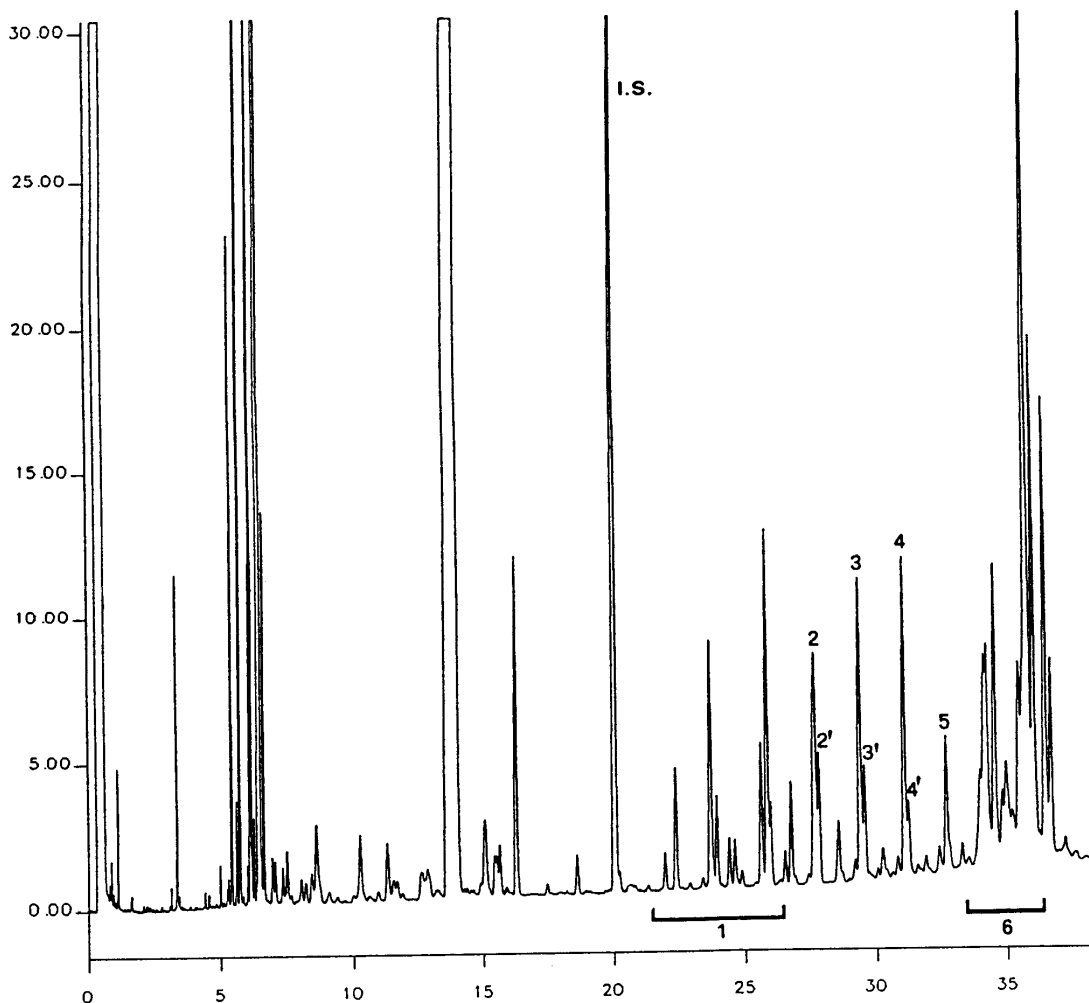
Indicar la suma de los contenidos de las distintas ceras de C₄₀ a C₄₆, en mg/kg de materia grasa (ppm).

Nota: Los componentes que se deben cuantificar hacen referencia a los picos con un número par de carbonos, comprendidos entre los ésteres C₄₀ y C₄₆, según el ejemplo del cromatograma de las ceras del aceite de oliva indicado en la figura siguiente. Si el éster C₄₆ aparece dos veces, para identificarlo conviene analizar la fracción de las ceras de un aceite de orujo de oliva en que el pico C₄₆ sea fácil de identificar por ser claramente mayoritario.

Los resultados deben expresarse con una cifra decimal.

▼ M21

Figura

Cromatograma de las ceras de un aceite de oliva ⁽¹⁾

Leyenda:

- I.S. = araquidato de Laurilo
- 1 = ésteres diterpénicos
- 2 + 2' = ésteres C₄₀
- 3 + 3' = ésteres C₄₂
- 4 + 4' = ésteres C₄₄
- 5 = ésteres C₄₆
- 6 = ésteres de esteroides y alcoholes triterpénicos

⁽¹⁾ Tras la elución de los ésteres de esteroides, el trazado cromatográfico no debe presentar picos significativos (triglicéridos).

▼ M21*Apéndice***Determinación de la velocidad lineal del gas**

Inyectar de 1 a 3 µl de metano (o propano) en el cromatógrafo de gases, después de haberlo ajustado a las condiciones de trabajo normales. Cronometrar el tiempo que tarda el gas en recorrer la columna, desde el momento de su inyección hasta la aparición del pico (t_M).

La velocidad lineal, en cm/s, viene dada por la fórmula L/t_M , siendo L la longitud de la columna expresada en cm y t_M el tiempo cronometrado en segundos.



ANEXO V

DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y DEL CONTENIDO DE ESTEROLES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON COLUMNA CAPILAR

1. OBJETO

El presente método describe un procedimiento para la determinación del contenido de esteroides en las materias grasas, expresado como contenido de cada uno de los esteroides analizados y como contenido total de esteroides.

2. PRINCIPIO

Saponificación de la materia grasa, a la que se habrá añadido α -colestanol como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico; a continuación, extracción del insaponificable con éter etílico.

Separación de la fracción de esteroides del insaponificable extraído mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica; los esteroides recuperados del gel de sílice se transforman en trimetilsililéteres y se analizan mediante cromatografía de gases con columna capilar.

3. MATERIAL

- 3.1. Matraz de 250 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
- 3.2. Embudos de separación de 500 ml.
- 3.3. Matraces de 250 ml.
- 3.4. Equipo completo de cromatografía en capa fina, utilizando placas de vidrio de 20 × 20 cm.
- 3.5. Lámpara ultravioleta de una longitud de onda de 366 o 254 nm.
- 3.6. Microjeringa de 100 μ l y 500 μ l.
- 3.7. Embudo cilíndrico filtrante con filtro poroso G3 (porosidad 15-40 μ m), de 2 cm de diámetro y 5 cm de altura, aproximadamente, con un dispositivo adecuado para la filtración en vacío y una junta esmerilada macho 12/21.
- 3.8. Matraz cónico para vacío de 50 ml, con junta esmerilada hembra 12/21 acoplable al embudo filtrante (3.7).
- 3.9. Probeta de 10 ml de fondo cónico con tapón hermético.
- 3.10. Equipo de cromatografía de gases que pueda funcionar con columna capilar, provisto de un sistema de división de flujo formado por:
 - 3.10.1. Horno para la columna, que pueda mantener la temperatura deseada con precisión de ± 1 °C.
 - 3.10.2. Inyector con elemento vaporizador de vidrio tratado con persilano.
 - 3.10.3. Detector de ionización de llama y convertidor-amplificador.
 - 3.10.4. Registrador-integrador que pueda funcionar con el convertidor-amplificador (3.10.3), con un tiempo de respuesta no superior a 1 segundo y con velocidad de papel variable.
- 3.11. Columna capilar de vidrio o sílice fundida, de 20 a 30 m de longitud y de 0,25 a 0,32 mm de diámetro interno, recubierta interiormente de líquido SE-52, SE-54 o equivalente, con un espesor uniforme que oscile entre 0,10 y 0,30 μ m.
- 3.12. Microjeringa de 10 μ l para cromatografía de gases, con aguja endurecida.

▼B

4. REACTIVOS

- 4.1. Hidróxido potásico, solución etanólica 2N aproximadamente: disolver, enfriando al mismo tiempo, 130 g de hidróxido potásico (valoración mínima del 85 %) en 200 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol. Conservar la solución en botellas de vidrio oscuro bien cerradas.
- 4.2. Éter etílico de calidad para análisis.
- 4.3. Sulfato sódico anhidro de calidad para análisis.
- 4.4. Placas de vidrio recubiertas con gel de sílice, sin indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor (disponibles en el comercio ya preparadas para el uso).
- 4.5. Hidróxido potásico, solución etanólica 0,2N: disolver 13 g de hidróxido potásico en 20 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol.
- 4.6. Benceno para cromatografía.
- 4.7. Acetona para cromatografía. (Véase 5.2.2).
- 4.8. Hexano para cromatografía. (Véase 5.2.2).
- 4.9. Éter etílico para cromatografía. (Véase 5.2.2).
- 4.10. Cloroformo de calidad para análisis.
- 4.11. Solución patrón para cromatografía en capa fina: colesterol o fitosteroles, solución al ► **M6** 2 % ◀ en cloroformo.
- 4.12. Solución de 2,7-diclorofluoresceína al 0,2 % en etanol. Para hacerla ligeramente básica se añaden algunas gotas de solución alcohólica 2N de hidróxido potásico.
- 4.13. Piridina anhidra para cromatografía.
- 4.14. Hexametildisilazano.
- 4.15. Trimetilclorosilano.
- 4.16. Solución problema de trimetilsililéteres de los esteroides: preparar en el momento del uso a partir de esteroides puros o de mezclas de esteroides obtenidos de aceites que los contengan.
- 4.17. α -colestanol, disolución al 0,2 % (m/V) en cloroformo (patrón interno).
- 4.18. Gas portador: hidrógeno o helio de calidad para cromatografía de gases.
- 4.19. Gases auxiliares:
- hidrógeno de calidad para cromatografía de gases,
 - aire de calidad para cromatografía de gases.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Preparación del insaponificable.

- 5.1.1. Con la microjeringa de 500 μ l introducir en el matraz de 250 ml un volumen de disolución de α -colestanol al 0,2 % en cloroformo (4.17) que contenga una cantidad de α -colestanol correspondiente al 10 % aproximadamente del contenido de esteroides en la alícuota de la muestra para la determinación. Por ejemplo, para 5 g de muestra añadir 500 μ l de la solución de α -colestanol al 0,2 %, si se trata de aceite de oliva, y 1 500 μ l, si se trata ► **M6** ◀ de aceite de orujo de oliva.

Evaporar en corriente de nitrógeno hasta sequedad y, a continuación, pesar con precisión, en el mismo matraz, 5 g de muestra seca y filtrada.

▼B

En el caso de aceites ► **M6** ————— ◀ con un alto contenido de colesterol puede producirse un pico cuyo tiempo de retención sea idéntico al del colestanol. En tal caso el análisis de la fracción de esteroides debe realizarse dos veces: con patrón interno y sin él ► **M6** o hay que utilizar betulinol en lugar de colestanol ◀.

5.1.2. Añadir 50 ml de solución etanólica de hidróxido potásico 2N, adaptar el refrigerante de reflujo y calentar en baño María con ligera ebullición, agitando enérgica e ininterrumpidamente hasta que se produzca la saponificación (la solución se vuelve límpida). Calentar durante 20 minutos más y, a continuación, añadir 50 ml de agua destilada por la parte superior del refrigerante; separar el refrigerante y enfriar el matraz a 30 °C aproximadamente.

5.1.3. Transvasar cuantitativamente el contenido del matraz a un embudo de separación de 500 ml, mediante varios lavados con un total aproximado de 50 ml de agua destilada. Agregar 80 ml aproximadamente de éter etílico, agitar enérgicamente durante unos 30 segundos y dejar reposar hasta la separación de las fases (nota 1).

Separar la fase acuosa inferior pasándola a un segundo embudo de separación. Efectuar otras dos extracciones de la fase acuosa por el mismo procedimiento, utilizando cada vez de 60 a 70 ml de éter etílico.

Nota 1: Las posibles emulsiones podrán eliminarse añadiendo pequeñas cantidades de alcohol etílico o metílico con un pulverizador.

5.1.4. Reunir las fracciones etéreas en un mismo embudo de separación y lavarlas con agua destilada (50 ml cada vez) hasta que el agua de lavado presente reacción neutra.

Una vez eliminada el agua de lavado, secar con sulfato sódico anhidro y filtrar sobre sulfato sódico anhidro a un matraz de 250 ml previamente pesado, lavando el embudo y el filtro con pequeñas cantidades de éter etílico.

5.1.5. Destilar el éter hasta que queden unos pocos ml; a continuación, secar con un vacío ligero o en una corriente de nitrógeno, completando el secado en una estufa a 100 °C durante 15 minutos aproximadamente; dejar enfriar en un desecador y pesar.

5.2. Separación de la fracción de esteroides.

5.2.1. Preparación de las placas básicas: sumergir completamente las placas con gel de sílice (4.4) en la solución etanólica 0,2N de hidróxido potásico (4.5) durante 10 segundos; dejar secar las placas en campana durante dos horas y, por último, mantenerlas en una estufa regulada a 100 °C durante una hora. Sacarlas de la estufa y conservarlas en un desecador de cloruro de calcio hasta el momento del uso (las placas sometidas a este tratamiento deberán utilizarse en un plazo de quince días como máximo).

Nota 2: Si se utilizan placas básicas de gel de sílice para la separación de la fracción de esteroides, ya no es necesario tratar el insaponificable con alúmina. De este modo, todos los compuestos de naturaleza ácida (ácidos grasos y otros) quedan retenidos en la línea de aplicación, y la banda de los esteroides aparece perfectamente diferenciada de la banda de los alcoholes alifáticos y triterpénicos.

▼ B

- 5.2.2. Introducir en la cubeta de desarrollo de las placas una mezcla de benceno-acetona 95:5 (v/v) hasta una altura de 1 cm aproximadamente. Puede utilizarse como alternativa una mezcla de hexano y éter etílico 65:35 (v/v). Cerrar la cubeta con su correspondiente tapa y dejar transcurrir media hora como mínimo, de forma que se alcance el equilibrio líquido-vapor. En las caras interiores de la cubeta pueden colocarse tiras de papel de filtro que se sumerjan en el eluyente: de esta manera el tiempo de desarrollo se reduce casi un tercio y se obtiene una elución más uniforme y regular de los componentes.

Nota 3: Para que las condiciones de elución sean perfectamente reproducibles, la mezcla de desarrollo deberá cambiarse en cada prueba.

- 5.2.3. Preparar una solución de insaponificable (5.1.5) en cloroformo al 5 % aproximadamente y, con la microjeringa de 100 µl, depositar 0,3 ml de dicha solución en una placa cromatográfica (5.2.1) a unos 2 cm de uno de los bordes, formando una línea lo más fina y uniforme posible. A la altura de la línea de aplicación se depositan, en un extremo de la placa, de 2 a 3 µl de la solución de referencia de esteroides (4.11) para poder identificar la banda de esteroides una vez efectuado el desarrollo.

- 5.2.4. Introducir la placa en la cubeta de desarrollo, preparada como se indica en el punto 5.2.2. Deberá mantenerse una temperatura ambiente entre 15 y 20 °C. Tapar inmediatamente la cubeta y dejar que se produzca la elución hasta que el frente del disolvente se sitúe a 1 cm aproximadamente del borde superior de la placa. Sacar la placa de la cubeta y evaporar el disolvente en una corriente de aire caliente o dejando la placa bajo una campana unos minutos.

- 5.2.5. Pulverizar la placa ligera y uniformemente con la solución de 2,7-diclorofluoresceína. Al examinar la placa a la luz ultravioleta puede identificarse la banda de los esteroides mediante comparación con la mancha obtenida a partir de la solución de referencia; marcar con lápiz negro los límites de la banda a lo largo de los márgenes de fluorescencia.

- 5.2.6. Rascar con una espátula metálica el gel de sílice contenido en el área delimitada. Introducir el material obtenido, finamente triturado, en el embudo filtrante (3.7); añadir 10 ml de cloroformo caliente, mezclar cuidadosamente con la espátula metálica y filtrar en vacío, recogiendo el filtrado en el matraz cónico (3.8) acoplado al embudo filtrante.

Lavar el residuo en el embudo tres veces con éter etílico (empleando cada vez unos 10 ml), recogiendo cada vez el filtrado en el mismo matraz cónico acoplado al embudo. Evaporar el filtrado hasta obtener un volumen de 4 a 5 ml, transvasar la solución residual al tubo de ensayo de 10 ml (3.9) previamente pesado, evaporar hasta sequedad mediante calentamiento suave en corriente ligera de nitrógeno, recoger con algunas gotas de acetona, evaporar de nuevo hasta sequedad, introducir en una estufa a 105 °C durante unos 10 minutos, dejar enfriar en el desecador y pesar.

El residuo que queda en el tubo de ensayo está formado por la fracción de esteroides.

- 5.3. Preparación de los trimetilsiléteres.

- 5.3.1. Agregar al tubo que contiene la fracción de esteroides el reactivo de silanización formado por una mezcla de piridina-hexametildisilazano-trimetilclorosilano 9:3:1 (v/v/v) (nota 4), a razón de 50 µl por miligramo de esteroides, evitando toda absorción de humedad (nota 5).

Nota 4: Existen soluciones comerciales listas para el uso. Además, también existen otros reactivos de silanización, como el bis-trimetilsililacetamida + 1 % de trimetilclorosilano, que se diluye en el mismo volumen de piridina anhidra.

▼B

- 5.3.2. Tapar el tubo y agitar cuidadosamente (sin invertir) hasta la completa disolución de los esteroides. Dejar reposar un cuarto de hora, como mínimo, a temperatura ambiente y centrifugar durante algunos minutos; la solución límpida queda lista para el análisis mediante cromatografía de gases.

Nota 5: La formación de una ligera opalescencia es normal y no ocasiona ninguna interferencia. La formación de una floculación blanca o la aparición de una coloración rosa son indicios de presencia de humedad o de deterioro del reactivo. En este caso deberá repetirse la prueba.

- 5.4. Cromatografía de gases.

- 5.4.1. Operaciones preliminares: acondicionamiento de la columna.

- 5.4.1.1. Colocar la columna en el cromatógrafo uniendo uno de los extremos de la columna al inyector y el otro al detector.

Efectuar los controles generales del equipo para cromatografía de gases (estanquidad de los circuitos de gases, eficacia del detector, eficacia del sistema de división de flujo y del sistema de registro, etc.).

- 5.4.1.2. Si la columna se utiliza por vez primera, es conveniente acondicionarla previamente. Hacer pasar un ligero flujo de gas a través de la columna, encender el equipo de cromatografía de gases e iniciar un calentamiento gradual hasta alcanzar una temperatura al menos 20 °C superior a la temperatura de trabajo (nota 6). Mantener dicha temperatura durante 2 horas como mínimo; a continuación, poner el equipo completo en condiciones de funcionamiento (regulación del flujo de gases y de la relación de «split», ignición de la llama, conexión con el registrador electrónico, regulación de la temperatura del horno del detector y del inyector, etc.) y registrar la señal con una sensibilidad al menos dos veces superior a la prevista para el análisis. El trazado de la línea de base debe ser lineal, exento de picos de cualquier tipo y no debe presentar deriva.

Una deriva rectilínea negativa indica que las conexiones de la columna no son totalmente estancas; una deriva positiva indica que el acondicionamiento de la columna es insuficiente.

Nota 6: La temperatura de acondicionamiento deberá ser siempre, como mínimo 20 °C inferior a la temperatura máxima prevista para la fase estacionaria utilizada.

- 5.4.2. Elección de las condiciones de trabajo.

- 5.4.2.1. Las condiciones de trabajo exigidas son las siguientes:

- temperatura de la columna: 260 °C ± 5 °C,
- ►C1 temperatura del inyector ◀: 280 °C,
- temperatura del detector: 290 °C,
- velocidad lineal del gas portador: helio 20 a 35 cm/s, hidrógeno 30 a 50 cm/s,
- relación de «split» de 1/50 a 1/100,
- sensibilidad del instrumento: de 4 a 16 veces la atenuación mínima,
- sensibilidad de registro: 1 a 2 mV f.e.
- velocidad del papel: 30 a 60 cm/hora,

▼B

— cantidad de sustancia inyectada: 0,5 a 1 µl de solución de TMSE.

Estas condiciones pueden modificarse en función de las características de la columna y del cromatógrafo, de modo que se obtengan cromatogramas que cumplan los siguientes requisitos:

- el tiempo de retención del β-sitosterol debe ser de 20 ± 5 minutos,
- el pico del campesterol debe ser: para el aceite de oliva (contenido medio del 3 %), 15 ± 5 % del fondo de escala; para el aceite de soja (contenido medio del 20 %), 80 ± 10 % del fondo de escala,
- se deben separar todos los esteroides presentes; es necesario que los picos no sólo se separen sino que se resuelvan completamente, es decir, que el trazo del pico llegue a la línea de base antes de que se inicie el pico siguiente. No obstante, podrá admitirse una resolución incompleta si el pico a TRR 1,02 puede cuantificarse utilizando la perpendicular.

5.4.3. Realización del análisis.

5.4.3.1. Con la microjeringa de 10 µl tomar 1 µl de hexano, aspirar 0,5 µl de aire y, a continuación, entre 0,5 y 1 µl de la solución problema; elevar el émbolo de la jeringa de modo que la aguja quede vacía. Introducir la aguja a través del septum y, después de 1 o 2 segundos, inyectar rápidamente; transcurridos unos 5 segundos, extraer la aguja lentamente.

5.4.3.2. Continuar el registro hasta la completa elución de los TMSE de los esteroides presentes.

La línea de base debe ajustarse en todo momento a las condiciones exigidas (5.4.1.2).

5.4.4. Identificación de los picos.

Para la identificación de los diferentes picos se utilizan los tiempos de retención y la comparación con mezclas de TMSE de los esteroides analizadas en las mismas condiciones.

La elución de los esteroides se efectúa en el orden siguiente: colesterol, brasicasterol, 24-metilcolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, Δ-7-campesterol, Δ-5,23-estigmastadienol, clerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ-5-avenasterol, Δ-5,24-estigmastadienol, Δ-7-estigmastanol, Δ-7-avenasterol.

En el cuadro I figuran los tiempos de retención correspondientes al β-sitosterol para las columnas SE 52 y SE 54.

Las figuras 1 y 2 ilustran los cromatogramas típicos de algunos aceites.

5.4.5. Determinación cuantitativa.

5.4.5.1. Calcular las áreas de los picos del α-colesterol y de los esteroides utilizando el integrador. No se tomarán en cuenta los picos de aquellos componentes que no figuren en el cuadro I. El factor de respuesta para el α-colesterol debe considerarse como 1.

5.4.5.2. Calcular del modo siguiente el contenido de cada uno de los esteroides, expresado en mg/100 g de materia grasa:

$$\text{esterol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m}$$

▼ B

siendo:

A_x : área del pico del esteroil x ► **M6** ————— ◀,

A_s : área del pico del α -coilelanol,

m_s : peso de α -coilelanol añadido, en miligramos,

m : peso de la muestra tomado para la determinación, en gramos.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1. ► **C1** Se expresa ◀ el contenido de cada uno de los esterolés en mg/-100 g de materia grasa y, como «esterolés totales», su suma.

6.2. El porcentaje de cada uno de los esterolés simples es la razón entre el área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de los esterolés.

$$\% \text{ del esterol X} = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

siendo:

A_x : área del pico de x,

$\sum A$: suma de las áreas de todos los picos.



APÉNDICE

Determinación de la velocidad lineal del gas

Inyectar en el cromatógrafo, preparado para trabajar en condiciones normales, de 1 a 3 µl de metano (o propano) y medir el tiempo que tarda el gas en recorrer la columna, desde el momento de la inyección hasta el momento en que aparece el pico (t_M).

La velocidad lineal en cm/s viene dada por L/t_M , siendo L la longitud de la columna en cm y t_M el tiempo, expresado en segundos.

Cuadro I

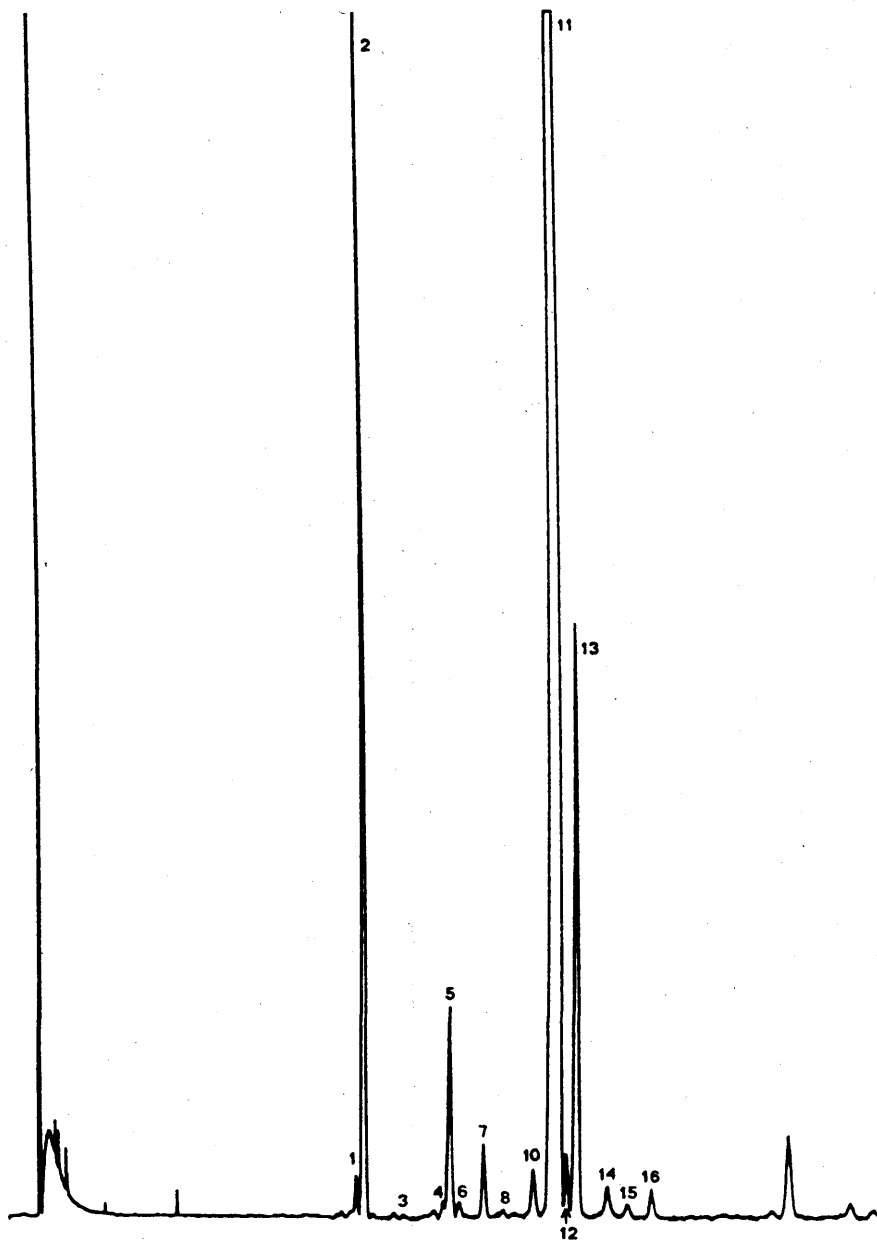
Tiempos de retención relativos de los esteroides

Pico	Identificación		Tiempo de retención	
			Columna SE 54	Columna SE 52
1	colesterol	Δ 5-colesten-3 β -ol	0,67	0,63
2	colestanol	5 α -colestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	brasicasterol	[24S]-24-metil- Δ 5,22-colestadien-3 β -ol	0,73	0,71
4	24-metilencolesterol	24-metil- Δ 5,24-colestadien-3 β -ol	0,82	0,80
5	campesterol	[24R]-24-metil- Δ 5-colesten-3 β -ol	0,83	0,81
6	campestanol	[24R]-24-metil-colestan-3 β -ol	0,85	0,82
7	estigmasterol	[24S]-24-etil- Δ 5,22-colestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ 7-campesterol	[24R]-24-metil- Δ 7-colesten-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ 5,23-estigmastadienol	[24R,S]-24-etil- Δ 5,23-colestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	clerosterol	[24S]-24-etil- Δ 5,25-colestadien-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -sitosterol	[24R]-24-etil- Δ 5-colesten-3 β -ol	1	1
12	sitostanol	24-etil-colestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ 5-avenasterol	[24Z]-24-etiliden- Δ 5-colesten-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ 5,24-estigmastadienol	[24R,S]-24-etil- Δ 5,24-colestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ 7-estigmastenol	[24R,S]-24-etil- Δ 7,24-colesten-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ 7-avenasterol	[24Z]-24-etiliden- Δ 7-3 β -ol	1,16	1,16

▼B

Figura 1

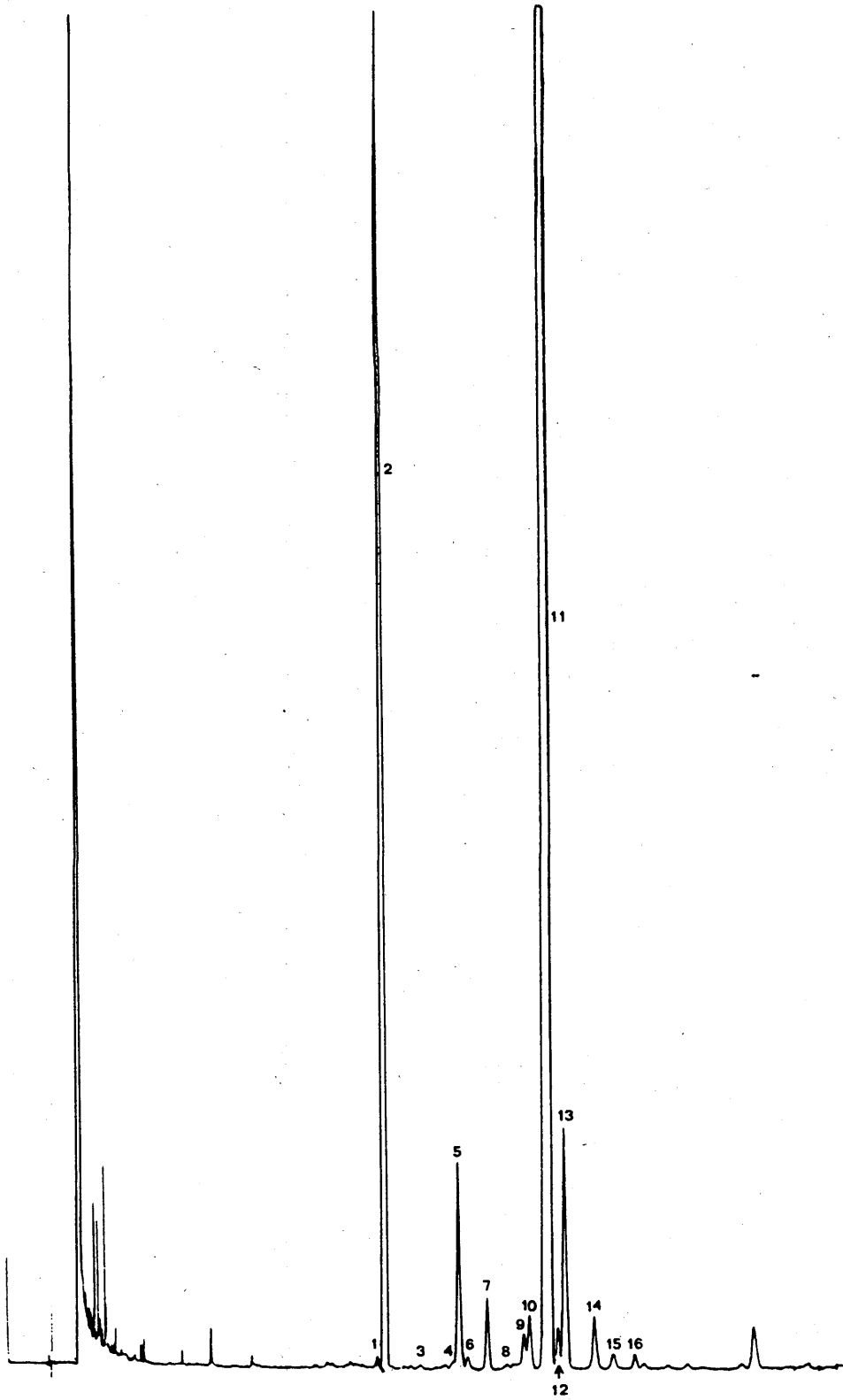
Cromatograma de la fracción de esteroides de un aceite de oliva bruto



▼B

Figura 2

Cromatograma de la fracción de esteroides de un aceite de oliva refinado





ANEXO VI

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ERITRODIOL Y UVAOL

INTRODUCCIÓN

El eritrodiol, entendido corrientemente como conjunto de los dioles eritrodiol y uvaol, es un componente del insaponificable, característico de algunos tipos de materias grasas. Su concentración es mucho más elevada en los aceites de oliva obtenidos mediante extracción que en los obtenidos mediante presión o en el aceite de pepita de uva y, por lo tanto, su determinación puede servir para comprobar la existencia de aceite de oliva obtenido mediante extracción.

1. OBJETO

El presente método describe un procedimiento para determinar el eritrodiol en las materias grasas.

2. PRINCIPIO

La materia grasa se saponifica con una solución etanólica de hidróxido potásico; a continuación se extrae el insaponificable con éter etílico y se purifica pasándolo por una columna de alúmina.

El fraccionamiento del insaponificable se realiza mediante cromatografía en capa fina en placa de gel de sílice y se aíslan la banda de la fracción esterólica y la del eritrodiol.

Los esteroides y el eritrodiol recuperados de la placa se transforman en trimetilsililéteres y seguidamente se analiza la mezcla mediante cromatografía de gases.

El resultado se expresa en porcentaje de eritrodiol respecto del conjunto de eritrodiol + esteroides.

3. MATERIAL Y APARATOS

- 3.1. El mismo material que el indicado para el método del Anexo V (Determinación del contenido de esteroides).

4. REACTIVOS

- 4.1. Los mismos reactivos que los indicados para el método del Anexo V (Determinación del contenido de esteroides).
- 4.2. Solución patrón de eritrodiol al 0,5 % en cloroformo.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. **Preparación del insaponificable**

Se realiza tal como se indica en el apartado 5.1.2 del método del Anexo V

5.2. **Separación del eritrodiol y los esteroides**

5.2.1. Véase el apartado 5.2.1 del método del Anexo V.

5.2.2. Véase el apartado 5.2.2 del método mencionado.

5.2.3. Preparar una solución del insaponificable al 5 % en cloroformo.

Con una microjeringa de 0,1 ml depositar 0,3 ml de esta solución en una placa cromatográfica a aproximadamente 1,5 cm del borde inferior de la placa, formando una banda lo más fina y uniforme posible. Depositar en un extremo de la placa, como referencia, algunos microlitros de las soluciones de colesterol y eritrodiol.

5.2.4. Introducir la placa en la cubeta de desarrollo, preparada como se indica en el apartado 5.2.1. La temperatura ambiente debe ser de unos 20 °C. Tapar inmediatamente la cubeta y dejar que se produzca la elución hasta que el frente del disolvente se sitúe a 1 cm aproximadamente del borde superior de la placa. Sacar ésta de la cubeta de desarrollo y evaporar el disolvente en una corriente de aire caliente.

▼B

5.2.5. Pulverizar la placa uniformemente con la solución alcohólica de 2', 7'-diclorofluoresceína. Al examinar la placa a la luz ultravioleta pueden identificarse las bandas de los esteroides y del eritrodiol mediante comparación con las referencias; delimitar las bandas con una punta ligeramente por el exterior de los márgenes de fluorescencia.

5.2.6. Rascar con una espátula metálica el gel de sílice contenido en las áreas delimitadas. Reunir el material obtenido en un matraz cónico de 50 ml; añadir 15 ml de cloroformo caliente, agitar bien y filtrar en el embudo de filtro poroso vertiendo el gel de sílice sobre el propio filtro. Lavar tres veces con 10 ml de cloroformo caliente cada vez, recogiendo el filtrado en un matraz esférico de 100 ml. Evaporar hasta obtener un volumen de 4 a 5 ml, transvasar al tubo de centrifugado de fondo cónico de 10 ml previamente tarado, evaporar hasta sequedad mediante calentamiento suave en corriente de nitrógeno y pesar.

5.3. **Preparación de los trimetilsililéteres**

Se realiza tal como se indica en el apartado 5.3 del método del Anexo V.

5.4. **Cromatografía de gases**

Se realiza tal como se indica en el apartado 5.4 del método citado. Las condiciones operativas de la cromatografía de gases deben cumplir los requisitos necesarios para analizar los esteroides y, además, permitir la separación de los TMSE del eritrodiol y del uvaol.

Una vez inyectada la muestra, dejar que se desarrolle el proceso hasta que se produzca la elución de los esteroides presentes, el eritrodiol y el uvaol; identificar los picos (el eritrodiol y el uvaol tienen tiempos de retención relativos, respecto al β -sitosterol, de alrededor de 1,45 y 1,55, respectivamente) y calcular sus áreas de la misma forma que para los esteroides.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

$$\text{Eritrodiol, \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{esteroides}}} \times 100$$

siendo:

A_1 : área del pico del eritrodiol,

A_2 : área del pico del uvaol ► **M6** ————— ◀,

$\sum A_{\text{esteroides}}$: suma de las áreas de los esteroides presentes.

Los resultados deben expresarse con una cifra decimal.

▼ **M21***ANEXO VII***DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MONOPALMITATO DE 2-GLICERILO****1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN**

El presente método describe el procedimiento analítico para la determinación del porcentaje de ácido palmítico en posición 2 de los triglicéridos mediante la evaluación del monopalmitato de 2-glicerilo.

Este método es aplicable a los aceites vegetales líquidos a temperatura ambiente (20 °C).

2. PRINCIPIO

Tras la preparación, la muestra de aceite se somete a la acción de la lipasa pancreática: la hidrólisis parcial y específica en las posiciones 1 y 3 de las moléculas de triglicéridos implica la aparición de monoglicéridos en posición 2. Se determina el porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo en la fracción monoglicéridica, previa sililación, mediante cromatografía de gases en columna capilar.

3. EQUIPO Y MATERIAL HABITUAL

- 3.1. Matraz Erlenmeyer de 25 ml.
- 3.2. Vasos de precipitados de 100, 250 y 300 ml.
- 3.3. Columna de vidrio para cromatografía, con un diámetro interior de entre 21 y 23 mm, una longitud de 400 mm, una placa de vidrio fritado y una llave.
- 3.4. Probetas graduadas de 10, 50, 100 y 200 ml.
- 3.5. Matraces redondos de 100 y 250 ml.
- 3.6. Rotavapor.
- 3.7. Tubos de centrifuga de fondo cónico de 10 ml, con tapón esmerilado.
- 3.8. Centrífuga para tubos de 10 y 100 ml.
- 3.9. Termostato capaz de mantener la temperatura a $40\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.
- 3.10. Pipetas graduadas de 1 y 2 ml.
- 3.11. Jeringa hipodérmica de 1 ml.
- 3.12. Microjeringa de 100 μl .
- 3.13. Embudo de 1 000 ml.
- 3.14. Cromatógrafo de gases para columna capilar, provisto de un dispositivo de inyección en columna en frío para la introducción directa de la muestra en la columna y de un recinto capaz de mantener la temperatura seleccionada con una variación máxima de 1 °C.
- 3.15. Inyector en columna en frío para la introducción directa de la muestra en la columna.
- 3.16. Detector de ionización de llama y electrómetro.
- 3.17. Registrador-integrador adaptado al electrómetro con un tiempo de respuesta inferior o igual a un segundo y velocidad variable de despliegue del papel.
- 3.18. Columna capilar de vidrio o sílice fundida, de 8 a 12 m de longitud y de 0,25 a 0,32 mm de diámetro interior, recubierta interiormente de metilpolisiloxano o de fenilmetilpolisiloxano al 5 %, con un espesor de entre 0,10 y 0,30 μm , que pueda utilizarse a 370 °C.

▼ M21

- 3.19. Microjeringa de 10 µl provista de una aguja cementada, de al menos 7,5 cm de longitud, para inyección directa en columna.

4. REACTIVOS

- 4.1. Gel de sílice de una granulometría comprendida entre 0,063 y 0,200 mm (70/280 mallas), preparado de la forma siguiente: se pone el gel de sílice en una cápsula de porcelana, se seca en estufa a 160 °C durante 4 horas y después se deja enfriar a temperatura ambiente en un desecador. Se añade un volumen de agua equivalente al 5 % del peso del gel de sílice, de la manera siguiente: en un matraz Erlenmeyer se pesan 152 g de gel de sílice y se añaden 8 g de agua destilada; se tapa y se agita suavemente para obtener un reparto uniforme del agua. Se deja reposar al menos durante 12 horas antes del empleo.
- 4.2. n-hexano (para cromatografía).
- 4.3. Isopropanol.
- 4.4. Isopropanol, solución acuosa 1/1 (V/V).
- 4.5. Lipasa pancreática. Debe tener una actividad comprendida entre 2,0 y 10 unidades de lipasa por mg. (En el comercio se encuentran lipasas pancreáticas con una actividad comprendida entre 2 y 10 unidades por mg de enzima.).
- 4.6. Solución amortiguadora de tris-hidroxi-metilaminometano: solución acuosa 1 M llevada a pH 8 (control potenciométrico) con HCl concentrado (1/1 V/V).
- 4.7. Colato de sodio, calidad enzimática, solución acuosa al 0,1 % (esta solución debe utilizarse en el plazo de 15 días a partir de su preparación).
- 4.8. Cloruro de calcio, solución acuosa al 22 %.
- 4.9. Éter dietílico para cromatografía.
- 4.10. Disolvente de desarrollo: mezcla n-hexano/éter dietílico (87/13) (V/V).
- 4.11. Hidróxido de sodio, solución al 12 % en peso.
- 4.12. Fenolftaleína, solución al 1 % en etanol.
- 4.13. Gas portador: hidrógeno o helio puro, para cromatografía de gases.
- 4.14. Gases auxiliares: hidrógeno, como mínimo al 99 %, exento de humedad y de sustancias orgánicas, y aire, para cromatografía de gases de la misma pureza.
- 4.15. Reactivo de sililación: mezcla piridina/hexametildisilazano, trimetilclorosilano 9/3/1 (V/V/V). (En el comercio se encuentran soluciones listas para su empleo. Pueden emplearse otros reactivos de sililación, como la bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida + 1 % trimetilclorosilano, diluidos con un volumen idéntico de piridina anhidra.).
- 4.16. Muestras de referencia: monoglicéridos puros o mezclas de monoglicéridos cuya composición porcentual se conoce y es similar a la de la muestra.

5. PROCEDIMIENTO**5.1. Preparación de la muestra**

- 5.1.1. Los aceites con una acidez libre inferior al 3 % no tienen que neutralizarse antes de la cromatografía en columna de gel de sílice. Los aceites con una acidez libre superior al 3 % deberán someterse a la neutralización como se indica en el punto 5.1.1.1.

▼ M21

- 5.1.1.1. En el embudo de 1 000 ml (3.13), poner 50 g de aceite y 200 ml de n-hexano. Añadir 100 ml de isopropanol y una cantidad de la solución de hidróxido de sodio al 12 % (4.11) correspondiente a la acidez libre del aceite más el 5 %. Agitar enérgicamente durante un minuto. Añadir 100 ml de agua destilada, agitar de nuevo y dejar en reposo.

Decantar y después eliminar la capa inferior que contiene los jabones. Eliminar las eventuales capas intermedias (mucílago y sustancias insolubles). Lavar la solución hexánica de aceite neutralizado con porciones sucesivas de 50 o 60 ml de la solución de isopropanol/agua 1/1 (V/V) (4.4) hasta que desaparezca el color rosado de la fenoltaleína.

Eliminar la mayor parte del hexano por destilación en vacío (utilizar por ejemplo un rotavapor) y pasar el aceite a un matraz redondo de 100 ml (3.5). Secar el aceite en vacío hasta la eliminación total del disolvente.

Al final de esta operación, la acidez del aceite debe ser inferior al 0,5 %.

- 5.1.2. Introducir 1,0 g de aceite preparado como se indica más arriba en un Erlenmeyer de 25 ml (3.1) y disolver en 10 ml de mezcla de desarrollo (4.10). Dejar reposar la solución durante al menos 15 minutos antes de efectuar la cromatografía en columna de gel de sílice.

Si la solución está turbia, centrifugarla a fin de garantizar condiciones óptimas de cromatografía. (Pueden utilizarse cartuchos de gel de sílice SPE de 500 mg listos para su empleo.).

- 5.1.3. *Preparación de la columna cromatográfica*

Poner en la columna (3.3) unos 30 ml de disolvente de desarrollo (4.10), introducir un trozo de algodón en la parte inferior de la columna con ayuda de una varilla de vidrio; apretar para eliminar el aire.

En un vaso de precipitados, preparar una suspensión de 25 g de gel de sílice (4.1) en unos 80 ml de disolvente de desarrollo y pasarla a la columna con ayuda de un embudo.

Verificar que todo el gel de sílice se ha introducido en la columna; lavar con el disolvente de desarrollo (4.10), abrir la llave y dejar que el nivel del líquido llegue a unos 2 mm por encima del nivel superior del gel de sílice.

- 5.1.4. *Cromatografía en columna*

En un Erlenmeyer de 25 ml (3.1), pesar exactamente 1,0 g de muestra preparada con arreglo al punto 5.1.

Disolver la muestra en 10 ml de disolvente de desarrollo (4.10). Poner la solución en la columna cromatográfica preparada con arreglo al punto 5.1.3. Evitar remover la superficie de la columna.

Abrir la llave y dejar que salga la solución de la muestra hasta que llegue al nivel del gel de sílice. Desarrollar con 150 ml de disolvente de desarrollo. Ajustar el flujo a 2 ml/min (de forma que pasen a la columna 150 ml en unos 60 o 70 minutos).

Recuperar el eluido en un matraz redondo de 250 ml, tarado previamente. Evaporar el disolvente en vacío y retirar las últimas trazas de este en corriente de nitrógeno.

Pesar el matraz y calcular el extracto recuperado.

▼ M21

[En caso de utilización de cartuchos SPE de sílice listos para el empleo, proceder de la manera siguiente: introducir 1 ml de solución (5.1.2) en los cartuchos previamente preparados con 3 ml de n-hexano.

Después de filtrar la solución, desarrollar con 4 ml de n-hexano/éter dietílico 9/1 (V/V).

Recuperar el eluido en un tubo de 10 ml y someterlo a evaporación en corriente de nitrógeno hasta sequedad.

Someter el residuo seco a la acción de la lipasa pancreática (5.2). Es fundamental verificar la composición en ácidos grasos antes y después del paso por el cartucho SPE.].

5.2. Hidrólisis con lipasa pancreática

5.2.1. En el tubo de la centrífuga, pesar 0,1 g de aceite preparado con arreglo al punto 5.1. Añadir 2 ml de solución amortiguadora (4.6), 0,5 ml de la solución de colato de sodio (4.7) y 0,2 ml de la solución de cloruro de calcio, agitando bien tras cada adición. Cerrar el tubo con el tapón esmerilado y colocarlo en el termostato a $40\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

5.2.2. Añadir 20 mg de lipasa, agitar cuidadosamente (evitando mojar el tapón) y poner el tubo en el termostato durante 2 minutos exactos; retirarlo después, agitarlo enérgicamente durante un 1 minuto exacto y dejar enfriar.

5.2.3. Añadir 1 ml de éter dietílico, taponar y agitar enérgicamente, después centrifugar y pasar la solución de éter a un tubo limpio y seco, con ayuda de una microjeringa.

5.3. Preparación de los derivados sililados y de la cromatografía de gases

5.3.1. Mediante una microjeringa, introducir 100 µl de solución (5.2.3) en un tubo de fondo cónico de 10 ml.

5.3.2. Eliminar el disolvente en corriente ligera de nitrógeno, añadir 200 µl de reactivo de sililación (4.15), taponar el tubo y dejar reposar durante 20 minutos.

5.3.3. Tras 20 minutos, añadir entre 1 y 5 ml de n-hexano (en función de las condiciones cromatográficas): la solución resultante está lista para la cromatografía de gases.

5.4. Cromatografía de gases

Las condiciones de trabajo son las siguientes:

— temperatura del inyector (inyector en columna) inferior a la temperatura de ebullición del disolvente (68 °C),

— temperatura del detector: 350 °C ,

— temperatura de la columna: programación de la temperatura del horno: 60 °C durante 1 minuto, subir 15 °C por minuto hasta 180 °C , después 5 °C por minuto hasta 340 °C , y después 340 °C durante 13 minutos,

— gas portador: hidrógeno o helio, regulado a la velocidad lineal adecuada para obtener la resolución reflejada en la figura 1. El tiempo de retención del triglicérido C_{54} debe ser de 40 ± 5 minutos (véase la figura 2). (Las condiciones de trabajo que se recogen aquí se proponen a título indicativo. Cada operador deberá optimizarlas para alcanzar la resolución deseada. La altura del pico correspondiente al monopalmitato de 2-glicerilo debe tener una altura mínima igual al 10 % de la escala del registrador.),

▼ M21

— cantidad de sustancia inyectada: 0,5-1 µl de la solución (5 ml) de n-hexano (5.3.3).

5.4.1. Identificación de los picos

Los distintos monoglicéridos se identifican en función de sus tiempos de retención obtenidos, comparándolos con los correspondientes a las mezclas patrón de monoglicéridos analizadas en las mismas condiciones.

5.4.2. Determinación cuantitativa

El área de cada pico se calcula mediante un integrador electrónico.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El porcentaje de monopalmitato de glicerilo se calcula a partir de la relación entre el área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de todos los monoglicéridos (véase la figura 2), según la fórmula siguiente:

$$\text{Monopalmitato de glicerilo (\%)}: \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

siendo:

A_x = el área del pico correspondiente al monopalmitato de glicerilo

$\sum A$ = la suma de las áreas de todos los picos de los monoglicéridos.

El resultado debe expresarse con una cifra decimal.

7. INFORME DEL ANÁLISIS

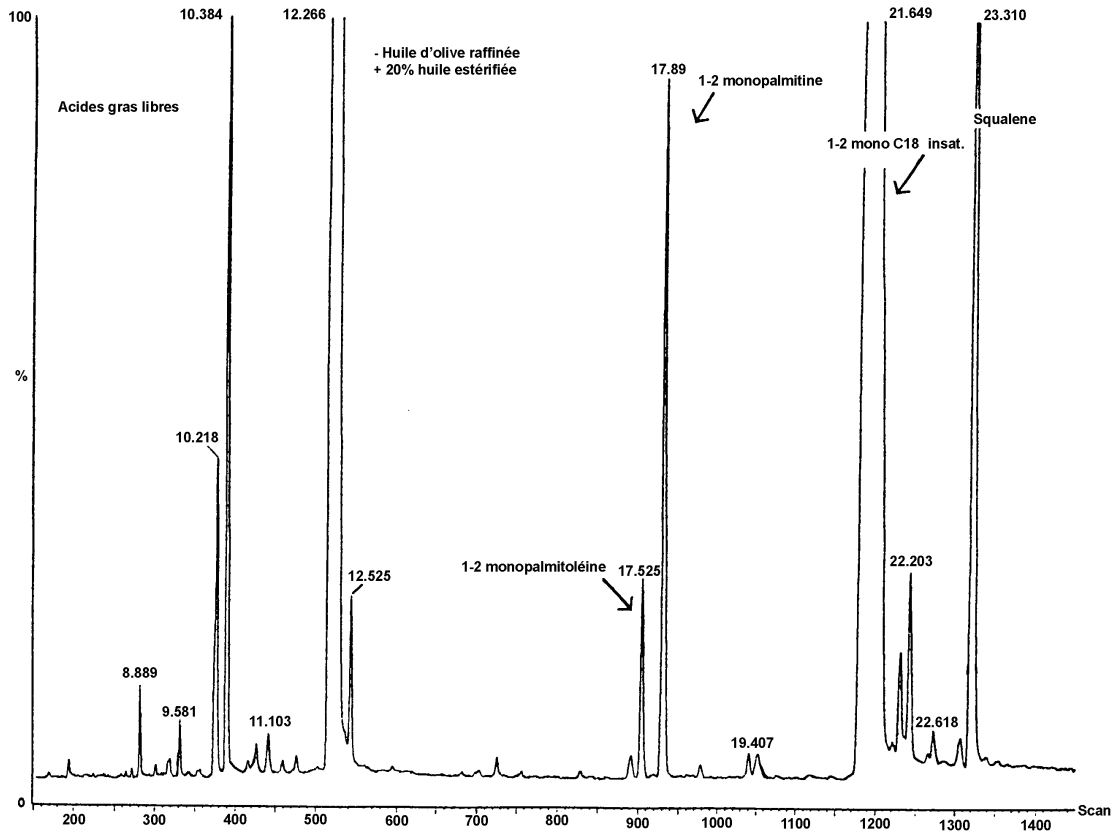
El informe del análisis deberá especificar:

- la referencia al presente método,
- toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra,
- el resultado del análisis,
- las eventuales desviaciones respecto al presente método, tanto si se trata de una decisión de los interesados como si se debe a cualquier otra razón,
- los datos de identidad del laboratorio, la fecha del análisis y la firma de los responsables del mismo.

▼M21

Figura 1

Cromatograma de los productos de la reacción de sililación obtenidos por acción de la lipasa en un aceite de oliva refinado con la adición de un 20 % de aceite esterificado (100 %)



Leyenda: «acides gras libres» = Ácidos grasos libres; «Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée» = Aceite de oliva refinado + 20 % aceite de oliva esterificado; «1-2 monopalmitoléine» = 1-2 monopalmitina; «1-2 mono C₁₈ insat.» = 1,2-mono C₁₈ insat.; «Squalene» = Escualeno; «1-2 monopalmitoléine» = 1,2-monopalmitoléina; «Scan» = Lectura.

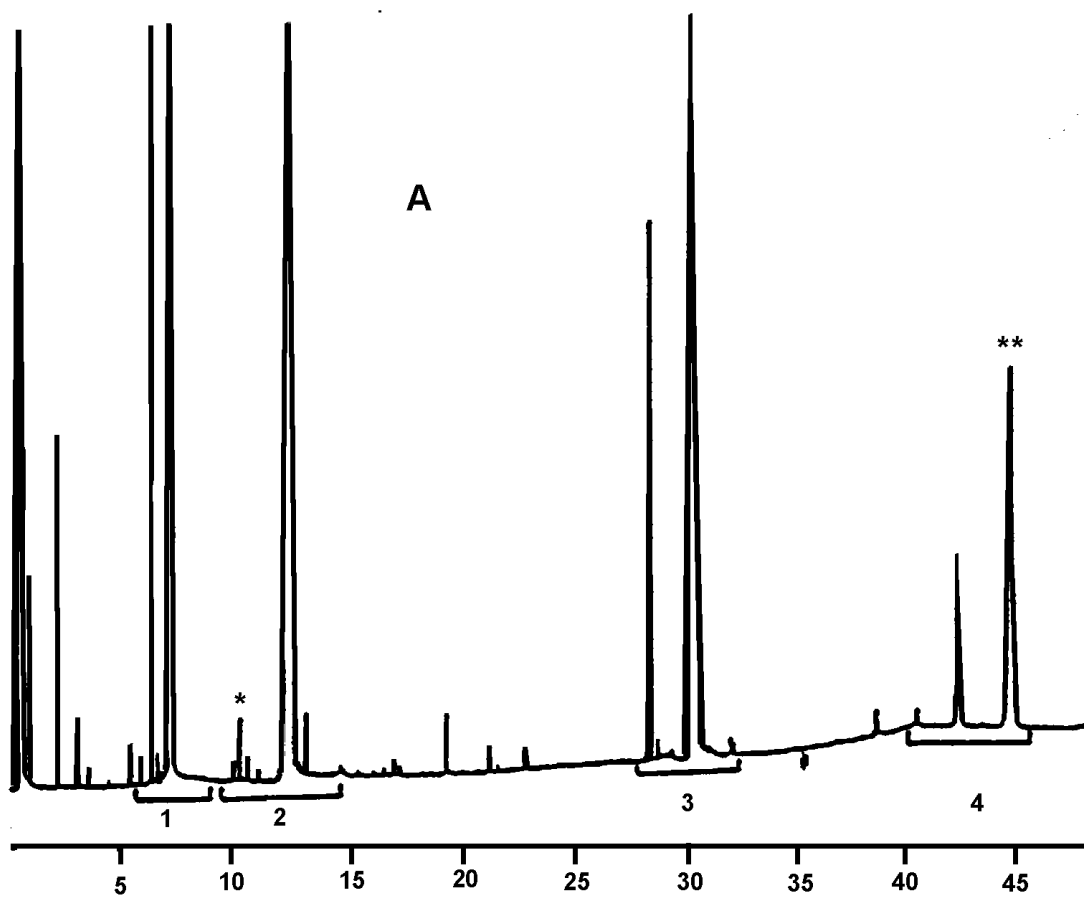
▼ M21

Figura 2

Cromatograma de:

A) aceite de oliva no esterificado, previo tratamiento con lipasa y sililación; en estas condiciones (columna capilar de 8 a 12 m), la fracción de ceras se eluye al mismo tiempo que la fracción de diglicéridos o poco después.

Tras el tratamiento con lipasa, el contenido en triglicéridos no debería superar el 15 %



Leyenda:

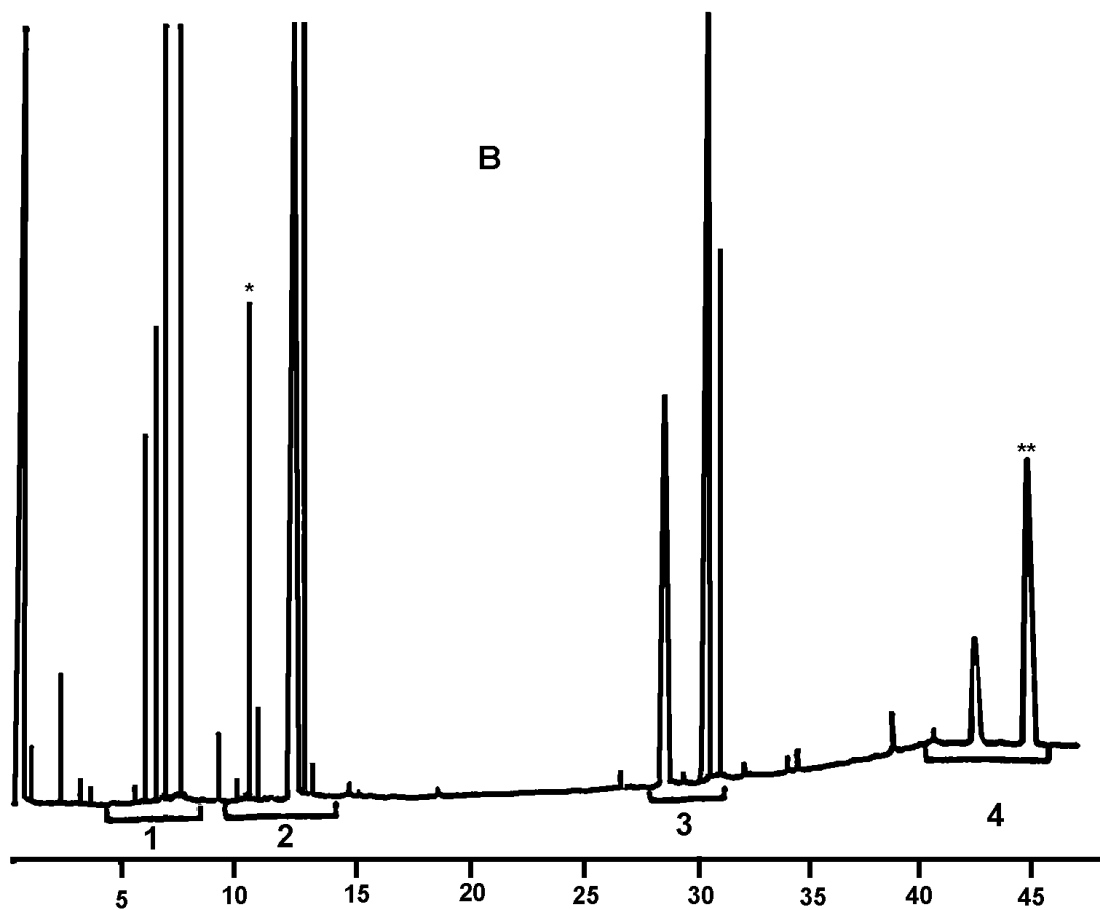
- 1 = Ácidos grasos libres
- 2 = Monoglicéridos
- 3 = Diglicéridos
- 4 = Triglicéridos
- * = 2-monopalmitina
- ** = Triglicérido C₅₄

▼ M21

Cromatograma de:

B) aceite esterificado previo tratamiento con lipasa y siliación; en estas condiciones (columna capilar de 8 a 12 m), la fracción de ceras se eluye al mismo tiempo que la fracción de diglicéridos o poco después.

Tras el tratamiento con lipasa, el contenido en triglicéridos no debería superar el 15 %.



Legenda:

- 1 = Ácidos grasos libres
- 2 = Monoglicéridos
- 3 = Diglicéridos
- 4 = Triglicéridos
- * = 2-monopalmitina
- ** = Triglicérido C₅₄

▼ **M21**

8. NOTAS

Nota 1. PREPARACIÓN DE LA LIPASA

En el comercio se encuentran lipasas con una actividad satisfactoria. También es posible prepararlas en el laboratorio de la forma siguiente:

Enfriar a 0 °C 5 kg de páncreas fresco de cerdo. Retirar la grasa sólida y el tejido conjuntivo que lo rodea y tritularlo en un molino de cuchillas hasta obtener una pasta fluida. Agitar dicha pasta durante 4-6 horas con 2,5 l de acetona anhidra y después centrifugar. Extraer el residuo tres veces más con el mismo volumen de acetona anhidra, después dos veces con una mezcla de acetona/éter dietílico 1/1 (V/V), y otras dos veces con éter dietílico.

Secar el residuo durante 48 horas en vacío para obtener un polvo estable que deberá conservarse en el refrigerador y al abrigo de la humedad.

Nota 2. CONTROL DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA

Preparar una emulsión de aceite de oliva de la forma siguiente:

Agitar en un mezclador durante 10 minutos una mezcla constituida por 165 ml de una solución de goma arábiga de 100 g/l, 15 gramos de hielo picado y 20 ml de un aceite de oliva previamente neutralizado.

Poner en un vaso de precipitados de 50 ml sucesivamente 10 ml de la emulsión anterior, 0,3 ml de una solución de colato de sodio de 0,2 g/ml y 20 ml de agua destilada.

Colocar el vaso en un termostato regulado a 37 °C; introducir en el vaso los electrodos del pH-metro y el agitador de hélice.

Por medio de una bureta, añadir gota a gota una solución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta la obtención de un pH de 8,3.

Añadir un volumen de suspensión de polvo de lipasa en agua (0,1 g/ml de lipasa). Desde el momento en que el pH-metro indique un pH de 8,3, poner en marcha el cronómetro y añadir la solución de hidróxido de sodio gota a gota, al ritmo necesario para mantener el pH en el valor de 8,3. Anotar cada minuto el volumen de solución consumido.

Llevar los datos obtenidos a un sistema de coordenadas, poniendo en abscisas los tiempos y en ordenadas los mililitros de solución alcalina 0,1 N consumidos para mantener el pH constante. Debe obtenerse un gráfico lineal.

La actividad de la lipasa, medida en unidades de lipasa por mg, viene dada por la fórmula siguiente:

$$A = \frac{V \times N \times 100}{m}$$

siendo:

A la actividad en unidades de lipasa/mg

V el número de mililitros de solución de hidróxido de sodio 0,1 N por minuto (calculado a partir del gráfico)

N la normalidad de la solución de hidróxido de sodio

m la masa en miligramos de la lipasa correspondiente.

La unidad de lipasa se define como la cantidad de enzima que libera 10 micro-equivalentes de ácido por minuto.

▼ **M20**

▼ B*ANEXO IX***PRUEBA ESPECTROFOTOMÉTRICA EN EL ULTRAVIOLETA**

INTRODUCCIÓN

La prueba espectrofotométrica en el ultravioleta puede proporcionar indicaciones sobre la calidad de una materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos.

Las absorciones en las longitudes de onda indicadas en el método se deben a la presencia de sistemas diénicos y triénicos ► **C1** conjugados ◀. Los valores de estas absorciones se expresan en extinción específica $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (extinción de una solución de la materia grasa al 1 % en el disolvente determinado, en un espesor de 1 cm) que se expresará convencionalmente como K, también denominado coeficiente de extinción.

1. OBJETO

El método describe el procedimiento de ejecución de la prueba espectrofotométrica en el ultravioleta de las materias grasas.

2. PRINCIPIO

La materia grasa se disuelve en el disolvente requerido y se determina la extinción de la solución a las longitudes de onda prescritas, respecto al disolvente puro. A partir de los valores espectrofotométricos se calculan las extinciones específicas.

3. MATERIAL Y APARATOS

- 3.1. Espectrofotómetro para medidas de extinción en el ultravioleta entre 220 y 360 nm, con posibilidad de lectura para cada unidad nanométrica.
- 3.2. Cubetas de cuarzo, con tapadera, con paso óptico de 1 cm. Las cubetas, llenas de agua o de otro disolvente adecuado, no deben presentar entre ellas diferencias superiores a 0,01 unidades de extinción.
- 3.3. Matraces aforados de 25 ml.

▼ M6

- 3.4. Columna de cromatografía de 270 mm de longitud y 35 mm de diámetro en la parte superior; de 270 mm de longitud y 10 mm de diámetro en la parte inferior.

▼ B

4. REACTIVOS

- 4.1. Isooctano (2,2,4-trimetilpentano) de calidad para espectrofotometría: debe tener, respecto al agua destilada, una transmitancia del 60 % como mínimo a 220 nm y del 95 % como mínimo a 250 nm; o
 - ciclohexano de calidad para espectrofotometría: debe tener, respecto al agua destilada, una transmitancia del 40 % como mínimo a 220 nm y del 95 % como mínimo a 250 nm.

▼ M6

▼ B

- 4.2. Alúmina básica para cromatografía en columna, preparada y controlada como se describe en el apéndice I.
- 4.3. n-Hexano para cromatografía.

▼ B

5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. La muestra debe ser perfectamente homogénea y estar exenta de impurezas en suspensión. Los aceites líquidos a temperatura ambiente se filtran con papel de filtro a una temperatura aproximada de 30 °C, las grasas sólidas se homogeneizan y se filtran a una temperatura superior en 10 °C como máximo a su temperatura de fusión.
- 5.2. Se pesan con precisión 0,25 g aproximadamente de la muestra preparada y se colocan en un matraz aforado de 25 ml, se completa con el disolvente adecuado y se homogeneiza. La solución resultante debe estar perfectamente clara. Si presenta opalescencia o turbidez, se filtrará rápidamente con papel de filtro.
- 5.3. Se llena una cubeta con la solución obtenida y se miden las extinciones, usando como referencia el disolvente empleado, a las longitudes de onda comprendidas entre 232 y 276 nm. Los valores de extinción obtenidos deben estar comprendidos en el intervalo entre 0,1 y 0,8; en caso contrario es necesario repetir la medida utilizando soluciones más concentradas o más diluidas según el caso.
- 5.4. Cuando se quiera determinar la extinción específica después del tratamiento con alúmina se procederá del siguiente modo: en la columna para cromatografía se introducen 30 g de alúmina básica en suspensión en hexano; después de asentarse el absorbente se elimina el exceso de hexano, hasta 1 cm aproximadamente sobre el nivel superior de la alúmina.

Se disuelven 10 g de materia grasa, homogeneizada y filtrada tal como se describe en el punto 5.1, en 100 ml de hexano y se vierte esta solución en la columna. Se recoge el líquido eluido y se evapora totalmente el disolvente en vacío a una temperatura inferior a 25 °C.

Con la materia grasa así obtenida se procede inmediatamente tal como se indica en el punto 5.2.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- 6.1. Se expresan las extinciones específicas o coeficientes de extinción a las diversas longitudes de onda, calculadas como sigue:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot e}$$

siendo:

K_{λ} = extinción específica a la longitud de onda λ ,

E_{λ} = extinción medida a la longitud de onda λ ,

c = concentración de la disolución en g por 100 ml,

▼ B

e = espesor de la cubeta en cm.

Los resultados deben expresarse con dos cifras decimales.

- 6.2. La prueba espectrofotométrica del aceite de oliva según el método oficial de los Reglamentos de la CEE requiere la determinación de la extinción específica, en solución en isooctano, a las longitudes de onda de 232 y 270 nm, y la determinación de ΔE definido como:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

donde K_m es la extinción específica a la longitud de onda m, longitud de onda de máxima absorción alrededor de 270 nm.

▼B*APÉNDICE I**Preparación de la alúmina y control de su actividad*

A.1.1. Preparación de la alúmina

En un recipiente que pueda cerrarse herméticamente se echa la alúmina previamente desecada en horno a 380-400 °C durante tres horas, se añade agua destilada en una proporción de 5 ml por 100 g de alúmina, se cierra rápidamente el recipiente, se agita repetidas veces y se deja reposar durante 12 horas como mínimo antes del uso.

A.1.2. Control de la actividad de la alúmina

Se prepara una columna para cromatografía con 30 g de alúmina. Se opera tal como se describe en el apartado 5.4. Se hace pasar a través de la columna una mezcla formada por:

- 95 % de aceite de oliva virgen, con extinción específica a 268 nm menor que 0,18,
- 5 % de aceite de cacahuete tratado con tierras decolorantes en el proceso de refinado, con una extinción específica a 268 nm mayor o igual que 4.

Si, después del paso por la columna, la mezcla presenta una extinción específica a 268 nm mayor que 0,11, la alúmina es aceptable; en otro caso se debe aumentar el porcentaje de hidratación.

▼B*APÉNDICE II**Ajuste del espectrofotómetro*

- A.2. El aparato debe revisarse periódicamente (por lo menos cada seis meses) tanto en lo que se refiere a la conformidad de la longitud de onda como a la exactitud de la respuesta.
- A.2.1. El control de la respuesta de la longitud de onda puede hacerse mediante una lámpara de vapor de mercurio o mediante filtros adecuados.
- A.2.2. Para controlar la célula fotoeléctrica y el fotomultiplicador se procede como sigue: se pesan 0,2 g de cromato potásico de calidad para espectrofotometría, se disuelven, en un matraz aforado de 1 000 ml, en una solución de hidróxido potásico 0,05 N y se completa hasta el enrase. De la solución obtenida se toman exactamente 25 ml, se transvasan a un matraz aforado de 500 ml y se completa hasta el enrase con la misma solución de hidróxido potásico.

Se mide la extinción a 275 nm de la solución así obtenida, utilizando la solución de hidróxido potásico como referencia. La extinción medida en cubeta de 1 cm deberá ser de $0,200 \pm 0,005$.

▼B

ANEXO X «A»

**ANÁLISIS DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES**

1. OBJETO

El presente ►C1 método ◀ proporciona orientaciones generales para determinar, mediante cromatografía de gases con columna de relleno o capilar, la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos con arreglo al Anexo X B.

El método no es aplicable a los ácidos grasos polimerizados.

2. REACTIVOS

2.1. Gas portador

Gas inerte (nitrógeno, helio, argón, hidrógeno, etc.), perfectamente desecado y que contenga menos de 10 mg/kg de oxígeno.

Nota 1: El hidrógeno, que sólo se emplea como gas portador en las columnas capilares, puede duplicar la velocidad del análisis, pero es peligroso. Existen dispositivos de seguridad.

2.2. Gases auxiliares

2.2.1. Hidrógeno (pureza $\geq 99,9\%$) exento de impurezas orgánicas.

2.2.2. Aire u oxígeno, exento de impurezas orgánicas.

2.3. Patrón de referencia

Una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos puros, o los ésteres metílicos de una grasa de composición conocida y, preferentemente, similar a la de la materia grasa objeto de análisis.

Deberá evitarse la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados.

3. APARATOS

Las normas que figuran a continuación se refieren al equipo ordinario para cromatografía de gases, utilizando columnas de relleno y/o capilares y un detector de ionización de llama. Podrá utilizarse cualquier aparato cuya eficacia y resolución se ajusten a lo dispuesto en el punto 4.1.2.

3.1. Cromatógrafo de gases

El cromatógrafo de gases constará de los siguientes elementos:

3.1.1. Sistema de inyección

Utilizar un sistema de inyección:

a) con columnas de relleno, con un espacio muerto lo más pequeño posible (en este caso, el sistema de inyección podrá calentarse a una temperatura que sea entre 20 y 50 °C superior a la de la columna); o

b) con columnas capilares; en este caso, el sistema de inyección estará especialmente diseñado para poder operar con esa clase de columnas; podrá utilizarse un inyector con división de flujo o un inyector «on column».

▼B

Nota 2: En ausencia de ácidos grasos con menos de 16 átomos de carbono, podrá utilizarse un inyector de aguja móvil.

3.1.2. Horno

El horno podrá calentar la columna a 260 °C como mínimo y mantener dicha temperatura con una oscilación máxima de 1 °C, si se emplea una columna de relleno, y de 0,1 °C, si se emplea una columna capilar. Este último requisito es especialmente importante si se utiliza una columna de sílice fundida.

Se recomienda emplear en todos los casos un sistema de calentamiento programado, sobre todo en el caso de ácidos grasos con menos de 16 átomos de carbono.

3.1.3. Columna de relleno

3.1.3.1. Columna de un material inerte a las sustancias que vayan a analizarse (es decir, vidrio o acero inoxidable) y de las dimensiones siguientes:

a) Longitud: de 1 a 3 m. Con ácidos grasos de cadena larga (más de C₂₀) es conveniente utilizar una columna relativamente corta. Para el análisis de ácidos con 4 o 6 átomos de carbono se recomienda una columna de 2 m.

b) Diámetro interior: de 2 a 4 mm.

Nota 3: Si hay componentes poliinsaturados con más de tres enlaces dobles, pueden descomponerse en una columna de acero inoxidable.

Nota 4: Puede utilizarse un sistema con doble columna de relleno.

3.1.3.2. Relleno, que incluya los siguientes elementos:

a) *Soporte:* tierra de diatomeas lavada con ácido y silanizada, u otro soporte inerte adecuado, con un margen estrecho de tamaño de grano (margen de 25 µm, entre 125 y 200 µm); el tamaño medio de grano estará en función del diámetro interior y de la longitud de la columna.

b) *Fase estacionaria:* líquido polar de tipo poliéster (por ejemplo: polisuccinato de dietilenglicol, polisuccinato de butanodiol, poliadipato de etilenglicol, etc.), cianosiliconas o cualquier otro líquido que permita efectuar la separación cromatográfica exigida (véase el punto 4). La fase estacionaria deberá constituir del 5 % (m/m) al 20 % (m/m) del relleno. Para algunas separaciones podrá utilizarse una fase fija no polar.

3.1.3.3. Acondicionamiento de la columna

Estando la columna desconectada del detector, si es posible, calentar el horno gradualmente hasta 185 °C y hacer pasar a través de la columna recién preparada una corriente de gas inerte a razón de 20-60 ml/min durante 16 horas como mínimo a la temperatura citada y, a continuación, a la temperatura de 195 °C durante 2 horas más.

3.1.4. Columna capilar

3.1.4.1. Tubo de un material inerte a las sustancias que vayan a analizarse (generalmente, vidrio o sílice fundida). El diámetro interior estará comprendido entre 0,2 y 0,8 mm. La superficie interior se someterá a un tratamiento adecuado (por ejemplo, preparación de la superficie, inactivación) antes de introducir el recubrimiento de fase fija. En la mayoría de casos, es suficiente una longitud de ►C1 25 m ◀.

▼ B

- 3.1.4.2. Fase estacionaria de tipo poliglicol [poli(etilenglicol) 20 000], poliéster (polisuccinato de butanodiol) o polisiloxano polar (cianosiliconas), generalmente. Son apropiadas las columnas de fase químicamente ligada.

Nota 5: Existe el riesgo de que los polisiloxanos polares dificulten la identificación y separación del ácido linolénico y de los ácidos C₂₀.

El espesor de la fase estará comprendido entre 0,1 y 0,2 µm.

- 3.1.4.3. Montaje y acondicionamiento de la columna.

Observar las precauciones normales de montaje de columnas capilares (es decir, instalación de la columna en el horno, elección y montaje de las juntas (estanqueidad), conexión de los extremos de la columna al inyector y al detector (reducción de los espacios muertos). Colocar la columna bajo un flujo de gas portador [por ejemplo, 0,3 bar (30 kPa) para una columna de ► **C1** 25 m ◀ de longitud y 0,3 mm de diámetro interior].

Acondicionar la columna programando el gradiente de temperatura del horno a 3 °C/min a partir de la temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura 10 °C inferior al límite de descomposición de la fase estacionaria. Mantener el horno a esa temperatura durante 1 hora hasta que se establezca la línea de base. Restablecer la temperatura de 180 °C para trabajar en condiciones isotérmicas.

Nota 6: En el comercio pueden obtenerse columnas adecuadas previamente acondicionadas.

- 3.1.5. Detector que puede calentarse a una temperatura superior a la de la columna.

3.2. **Jeringa**

Tendrá una capacidad máxima de 10 µl y estará graduada en 0,1 µl.

3.3. **Registrador**

Si se emplea la curva del registrador para calcular la composición de la mezcla analizada, se necesita un registrador electrónico de alta precisión compatible con los aparatos utilizados. El registrador deberá tener las siguientes características:

- a) tiempo de repuesta inferior a 1,5 s y, preferiblemente, inferior a 1 s (el tiempo de repuesta es el tiempo que tarda la pluma registradora en pasar de 0 a 90 % después de la introducción instantánea de una señal del 100 %);
- b) ancho del papel: 20 cm como mínimo;
- c) velocidad del papel: ajustable a valores comprendidos entre 0,4 cm/min y 2,5 cm/min.

3.4. **Integrador**

La utilización de un integrador electrónico permite efectuar cálculos rápidos y precisos. Debe proporcionar una respuesta lineal de sensibilidad adecuada y la corrección de la desviación de la línea de base debe ser satisfactoria.

▼ B**4. PROCEDIMIENTO**

Las operaciones descritas en los puntos 4.1 a 4.3 sólo son válidas si se emplea un detector de ionización de llama.

Como alternativa puede emplearse un cromatógrafo de gases con catarómetro (cuyo funcionamiento se basa en el principio de los cambios de conductividad térmica). En ese caso, las condiciones de ensayo deberán modificarse como se indica en el punto 6.

4.1. Condiciones de ensayo**4.1.1. Determinación de las condiciones operativas óptimas****4.1.1.1. Columna de relleno**

Al establecer las condiciones de ensayo deberán tenerse en cuenta las variables siguientes:

- a) longitud y diámetro de la columna;
- b) composición y cantidad de la fase estacionaria;
- c) temperatura de la columna;
- d) flujo del gas portador;
- e) resolución exigida;
- f) tamaño de la muestra problema, determinado de modo que el conjunto del detector y el electrómetro dé una respuesta lineal;
- g) duración del análisis.

Como norma general, las cifras de las tablas 1 y 2 permitirán obtener los resultados deseados, es decir, al menos 2 000 platos teóricos por metro de longitud de columna en el caso del estearato de metilo, y su elución en 15 minutos aproximadamente.

Cuando el aparato lo permita, la temperatura del inyector deberá ser de 200 °C aproximadamente y la del detector deberá ser igual o superior a la de la columna.

Por lo general, la razón entre la velocidad de flujo del hidrógeno suministrado al detector de ionización de llama y la del gas portador oscila entre 1:2 y 1:1, en función del diámetro de la columna. El flujo del oxígeno es de 5 a 10 veces superior al del hidrógeno.

Tabla 1

Diámetro interior de la columna mm	Flujo del gas portador ml/min
2	15 a 25
3	20 a 40
4	40 a 60

Tabla 2

Concentración de la fase fija % (m/m)	Temperatura de la columna °C
5	175
10	180
15	185
20	185

▼ B

4.1.1.2. Columna capilar

Las propiedades de eficacia y permeabilidad de las columnas capilares implican que la separación de los constituyentes y la duración del análisis dependen considerablemente del flujo del gas portador en la columna. Por lo tanto, para optimizar las condiciones operativas será necesario manipular este parámetro (o, lo que es más sencillo, la presión en cabeza de columna) según se desee mejorar las separaciones o efectuar un análisis rápido.

4.1.2. Determinación del número de platos teóricos (eficacia) y de la resolución

(Véase la figura 1)

Efectuar el análisis de una mezcla de estearato de metilo y de oleato de metilo (por ejemplo, ésteres metílicos de manteca de cacao) en proporciones aproximadamente equivalentes.

Escoger la temperatura de la columna y el flujo del gas portador de manera que el máximo del pico del estearato de metilo se registre aproximadamente 15 minutos después del pico del disolvente. Utilizar una cantidad suficiente de la mezcla de ésteres metílicos, de manera que el pico del estearato de metilo se eleve a tres cuartos aproximadamente de la escala completa.

Calcular el número «n» de platos teóricos (eficacia) mediante la siguiente fórmula:

$$n = 16 \left[\frac{dr_1}{a_1} \right]^2$$

y la resolución «R» mediante la siguiente fórmula:

$$R = \frac{2\Delta}{a_1 + a_2}$$

siendo:

dr_1 = distancia en mm, desde el inicio del cromatograma hasta el máximo del pico del estearato de metilo,

a_1 y a_2 = anchura, en mm, de los picos del estearato de metilo y del oleato de metilo, respectivamente, medida entre los puntos de intersección de las tangentes en los puntos de inflexión de la curva con la línea de base,

Δ = distancia, en mm, entre los dos máximos de los picos del estearato de metilo y del oleato de metilo,

▼ M2

y el índice de resolución « r » mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{a}{b}$$

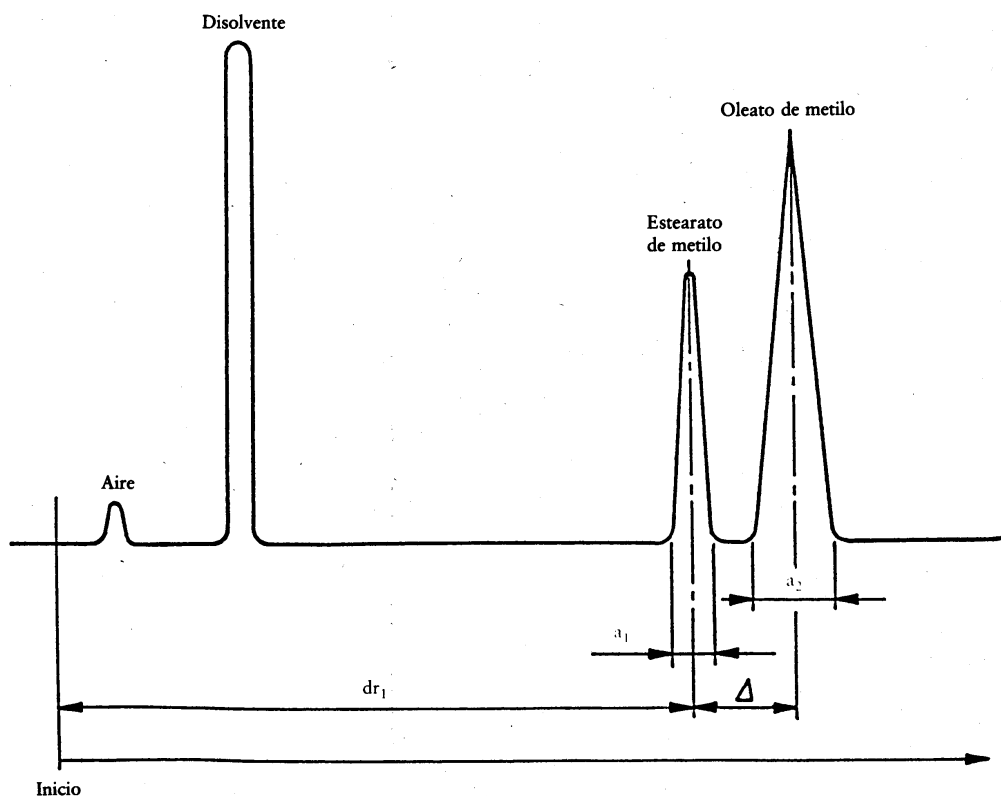
siendo:

a = altura del pico más pequeño, medida a partir de la línea de base;

b = altura del punto más bajo del valle comprendido entre los dos picos adyacentes, medida a partir de la línea de base.

▼ B**Figura 1**

Cromatograma para determinar el número de platos teóricos (eficacia) y la resolución



Se establecerán unas condiciones de análisis que permitan obtener al menos 2 000 platos teóricos por metro de longitud de columna para el estearato de metilo y una resolución de 1,25 como mínimo.

4.2. Muestra problema

Tomar con la jeringa (3.2) de 0,1 μ l a 2 μ l de la solución de ésteres metílicos preparados con arreglo al Anexo X B e inyectarlos en la columna.

En el caso de ésteres no disueltos, preparar una solución de 100 mg/ml aproximadamente en heptano de calidad para cromatografía e inyectar de 0,1 μ l a 1 μ l de esta solución.

Si sólo se desean detectar los componentes presentes en cantidades muy pequeñas, se podrá aumentar el tamaño de la muestra (hasta 10 veces).

4.3. Análisis

Como norma general, las condiciones de ensayo son las que se especifican en el punto 4.1.1.

No obstante, cuando se determinan ácidos con menos de 12 átomos de carbono es posible operar a menor temperatura de columna, mientras que cuando se determinan ácidos grasos con más de 20 átomos de carbono es posible operar a una temperatura mayor. A veces se puede utilizar en los dos casos anteriores un sistema de programación de temperatura. Por ejemplo, si la muestra contiene ésteres metílicos de ácidos grasos con menos de 12 átomos de carbono, inyectar la muestra a 100 °C (o a 50 — 60 °C si hay ácido butírico) y elevar inmediatamente la temperatura a razón de 4 — 8 °C/min hasta alcanzar el nivel deseado. En algunos casos es posible combinar ambos procedimientos.

▼B

Tras el calentamiento programado, se continúa la elución a temperatura constante hasta que todos los componentes se hayan eluido. Si el instrumento no puede efectuar un calentamiento programado, se opera a dos temperaturas fijas comprendidas entre 100 y 195 °C.

Si es necesario, se recomienda que se efectúe un análisis con dos fases fijas de diferente polaridad para comprobar la ausencia de picos «ocultos», por ejemplo en caso de presencia simultánea de C_{18:3} y C_{20:0} o C_{18:3} y C_{18:2} conjugados.

4.4. Preparación del cromatograma y las gráficas de referencia

Analizar la mezcla patrón de referencia (2.3) aplicando las mismas condiciones de ensayo que a la muestra y medir los tiempos o las distancias de retención de los ácidos grasos que la componen. Representar gráficamente en papel semilogarítmico, para cualquier grado de insaturación, el logaritmo del tiempo o de la distancia de retención en función del número de átomos de carbono. En condiciones isotérmicas, las gráficas de los ésteres de cadena lineal con el mismo grado de insaturación deben formar líneas rectas. Dichas líneas rectas deben ser aproximadamente paralelas.

Deben evitarse las condiciones que propicien la existencia de «picos ocultos», es decir, una resolución insuficiente para separar dos componentes.

5. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

5.1. Análisis cualitativo

Identificar los picos del estearato de metilo de la muestra a partir de los gráficos citados en el punto 4.4, si es necesario por interpolación.

5.2. Análisis cuantitativo

5.2.1. Determinación de la composición

Salvo en casos excepcionales, utilizar el método de normalización interna, es decir, partir del principio de que todos los componentes de la muestra están representados en el cromatograma, de manera que el total de las áreas situadas debajo de cada pico representa el 100 % de los constituyentes (elución total).

Si el equipo incluye un integrador, utilizar las cifras que éste proporcione. En caso contrario, determinar el área situada debajo de cada pico multiplicando la altura del pico por el ancho a la mitad de la altura y, cuando sea necesario, tomar en consideración las atenuaciones utilizadas durante el registro.

5.2.2. Método de cálculo

5.2.2.1. Caso general

Calcular el contenido de un componente dado (i) (expresado como porcentaje en masa de ésteres metílicos), mediante la determinación del porcentaje que representa el área de su pico en relación con la suma de las áreas de todos los picos, aplicando la fórmula siguiente:

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

siendo:

A_i: área del pico correspondiente al componente i.

∑ A: suma de las áreas de todos los picos.

▼B

Expresar el resultado con una cifra decimal.

Nota 7: En este caso general se considera que el resultado del cálculo basado en las áreas relativas representa el porcentaje en peso. Para los casos en que no es válida esta consideración, véase el punto 5.2.2.2.

5.2.2.2. Utilización de factores de corrección

En algunos casos, por ejemplo en presencia de ácidos grasos con menos de 8 átomos de carbono o de ácidos con grupos secundarios, si se utilizan detectores de conductividad térmica o si es necesario alcanzar mayor nivel de exactitud, deben aplicarse factores de corrección para convertir los porcentajes de las áreas de los picos en porcentajes en peso de los componentes.

Determinar los factores de corrección con un cromatograma obtenido del análisis de una mezcla de referencia de ésteres metílicos de composición conocida en condiciones de ensayo idénticas a las empleadas para el análisis de la muestra.

La fórmula que se aplicará a la muestra de referencia para obtener el porcentaje en peso del componente *i* es la siguiente:

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

siendo:

m_i = peso del componente *i* de la muestra de referencia,

$\sum m$ = suma de los pesos de los diversos componentes de la muestra de referencia.

A partir del cromatograma de la muestra de referencia (4.4) calcular el porcentaje (área/área) del componente *i* del siguiente modo:

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

siendo:

A_i : área del pico correspondiente al componente *i*,

$\sum A$: suma de las áreas de todos los picos.

El factor de corrección se calcula del siguiente modo:

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

Por lo general, los factores de corrección se expresan con relación a K_{C16} , de modo que los factores relativos se convierten en lo siguiente:

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

En la muestra, el contenido de cada componente *i*, expresado como porcentaje en peso de los ésteres metílicos, es el siguiente:

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

Expresar los resultados con una cifra decimal.

▼ B

5.2.2.3. Utilización de patrón interno

En algunos análisis (por ejemplo, cuando no se cuantifican todos los ácidos grasos por estar presentes simultáneamente ácidos de 4 y 6 átomos de carbono y ácidos de 16 y 18 átomos de carbono, o cuando es necesario determinar la cantidad absoluta de un ácido graso en la muestra) es preciso utilizar un patrón interno. Se emplean con frecuencia ácidos grasos de 5, 15 o 17 átomos de carbono. Debe determinarse, si es necesario, el factor de corrección del patrón interno.

El porcentaje en peso del componente i, expresado como ésteres metílicos, se calcula mediante esta fórmula:

$$\frac{m_p \times K'_i \times A_i}{m \times K'_p \times A_p} \times 100$$

siendo:

A_i : área del pico correspondiente al componente i.

A_p : área del pico correspondiente al patrón interno.

K'_i : factor de corrección del componente i (con relación a K_{C16}).

K'_p : factor de corrección del patrón interno (con relación a K_{C16}).

m: peso, en mg, de la muestra.

m_p : peso, en mg, del patrón interno.

Expresar los resultados con una cifra decimal.

▼ M2

6. CASO ESPECIAL DE DETERMINACIÓN DE LOS ISÓMEROS TRANS

Es posible determinar el contenido de isómeros trans de los ácidos grasos con un número de átomos de carbono comprendido entre 10 y 24 por separación de los ésteres metílicos, utilizando columnas cromatográficas capilares con una polaridad especial.

- 6.1. Columna capilar de silicio de un diámetro interno comprendido entre 0,25 mm y 0,32 mm y de 50 m de longitud, recubierta de una capa de cianopropilsilicona de un espesor comprendido entre 0,1 y 0,3 μm (tipo SP 2340, tipo SP 2380, C.P. sil 88, Silor 10 o similar).

▼ M21

- 6.2. Los ésteres metílicos se preparan según el procedimiento B descrito en el anexo X B. Las materias grasas con una acidez libre superior al 3 % deben neutralizarse previamente con arreglo al punto 5.1.1 del anexo VII.

▼ M2

- 6.3. Las condiciones generales de trabajo para la cromatografía en fase gaseosa son las siguientes:

- temperatura de la columna programada de 150° a 230 °C (por ejemplo, 165 °C durante 15 minutos y a continuación un aumento de 5 °C por minuto hasta alcanzar 200 °C),
- temperatura del inyector: 250 °C si se utiliza el sistema de inyector divisor o la temperatura inicial de la columna si se emplea el sistema «on column»,

▼ **M2**

— temperatura del detector: 260 °C,

— flujo del gas vector (helio e hidrógeno): 1,2 ml/minuto.

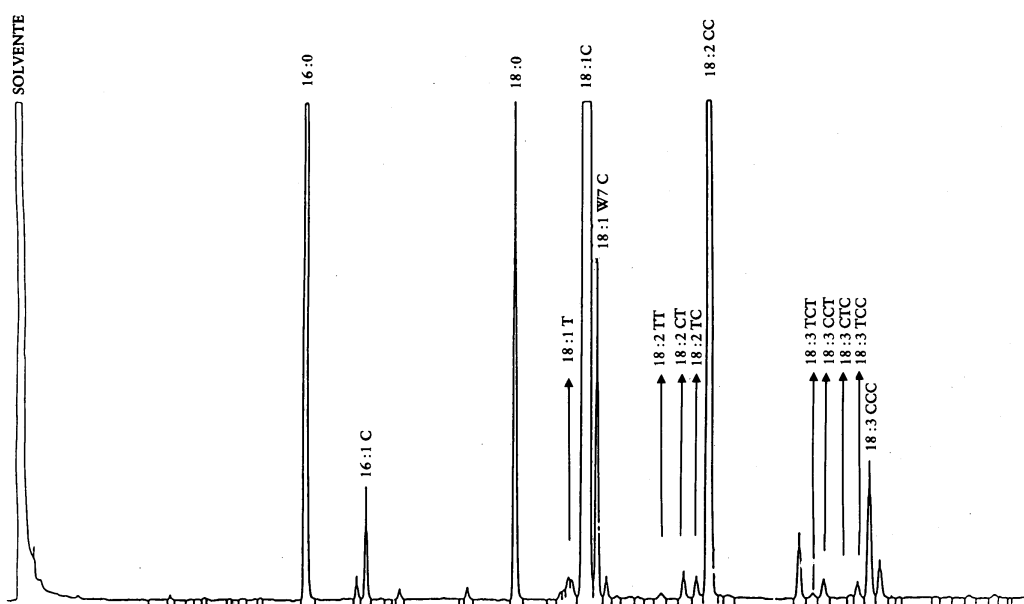
La cantidad inyectada debe ser tal que, en las condiciones de sensibilidad empleadas, la altura del pico correspondiente al éster metílico del ácido araquídico sea igual o superior al 20 % del fondo de escala.

- 6.4. La identificación de los diversos ésteres metílicos se efectúa comparando los tiempos de retención con los de las mezclas de referencia (tal y como se indica en el punto 2.3).

Los ésteres de los ácidos grasos trans son eluidos antes que los isómeros cis correspondientes. En la figura 2 se presenta un ejemplo de cromatograma.

Figura 2

Cromatograma de gases tipo relativo a la determinación de los isómeros trans de los ácidos grasos con columna capilar



- 6.5. La eficacia de la columna determinada con arreglo al punto 4.1.2 deberá permitir una separación, con un índice de resolución superior a 2, de determinadas parejas críticas, como la formada por el grupo de los ácidos transoleicos y el pico del ácido oleico (trans C18:1/cis C18:1).

- 6.6. La proporción de los diversos ácidos grasos trans se calcula estableciendo la relación entre la superficie del pico correspondiente y la suma de las superficies de todos los picos presentes.

Se toman en consideración los porcentajes de los ácidos:

- trans octadecenoicos (T 18:1), que en el Anexo I del presente Reglamento figuran como tal de isómeros transoleicos,
- cis-trans y trans-cis octadecadienoicos [(CT/TC) 8:2], que en el Anexo I del presente Reglamento figuran como tal de isómeros translinoleicos,
- trans-cis-trans, cis-cis-trans, cis-trans-cis, trans-cis-cis octadecatrienoicos [(TCT + CCT + CTC + TCC) 18:3], que en el Anexo I del presente Reglamento figuran como total de isómeros translinolénicos.

▼ **M2**

Nota 8: Teniendo en cuenta las características particulares de este método, los resultados deben darse con dos decimales.

▼ **B**

7. CASO ESPECIAL DE UTILIZACIÓN DE UN CATARÓMETRO (FUNCIONAMIENTO BASADO EN EL PRINCIPIO DE LOS CAMBIOS DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA)

Para la determinación de la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos también podrá utilizarse un cromatógrafo de gases provisto de un detector cuyo funcionamiento se base en el principio de los cambios de conductividad térmica (catarómetro). En ese caso, las condiciones establecidas en los puntos 3 y 4 deberán modificarse como se indica en la tabla 3.

Para el análisis cuantitativo, utilizar los factores de corrección definidos en el punto 5.2.2.2.

Tabla 3

Variable	Valor/condición
Columna	Longitud: 2 a 4 m Diámetro interior: 4 mm
Soporte	Tamaño de grano entre 160 y 200 µm
Concentración de la fase estacionaria	De 15 % a 25 % (m/m)
Gas portador	Helio o, en su defecto, hidrógeno, con el menor contenido de oxígeno posible
Gases auxiliares	Ninguno
Temperatura del inyector	De 40 a 60 °C más que la de la columna
Temperatura de la columna	De 180 a 200 °C
Flujo del gas portador	Normalmente entre 60 y 80 ml/min
Tamaño de la muestra problema inyectada	Normalmente entre 0,5 y 2 µl

8. INFORME DEL ANÁLISIS

En el informe del análisis se expondrán los métodos utilizados para la preparación de los ésteres metílicos y para la realización del análisis mediante cromatografía de gases, así como los resultados obtenidos. Se mencionarán, asimismo, cualesquiera procedimientos de trabajo que no se especifiquen en la presente norma internacional o que se consideren facultativos, así como toda circunstancia que pueda haber influido en los resultados.

El informe del análisis incluirá todos los datos necesarios para la completa identificación de la muestra.

▼ **M19**

ANEXO X «B»

PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÁLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE OLIVA Y DEL ACEITE DE ORUJO DE OLIVA

Se recomiendan los dos métodos siguientes para la preparación de los ésteres metálicos de los ácidos grasos de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva.

Método A: Transesterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico.

Método B: Metilación en caliente con una solución metanólica de metilato de sodio, seguida de esterificación en medio ácido.

Se aplicará uno u otro método según el parámetro analítico que se vaya a determinar y dependiendo de la categoría de aceite, tal como se indica a continuación:

a) Determinación del Δ ECN42 (diferencia entre el contenido real y el contenido teórico en triglicéridos con ECN42):

— El método A se aplicará a las muestras de aceites de todas las categorías tras purificación del aceite pasándolo a través de una columna de gel de sílice.

b) Determinación de la composición de ácidos grasos

— El método A se aplicará directamente a las muestras de aceites de las siguientes categorías:

— aceites de oliva vírgenes con una acidez libre inferior al 3,3 %,

— aceite de oliva refinado,

— aceite de oliva (mezcla de aceites de oliva vírgenes y de aceite de oliva refinado),

— aceite de orujo de oliva refinado,

— aceite de orujo de oliva (mezcla de aceites de oliva vírgenes y de aceite de orujo de oliva refinado).

— El método B se aplicará directamente a las muestras de aceites de las siguientes categorías:

— aceite de oliva virgen con una acidez libre superior al 3,3 %,

— aceite de orujo de oliva crudo.

c) Determinación de los isómeros *trans* de los ácidos grasos

— El método A se aplicará directamente a las muestras de aceites de las siguientes categorías:

— aceites de oliva vírgenes con una acidez libre inferior al 3,3 %,

— aceite de oliva refinado,

— aceite de oliva (mezcla de aceites de oliva vírgenes y de aceite de oliva refinado),

— aceite de orujo de oliva refinado,

— aceite de orujo de oliva (mezcla de aceites de oliva vírgenes y de aceite de orujo de oliva refinado).

— El método A se aplicará a las muestras de aceite de las categorías siguientes tras purificación del aceite pasándolo a través de una columna de gel de sílice:

— aceite de oliva virgen con una acidez libre superior al 3,3 %,

— aceite de orujo de oliva crudo.

▼ M19

PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ACEITE

Cuando proceda, las muestras se purificarán pasando el aceite a través de una columna de gel de sílice, utilizando como disolvente de elución hexano/éter dietílico (87: 13, v/v) tal como se describe en el método IUPAC 2.507.

Como procedimiento alternativo puede recurrirse a la extracción en fase sólida utilizando cartuchos de gel de sílice. Se coloca un cartucho de gel de sílice (1 g, 6 ml) en un aparato de elución en vacío, se lava con 6 ml de hexano y se deja de aplicar el vacío para evitar que se seque la columna. A continuación se introduce en la columna una solución de aceite (0,12 g aproximadamente) en 0,5 ml de hexano y se aplica el vacío para que la solución se introduzca en la sílice; después se eluye con 10 ml de hexano/éter dietílico (87: 13 v/v) en vacío. Se homogeneiza la totalidad de los eluidos y se divide en dos alícuotas similares. Una alícuota se evapora hasta sequedad en un evaporador rotatorio a presión reducida y a temperatura ambiente. El residuo se disuelve en 1 ml de heptano y la solución queda lista para el análisis de ácidos grasos por CG. La segunda alícuota se evapora y el residuo se disuelve en 1 ml de acetona para el análisis de los triglicéridos mediante HPLC si es necesario.

MÉTODOS PARA LA PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

1. **Método A: Transesterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico**1.1. **Ámbito de aplicación**

Este método rápido es aplicable a los aceites de oliva y a los aceites de orujo de oliva con un contenido en ácidos grasos libres inferior al 3,3 %. El hidróxido potásico no produce la esterificación de los ácidos grasos libres. Los ésteres etílicos de los ácidos grasos se transesterifican más lentamente que los glicéridos y puede que sólo se metilen parcialmente.

1.2. **Principio**

Los ésteres metílicos se forman por transesterificación con una solución metanólica de hidróxido potásico como fase intermedia antes de que se produzca la saponificación (punto 5 del método ISO 5509: 2000, punto 5 del método IUPAC 2.301).

1.3. **Reactivos**

Metanol con un contenido en agua igual o inferior al 0,5 % (m/m).

Heptano para cromatografía.

Hidróxido potásico, solución metanólica 2 N aproximadamente: disolver 11,2 g de hidróxido potásico en 100 ml de metanol.

1.4. **Material**

Tubos de rosca (5 ml de volumen) con tapón provisto de junta de PTFE

Pipetas aforadas o automáticas de 2 ml y 0,2 ml.

1.5. **Procedimiento**

En un tubo de rosca de 5 ml pesar aproximadamente 0,1 g de la muestra de aceite. Añadir 2 ml de heptano y agitar. Añadir 0,2 ml de la solución metanólica 2 N de hidróxido potásico, poner el tapón provisto de junta de PTFE, cerrar bien y agitar enérgicamente durante 30 segundos. Dejar reposar hasta que la parte superior de la solución quede clara. Decantar la capa superior, que es la que contiene los ésteres metílicos. La solución de heptano está lista para inyectarse en el cromatógrafo. Es aconsejable mantener la solución en el frigorífico hasta el momento de realizar el análisis cromatográfico. No se recomienda guardar la solución durante más de 12 horas.

▼ M19**2. Método B: Metilación en caliente con una solución metanólica de metilato de sodio, seguida de esterificación en medio ácido****2.1. Ámbito de aplicación**

Este método es aplicable a los aceites de oliva y a los aceites de orujo de oliva con un contenido en ácidos grasos libres superior al 3,3 %.

2.2. Principio

Neutralización de los ácidos grasos libres y metanólisis alcalina de los glicéridos, seguida de esterificación de los ácidos grasos en medio ácido (punto 4.2 del método IUPAC nº 2.301).

2.3. Reactivos

- Heptano para cromatografía,
- Metanol con un contenido en agua igual o inferior al 0,05 % (m/m),
- Metilato de sodio, solución metanólica 0,2 N: disolver 5 g de sodio en 1 000 ml de metanol (puede prepararse a partir de soluciones comerciales),
- Fenoltaleína, 0,2 % solución metanólica,
- Ácido sulfúrico, en solución metanólica 1 N: añadir 3 ml de ácido sulfúrico al 96 % a 100 ml de metanol,
- Solución saturada de cloruro sódico en agua.

2.4. Material

- Matraz aforado de 50 ml, con fondo plano y cuello esmerilado largo y estrecho,
- Refrigerante de reflujo: refrigerante de aire (de 1 m de longitud) con junta esmerilada,
- Perlas para regular la ebullición,
- Embudo de cristal.

2.5. Procedimiento

Poner 0,25 g de la muestra de aceite en un matraz aforado de 50 ml, con cuello esmerilado. Con ayuda del embudo, añadir 10 ml de la solución metanólica de metilato de sodio 0,2 N y las perlas para regular la ebullición. Acoplar el refrigerante de reflujo, agitar y llevar a ebullición. La solución debería quedar límpida al cabo de unos 10 minutos. La reacción está terminada prácticamente a los 15 minutos. Retirar el matraz de la fuente de calor, esperar hasta que pare el reflujo, quitar el refrigerante y añadir dos gotas de la solución de fenoltaleína. Añadir unos mililitros de ácido sulfúrico en solución metanólica 1 N hasta que la solución quede incolora y, a continuación, añadir un exceso de 1 ml. Colocar el refrigerante y volver a llevar a ebullición durante unos 20 minutos. Retirar el matraz de la fuente de calor y enfriarlo en chorro de agua. Quitar el refrigerante, añadir 20 ml de la solución saturada de cloruro sódico y agitar. Añadir 5 ml de heptano, tapan el matraz y agitar enérgicamente durante 15 segundos.

Dejar reposar hasta que las dos fases se separen completamente. Añadir de nuevo solución saturada de cloruro sódico hasta que la fase acuosa alcance la parte inferior del cuello del matraz. La capa superior, que se encuentra en el cuello del matraz, es la que contiene los ésteres metílicos. Esta solución está lista para inyectarse en el cromatógrafo de gases.

Precaución: La metilación con el método B debe realizarse en campana extractora.

▼ M19**2.6. Alternativas a la metilación según el Método B****2.6.1. Método C****2.6.1.1. Principio**

La materia grasa analizada se trata con solución metanólica de ácido clorhídrico, en una ampolla cerrada, a 100 °C.

2.6.1.2. Material

— Ampolla de cristal grueso con una capacidad de unos 5 ml (altura de 40 a 45 mm, diámetro de 14 a 16 mm).

— Pipetas aforadas de 1 y 2 ml.

2.6.1.3. Reactivos

Solución de ácido clorhídrico en 2 % de metanol, preparada a partir de ácido clorhídrico gaseoso y metanol anhidro (nota 1).

Hexano para cromatografía.

Nota 1: Pueden emplearse soluciones comerciales de cloruro de hidrógeno en metanol. En el laboratorio pueden prepararse fácilmente pequeñas cantidades de ácido clorhídrico gaseoso por simple desplazamiento de la solución comercial ($p = 1,18$), añadiendo algunas gotas de ácido sulfúrico concentrado. Como el metanol muestra mucha avidez por el ácido clorhídrico, se aconseja tomar las precauciones necesarias para la disolución (por ejemplo, introducir el gas a través de un pequeño embudo invertido cuyo borde roce la superficie del metanol). Pueden prepararse con antelación grandes cantidades de solución metanólica de ácido clorhídrico, ya que se conserva en perfectas condiciones en la oscuridad dentro de frascos con tapones de vidrio. Este reactivo puede asimismo prepararse disolviendo cloruro de acetilo en metanol anhidro.

2.6.1.4. Procedimiento

— Colocar en la ampolla de cristal 0,2 g de la materia grasa, previamente desecada en sulfato de sodio y filtrada, y 2 ml de la solución metanólica de ácido clorhídrico. Cerrar la ampolla.

— Sumergir la ampolla a 100 °C durante 40 minutos.

— Enfriar la ampolla en chorro de agua, abrirla y añadir 2 ml de agua destilada y 1 ml de hexano.

— Centrifugar y extraer la fase del hexano, que estará lista para ser utilizada.

2.6.2. Método D**2.6.2.1. Principio**

La materia grasa analizada se calienta a reflujo con metanol, hexano y ácido sulfúrico. Los ésteres metílicos obtenidos se extraen con éter de petróleo.

2.6.2.2. Material

— Tubo de ensayo de unos 20 ml de capacidad, con refrigerante de reflujo de aire de aproximadamente 1 m de longitud, con junta esmerilada.

▼ M19

- Pipeta aforada de 5 ml.
- Ampolla de decantación de 50 ml.
- Probetas de 10 ml y 25 ml.
- Tubo de ensayo de fondo cónico de 15 ml.

2.6.2.3. Reactivos

- Reactivo de metilación: metanol anhidro, hexano y ácido sulfúrico concentrado ($p = 1,84$) en la siguiente proporción: 75:25:1 (v/v/v).
- Éter de petróleo 40-60 °C.
- Sulfato sódico anhidro.

2.6.2.4. Procedimiento

Introducir 0,1 g de aceite en el tubo de 20 ml y añadir 5 ml del reactivo de metilación.

Acoplar el refrigerante de reflujo y calentar al baño María en ebullición durante 30 minutos (nota 2).

Pasar cuantitativamente la mezcla a una ampolla de decantación de 50 ml con 10 ml de agua destilada y 10 ml de éter de petróleo. Agitar energicamente y esperar a que se produzca la separación de las fases. Separar la fase acuosa y lavar dos veces la capa etérea con 20 ml de agua destilada. Añadir a la ampolla de decantación una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro, agitar, dejar reposar unos minutos y filtrar, recogiendo el filtrado en un tubo de fondo cónico de 15 ml.

Evaporar el disolvente al baño María haciendo pasar una corriente de nitrógeno.

Nota 2: Para controlar la ebullición, introducir una varita de vidrio en el tubo y limitar la temperatura del baño María a 90 °C.

3. **Parámetros de precisión**

La evaluación estadística de la precisión de los métodos A y B ha sido publicada por el Consejo Oleícola Internacional en su método COI/T.20/Doc. nº 24.

RECOMENDACIONES PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LOS ÉSTERES DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE OLIVA Y DEL ACEITE DE ORUJO DE OLIVA

1. **Procedimiento**

El análisis mediante cromatografía de gases de soluciones de ésteres grasos en hexano se realizará según la norma ISO 5508, utilizando una columna capilar (50 m de longitud \times 0,25 o 0,32 mm de diámetro interior) impregnada con cianopropilsilicona, tal como se indica para la determinación de los isómeros *trans* de los ácidos grasos (COI/T.20/Doc. nº 17).

En la figura 1 se presenta el perfil cromatográfico típico de un aceite de orujo de oliva que contiene ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos e isómeros *trans* de ésteres metílicos.

2. **Cálculos**2.1. Para calcular la composición en ácidos grasos y el Δ ECN42, se han de tener en cuenta los siguientes ácidos grasos:

Mirístico (C14:0).

Palmítico (C16:0). Suma de las áreas de los picos correspondientes a los ésteres metílicos y etílicos.

▼ M19

Palmitoleico (C16:1). Suma de las áreas de los picos correspondientes a los isómeros ω 9 y ω 7 del éster metílico.

Heptadecanoico (C17:0).

Heptadecenoico (C17:1).

Esteárico (C18:0).

Oleico (C18:1). Suma de las áreas de los picos correspondientes a los isómeros ω 9 y ω 7 del éster metílico, del éster etílico y de los isómeros *trans* del éster metílico.

Linoleico (C18:2). Suma de las áreas de los picos correspondientes a los ésteres metílicos y etílicos y a los isómeros *trans* del éster metílico.

Araquídico (C20:0).

Linolénico (C18:3). Suma de las áreas del éster metílico y de los isómeros *trans* del éster metílico.

Eicosenoico (C20:1).

Behénico (C22:0).

Lignocérico (C24:0).

El escualeno no se tiene en cuenta para calcular el área total.

- 2.2. Para calcular el porcentaje de *trans*-C18:1 se utilizará el pico correspondiente a los ésteres metílicos de este ácido graso. Para la suma [*trans*-C18:2 + *trans*-C18:3], se sumarán todos los picos correspondientes a los isómeros *trans* de estos dos ácidos grasos. Para calcular el área total se tendrán en cuenta todos los picos mencionados en 2.1 (véase COI/T.20/Doc. n° 17).

El cálculo del porcentaje de cada ácido graso se efectuará según la siguiente fórmula:

$$\% X = (\text{Área X} \times 100) / (\text{áreatotal})$$

▼ M19

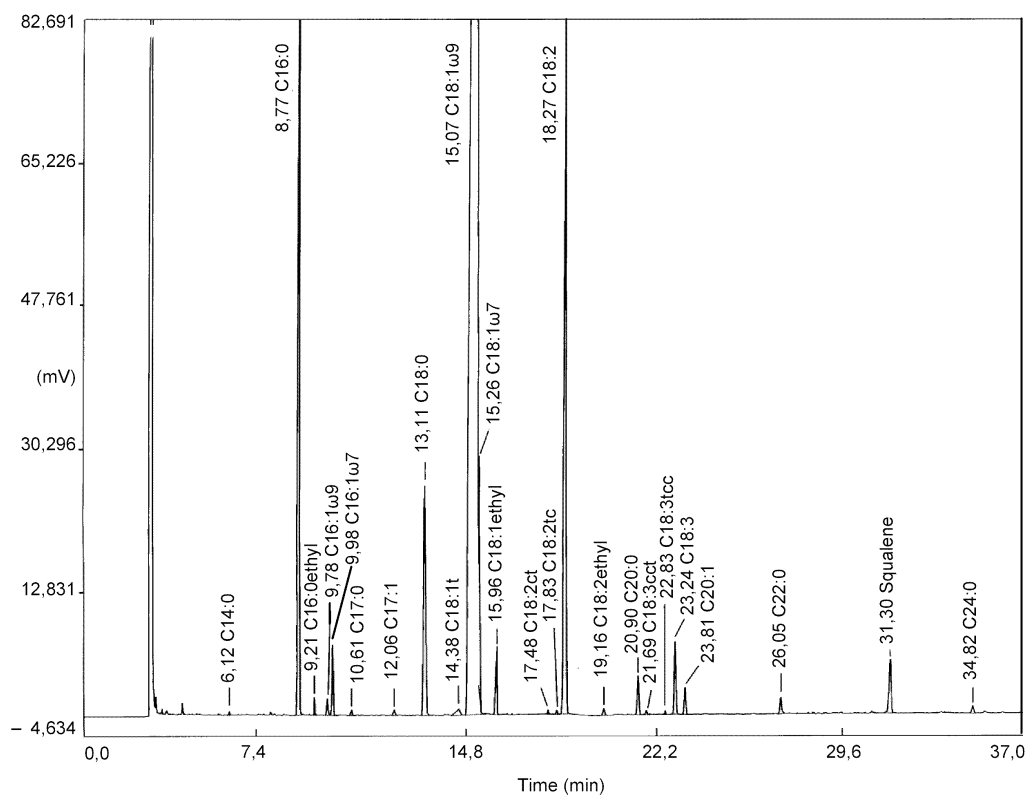


Figura 1: Perfil cromatográfico de un aceite de orujo de oliva, obtenido con el método de metilación en frío. Los picos cromatográficos corresponden a los ésteres metílicos, excepto aquellos en que se indica otra cosa.

▼B

ANEXO XI

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ►C1 DISOLVENTES ◀
HALOGENADOS VOLÁTILES EN EL ACÉITE DE OLIVA**

1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Análisis por cromatografía en fase gaseosa según la técnica del espacio de cabeza (*head space*).

2. EQUIPO

- 2.1. Cromatografía de gases con detector de captura de electrones (ECD).
- 2.2. Equipo para espacio de cabeza (*head space*).
- 2.3. Columna de cromatografía en fase gaseosa de vidrio de 2 metros de largo y 2 mm de diámetro, fase estacionaria.
OV 101 al 10 % impregnado en cromosorb W-AW-DMCS (tierra de diatomeas calcinada lavada con ácido y silanizado (80—100 Mesh).
- 2.4. Gas portador y gas auxiliar: nitrógeno para cromatografía de gases de pureza adecuada para la detección por captura de electrones.
- 2.5. Frascos de cristal de 10 a 15 ml provistos de septum de teflón y con una cápsula de aluminio con un orificio para toma de muestras con jeringa.
- 2.6. Pinzas capsuladora para cerrar herméticamente.
- 2.7. Jeringa para gases de 0,5 y 2 ml.

3. REACTIVOS

►C1 Disolventes ◀ halogenados con una pureza apropiada para su uso en cromatografía en la fase gaseosa.

4. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

- 4.1. Pesar con exactitud unos 3 g de aceite en un frasco de cristal (no reutilizable), tapar el frasco de manera que quede cerrado herméticamente. Introducir el frasco en un baño con termostato a 70 °C durante 1 hora. Extraer con precisión, por medio de una jeringa, un volumen de 0,2 a 0,5 ml del espacio de cabeza. Inyectarlo en la columna del cromatógrafo de gases con las siguientes condiciones:

temperatura inyector: 150 °C

temperatura columna: 70—80 °C

temperatura detector: 200—250 °C

Podrán utilizarse otras temperaturas siempre que los resultados sean equivalentes.

La inyección se puede realizar con el equipo para espacio de cabeza.

- 4.2. Soluciones de referencia. Preparar soluciones patrón utilizando aceite de oliva refinado sin trazas de ►C1 disolventes ◀ con concentraciones en hidrocarburos halogenados de 0,05 a 1 ppm (mg/kg) según el contenido supuesto de la muestra. Para preparar la solución de referencia, si es necesario diluir previamente el hidrocarburo halogenado patrón, puede utilizarse pentano.
- 4.3. Cuantificación. Se efectúa por cálculo mediante la relación de áreas o alturas del pico de la muestra y de la solución patrón cuya concentración sea la más próxima a la de la muestra. Si la desviación es superior al 10 %, será necesario volver a hacer el análisis, comparándolo con una nueva solución patrón de concentración tal que se ajuste a la desviación relativa antes mencionada. El contenido se establecerá efectuando la media de varias inyecciones.
- 4.4. Expresión de los resultados. Los resultados se expresarán en ppm (mg/kg). El límite de detección del método es de 0,01 mg/kg.

▼ **M22**

ANEXO XII

MÉTODO DEL CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL PARA LA VALORACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LOS ACEITES DE OLIVA VÍRGENES**1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN**

El presente método se basa en la Decisión nº DEC-21/95-V/2007, de 16 de noviembre de 2007, relativa al método revisado para la valoración organoléptica del aceite de oliva virgen del Consejo Oleícola Internacional. Tiene por finalidad establecer el procedimiento para evaluar las características organolépticas de los aceites de oliva vírgenes según se define en el punto 1 del anexo XVI del Reglamento (CE) nº 1234/2007, y describir el método para su clasificación en función de dichas características. El método incluye, asimismo, indicaciones para un etiquetado optativo.

El método descrito solo es aplicable a los aceites de oliva vírgenes, y a su clasificación o su etiquetado en función de la intensidad de los defectos detectados, del atributo frutado y otros atributos positivos, determinados por un grupo de catadores seleccionados, entrenados y examinados, constituidos en panel.

2. ASPECTOS GENERALES

Para el vocabulario general de base, la sala de degustación, la copa de cata de los aceites y cualquier otra cuestión vinculada al presente método, se recomienda ajustarse a las prescripciones del Consejo Oleícola Internacional, en particular la decisión nº DEC-21/95-V/2007, de 16 de noviembre de 2007, relativa al método revisado para la valoración organoléptica del aceite de oliva virgen.

3. VOCABULARIO ESPECÍFICO**3.1. Atributos positivos**

Frutado: conjunto de sensaciones olfativas características del aceite, dependientes de la variedad de las aceitunas, procedentes de frutos sanos y frescos, verdes o maduros, y percibidas por vía directa y/o retronasal.

El atributo *frutado* se considera *verde* cuando las sensaciones olfativas recuerdan las de los frutos verdes, características del aceite procedente de frutos verdes.

El atributo *frutado* se considera *maduro* cuando las sensaciones olfativas recuerdan las de los frutos maduros, características del aceite procedente de frutos verdes y maduros.

Amargo: sabor elemental característico del aceite obtenido de aceitunas verdes o en envero. Se percibe en las papilas circunvaladas de la uve lingual.

Picante: sensación táctil de picor, característica de los aceites obtenidos al comienzo de la campaña, principalmente de aceitunas todavía verdes. Puede ser percibido en toda la cavidad bucal, especialmente en la garganta.

3.2. Atributos negativos

Atrojado/borras: flavor característico del aceite obtenido de aceitunas amontonadas o almacenadas en condiciones tales que han sufrido un avanzado grado de fermentación anaerobia o del aceite que ha permanecido en contacto con los lodos de decantación, que también han sufrido un proceso de fermentación anaerobia en trujales y depósitos.

Moho-humedad: flavor característico del aceite obtenido de aceitunas en las que se han desarrollado abundantes hongos y levaduras a causa de haber permanecido amontonadas con humedad varios días.

▼ **M22**

Avinado-avinagrado/Ácido-agrio: flavor característico de algunos aceites que recuerda al vino o vinagre. Es debido fundamentalmente a un proceso fermentativo aerobio de las aceitunas o de los restos de pasta de aceitunas en capachos que no han sido limpiados adecuadamente, que da lugar a la formación de ácido acético, acetato de etilo y etanol.

Metálico: flavor que recuerda a los metales. Es característico del aceite que ha permanecido en contacto, durante tiempo prolongado, con superficies metálicas, durante los procesos de molienda, batido, prensado o almacenamiento.

Rancio: flavor de los aceites que han sufrido un proceso oxidativo intenso.

Cocido o quemado: flavor característico del aceite originado por un excesivo y/o prolongado calentamiento durante su obtención, muy particularmente durante el termo-batido de la pasta, si este se realiza en condiciones térmicas inadecuadas.

Heno-madera: flavor característico de algunos aceites procedentes de aceitunas secas.

Basto: sensación buco-táctil densa y pastosa producida por algunos aceites viejos.

Lubricante: flavor del aceite que recuerda al gasóleo, la grasa o al aceite mineral.

Alpechín: flavor adquirido por el aceite a causa de un contacto prolongado con las aguas de vegetación, que ya han sufrido procesos fermentativos.

Salmuera: flavor del aceite extraído de aceitunas conservadas en salmuera.

Esparto: flavor característico del aceite obtenido de aceitunas prensadas en capachos nuevos de esparto. El flavor puede ser diferente si el capacho está fabricado con esparto verde o si lo está con esparto seco.

Tierra: flavor del aceite obtenido de aceitunas recogidas con tierra, empaquetadas y no lavadas.

Gusano: flavor característico del aceite obtenido de aceitunas fuertemente atacadas por larvas de mosca del olivo (*Bactrocera Oleae*).

Pepino: flavor que se produce en el aceite durante un envasado hermético y excesivamente prolongado, particularmente en hojalata, que es atribuido a la formación de 2,6 nonadienal.

Madera húmeda: flavor característico de aceites que han sido extraídos de aceitunas que han sufrido un proceso de congelación en el árbol.

3.3. Terminología opcional para el etiquetado

A petición expresa, el jefe de panel puede certificar que los aceites evaluados cumplen las definiciones e intervalos correspondientes a las expresiones y adjetivos siguientes en función de la intensidad y de la percepción de los atributos:

- a) con respecto a cada uno de los atributos positivos mencionados en el punto 3.1 (*frutado*, según proceda calificado como *verde* o *maduro*, *picante* y *amargo*):
 - i) el término «intenso» puede utilizarse cuando la mediana del atributo en cuestión sea superior a 6,
 - ii) el término «medio» puede utilizarse cuando la mediana del atributo en cuestión esté comprendida entre 3 y 6,
 - iii) el término «ligero» puede utilizarse cuando la mediana del atributo en cuestión sea inferior a 3,

▼ **M22**

iv) los atributos en cuestión pueden utilizarse sin referencia a los adjetivos mencionados en los puntos i), ii) y iii) cuando la mediana del atributo de que se trate sea superior o igual a 3;

b) el término «equilibrado» puede utilizarse en aquel aceite que no es desequilibrado. Se entiende por desequilibrio la sensación olfato-gustativa y táctil del aceite en que la mediana de los atributos *amargo* y/o *picante* es superior en dos puntos a la mediana del atributo *frutado*;

c) la expresión «aceite dulce» puede utilizarse en un aceite en el cual la mediana del atributo *amargo* y la del *picante* sean inferiores o iguales a 2.

4. PANEL DE CATADORES

El panel estará compuesto por un jefe de panel y un número de catadores comprendido entre ocho y doce.

El jefe del panel deberá haber recibido una sólida formación y ser un conocedor y un avezado experto en los diferentes tipos de aceite de oliva. Será responsable del panel, de su organización y funcionamiento y de la preparación, codificación y presentación de las muestras a los catadores, así como de la compilación de los datos y su tratamiento estadístico.

El jefe del panel seleccionará a los catadores y supervisará su entrenamiento y actuación profesional para garantizar que se mantienen en un nivel de aptitud adecuado.

Los catadores de los controles organolépticos del aceite de oliva deberán ser seleccionados y entrenados en función de su habilidad para distinguir entre muestras similares, conforme a lo establecido en la guía del Consejo Oleícola Internacional para la selección, entrenamiento y control de los catadores cualificados de aceite de oliva virgen.

Los paneles deberán comprometerse a participar en las valoraciones organolépticas que se programen en los ámbitos nacional, comunitario o internacional para el control periódico y la armonización de los criterios de percepción. Además, en el caso de los paneles autorizados con arreglo a las disposiciones del artículo 4, apartado 1, del presente Reglamento, deberán presentar anualmente al Estado miembro interesado toda la información sobre la composición del panel e indicarle el número de valoraciones que hayan realizado en calidad de panel autorizado.

5. PROCEDIMIENTO DE VALORACIÓN ORGANOLÉPTICA Y CLASIFICACIÓN

5.1. Utilización de la ficha de cata por el catador

En el apéndice A del presente método figura el modelo de ficha de cata que deben emplear los catadores.

Cada uno de los catadores integrantes del panel deberá oler y, acto seguido, degustar el aceite sometido a valoración. A continuación, deberá consignar en las escalas de 10 cm de la ficha de cata que se pondrá a su disposición la intensidad con la que percibe cada uno de los atributos negativos y positivos ⁽¹⁾. En caso de percepción del carácter verde o maduro del atributo frutado, el catador marcará la casilla correspondiente de la ficha de cata.

En caso de que se perciban atributos negativos no indicados en la ficha de cata, deberán consignarse en el apartado «Otros», empleando los términos que los describan con mayor precisión de entre los definidos.

⁽¹⁾ El catador podrá abstenerse de catar un aceite cuando aprecie por vía olfativa directa algún atributo negativo sumamente intenso, circunstancia excepcional que deberá indicar en la ficha de cata.

▼ M22**5.2. Utilización de los datos por el jefe de panel**

El jefe de panel deberá recoger las fichas de cata cumplimentadas por cada uno de los catadores, controlar las intensidades asignadas a los diferentes atributos, y, si comprueba alguna anomalía, solicitar al catador que revise su ficha de cata y, en caso necesario, que repita la prueba.

El jefe de panel puede introducir los datos de cada catador en un programa informático conforme al método de cálculo estadístico de la mediana indicado en el apéndice B. La introducción de datos para cada muestra deberá realizarse mediante una matriz compuesta de nueve columnas correspondientes a los nueve atributos sensoriales y de n líneas correspondientes a los n miembros del panel de cata.

Cuando al menos el 50 % del panel inscriba un atributo negativo en el apartado «Otros», se calculará la mediana de ese defecto y el aceite se clasificará en consecuencia.

El jefe de panel solo podrá certificar que el aceite evaluado cumple las condiciones mencionadas en el punto 3.3.a en lo que atañe a los términos «verde» y «maduro» cuando al menos el 50 % del panel haya señalado haber percibido el carácter verde o maduro del atributo frutado.

En el caso de los análisis efectuados en el marco de controles de conformidad, se realizará un ensayo. En el caso de los contra-análisis, el jefe de panel deberá proceder a la realización del análisis por duplicado. En el caso de los análisis dirimentes, la valoración deberá ser realizada por triplicado. En estos casos, la mediana de los atributos se calculará a partir de la media de las medianas. Todos los replicados de estos análisis deberán hacerse en sesiones diferentes.

5.3. Clasificación de los aceites

El aceite se clasifica en las categorías que se indican más adelante, en función de la mediana de los defectos y de la mediana del atributo frutado. Por mediana de los defectos se entiende la mediana del defecto percibido con mayor intensidad. La mediana de los defectos y la mediana del atributo frutado se expresarán con una sola cifra decimal y el valor del coeficiente de variación sólido que los define deberá ser inferior o igual al 20 %.

La clasificación del aceite se hace comparando el valor de la mediana de los defectos y de la mediana del atributo frutado con los intervalos de referencia expuestos a continuación. Los límites de estos intervalos han sido establecidos teniendo en cuenta el error del método, por lo que son considerados como absolutos. Los programas informáticos permiten una clasificación visual en un cuadro de datos estadísticos o gráficamente.

- a) *Aceite de oliva virgen extra*: la mediana de los defectos es igual a 0 y la del atributo «frutado» superior a 0;
- b) *Aceite de oliva virgen*: la mediana de los defectos es superior a 0 e inferior o igual a 3,5 y la del atributo «frutado» superior a 0;
- c) *Aceite de oliva lampante*: la mediana de los defectos es superior a 3,5, o bien, la mediana de los defectos es inferior o igual a 3,5 y la del atributo «frutado» es igual a 0.

5.4. Casos particulares

Cuando la mediana de los atributos positivos distintos de «frutado» sea superior a 5,0, el jefe de panel consignará tal extremo en el certificado de análisis del aceite.

▼ **M22***Apéndice A***Ficha de cata del aceite de oliva virgen**

INTENSIDAD DE PERCEPCIÓN DE LOS DEFECTOS

Atrojado/borras	_____ →
Mohoso — húmedo-terroso	_____ →
Avinado — avinagrado Ácido — agrio	_____ →
Metálico	_____ →
Rancio	_____ →
Otros (especifíquense)	_____ →

INTENSIDAD DE LAS PERCEPCIONES DE LOS ATRIBUTOS POSITIVOS

Frutado	_____ →
Verde <input type="checkbox"/> Maduro <input type="checkbox"/>	
Amargo	_____ →
Picante	_____ →

Nombre del catador:**Código de la muestra:****Fecha:****Observaciones:**

▼ **M22***Apéndice B***MÉTODO DE CÁLCULO DE LA MEDIANA Y DE LOS INTERVALOS DE CONFIANZA****Mediana**

$$Me = [P(X < X_m) \leq 1/2 \wedge P(X \leq X_m) \geq 1/2]$$

La mediana se define como el número real X_m , caracterizado por el hecho de que la probabilidad (P) de que los valores de la distribución (X) sean inferiores a este número (X_m) es inferior o igual a 0,5 y de que, simultáneamente, la probabilidad (P) de que los valores de la distribución (X) sean inferiores o iguales a X_m es superior o igual a 0,5. Otra definición considera la mediana como el 50º percentil de una distribución de números ordenados de modo creciente. En términos más simples, la mediana representa el valor central de una serie ordenada de números impares o la media de los dos valores centrales de una serie ordenada de números pares.

Desviación típica robusta

Para obtener una estimación fiable de la variabilidad que se produce en torno a la mediana, hay que remitirse a la estimación de la desviación típica robusta de Stuart y Kendall. La fórmula siguiente indica la desviación típica asintótica, es decir, la estimación sólida de la variabilidad de los datos considerados, en la que N es el número de observaciones e IQR el intervalo intercuartil, el cual incluye exactamente el 50 % de los casos de una distribución de probabilidad cualquiera.

$$S^* = \frac{1,25 \text{ IQR}}{1,35 \sqrt{N}}$$

El cálculo del intervalo intercuartil se efectúa calculando la magnitud de la diferencia entre el 75º y el 25º percentil.

$$\text{IQR} = 75^\circ \text{ percentil} - 25^\circ \text{ percentil}$$

Siendo el percentil el valor X_{pc} , caracterizado por el hecho de que la probabilidad (P) de que los valores de la distribución sean inferiores a X_{pc} es inferior o igual a una centésima determinada y de que, simultáneamente, la probabilidad (P) de que los valores de la distribución sean inferiores o iguales a X_{pc} es superior o igual a dicha centésima. La centésima indica la fracción de distribución elegida. En el caso de la mediana esta es igual a 50/100.

$$\text{Percentile} = \left[P(X < X_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge P(X \leq X_{pc}) \geq \frac{n}{100} \right]$$

En la práctica, el percentil es el valor de distribución que corresponde a un área determinada, trazada a partir de la curva de distribución o de densidad. Por ejemplo, el 25º percentil representa el valor de distribución correspondiente a un área igual a 0,25 o 25/100.

Coefficiente de variación robusto (en %)

El CVr% representa un número puro, es decir sin dimensión, que indica el porcentaje de variabilidad de la serie de números analizada. Por esta razón este coeficiente resulta muy útil para comprobar la fiabilidad de los miembros del panel.

$$\text{CVr \%} = \frac{S^*}{Me} 100$$

▼ M22**Intervalos de confianza al 95 % sobre la mediana**

Los intervalos de confianza al 95 % (valor del error de primer tipo igual a 0,05 o 5 %) representan el intervalo en el que el valor de la mediana podría variar si fuese posible repetir infinitas veces un experimento. En la práctica, indica el intervalo de variabilidad de la prueba en las condiciones operativas adoptadas, partiendo de la hipótesis de que pudiera repetirse varias veces. El intervalo ayuda a evaluar, como en el caso del CVr%, la fiabilidad de la prueba.

$$IC_{\text{sup}} = Me + (c.S^*)$$

$$IC_{\text{inf}} = Me - (c.S^*)$$

Donde c, en el caso del intervalo de confianza al 0,95, es igual a 1,96.

▼ M20

▼ M19

▼B*ANEXO XV*

1. CONTENIDO EN ACEITE DE LOS ORUJOS DE ACEITUNA

1.1. **Material**

- aparato de extracción apropiado tipo ► **C1** soxhlet ◀, provisto de un matraz de 200 a 250 ml,
- baño por calefacción eléctrica (baño de arena, baño de agua, etc.) o placa calefactora,
- balanza analítica,
- estufa regulada a 80 °C como máximo,
- estufa de calefacción eléctrica provista de un dispositivo de termorregulación regulada a 103 °C ± 2 °C y que permita realizar una insuflación de aire o una presión reducida,
- triturador mecánico fácil de limpiar y que permita el triturado del orujo sin calentamiento y sin disminución sensible de su contenido en agua y en aceite,
- cartucho de extracción y algodón hidrófilo o papel filtro, exentos de productos extraíbles por el hexano,
- desecador,
- criba con agujeros de 1 mm de diámetro,
- piedra pómez en pequeños granos, previamente secada.

1.2. **Reactivo**

n-hexano técnico cuyo residuo en evaporación completa deberá ser inferior a 0,002 g para 100 ml.

2. MODO DE OPERAR

2.1. **Preparación de la muestra para ensayo**

Triturar la muestra para laboratorio, si fuera necesario, en el triturador mecánico, previamente bien limpio, para reducirla a partículas que puedan atravesar completamente la criba.

Utilizar aproximadamente una vigésima parte de la muestra para completar la limpieza del triturador, tirar dicha mezcla, triturar el resto, recogerlo, mezclarlo con cuidado y analizarlo sin demora.

2.2. **Toma de muestra**

Pesar inmediatamente después del triturado, alrededor de 10 g de la muestra para ensayo con una aproximación de 0,01 g.

2.3. **Preparación del cartucho de extracción**

► **C1** colocar la muestra en el cartucho y tapparla con el tapón ◀ de algodón hidrófilo. En caso de haber utilizado papel de filtro, envolver la muestra molida en dicho papel.

2.4. **Presecado**

Cuando el orujo esté muy húmedo (contenido en agua y en materias volátiles superior al 10 %), efectuar un presecado colocando durante un tiempo conveniente el cartucho lleno (o el papel de filtro) en la estufa calentada a 80 °C como máximo, para llevar el contenido en agua y en materias volátiles por debajo del 10 %.

▼B**2.5. Preparación del matraz**

Pesar con aproximación de 1 g el matraz que contenga 1 a 2 granos de piedra pómez, previamente secado en la estufa a $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después enfriado durante al menos una hora en el desecador.

2.6. Primera extracción

Colocar en el aparato de extracción el cartucho (o el papel de filtro) que contenga la muestra. Verter en el matraz la cantidad necesaria de hexano. ►C1 Adaptar ◀ el matraz al aparato de extracción y colocarlo todo sobre la placa calefactora. Llevar la calefacción a tal estado que el caudal de reflujo sea al menos de tres gotas por segundo (ebullición moderada, no tumultuosa).

Después de cuatro horas de extracción, dejar enfriar. Quitar el cartucho del aparato de extracción y colocarlo en una corriente de aire para eliminar la mayor parte del disolvente que lo impregna.

2.7. Segunda extracción

Vaciar el cartucho en el microtritador y triturar tan finamente como sea posible. Colocar de nuevo cuantitativamente la mezcla en el cartucho y ésta en el aparato de extracción.

Empezar de nuevo la extracción durante dos horas más, utilizando el mismo matraz conteniendo la primera extracción.

La solución obtenida en el matraz de extracción deberá ser límpida. Si no fuere así, filtrarla sobre un papel de filtro lavando varias veces el primer matraz y el papel de filtro con hexano. Recoger el filtrado y el disolvente en un segundo matraz previamente secado y tarado aproximadamente a 1 mg.

2.8. Eliminación del disolvente y pesada del extracto

Eliminar en el equipo de extracción la mayor parte del disolvente. Eliminar los últimos restos de éste calentando el matraz en la estufa a $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. Facilitar dicha eliminación, ya sea insuflando aire de vez en cuando o preferiblemente un gas inerte, o actuando bajo una presión reducida.

Dejar enfriar el matraz en un desecador durante al menos una hora, y pesarlo con una precisión de 1 mg aproximadamente.

Calentar de nuevo 10 minutos en las mismas condiciones, dejar enfriar en el desecador y pesar.

La diferencia entre los resultados de estas dos pesadas deberá ser inferior o igual a 10 mg, si no, calentar de nuevo durante períodos de diez minutos seguidos de enfriamiento y pesada, hasta que la diferencia de peso sea, a lo sumo, de 10 mg. Seleccionar la última pesada del matraz.

Efectuar dos determinaciones.

3. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS**3.1. Modo de cálculo y fórmula**

a) El extracto expresado en peso del producto tal cual será igual a:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0}$$

▼B

donde: S es el porcentaje en peso del extracto del producto tal cual,
m₀ es el peso, en gramos, de la muestra,
m₁ es el peso, en gramos, del extracto seco.

Tomar como resultado la media aritmética de las dos determinaciones, si las condiciones de repetitividad se cumplen.

Expresar el resultado con un solo decimal.

- b) El extracto se relacionará con la materia seca utilizando la siguiente fórmula:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \% \text{ grasa sobre extracto seco}$$

donde: S es el porcentaje en peso de extracto del producto tal cual ver a),
U es su contenido en agua y en materias volátiles.

3.2. Repetitividad

La diferencia entre los resultados de las dos determinaciones, efectuadas simultáneamente o rápidamente la una a continuación de la otra mediante el mismo análisis, no deberá ser superior a 0,2 g de extracto de hexano por cada 100 g de muestra.

En caso contrario, repetir sobre otras dos tomas de muestra. Si esta vez la diferencia es de nuevo superior a 0,2 g tomar como resultado la media aritmética de las cuatro determinaciones efectuadas.



ANEXO XVI

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE YODO

1. OBJETO

La presente norma internacional especifica un método para la determinación del índice de yodo de las grasas y aceites animales y vegetales, en lo sucesivo denominados grasas.

2. DEFINICIÓN

A los fines de la presente norma internacional, se aplicará la definición siguiente:

- 2.1. *Índice de yodo*: el peso de yodo absorbido por la muestra en las condiciones de trabajo que se especifican en la presente norma internacional.

El índice de yodo se expresa en gramos de yodo por 100 gr de muestra.

3. PRINCIPIO

Disolución de la muestra problema y adición de reactivo de Wijs. Una vez transcurrido el tiempo que se especifica, adición de solución acuosa de yoduro potásico y valoración del yodo liberado con solución de tiosulfato sódico.

4. REACTIVOS

Todos los reactivos serán de calidad analítica reconocida.

- 4.1. Yoduro potásico, solución de 100 g/l, exento de yodatos o de yodo libre.

- 4.2. Engrudo de almidón.

Mezclar 5 g de almidón soluble con 30 ml de agua, añadir esta mezcla a 1 000 ml de agua en ebullición, hervir durante 3 minutos y dejar enfriar.

- 4.3. Solución volumétrica patrón de tiosulfato sódico.

$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, valorada como máximo 7 días antes de su uso.

- 4.4. Disolvente, preparado mezclando volúmenes iguales de ciclohexano y ácido acético.

- 4.5. Reactivo de Wijs, que contenga monocloruro de yodo en ácido acético. Se utilizará reactivo de Wijs comercializado.

Nota: El reactivo contiene 9 g de ICl_3 + 9 g de I en ácido acético.

5. MATERIAL

Material ordinario de laboratorio y, en particular, lo siguiente:

- 5.1. Navecillas de vidrio, apropiadas para la muestra problema y que puedan introducirse en los matraces (5.2).

- 5.2. Matraces erlenmeyer de 500 ml de capacidad con boca esmerilada, provistos de sus correspondientes tapones de vidrio y perfectamente secos.

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA ► C1 PROBLEMA ◀.

► C1 La muestra homogeneizada, se seca sobre sulfato sódico y se filtra ◀.

7. PROCEDIMIENTO

- 7.1. Tamaño de la muestra

El peso de la muestra varía en función del índice de yodo previsto, como se indica en el cuadro 1.

▼ **B**

Cuadro 1

Índice de yodo previsto	Peso de la muestra problema
menos de 5	3,00 g
5— 20	1,00 g
21— 50	0,40 g
51—100	0,20 g
101—150	0,13 g
151—200	0,10 g

Pesar la muestra problema con precisión de 0,1 mg en una ► **C1** navecilla ◀ de vidrio 5.1.

7.2. Determinación

Introducir la muestra problema en un matraz de 500 ml (5.2). Añadir 20 ml del disolvente (4.4) para disolver la grasa. Agregar exactamente 25 ml del reactivo de Wijs (4.5), tapar el matraz, agitar el contenido y colocar el matraz al abrigo de la luz. No deberá utilizarse la boca para pipetear el reactivo de Wijs.

Preparar del mismo modo un ensayo en blanco con el disolvente y el reactivo, pero sin la muestra problema.

Para las muestras con un índice de yodo inferior a 150, mantener los matraces en la oscuridad durante 1 hora; para las muestras con un índice de yodo superior a 150, así como en el caso de productos polimerizados o considerablemente oxidados, mantener en la oscuridad durante 2 horas.

Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, agregar a cada uno de los matraces 20 ml de solución de yoduro potásico (4.1) y 150 ml de agua.

Valorar con la disolución de tiosulfato sódico (4.3) hasta que haya desaparecido casi totalmente el color amarillo producido por el yodo. Añadir unas gotas de engrudo de almidón (4.2) y continuar la valoración hasta el momento preciso en que desaparezca el color azul después de una agitación muy intensa.

Nota: Se permite la determinación potenciométrica del punto final.

7.3. Número de determinaciones

Efectuar 2 determinaciones de la muestra problema.

8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El índice de yodo se expresa del siguiente modo:

$$\frac{12,69 \text{ c} (V_1 - V_2)}{p}$$

siendo:

c: valor numérico de la concentración exacta, expresada en moles por litro, de la solución volumétrica patrón de tiosulfato sódico (4.3) utilizada;

V₁: valor numérico del volumen, expresado en mililitros, de la solución de tiosulfato sódico (4.3) utilizada para el ensayo en blanco;

▼B

V_2 : valor numérico del volumen, expresado en mililitros, de la solución de tiosulfato sódico (4.3) utilizada para la determinación;

p: valor numérico del peso, expresado en gramos, de la muestra problema (7.1).

Se tomará como resultado la media aritmética de las dos determinaciones, siempre que se cumpla el requisito establecido con respecto a la repetibilidad.

▼M11*ANEXO XVII***MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTIGMASTADIENOS EN LOS ACEITES VEGETALES****1. OBJETIVOS**

Determinación de estigmastadienos en los aceites vegetales que presentan bajas concentraciones de dichos hidrocarburos, particularmente en el aceite de oliva virgen y en el aceite de orujo de oliva sin refinar.

2. APLICACIÓN

Se trata de una norma aplicable a cualquier aceite de origen vegetal, teniendo en cuenta que únicamente se obtendrán medidas fiables cuando el contenido de estos hidrocarburos se halle incluido en un margen de 0,01 a 4,0 mg/kg. El método resulta especialmente adecuado para detectar la presencia de aceites vegetales refinados (aceites de oliva, orujo de oliva, girasol, palma, etc.) en el aceite de oliva virgen, dado que los aceites refinados contienen estigmastadienos y los aceites vírgenes no.

3. FUNDAMENTO

Aislamiento de la materia insaponificable. Separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos mediante cromatografía en columna de gel de sílice y análisis mediante cromatografía de gases en columna capilar.

4. INSTRUMENTAL

- 4.1. Matraces de 250 ml aptos para colocarles un refrigerante de reflujo.
- 4.2. Embudos de decantación con capacidad para 500 ml.
- 4.3. Matraces de fondo redondo de 100 ml.
- 4.4. Rotavapor.
- 4.5. Columna de vidrio para cromatografía (1,5-2,0 cm de diámetro interno por 50 cm de longitud) provista de una llave de teflón y con una torunda de lana de vidrio o un disco de vidrio unterizado en el fondo. Para preparar la columna de gel de sílice se vierte hexano en la columna de cromatografía hasta que alcance una altura de aproximadamente 5 cm, llenándose a continuación con una papilla de gel de sílice en hexano (15 g en 40 ml) mediante la ayuda de varias porciones de hexano. Se deja sedimentar la mezcla en reposo, completándose la sedimentación aplicando una ligera vibración. Añadir sulfato sódico anhidro hasta una altura de aproximadamente 0,5 cm y finalmente eluir el exceso de hexano.
- 4.6. Cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de llama, inyector con división de flujo u «cold on -column» y horno programable con precisión de ± 1 °C.
- 4.7. Columna capilar de sílice fundida (0,25 o 0,32 mm de diámetro interno \times 25 m de longitud), recubierta con una película de 0,25 μ m de espesor de la fase 5 %-fenilmetilsilicona.

Nota 1.

Pueden utilizarse otras columnas con polaridades similares o inferiores.

- 4.8. Integrador-registrador con capacidad para modo de integración valle-valle.
- 4.9. Microjeringa de 5-10 μ l para cromatografía de gases con aguja fija.
- 4.10. Calentador de tipo manta o placa eléctrica.

▼ M11

5. REACTIVOS

Salvo indicación en sentido contrario, únicamente se utilizarán reactivos de calidad para análisis. Debe emplearse agua destilada o de pureza al menos equivalente.

- 5.1. Hexano o una mezcla de alcanos con un intervalo de ebullición de 65-70 °C, destilados en columna rectificadora.

Nota 2.

El disolvente debe destilarse para eliminar impurezas.

- 5.2. Etanol de 96 v/v.

- 5.3. Sulfato sódico anhidro.

- 5.4. Solución alcohólica de hidróxido potásico al 10 %. Añadir 10 ml de agua a 50 g de hidróxido potásico, agitar y diluir seguidamente la mezcla en etanol hasta un volumen de 500 ml.

Nota 3.

La potasa alcohólica toma color marrón con el tiempo. Debe prepararse diariamente y se almacenará en botellas de vidrio oscuro cerradas herméticamente.

- 5.5. Gel de sílice 60 para columna de cromatografía, de 70-230 mallas (referencia 7734 de Merck o similar).

Nota 4.

Por lo general, el gel de sílice puede utilizarse directamente a partir del envase sin necesidad de tratamiento. Sin embargo, algunos lotes de sílice pueden presentar baja actividad produciendo separaciones cromatográficas inadecuadas. Cuando ello ocurra debe tratarse el gel de sílice de la siguiente manera: activar el gel calentándolo a 550 °C durante un mínimo de cuatro horas. Tras el calentamiento poner el gel de sílice a enfriar en un desecador y trasvasarlo a continuación a un matraz con cierre hermético. Se añade seguidamente un 2 % de agua agitando hasta que dejen de verse grumos y el polvo fluya libremente.

Si algún lote de gel de sílice origina cromatogramas con picos que interfieran, dicho gel será sometido al tratamiento anteriormente mencionado. Puede considerarse como alternativa la utilización de gel de sílice 60 extrapuro (referencia 7754 de Merck).

- 5.6. Solución madre (200 ppm) de colestá-3,5-dieno (Sigma, 99 % de pureza) en hexano (10 mg en 50 ml).

- 5.7. Solución patrón de colestá-3,5-dieno en hexano con una concentración de 20 ppm, que se obtiene diluyendo la solución anterior.

Nota 5.

Si se mantiene la temperatura por debajo de 4 °C, las soluciones 5.6 y 5.7 permanecerán inalteradas durante un mínimo de 4 meses.

- 5.8. Solución de n-nonacosano en hexano con una concentración aproximada de 100 ppm.

- 5.9. Gas portador para cromatografía: helio o hidrógeno de 99,9990 % de pureza.

- 5.10. Gases auxiliares para el detector de ionización de llama: aire purificado e hidrógeno de 99,9990 % de pureza.

▼ M11**6. METODOLOGÍA****6.1. Preparación de la materia insaponificable:**

6.1.1. Pesar $20 \pm 0,1$ g de aceite en un matraz de 250 ml (4.1), añadir 1 ml de solución patrón de colest-3,5-dieno (20 μ g) y 75 ml de potasa alcohólica al 10 %, colocar un refrigerante de reflujo y calentar a ebullición suave durante 30 minutos. Retirar de la fuente de calor el matraz con la muestra y dejar enfriar ligeramente la solución (el enfriamiento no debe ser total para evitar la decantación de la muestra). Añadir 100 ml de agua y pasar la solución a un embudo de decantación (4.2) con ayuda de 100 ml de hexano. Agitar enérgicamente durante 30 segundos y dejar decantar.

Nota 6.

Si se produce emulsión, que no desaparece rápidamente, añadir pequeñas cantidades de etanol.

6.1.2. Pasar la fase acuosa inferior a un segundo embudo de decantación y someterla nuevamente a extracción con 100 ml de hexano. Separar nuevamente la fase inferior y lavar los extractos de hexano (mezclándolos en otro embudo de decantación) con tres porciones de 100 ml cada una de una mezcla de agua y etanol (1: 1) hasta obtener un pH neutro.

6.1.3. Pasar la solución de hexano a través de sulfato sódico anhidro (50 g), lavar con 20 ml de hexano y evaporar a 30 °C y presión reducida en un rotavapor hasta sequedad.

6.2. Separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos:

6.2.1. Introducir el residuo en la columna de fraccionamiento con ayuda de dos porciones de 1 ml de hexano, distribuir la muestra en la columna dejando que el nivel de solución descienda hasta la parte superior del sulfato de sodio y comenzar la elución cromatográfica con hexano a un flujo aproximado de 1 ml/min. Desechar los primeros 25-30 ml de eluido y recoger la fracción siguiente de 40 ml. Después, pasar esta fracción a un matraz de fondo redondo de 100 ml (4.3).

Nota 7.

La primera fracción contiene los hidrocarburos saturados (cf. Figura 1a) y la segunda fracción los esteroideos. Al proseguir con la elución se obtiene escualeno y otros compuestos relacionados. Para poder obtener una buena separación entre los hidrocarburos saturados y los esteroideos, es necesario optimizar los volúmenes de las fracciones. A tal efecto se debe ajustar el volumen de la primera fracción de tal manera que cuando se analice la segunda, los picos correspondientes a los hidrocarburos saturados sean bajos (cf. Figura 1c); cuando estos no aparezcan pero la intensidad del pico correspondiente al patrón sea reducida, debe disminuirse el volumen. De todas formas, puesto que no se produce solapamiento de los picos durante la cromatografía de gases, no es precisa una separación completa entre los componentes de la primera y segunda fracciones siempre que las condiciones de la CG estén ajustadas como se indica en 6.3.1. Por lo general no es necesario optimizar el volumen de la segunda fracción, puesto que existe una buena separación con los componentes que eluyen posteriormente. Sin embargo, la presencia de un pico importante a 1,5 min, aproximadamente, por debajo del tiempo de retención del patrón se debe al escualeno y revela una mala separación.

6.2.2. Evaporar la segunda fracción en rotavapor a 30 °C y presión reducida hasta sequedad. Disolver inmediatamente el residuo en 0,2 ml de hexano y mantener la solución en el refrigerador hasta el momento de su análisis.

Nota 8.

Los residuos 6.1.3 y 6.2.2 no deben mantenerse en seco a temperatura ambiente. Una vez obtenidos, es necesario añadirles disolvente y almacenarlos en un refrigerador.

▼ **M11****6.3. Cromatografía de gases**

6.3.1. Condiciones de trabajo para inyección con división de flujo.

- temperatura del inyector: 300 °C,
- temperatura del detector: 320 °C.
- integrador-registrador: los parámetros de integración deben ser fijados de tal forma que la evaluación de las áreas sea correcta. La modalidad de integración valle-valle es la más recomendable,
- sensibilidad: aproximadamente 16 veces la atenuación mínima,
- cantidad de disolución inyectada: 1 µl,
- programación de la temperatura del horno: temperatura inicial constante de 235 °C durante 6 minutos, seguida de un aumento gradual de 2 °C/min hasta alcanzar 285 °C,
- inyección con una división de flujo de 1: 15,
- gas portador: helio o hidrógeno a 120 kPa de presión.

Dichas condiciones pueden modificarse en función de las características del cromatógrafo y de la columna con objeto de obtener cromatogramas que respondan a los siguientes requisitos: Pico del patrón interno situado con una aproximación de 5 minutos en torno al tiempo citado en 6.3.2; el pico del patrón interno alcanzará, como mínimo, un 80 % de la escala total.

El sistema de cromatografía de gases deberá comprobarse inyectando una mezcla de la solución madre de colestadieno (5.6) y de n-nonacosano (5.8). El pico del colestadieno deberá aparecer antes que el del n-nonacosano (véase figura 1c); si esto no ocurre, pueden adoptarse dos soluciones: reducir la temperatura inicial del horno o sustituir la columna de cromatografía de gases por otra de polaridad inferior.

6.3.2. Identificación de picos

El pico del patrón interno aparece a un tiempo de retención de, aproximadamente, 19 minutos, y el del estigmasta-3,5-dieno lo hace a un tiempo de retención relativo de aproximadamente 1,29 (véase figura 1b). El estigmasta-3,5-dieno suele ir acompañado de pequeñas cantidades de un isómero y, por lo general, ambos originan un solo pico cromatográfico. No obstante, si la columna es demasiado polar, o tiene un gran poder de resolución, el isómero puede aparecer en forma de un pequeño pico justo antes y cerca del estigmasta-3,5-dieno (véase figura 2). En estos casos, es preciso sumar las áreas de los dos picos. Con el fin de estar seguro que los estigmastadienos eluyen como un solo pico se recomienda instituir la columna por otra de menor polaridad o de mayor diámetro interior.

Nota 9.

Para obtener una referencia de los estigmastadienos puede utilizarse el análisis de cualquier aceite vegetal refinado empleando menor cantidad de muestra (de 1 a 2 g). Los estigmastadienos dan lugar a un pico importante de fácil identificación.

6.3.3. Análisis cuantitativo

El contenido de los estigmastadienos se determina aplicando la fórmula

$$\text{mg/kg de estigmastadienos} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

▼ M11

en la cual: A_b = área del pico de estigmastadienos (si el pico se halla dividido en dos picos, súmese el área de los dos picos.).

A_c = área del pico del patrón interno (colestadieno).

M_c = peso de patrón añadido, en microgramos.

M_o = peso de aceite empleado, en gramos.

Límite de detección: aproximadamente 0,01 mg/kg.

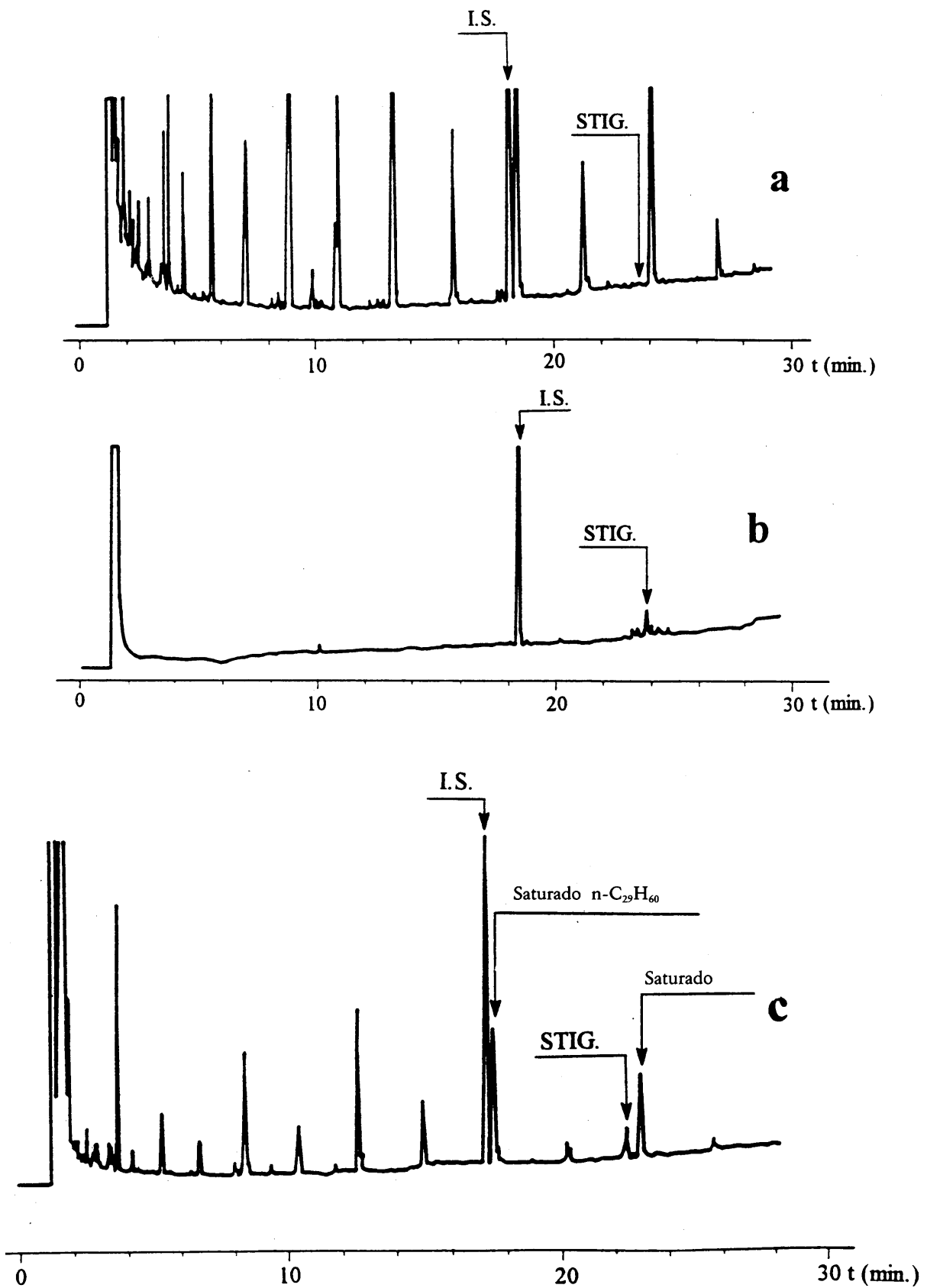
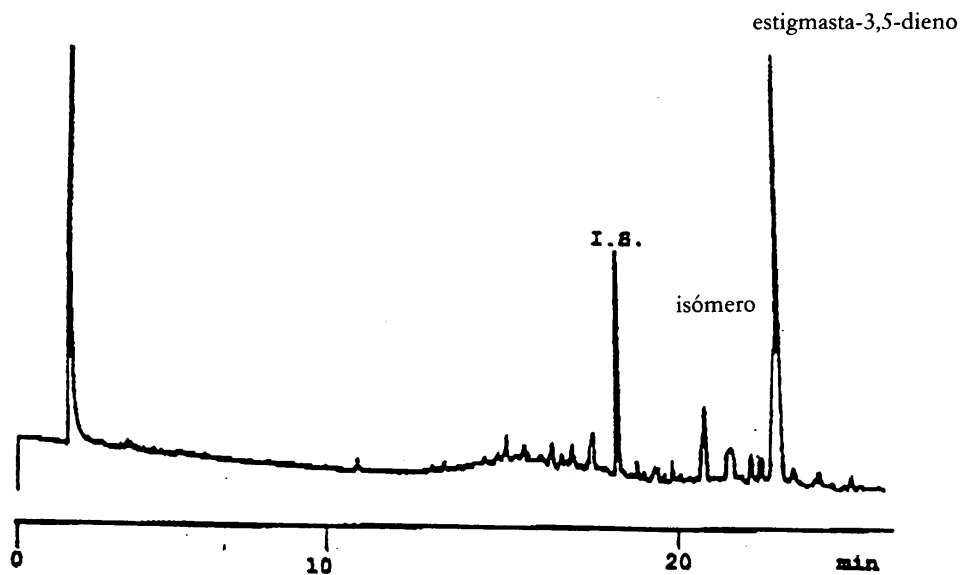
▼ M11

Figura 1

Cromatogramas procedentes del análisis de muestras de aceite de oliva en columna capilar de sílice fundida (0,25 mm de diámetro interno × 25 m) recubierta con una película de 0,25 μm de grosor de 5 %-fenilmetilsilicona.

▼ M11

- Primera fracción (30 ml) de un aceite virgen marcado con el patrón.
- Segunda fracción (40 ml) de un aceite de oliva que contiene 0,10 mg/kg de estigmastadienos.
- Segunda fracción (40 ml) que incluye una pequeña proporción de la primera.

**Figura 2**

Cromatograma procedente del análisis de una muestra de aceite de oliva refinado en una columna DB-5, en el que se aprecia el isómero del estigmasta-3,5-dieno.

▼ M13*ANEXO XVIII***DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS CON ECN42 (DIFERENCIA ENTRE EL CONTENIDO TEÓRICO Y LOS DATOS OBTENIDOS POR HPLC)****1. Objeto**

Determinación de la composición de triglicéridos (TG) de los aceites de oliva, expresados en su número equivalente de carbonos (ECN) en función de las diferencias existentes entre el contenido teórico, calculado a partir de la composición de ácidos grasos, y los resultados analíticos obtenidos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

2. Campo de aplicación

La presente norma es aplicable a los aceites de oliva. El método puede utilizarse para detectar la presencia de pequeñas cantidades de aceites de semillas (ricos en ácido linoleico) en todos los tipos de aceites de oliva.

3. Principio

El contenido teórico de triglicéridos con ECN42 (calculado sobre la base de la determinación de la composición de ácidos grasos mediante GLC) y el contenido de triglicéridos con ECN42 determinado mediante HPLC se corresponden dentro de unos límites en el caso de los aceites puros. Las diferencias superiores a los valores establecidos en el Reglamento respecto a cada tipo de aceite indican que el aceite contiene aceites de semillas.

4. Método

El método para calcular el contenido teórico de triglicéridos con ECN42 y su diferencia respecto a los datos obtenidos mediante HPLC consiste esencialmente en coordinar los datos analíticos obtenidos por otros métodos. Pueden distinguirse tres fases: determinación de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases en columna capilar, cálculo de la composición teórica de triglicéridos con ECN42, y determinación de los triglicéridos con ECN42 mediante HPLC.

4.1. Aparatos

- 4.1.1. Matraces redondos de 250 y 500 ml.
- 4.1.2. Vasos de precipitados de 100 ml.
- 4.1.3. Columna de cromatografía de vidrio, de 21 mm de diámetro interior y 450 mm de longitud, con grifo y cono (hembra) normalizado en el extremo superior.
- 4.1.4. Embudos de decantación de 250 ml, con cono (macho) normalizado en el extremo inferior, para conexión con el extremo superior de la columna.
- 4.1.5. Varilla de vidrio de 600 mm de longitud.
- 4.1.6. Embudo de vidrio de 80 mm de diámetro.
- 4.1.7. Matraces aforados de 50 ml.
- 4.1.8. Matraces aforados de 20 ml.
- 4.1.9. Evaporador de rotación.
- 4.1.10. Cromatografía de líquidos de alta resolución, con control termostático de la temperatura de la columna.
- 4.1.11. Sistema de inyección de volúmenes de 10 µl.
- 4.1.12. Detector: refractómetro diferencial. La sensibilidad de toda la escala deberá ser como mínimo de 10^{-4} unidades de índice de refracción.

▼ M13

4.1.13. Columna de acero inoxidable de 250 mm de longitud y 4,5 mm de diámetro interior, rellena de partículas de sílice de 5 µm de diámetro con un 22-23 % de carbono en forma de octadecilsilano (nota 2).

4.1.14. Registrador o integrador.

4.2. Reactivos

Los reactivos deberán ser de calidad para análisis. Los disolventes de elución deberán desgasificarse y podrán reciclarse varias veces sin que ello afecte a las separaciones.

4.2.1. Éter de petróleo, 40-60 °C, grado cromatográfico.

4.2.2. Éter etílico, libre de peróxidos, recién destilado.

4.2.3. Disolvente de elución para la purificación del aceite por cromatográfica en columna: mezcla de éter de petróleo/éter etílico 87/13 (v/v).

4.2.4. Gel de sílice, 70-230 mallas, tipo Merck 7734, con contenido de agua normalizado al 5 % (p/p).

4.2.5. Lana de vidrio.

4.2.6. Acetona.

4.2.7. Acetonitrilo.

4.2.8. Disolvente de elución para HPLC: acetonitrilo + acetona (las proporciones se ajustarán para obtener la separación deseada; comenzar con una mezcla de 50:50).

4.2.9. Disolvente de solubilización: acetona.

4.2.10. Triglicéridos de referencia: pueden utilizarse triglicéridos comerciales (tripalmitina, trioleína, etc.), en cuyo caso se reflejarán en un gráfico los tiempos de retención frente al número equivalente de carbonos, o bien cromatogramas de referencia correspondientes a aceite de soja, a una mezcla de aceite de soja y aceite de oliva 30:70 y a aceite puro de oliva (véanse las notas 3 y 4 y las figuras 1, 2, 3 y 4).

4.3. Preparación de la muestra

Como pueden obtenerse falsos resultados positivos debido a la presencia de diversas sustancias que interfieren, la muestra debe someterse siempre a un proceso de purificación según el método IUPAC 2.507, relativo a la determinación de las sustancias polares en los aceites oxidados.

4.3.1. Preparación de la columna cromatográfica

Llenar la columna (4.1.3) con aproximadamente 30 ml de disolvente de elución (4.2.3); introducir un poco de lana de vidrio (4.2.5), empujándolo hasta el fondo de la columna con la varilla de vidrio (4.1.5).

Preparar en un vaso de precipitados de 100 ml una suspensión con 25 g de gel de sílice (4.2.4) en 80 ml de la mezcla de elución (4.2.3) y transferirla a la columna con ayuda de un embudo de vidrio (4.1.6).

Para realizar la transferencia total del gel de sílice a la columna, lavar el vaso de precipitados con la mezcla de elución y pasar también los líquidos de lavado a la columna.

Abrir el grifo de la columna y dejar que salga el disolvente de ella hasta que su nivel se sitúe aproximadamente 1 cm por encima del gel de sílice.

▼M13**4.3.2. Cromatografía en columna**

Pesar, con la precisión de 0,001 g, $2,5 \pm 0,1$ g de aceite previamente filtrado, homogeneizado y, en caso necesario, deshidratado, en un matraz aforado de 50 ml (4.1.7). Disolver en 20 ml aproximadamente de disolvente de elución (4.2.3). Si es necesario, calentar ligeramente para facilitar la disolución. Enfriar a temperatura ambiente y enrasar con el disolvente de elución.

Introducir con una pipeta aforada 20 ml de solución en la columna preparada como se indica en 4.3.1, abrir el grifo y hacer eluir el disolvente hasta el nivel de la capa de gel de sílice.

Eluir con 150 ml de disolvente de elución (4.2.3), regulando el flujo de disolvente a 2 ml por minuto aproximadamente (de modo que pasen a través de la columna 150 ml en 60-70 minutos).

Recoger el eluido en un matraz redondo de 250 ml (4.1.1) previamente tarado y pesado exactamente. Eliminar el disolvente a presión reducida (Rotavapor) y pesar el residuo que se utilizará en la preparación de la solución para el análisis por HPLC y en la preparación de los ésteres metílicos.

Tras pasar por la columna, debe recuperarse como mínimo un 90 % de la muestra en el caso de aceite de oliva de las categorías extravirgen, virgen y refinado ordinario, mientras que en el de los aceites lampantes y de orujo los porcentajes de recuperación no pueden ser inferiores al 80 %.

4.4. Análisis por HPLC**4.4.1. Preparación de las muestras para el análisis cromatográfico**

Preparar del siguiente modo una solución al 5 % de la muestra que vaya a analizarse: pesar $0,5 \pm 0,001$ g de la muestra en un matraz aforado de 10 ml y enrasar con el disolvente de solubilización (4.2.9).

4.4.2. Procedimiento

Instalar el sistema cromatográfico. Bombear el disolvente de elución (4.2.8) a un ritmo de 1,5 ml/mn para purgar todo el sistema. Esperar hasta que se obtenga una línea de base estable. Inyectar 10 μ l de la muestra preparada como se indica en el punto 4.3.

4.4.3. Cálculo y expresión de los resultados

Utilizar el método de normalización interna, es decir, considerar que la suma de las superficies de los picos correspondientes a los distintos triglicéridos de ECN entre 42 y 52 es igual al 100 %. Calcular el porcentaje relativo de cada triglicérido mediante la fórmula siguiente:

% de triglicérido = superficie del pico \times 100 / suma de las superficies de los picos.

El resultado se expresa con, como mínimo, dos decimales.

Nota 1: El orden de elución puede determinarse mediante el cálculo del número equivalente de carbonos, que con frecuencia viene dado por la fórmula $ECN = CN - 2n$, siendo CN el número de carbonos y n el número de enlaces dobles; puede calcularse con mayor precisión teniendo en cuenta el origen del enlace doble. Si n_o , n_l y n_{ln} son los números de enlaces dobles de los ácidos oleico, linoleico y linoléico, respectivamente, el número equivalente de carbonos puede calcularse mediante la fórmula siguiente:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

▼ **M13**

siendo d_o , d_l y d_{ln} coeficientes que pueden calcularse mediante los triglicéridos de referencia. En las condiciones que se especifican en el presente método la fórmula obtenida será similar a la siguiente:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_l) - (2,17 n_{ln})$$

Nota 2: Ejemplos: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333
Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Art 50377 o equivalente.

Nota 3: Con varios triglicéridos de referencia también es posible calcular la resolución con respecto a la trioleína:

$$\alpha = TR' / TR \text{ trioleína}$$

utilizando el tiempo de retención reducido $TR' = TR - TR \text{ disolvente}$.

La representación gráfica del $\log \alpha$ frente a f (número de enlaces dobles) permite determinar los valores de retención de todos los triglicéridos de los ácidos grasos contenidos en los triglicéridos de referencia (véase la figura 2).

Nota 4: La resolución de la columna debe permitir separar claramente el pico de la trilinoleína de los picos de los triglicéridos con un tiempo de retención próximo. La elución se prosigue hasta el pico de ECN52.

Nota 5: Para obtener un cromatograma que permita la medición correcta de las superficies de todos los picos de interés en la presente determinación, es necesario que el segundo pico correspondiente a ECN50 tenga una altura igual al 50 % de la escala completa del registrador.

4.5. **Cálculo de la composición de triglicéridos (% moles) a partir de los datos de GLC de ácidos grasos (% superficie)**

4.5.1. **Determinación de la composición de ácidos grasos**

La composición de ácidos grasos se determina con arreglo al método de cromatografía de gases de la CEE que figura en el Anexo X A del Reglamento (CEE) nº 2568/91, utilizando columna capilar. La preparación de los ésteres metílicos se realiza según el Anexo X B (solución alcohólica de metilato sódico).

4.5.2. **Ácidos grasos considerados para el cálculo**

Los glicéridos se agrupan en función de su número equivalente de carbonos (ECN), teniendo en cuenta las equivalencias que figuran a continuación entre ECN y ácidos grasos. Sólo se han considerado los ácidos grasos con 16 y 18 átomos de carbono, ya que son los únicos importantes para el aceite de oliva.

Ácido graso (AG)	Abreviatura	Peso molecular (PM)	ECN
Ácido palmítico	P	256,4	16
Ácido palmitoleico	Po	254,4	14
Ácido esteárico	S	284,5	18
Ácido oleico	O	282,5	16
Ácido linoleico	L	280,4	14
Ácido linolénico	Ln	278,4	12

▼ **M13**

4.5.3. Transformación del % superficie en moles para todos los ácidos grasos

$$\left. \begin{aligned} \text{moles P} &= \frac{\% \text{ sup. P}}{\text{PM P}} & \text{moles S} &= \frac{\% \text{ sup. S}}{\text{PM S}} & \text{moles Po} &= \frac{\% \text{ sup. Po}}{\text{PM Po}} \\ \text{moles O} &= \frac{\% \text{ sup. O}}{\text{PM O}} & \text{moles L} &= \frac{\% \text{ sup. L}}{\text{PM L}} & \text{moles Ln} &= \frac{\% \text{ sup. Ln}}{\text{PM Ln}} \end{aligned} \right\} (1)$$

4.5.4. Normalización al 100 % de los ácidos grasos

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles P (1,2,3)} &= \frac{\text{moles P} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ moles S (1,2,3)} &= \frac{\text{moles S} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ moles Po (1,2,3)} &= \frac{\text{moles Po} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ moles O (1,2,3)} &= \frac{\text{moles O} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ moles L (1,2,3)} &= \frac{\text{moles L} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ moles Ln (1,2,3)} &= \frac{\text{moles Ln} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \end{aligned} \right\} (2)$$

El resultado proporciona el porcentaje de cada ácido graso en % moles en todas las posiciones (1, 2 y 3) de los TG.

A continuación se calculan las sumas de los ácidos grasos saturados (AGS) P y S y de los ácidos grasos insaturados (AGI) Po, O, L y Ln:

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles AGS} &= \% \text{ moles P} + \% \text{ moles S} \\ \% \text{ moles AGI} &= 100 - \% \text{ moles AGS.} \end{aligned} \right\} (3)$$

4.5.5. Cálculo de la composición de los ácidos grasos en las posiciones 2 y 1-3 de los TG

Los ácidos grasos se distribuyen en tres grupos del siguiente modo: dos idénticos para las posiciones 1 y 3 y uno para la posición 2, con coeficientes diferentes para los ácidos saturados (P y S) y los insaturados (Po, O, L y Ln).

4.5.5.1. Ácidos grasos saturados en la posición 2 [P(2) y S(2)]

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles P(2)} &= \% \text{ moles P (1,2,3)} * 0,06 \\ \% \text{ moles S(2)} &= \% \text{ moles S (1,2,3)} * 0,06 \end{aligned} \right\} (4)$$

▼ **M13**

4.5.5.2. Ácidos grasos insaturados en la posición 2 [Po(2), O(2), L(2) y Ln(2)]

$$\begin{aligned}
 \% \text{ moles Po}(2) &= \frac{\% \text{ moles Po}(1, 2, 3)}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P}(2) - \% \text{ moles S}(2)] \\
 \% \text{ moles O}(2) &= \frac{\% \text{ moles O}(1, 2, 3)}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P}(2) - \% \text{ moles S}(2)] \\
 \% \text{ moles L}(2) &= \frac{\% \text{ moles L}(1, 2, 3)}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P}(2) - \% \text{ moles S}(2)] \\
 \% \text{ moles Ln}(2) &= \frac{\% \text{ moles Ln}(1, 2, 3)}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P}(2) - \% \text{ moles S}(2)]
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

4.5.5.3. Ácidos grasos en las posiciones 1 y 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3) O(1,3), L(1,3) y Ln(1,3)]

$$\begin{aligned}
 \% \text{ moles P}(1, 3) &= \frac{\% \text{ moles P}(1, 2, 3) - \% \text{ moles P}(2)}{2} + \% \text{ moles P}(1, 2, 3) \\
 \% \text{ moles S}(1, 3) &= \frac{\% \text{ moles S}(1, 2, 3) - \% \text{ moles S}(2)}{2} + \% \text{ moles S}(1, 2, 3) \\
 \% \text{ moles Po}(1, 3) &= \frac{\% \text{ moles Po}(1, 2, 3) - \% \text{ moles Po}(2)}{2} + \% \text{ moles Po}(1, 2, 3) \\
 \% \text{ moles O}(1, 3) &= \frac{\% \text{ moles O}(1, 2, 3) - \% \text{ moles O}(2)}{2} + \% \text{ moles O}(1, 2, 3) \\
 \% \text{ moles L}(1, 3) &= \frac{\% \text{ moles L}(1, 2, 3) - \% \text{ moles L}(2)}{2} + \% \text{ moles L}(1, 2, 3) \\
 \% \text{ moles Ln}(1, 3) &= \frac{\% \text{ moles Ln}(1, 2, 3) - \% \text{ moles Ln}(2)}{2} + \% \text{ moles Ln}(1, 2, 3)
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

4.5.6. Cálculo de los triglicéridos

4.5.6.1. TG con un ácido graso (AAA; en este caso, LLL, PoPoPo)

$$\% \text{ moles AAA} = \frac{\% \text{ moles A}(1, 3) * \% \text{ moles A}(2) * \% \text{ moles A}(1, 3)}{10000}
 \tag{7}$$

4.5.6.2. TG con dos ácidos grasos (AAB; en este caso, PoPoL, PoLL)

$$\begin{aligned}
 \% \text{ moles AAB} &= \frac{\% \text{ moles A}(1, 3) * \% \text{ moles A}(2) * \% \text{ moles B}(1, 3) * 2}{10000} \\
 \% \text{ moles ABA} &= \frac{\% \text{ moles A}(1, 3) * \% \text{ moles B}(2) * \% \text{ moles A}(1, 3)}{10000}
 \end{aligned}
 \tag{8}$$

▼ **M13**

4.5.6.3. TG con tres ácidos grasos diferentes (ABC; en este caso, OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln)

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles ABC} &= \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles B(2)} * \% \text{ moles C(1,3)} * 2}{10000} \\ \% \text{ moles BCA} &= \frac{\% \text{ moles B(1,3)} * \% \text{ moles C(2)} * \% \text{ moles A(1,3)} * 2}{10000} \\ \% \text{ moles CAB} &= \frac{\% \text{ moles C(1,3)} * \% \text{ moles A(2)} * \% \text{ moles B(1,3)} * 2}{10000} \end{aligned} \right\} (9)$$

4.5.6.4. Triglicéridos con ECN42

Los triglicéridos siguientes con ECN42 se calculan según las ecuaciones 7, 8 y 9, por orden previsto de elución en HPLC (normalmente sólo tres picos).

LLL

PoLL e isómero de posición LPoL

OLLn e isómeros de posición OLnL y LnOL

PoPoL e isómero de posición PoLPo

PoOLn e isómeros de posición OPoLn y OLnPo

PLLn e isómeros de posición LLnP y LnPL

PoPoPo

SLnLn e isómero de posición LnSLn

PPoLn e isómeros de posición PLnPo y PoPLn

Los triglicéridos con ECN42 se obtienen mediante la suma de los nueve triglicéridos, incluidos sus isómeros de posición. El resultado se expresa con, como mínimo, dos decimales.

5. Evaluación de los resultados

Se comparan el contenido teórico calculado y el determinado por HPLC. Si la diferencia entre los datos de HPLC y los datos teóricos es superior al valor establecido para la categoría correspondiente de aceite en el Reglamento, la muestra contiene aceite de semillas.

Nota: Los resultados se expresan con una cifra decimal.

6. Ejemplo (los números hacen referencia a las secciones del texto del método)

4.5.1. Cálculo del porcentaje de moles de los ácidos grasos a partir de los datos obtenidos mediante GLC (% superficie)

Los datos siguientes de la composición de ácidos grasos se obtienen mediante GLC:

AG PM	P 256,4	S 284,5	Po 254,4	O 282,5	L 280,4	Ln 278,4
% sup.	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M13**

4.5.3. Transformación del % superficie en moles para todos los ácidos grasos

$$\text{moles P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles P} \quad \text{Véase fórmula (1)}$$

$$\text{moles S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moles S} \quad \text{Véase fórmula (1)}$$

$$\text{moles Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moles Po} \quad \text{Véase fórmula (1)}$$

$$\text{moles O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles O} \quad \text{Véase fórmula (1)}$$

$$\text{moles L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles L} \quad \text{Véase fórmula (1)}$$

$$\text{moles Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ moles Ln} \quad \text{Véase fórmula (1)}$$

$$\text{Total} = 0,35822 \text{ moles TG}$$

4.5.4. Normalización al 100 % de los ácidos grasos

$$\% \text{ moles P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moles P} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 10,888 \% \quad \text{Véase fórmula (2)}$$

$$\% \text{ moles S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moles S} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 2,944 \% \quad \text{Véase fórmula (2)}$$

$$\% \text{ moles Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moles Po} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,097 \% \quad \text{Véase fórmula (2)}$$

$$\% \text{ moles O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moles O} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 74,113 \% \quad \text{Véase fórmula (2)}$$

$$\% \text{ moles L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moles L} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 9,956 \% \quad \text{Véase fórmula (2)}$$

$$\% \text{ moles Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moles Ln} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,003 \% \quad \text{Véase fórmula (2)}$$

$$\text{Total \% moles} = 100,0 \%$$

Suma de los ácidos grasos saturados e insaturados en las posiciones 1, 2 y 3 de los TG:

$$\% \text{ moles AGS} = 10,888 \% + 2,944 \% = 13,831 \% \quad \text{Véase fórmula (3)}$$

$$\% \text{ moles AGI} = 100,000 \% - 13,831 \% = 86,169 \% \quad \text{Véase fórmula (3)}$$

4.5.5. Cálculo de la composición de ácidos grasos en las posiciones 2 y 1-3 de los TG

4.5.5.1. Ácidos grasos saturados en la posición 2 [P(2) y S(2)]

$$\% \text{ moles P(2)} = 10,888 \% * 0,06 = 0,653 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (4)}$$

$$\% \text{ moles S(2)} = 2,944 \% * 0,06 = 0,177 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (4)}$$

▼ **M13**

4.5.5.2. Ácidos grasos insaturados en las posiciones 1 y 3 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) y Ln(1,3)]

$$\% \text{ moles Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 1,263 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (5)}$$

$$\% \text{ moles O(2)} = \frac{74,113 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 85,295 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (5)}$$

$$\% \text{ moles L(2)} = \frac{9,956 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 11,458 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (5)}$$

$$\% \text{ moles Ln(2)} = \frac{1,003 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 1,154 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (5)}$$

4.5.5.3. Ácidos grasos en las posiciones 1 y 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) y Ln(1,3)]

$$\% \text{ moles P(1,3)} = \frac{10,888 - 0,659}{2} 10,888 = 16,005 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

$$\% \text{ moles S(1,3)} = \frac{2,944 - 0,177}{2} 2,944 = 4,327 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

$$\% \text{ moles Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,263}{2} 1,097 = 1,015 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

$$\% \text{ moles O(1,3)} = \frac{74,113 - 85,295}{2} 74,113 = 68,522 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

$$\% \text{ moles L(1,3)} = \frac{9,956 - 11,458}{2} 9,956 = 9,205 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

$$\% \text{ moles Ln(1,3)} = \frac{1,003 - 1,154}{2} 1,003 = 0,927 \% \text{ moles} \quad \text{Véase fórmula (6)}$$

4.5.6. Cálculo de triglicéridos

A partir de la composición calculada de los ácidos grasos en las posiciones sn-2 y sn-1,3 (véase el siguiente cuadro):

AG en	Posición 1 y 3	Posición 2
P	16,005 %	0,653 %
S	4,327 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,263 %
O	68,522 %	85,295 %
L	9,205 %	11,458 %
Ln	0,927 %	1,154 %
Suma	100,0 %	100,0 %

Se calculan los triglicéridos siguientes:

LLL

PoPoPo

PoLL con un isómero de posición

SLnLn con un isómero de posición

PoPoL con un isómero de posición

▼ **M13**

PPoLn con dos isómeros de posición

OLLn con dos isómeros de posición

PLLn con dos isómeros de posición

PoOLn con dos isómeros de posición

4.5.6.1. TG con un ácido graso (LLL, PoPoPo)

Véase fórmula (7)

$$\% \text{ moles LLL} = \frac{9,205 \% * 11,458 \% * 9,205 \%}{10000} = 0,09708 \text{ mol LLL}$$

$$\% \text{ moles PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 1,015 \%}{10000} = 0,00013 \text{ mol PoPoPo}$$

4.5.6.2. TG con dos ácidos grasos (PoLL, SLnLn, PoPoL)

Véase fórmula (8)

$$\% \text{ moles PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,02141$$

$$\% \text{ moles LPoL} = \frac{9,205 \% * 1,263 \% * 9,205 \%}{10000} = 0,01070$$

0,03211 mol PoLL

$$\% \text{ moles SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,327 \% * 1,154 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,00093$$

$$\% \text{ moles LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10000} = 0,00002$$

0,00095 mol SLnLn

$$\% \text{ moles PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,00236$$

$$\% \text{ moles PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 1,015 \%}{10000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

4.5.6.3. TG con tres ácidos grasos diferentes (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)

Véase fórmula (9)

$$\% \text{ moles PPOLn} = \frac{16,005 \% * 1,263 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,00375$$

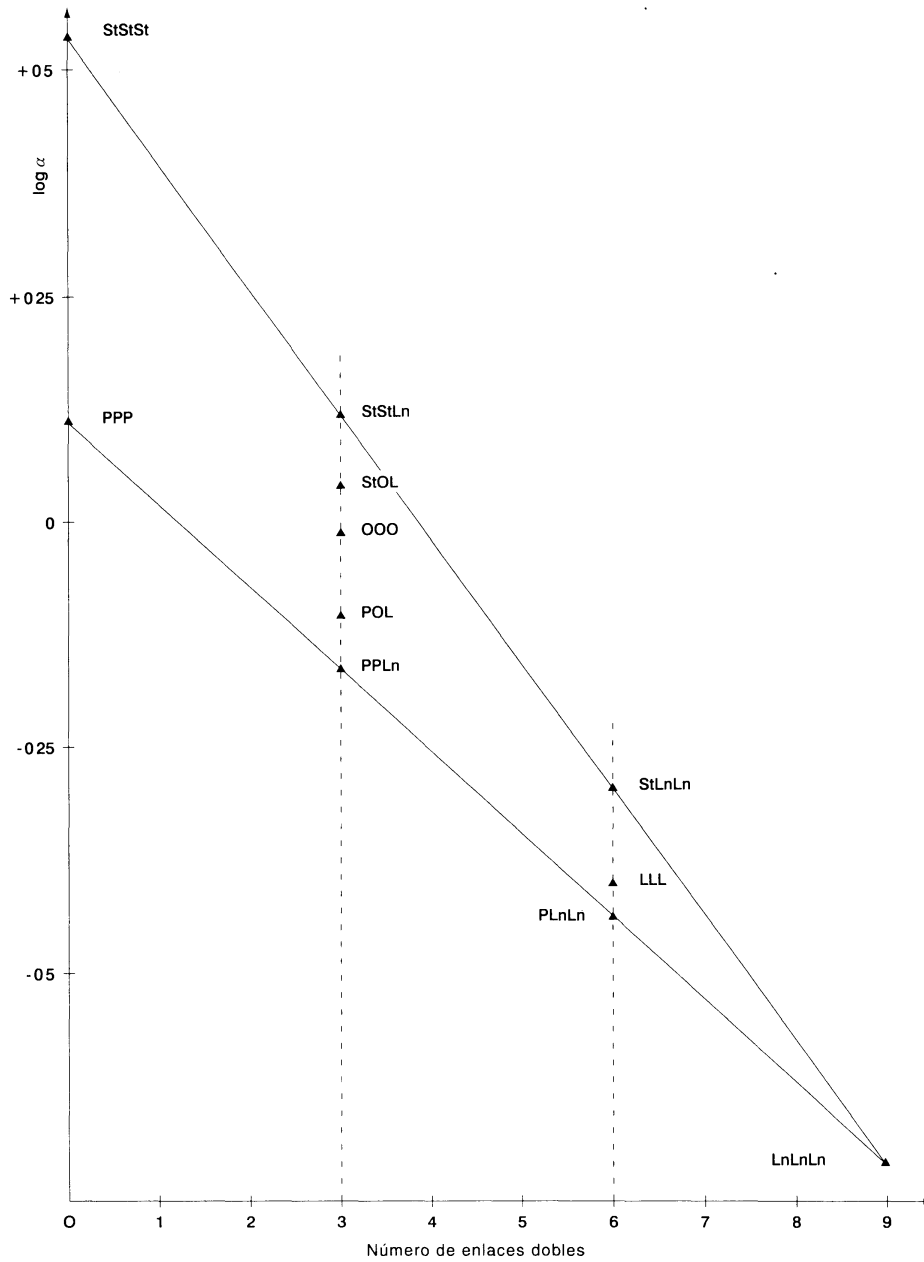
$$\% \text{ moles LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10000} = 0,00012$$

$$\% \text{ moles PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10000} = 0,00375$$

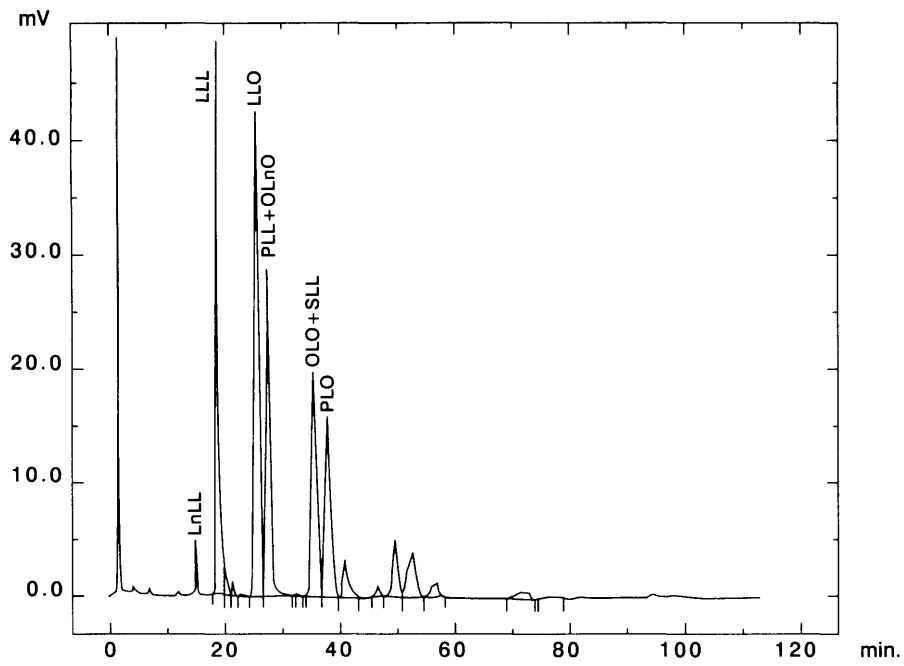
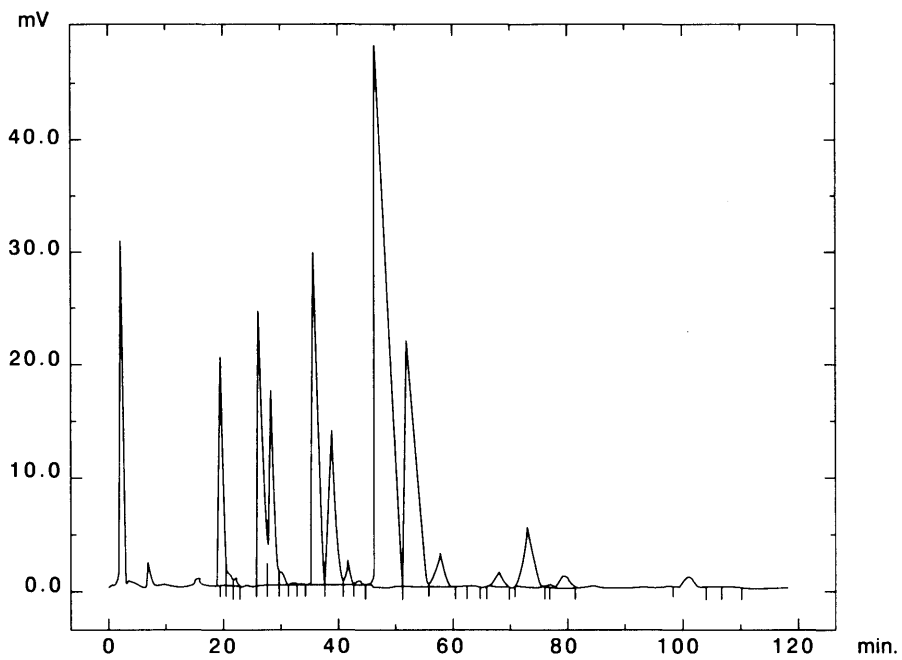
0,00762 mol PPOLn

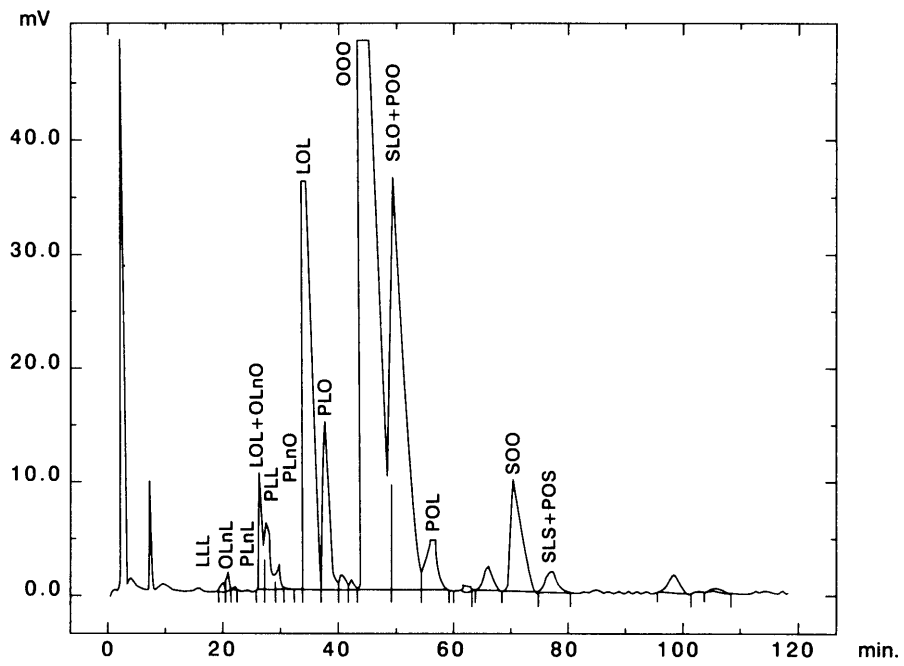
▼ M13

$$\begin{aligned}
\% \text{ moles OLLn} &= \frac{68,522 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10000} &= & 0,14577 \\
\% \text{ moles LnOL} &= \frac{0,927 \% * 85,295 \% * 9,205 \% * 2}{10000} &= & 0,14577 \\
\% \text{ moles LLnO} &= \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 68,522 \% * 2}{10000} &= & 0,14577 \\
&&&& 0,43671 \text{ mol OLLn} \\
\% \text{ moles PLLn} &= \frac{16,005 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10000} &= & 0,03400 \\
\% \text{ moles LnPL} &= \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,205 \% * 2}{10000} &= & 0,00111 \\
\% \text{ moles LLnP} &= \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10000} &= & 0,03400 \\
&&&& 0,06911 \text{ mol PLLn} \\
\% \text{ moles PoOLn} &= \frac{1,015 \% * 85,295 \% * 0,927 \% * 2}{10000} &= & \\
&&&& 0,01605 \\
\% \text{ moles LnPoO} &= \frac{0,927 \% * 1,263 \% * 68,522 \% * 2}{10000} &= & 0,01605 \\
\% \text{ moles OLnPo} &= \frac{68,522 \% * 1,154 \% * 1,015 \% * 2}{10000} &= & 0,01605 \\
&&&& 0,04815 \text{ mol PoOLn} \\
&&&& \text{ECN42} = 0,69540 \text{ mol TG}
\end{aligned}$$

▼ **M14****Figura 1:** Representación gráfica del log alfa frente a f (número de enlaces dobles)

Nota: La: ácido laúrico; My: ácido mirístico; P: ácido palmítico; St: ácido este-rárico; O: ácido oleico; L: ácido linoleico; Ln: ácido linoléico.

▼ M14Figura 2: *aceite de soja*Figura 3: *aceite de soja/aceite de oliva 30/70*

▼ M14Figura 4: *aceite de oliva*

▼ **M19***ANEXO XIX***DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON COLUMNA CAPILAR****1. OBJETO**

El presente método describe un procedimiento para la determinación del contenido de alcoholes alifáticos en las materias grasas, expresado como contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos analizados y como contenido total.

2. PRINCIPIO

Saponificación de la materia grasa, a la que se habrá añadido 1-eicosanol como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico; a continuación, extracción del insaponificable con éter etílico. Separación de la fracción alcohólica del insaponificable mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica; los alcoholes recuperados del gel de sílice se transforman en trimetilsililéteres y se analizan mediante cromatografía de gases con columna capilar.

3. EQUIPO

- 3.1. Matraz de 250 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
- 3.2. Embudos de decantación de 500 ml.
- 3.3. Matraces de 250 ml.
- 3.4. Equipo completo de cromatografía en capa fina (fase sólida), con placas de vidrio de 20 × 20 cm.
- 3.5. Lámpara ultravioleta de una longitud de onda de 366 o 254 nm.
- 3.6. Microjeringas de 100 y 500 µl.
- 3.7. Embudo cilíndrico filtrante con filtro poroso G3 (porosidad 15-40 µm), de 2 cm de diámetro y 5 cm de altura, aproximadamente, con un dispositivo adecuado para la filtración en vacío y una junta esmerilada macho 12/21.
- 3.8. Matraz cónico para vacío de 50 ml, con junta esmerilada hembra 12/21 acoplable al embudo filtrante (3.7).
- 3.9. Tubo de 10 ml de fondo cónico con tapón hermético.
- 3.10. Cromatógrafo de gases que pueda funcionar con columna capilar, provisto de un sistema de fraccionamiento, formado por:
 - 3.10.1. Horno termostático para la columna, que pueda mantener la temperatura deseada con precisión aproximada de 1 °C.
 - 3.10.2. Inyector termorregulable con elemento vaporizador de vidrio persilanizado.
 - 3.10.3. Detector de ionización de llama y convertidor-amplificador.
 - 3.10.4. Registrador-integrador que pueda funcionar con un convertidor-amplificador, con un tiempo de respuesta no superior a 1 segundo y con velocidad de papel variable.
- 3.11. Columna capilar de vidrio o sílice fundida, de 20 a 30 m de longitud y de 0,25 a 0,32 mm de diámetro interior, recubierta interiormente de líquido SE-52, SE-54 o equivalente, con un espesor uniforme que oscile entre 0,10 y 0,30 µm.
- 3.12. Microjeringa de 10 µl para cromatografía de gases, con aguja endurecida.
- 3.13. Balanza de precisión con sensibilidad de 1 mg e indicación de 0,1 mg.

▼ M19

4. REACTIVOS

- 4.1. Hidróxido potásico en solución etanólica aproximadamente 2 N: disolver, enfriando al mismo tiempo, 130 g de hidróxido potásico (título mínimo del 85 %) en 200 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol. Conservar la solución en botellas de vidrio opaco bien cerradas.
- 4.2. Éter etílico de calidad para análisis.
- 4.3. Sulfato sódico anhidro de calidad para análisis.
- 4.4. Placas de vidrio recubiertas con gel de sílice, sin indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor (disponibles en el comercio ya preparadas para el uso).
- 4.5. Hidróxido potásico en solución etanólica 0,2 N: disolver 13 g de hidróxido potásico en 20 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol.
- 4.6. Benceno para cromatografía (5.2.2).
- 4.7. Acetona para cromatografía (5.2.2).
- 4.8. Hexano para cromatografía (5.2.2).
- 4.9. Éter etílico para cromatografía (5.2.2).
- 4.10. Cloroformo de calidad para análisis.
- 4.11. Solución de referencia para cromatografía en capa fina: colesterol o fitosterol, solución al 0,5 % en cloroformo.
- 4.12. Solución de 2,7-diclorofluoresceína al 0,2 % en etanol; para hacerla ligeramente básica se añaden algunas gotas de solución alcohólica 2 N de hidróxido potásico.
- 4.13. Piridina anhidra para cromatografía.
- 4.14. Hexametildisilazano.
- 4.15. Trimetilclorosilano.
- 4.16. Solución patrón de trimetilsiléteres de los alcoholes alifáticos de C₂₀ a C₂₈; debe prepararse en el momento de utilización a partir de mezclas de alcoholes puros.
- 4.17. 1-eicosanol, solución al 0,1 % (m/v) en cloroformo (patrón interno).
- 4.18. Gas portador: hidrógeno o helio puro, de calidad para cromatografía de gases.
- 4.19. Gas auxiliar: nitrógeno puro, de calidad para cromatografía de gases.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. **Preparación del insaponificable**

- 5.1.1. Con la microjeringa de 500 µl, introducir en el matraz de 250 ml un volumen de solución de 1-eicosanol al 0,1 % en cloroformo (4.17) que contenga una cantidad de 1-eicosanol correspondiente al 10 % aproximadamente del contenido de alcoholes alifáticos en la alícuota de la muestra para la determinación. Por ejemplo, para 5 g de muestra, añadir 250 µl de la solución de 1-eicosanol al 0,1 %, si se trata de aceite de oliva, y 1 500 µl si se trata de aceite de orujo de oliva.

Evaporar en corriente de nitrógeno hasta sequedad y, a continuación, pesar con precisión, en el mismo matraz, 5 g de muestra seca y filtrada.

▼ **M19**

- 5.1.2. Añadir 50 ml de solución etanólica de hidróxido potásico 2 N, poner en funcionamiento el refrigerante de reflujo y calentar al baño María con ligera ebullición, agitando enérgica e ininterrumpidamente hasta que se produzca la saponificación (la solución se vuelve límpida). Calentar durante 20 minutos más y, a continuación, añadir 50 ml de agua destilada por la parte superior del refrigerante; separar éste y enfriar el matraz a 30 °C aproximadamente.
- 5.1.3. Pasar cuantitativamente el contenido del matraz a una ampolla de decantación de 500 ml, mediante varios lavados con un total de unos 50 ml de agua destilada. Agregar 80 ml aproximadamente de éter etílico, agitar enérgicamente durante unos 30 segundos y dejar reposar hasta la completa separación de las fases (nota 1).

Separar la fase acuosa inferior pasándola a una segunda ampolla de decantación. Efectuar otras dos extracciones de la fase acuosa por el mismo procedimiento, utilizando cada vez de 60 a 70 ml de éter etílico.

Nota 1: Las posibles emulsiones pueden eliminarse añadiendo una pequeña cantidad de alcohol etílico o metílico con un pulverizador.

- 5.1.4. Reunir las fracciones etéreas en una misma ampolla de decantación y lavarlas con agua destilada (50 ml cada vez) hasta que el agua de lavado presente reacción neutra.

Una vez eliminada el agua de lavado, desecar con sulfato sódico anhidro y filtrar sobre sulfato sódico anhidro a un matraz de 250 ml previamente pesado, lavando la ampolla y el filtro con pequeñas cantidades de éter etílico.

- 5.1.5. Destilar el éter hasta que quede una pequeña cantidad; a continuación, secar en vacío ligero o en corriente de nitrógeno y completar el secado en estufa a 100 °C durante 15 minutos aproximadamente; dejar enfriar en un desecador y pesar.

5.2. Separación de la fracción alcohólica

- 5.2.1. Preparación de las placas básicas: sumergir completamente las placas con gel de sílice (4.4) en la solución etanólica 0,2 N de hidróxido potásico (4.5) durante 10 segundos; dejarlas en reposo; secarlas bien bajo campana de aspiración durante dos horas y, por último, ponerlas en estufa a 100 °C durante una hora.

Sacarlas de la estufa y conservarlas en un desecador de cloruro de calcio hasta el momento del uso (las placas sometidas a este tratamiento deben utilizarse en el plazo de quince días como máximo).

Nota 2: Si se utilizan placas básicas de gel de sílice para la separación de la fracción alcohólica, ya no es necesario tratar el insaponificable con alúmina. De esta manera, se retienen en la línea de aplicación todos los componentes de naturaleza ácida (ácidos grasos y otros). Así se obtiene la banda de alcoholes alifáticos y terpénicos netamente separada de la banda de esteroides.

- 5.2.2. Introducir en la cubeta de desarrollo de las placas una mezcla de hexano-éter etílico 65:35 (v/v) hasta una altura de 1 cm aproximadamente ⁽¹⁾.

Cerrar la cubeta con su correspondiente tapa y dejar transcurrir media hora como mínimo, de forma que se alcance el equilibrio líquido-vapor. En las caras interiores de la cubeta pueden colocarse tiras de papel de filtro que se sumerjan en el eluyente: de esta manera el tiempo de desarrollo se reduce casi un tercio y se obtiene una elución más uniforme y regular de los componentes.

⁽¹⁾ En ciertos casos particulares, para obtener una buena separación de las bandas es necesario emplear como eluyente la mezcla benceno-acetona 95/5 (v/v).

▼ M19

Nota 3: A fin de que las condiciones de elución sean perfectamente reproducibles, la mezcla debe cambiarse para cada prueba.

- 5.2.3. Preparar una solución de insaponificable (5.1.5) en cloroformo al 5 % aproximadamente y, con la microjeringa de 100 µl, depositar 0,3 ml de dicha solución en la placa cromatográfica (5.2.1) a unos 2 cm de uno de los bordes, formando una línea continua lo más fina y uniforme posible. A la altura de la línea de aplicación se depositan, en un extremo de la placa, de 2 a 3 µl de la solución de referencia de alcoholes alifáticos (4.11) para poder identificar la banda de alcoholes alifáticos en el revelado.
- 5.2.4. Introducir la placa en la cubeta de desarrollo, preparada como se indica en el punto 5.2.2. Deberá mantenerse una temperatura de entre 15 y 20 °C. Tapar inmediatamente la cubeta con su tapa y dejar que se produzca la elución hasta que el frente del disolvente se sitúe a 1 cm aproximadamente del borde superior de la placa.

Sacar la placa de la cubeta y evaporar el disolvente en una corriente de aire caliente o bien dejando la placa bajo campana de aspiración un breve momento.

- 5.2.5. Pulverizar la placa ligera y uniformemente con la solución de 2,7-diclorofluoresceína. Identificar la banda de alcoholes alifáticos mediante comparación con la mancha obtenida con la solución de referencia; marcar con lápiz negro el conjunto de la banda de alcoholes alifáticos y de la banda inmediatamente superior correspondiente a los alcoholes triterpénicos.

Nota 4: La prescripción de recoger el conjunto de la banda de alcoholes alifáticos y de la banda de alcoholes terpénicos responde al hecho de que ésta, en las condiciones del método, incluye cantidades significativas de alcoholes alifáticos.

- 5.2.6. Rascar con una espátula metálica el gel de sílice contenido en el área delimitada. Introducir el material obtenido, finamente triturado, en el embudo filtrante (3.7); añadir 10 ml de cloroformo caliente, mezclar cuidadosamente con la espátula metálica y filtrar en vacío, recogiendo el filtrado en el matraz cónico (3.8) acoplado al embudo filtrante.

Lavar el residuo en el embudo tres veces con éter etílico (empleando cada vez unos 10 ml), recogiendo cada vez el filtrado en el mismo matraz cónico acoplado al embudo. Evaporar el filtrado hasta obtener un volumen aproximado de 4 a 5 ml, transvasar la solución residual al tubo de 10 ml (3.9) previamente pesado, evaporar hasta sequedad mediante calentamiento suave en corriente ligera de nitrógeno, recoger con algunas gotas de acetona, evaporar de nuevo hasta sequedad, introducir en estufa a 105 °C durante unos 10 minutos, dejar enfriar en el desecador y pesar.

El residuo que queda en el tubo de ensayo está formado por la fracción alcohólica.

5.3. Preparación de los trimetilsililéteres

- 5.3.1. Agregar al tubo que contiene la fracción de alcoholes el reactivo de silanización formado por una mezcla de piridina, hexametildisilazano y trimetilclorosilano 9:3:1 (V/V/V) (nota 5), a razón de 50 µl por miligramo de alcoholes evitando toda absorción de humedad (nota 6).

▼ **M19**

Nota 5: Existen soluciones comerciales listas para el uso. Además, también existen otros reactivos de silanización, como la *bis-trimetilsilil trifluoroacetamida* + 1 % de trimetilclorosilano, que se diluye en el mismo volumen de piridina anhidra.

Nota 6: La eventual formación de una ligera opalescencia es normal y no ocasiona ninguna interferencia. La formación de una floculación blanca o la aparición de una coloración rosa son indicios de presencia de humedad o de deterioro del reactivo. En este caso deberá repetirse la prueba.

- 5.3.2. Tapar el tubo y agitar cuidadosamente (sin invertir) hasta la total disolución de los alcoholes. Dejar reposar al menos un cuarto de hora a temperatura ambiente y centrifugar durante algunos minutos; la solución limpia queda lista para el análisis mediante cromatografía de gases.

5.4. **Cromatografía de gases**

- 5.4.1. Operaciones preliminares: acondicionamiento de la columna

- 5.4.1.1. Colocar la columna en el cromatógrafo de gases, uniendo el extremo de entrada al inyector conectado al sistema de fraccionamiento y el extremo de salida al detector. Efectuar los controles generales del equipo de cromatografía de gases (estanqueidad de los circuitos de gases, eficacia del detector, eficacia del sistema de fraccionamiento y del sistema de registro, etc.).

- 5.4.1.2. Si la columna se utiliza por vez primera, es conveniente acondicionarla previamente. Hacer pasar un ligero flujo de gas a través de la columna, encender después el equipo de cromatografía de gases e iniciar un calentamiento gradual hasta alcanzar una temperatura superior al menos en 20 °C a la temperatura de trabajo (nota 7). Mantener dicha temperatura durante 2 horas como mínimo; a continuación, poner el equipo completo en condiciones de funcionamiento [regulación del flujo de gases y del fraccionamiento (*split*), encendido de la llama, conexión con el registrador electrónico, regulación de la temperatura del horno, del detector y del inyector, etc.] y registrar la señal con una sensibilidad al menos dos veces superior a la prevista para el análisis. El trazado de la línea de base debe ser lineal, estar exento de picos de cualquier tipo y no debe presentar deriva. Una deriva rectilínea negativa indica que las conexiones de la columna no son totalmente estancas; una deriva positiva indica que el acondicionamiento de la columna es insuficiente.

Nota 7: La temperatura de acondicionamiento debe ser siempre inferior en, como mínimo, 20 °C a la temperatura máxima prevista para la fase estacionaria utilizada.

- 5.4.2. Elección de las condiciones de trabajo

- 5.4.2.1. Las condiciones de trabajo sugeridas son las siguientes:

— temperatura de la columna: inicialmente isoterma durante 8 minutos a 180 °C; a continuación, programar un incremento de 5 °C/minuto hasta alcanzar los 260 °C y mantener después 15 minutos a 260 °C,

— temperatura del evaporador (inyector): 280 °C,

— temperatura del detector: 290 °C,

— velocidad lineal del gas portador: helio 20 a 35 cm/s, hidrógeno 30 a 50 cm/s,

— relación de fraccionamiento (*split*): de 1/50 a 1/100,

— sensibilidad del instrumento: de 4 a 16 veces la atenuación mínima,

▼ **M19**

- sensibilidad de registro: 1 a 2 mV f.e.,
- velocidad del papel: 30 a 60 cm/hora,
- cantidad de sustancia inyectada: 0,5 a 1 µl de solución de TMSE.

Estas condiciones pueden modificarse en función de las características de la columna y del cromatógrafo, de modo que se obtengan cromatogramas que cumplan los siguientes requisitos:

- el tiempo de retención del alcohol C₂₆ debe ser de 18 ± 5 minutos,
- el pico del alcohol C₂₂ debe ser el 80 ± 20 % de la escala de fondo en el caso del aceite de oliva y el 40 ± 20 % de la escala de fondo en el caso del aceite de semillas.

5.4.2.2. Para comprobar los requisitos citados, efectuar varias inyecciones de mezclas problema de TMSE de alcoholes y ajustar las condiciones de trabajo para obtener los mejores resultados.

5.4.2.3. Los parámetros de integración de los picos deben establecerse de modo que se obtenga una evaluación correcta de las áreas de los picos tomados en consideración.

5.4.3. Realización del análisis

5.4.3.1. Con la microjeringa de 10 µl tomar 1 µl de hexano, aspirar 0,5 µl de aire y, a continuación, entre 0,5 y 1 µl de la solución problema; elevar el émbolo de la jeringa de modo que la aguja quede vacía. Introducir la aguja a través de la membrana del complejo de inyección y, después de 1 o 2 segundos, inyectar rápidamente; transcurridos unos 5 segundos, extraer la aguja lentamente.

5.4.3.2. Continuar el registro hasta la completa elución de los TMSE de los alcoholes presentes. La línea de base debe ajustarse en todo momento a las condiciones exigidas (5.4.1.2).

5.4.4. Identificación de los picos

Para la identificación de los diferentes picos se utilizan los tiempos de retención y la comparación con la mezcla de TMSE de los alcoholes alifáticos, analizada en las mismas condiciones.

La figura 1 muestra un cromatograma de la fracción alcohólica de un aceite de oliva virgen.

5.4.5. Determinación cuantitativa

5.4.5.1. Calcular las áreas de los picos del 1-eicosanol y de los alcoholes alifáticos C₂₂, C₂₄, C₂₆ y C₂₈ utilizando el integrador.

5.4.5.2. Calcular del modo siguiente el contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos, expresado en miligramos por 1 000 gramos de materia grasa:

$$\text{alcohol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

donde:

A_x = área del pico del alcohol x

A_s = área del pico del 1-eicosanol

m_s = peso de 1-eicosanol añadido, en miligramos

m = peso de la muestra tomada para la determinación, en gramos.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se expresa el contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos en miligramos por 1 000 gramos de materia grasa y su suma como «alcoholes alifáticos totales.».

▼ **M19**

APÉNDICE

Determinación de la velocidad lineal del gas

Inyectar en el cromatógrafo de gases, preparado para trabajar en condiciones normales, de 1 a 3 μl de metano (o propano) y medir el tiempo que tarda el gas en recorrer la columna, desde el momento de la inyección hasta el momento en que aparece el pico (tM).

La velocidad lineal en cm/s viene dada por L/t_M , siendo L la longitud de la columna en cm y tM el tiempo, expresado en segundos.

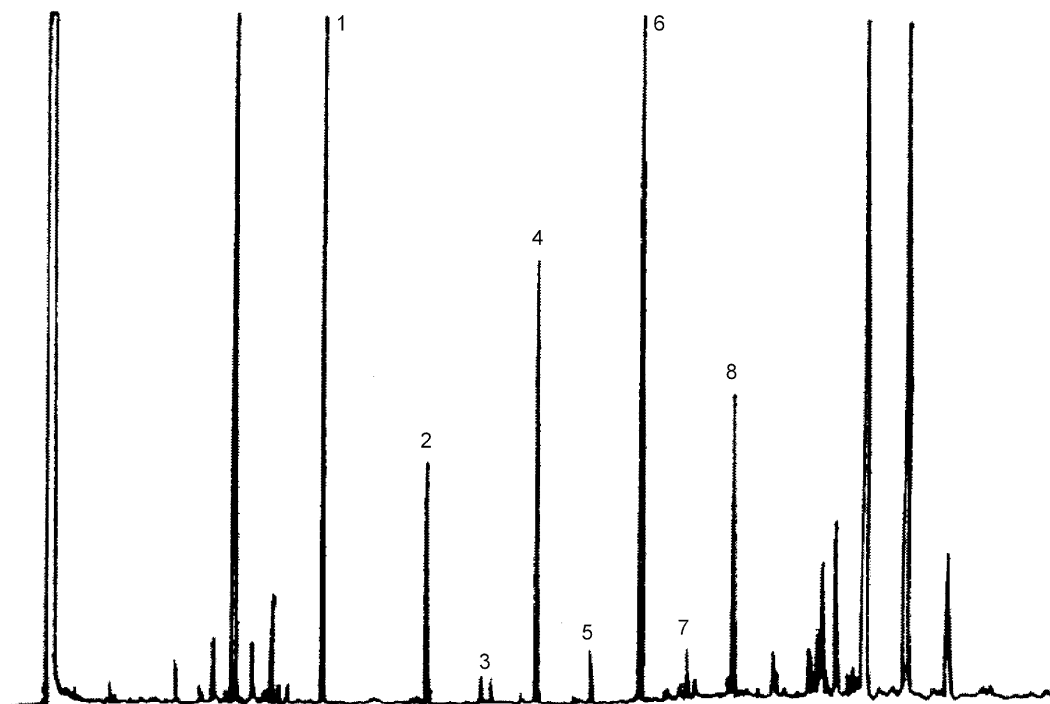


Figura 1 — Cromatograma de la fracción alcohólica de un aceite virgen

- 1 = Eicosanol
- 2 = Docosanol
- 3 = Tricosanol
- 4 = Tetracosanol
- 5 = Pentacosanol
- 6 = Hexacosanol
- 7 = Heptacosanol
- 8 = Octacosanol

▼ **M23**

ANEXO XX

Método para la determinación del contenido en ceras y en ésteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases con columna capilar

1. OBJETO

El presente método describe un procedimiento para la determinación del contenido en ceras y en ésteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos de los aceites de oliva. Las ceras y los ésteres de alquilo se separan en función del número de átomos de carbono. El método se recomienda como herramienta para distinguir entre el aceite de oliva y el aceite de orujo de oliva, y como parámetro cualitativo para los aceites de oliva vírgenes extra, ya que permite detectar las mezclas fraudulentas de aceites de oliva vírgenes extra con aceites de menor calidad, ya sean vírgenes, lampantes o desodorizados.

2. PRINCIPIO

La grasa, a la que se habrá añadido el adecuado patrón interno, se fracciona mediante cromatografía con columna de gel de sílice hidratado. La fracción eluida en primer lugar en las condiciones de ensayo (con polaridad inferior a la de los triglicéridos) se recupera y se analiza directamente mediante cromatografía de gases con columna capilar.

3. APARATOS

3.1. **Matraz Erlenmeyer de 25 ml.**

3.2. **Columna de vidrio** para cromatografía líquida, de 15 mm de diámetro interior y 30-40 cm de altura, provista de una llave adecuada.

3.3. **Cromatógrafo de gases** apto para columna capilar, provisto de un sistema de introducción directa en la columna, constituido por:

3.3.1. **Cámara termostática con programador de temperatura.**

3.3.2. **Inyector en frío** para introducción directa en la columna.

3.3.3. **Detector de ionización de llama y convertidor-amplificador.**

3.3.4. **Registrador-integrador** (nota 1) apto para funcionar con el convertidor-amplificador (3.3.3.), con tiempo de respuesta inferior o igual a un segundo y velocidad del papel variable.

Nota 1: También se pueden utilizar sistemas informatizados que prevean la obtención de los datos de la cromatografía de gases mediante ordenador.

3.3.5. **Columna capilar de sílice fundida (para el análisis de las ceras y de los ésteres metílicos y etílicos)**, de 8 a 12 m de longitud y de 0,25 a 0,32 mm de diámetro interior, con recubrimiento interno de fase líquida (nota 2) de espesor uniforme comprendido entre 0,10 y 0,30 μm .

Nota 2: Hay comercializadas fases líquidas listas para su uso, como la SE-52 o la SE-54.

3.4. **Microjeringa** para introducción directa en la columna, de 10 μl , provista de aguja cementada.

3.5. **Vibrador eléctrico.**

3.6. **Rotavapor.**

3.7. **Horno de mufla.**

3.8. Balanza **analítica** con una precisión de + 0,1 mg.

▼ M23

3.9. Cristalería normal de laboratorio.

4. REACTIVOS

4.1. **Gel de sílice** con granulometría comprendida entre 60 y 200 µm. El gel de sílice debe mantenerse un mínimo de 4 horas en el horno de mufla a 500 °C. Tras su enfriamiento, se añade un 2 % de agua respecto a la cantidad de gel de sílice utilizada. Se agita bien para homogeneizar la masa. Se mantiene en el desecador durante al menos 12 horas antes de su uso.

4.2. **n-hexano**, para cromatografía o análisis de residuos (ha de comprobarse la pureza).

ADVERTENCIA: Riesgo de inflamación de los vapores. Mantener alejado de fuentes de calor, chispas y llamas desnudas. Mantener en recipientes bien cerrados. Utilizar con la ventilación adecuada. Evitar la acumulación de vapores y eliminar toda posible causa de incendio, como calentadores o aparatos eléctricos no fabricados con material antiinflamable. Nocivo por inhalación: puede dañar las células del sistema nervioso. Evitar respirar los vapores. Utilizar, si es preciso, un aparato respirador adecuado. Evitar todo contacto con los ojos y la piel.

4.3. **Éter etílico, para cromatografía.**

ADVERTENCIA: Altamente inflamable y moderadamente tóxico. Irritante para la piel. Nocivo por inhalación. Puede dañar los ojos. Puede tener efectos retardados. Riesgo de formación de peróxidos explosivos. Riesgo de inflamación de los vapores. Mantener alejado de fuentes de calor, chispas y llamas desnudas. Mantener en recipientes bien cerrados. Utilizar con la ventilación adecuada. Evitar la acumulación de vapores y eliminar toda posible causa de incendio, como calentadores o aparatos eléctricos no fabricados con material antiinflamable. No evaporar hasta sequedad total o cuasi total. La adición de agua o de cualquier otro agente reductor adecuado puede reducir la formación de peróxidos. No ingerir. Evitar respirar los vapores. Evitar el contacto prolongado o repetido con la piel.

4.4. **n-heptano**, para cromatografía, o **isooctano**.

ADVERTENCIA: Inflamable. Nocivo por inhalación. Mantener alejado de fuentes de calor, chispas y llamas desnudas. Mantener en recipientes bien cerrados. Utilizar con la ventilación adecuada. Evitar respirar los vapores. Evitar el contacto prolongado o repetido con la piel.

4.5. **Solución patrón de araquidato de laurilo** (nota 3) al 0,05 % (m/V) en heptano (patrón interno para ceras).

Nota 3: También puede utilizarse palmitato de palmitilo, estearato de miristilo o laureato de araquidilo.

4.6. **Solución patrón de heptadecanoato metílico al 0,02 % (m/V) en heptano (patrón interno para ésteres metílicos y etílicos).**

4.7. **Sudán 1 (1-fenil-azo-2-naftol)**

▼ **M23**4.8. **Gas portador: hidrógeno o helio puro, para cromatografía de gases.**

ADVERTENCIA

Hidrógeno: altamente inflamable bajo presión. Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llamas desnudas o aparatos eléctricos no fabricados con material antiinflamable. Asegurarse de que la válvula de la bombona esté bien cerrada cuando no esté en uso. Utilizar exclusivamente con un reductor de presión. Destensar el muelle del reductor antes de abrir la válvula de la bombona. Mantenerse alejado del orificio de salida del gas de la bombona al abrir la válvula. Utilizar con la ventilación adecuada. No transferir el hidrógeno de una bombona a otra. No mezclar gases en la bombona. Asegurarse de que las bombonas no puedan caerse. Mantener las bombonas alejadas del sol o de fuentes de calor. No almacenar en ambiente corrosivo. No utilizar bombonas dañadas o sin etiquetar.

Helio: gas comprimido a alta presión. Reduce el oxígeno disponible para la respiración. Mantener cerrada la bombona. Utilizar con la ventilación adecuada. No entrar en los locales de almacenaje si no están bien ventilados. Utilizar exclusivamente con un reductor de presión. Destensar el muelle del reductor antes de abrir la válvula de la bombona. No transferir el gas de una bombona a otra. Asegurarse de que las bombonas no puedan caerse. Mantenerse alejado del orificio de salida del gas de la bombona al abrir la válvula. Mantener las bombonas alejadas del sol o de fuentes de calor. No almacenar en ambiente corrosivo. No utilizar bombonas dañadas o sin etiquetar. No inhalar. Utilizar exclusivamente para usos técnicos.

4.9. **Gases auxiliares:**

— hidrógeno puro, para cromatografía de gases;

— aire puro, para cromatografía de gases.

ADVERTENCIA

Aire: gas comprimido a alta presión. Utilizar con precaución en presencia de sustancias combustibles, ya que la temperatura de autoignición de la mayoría de los compuestos orgánicos en el aire se reduce considerablemente a alta presión. Asegurarse de que la válvula de la bombona esté bien cerrada cuando no esté en uso. Utilizar exclusivamente con un reductor de presión. Destensar el muelle del reductor antes de abrir la válvula de la bombona. Mantenerse alejado del orificio de salida del gas de la bombona al abrir la válvula. No transferir el gas de una bombona a otra. No mezclar gases en la bombona. Asegurarse de que las bombonas no puedan caerse. Mantener las bombonas alejadas del sol o de fuentes de calor. No almacenar en ambiente corrosivo. No utilizar bombonas dañadas o sin etiquetar. No inhalar ni utilizar para aparatos respiradores el aire destinado a usos técnicos.

5. **PROCEDIMIENTO**5.1. **Preparación de la columna cromatográfica**

Proceder a la suspensión de 15 g de gel de sílice (4.1.) en el n-hexano (4.2.) e introducirlo en la columna (3.2.). Permitir la sedimentación espontánea. Completar la sedimentación con ayuda de un vibrador eléctrico (3.5.) para obtener una capa cromatográfica más homogénea. Hacer pasar 30 ml de n-hexano para eliminar posibles impurezas. Pesar exactamente con la balanza de precisión (3.8.) 500 mg de la muestra con el matraz Erlenmeyer de 25 ml (3.1.). Añadir la cantidad adecuada de patrón interno (4.5.) en función del contenido de ceras previsto. Por ejemplo, añadir 0,1 mg de araquidato de laurilo si se trata de aceite de oliva y entre 0,25 y 0,5 mg si se trata de aceite de orujo, y 0,05 de heptadecanoato metílico en el caso de los aceites de oliva (4.6.).

▼ **M23**

Transferir la muestra así preparada a la columna cromatográfica con ayuda de dos porciones de 2 ml cada una de n-hexano (4.2.).

Dejar fluir el disolvente hasta 1 mm por encima del nivel superior del absorbente. Hacer pasar más n-hexano/éter etílico en una proporción de 99:1 y recoger 220 ml manteniendo un flujo aproximado de 15 gotas cada 10 segundos (**esta fracción contiene los ésteres metílicos y etílicos, y las ceras**) (notas 4 y 5).

Nota 4: La mezcla n-hexano/éter etílico (99:1) debe prepararse a diario.

Nota 5: Para controlar visualmente la correcta elución de las ceras, puede añadirse a la muestra de solución 100 µl de colorante Sudán I, al 1 %, en la mezcla de elución

El tiempo de retención del colorante se encuentra entre el de las ceras y el de los triglicéridos. Por tanto, cuando la coloración llega al fondo de la columna cromatográfica hay que suspender la elución por haberse eluido ya todas las ceras.

Evaporar las fracciones resultantes en el rotavapor (3.6.) hasta eliminar prácticamente todo el disolvente. Eliminar los 2 últimos ml del disolvente con ayuda de una corriente débil de nitrógeno. Tomar la fracción que contiene los ésteres metílicos y etílicos diluidos en 2 a 4 ml de n-heptano o isooctano.

5.2. Análisis por cromatografía de gases

5.2.1. Operaciones preliminares

Instalar la columna en el cromatógrafo de gases (3.3), conectando el terminal de entrada al sistema de la columna y el terminal de salida al detector. Efectuar los controles generales del cromatógrafo de gases (funcionamiento de los circuitos de gas, eficacia del detector y del registrador, etc.).

Si la columna se utiliza por vez primera, es conveniente acondicionarla. Hacer pasar a través de la columna una corriente ligera de gas y, a continuación, encender el cromatógrafo de gases. Calentar gradualmente hasta alcanzar, al cabo de unas cuatro horas, una temperatura de 350 °C.

Mantener esta temperatura durante al menos 2 horas; a continuación, ajustar el aparato a las condiciones de trabajo (regulación del flujo de gas, encendido de la llama, conexión con el registrador electrónico [3.3.4.], regulación de la temperatura de la cámara termostática para la columna, regulación del detector, etc.). Registrar la señal con una sensibilidad al menos 2 veces superior a la prevista para efectuar el análisis. El trazado de la línea de base deberá ser lineal, sin picos de ningún tipo ni deriva.

Una deriva rectilínea negativa indica que las conexiones de la columna no son correctas; una deriva positiva indica que la columna no ha sido acondicionada adecuadamente.

5.2.2. Elección de las condiciones operativas para las ceras y los ésteres etílicos y metílicos (nota 6)

En términos generales, las condiciones operativas serán las siguientes:

— temperatura de la columna::

20 °C/minuto 5 °C/minuto

Al inicio 80 °C (1') ————— 140 °C ————— 335 °C (20)

— temperatura del detector: 350 °C;

— cantidad inyectada: 1 µl de la solución de n-heptano (2-4 ml);

▼ M23

- gas portador: helio o hidrógeno a la velocidad lineal óptima para el gas seleccionado (ver Apéndice A);
- sensibilidad del instrumento: capaz de responder a las condiciones anteriores.

Nota 6: Por lo elevado de la temperatura final, se admite una deriva positiva que no debe ser superior al 10 % del fondo de la escala.

Estas condiciones pueden modificarse en función de las características de la columna y del cromatógrafo de gases, al objeto de obtener la separación de todas las ceras y de los ésteres etílicos y metílicos de los ácidos grasos, una resolución satisfactoria de los picos (ver figuras 2, 3 y 4) y un tiempo de retención del patrón interno araquidato de laurilo de 18 ± 3 minutos. El pico más representativo de las ceras debe medir al menos un 60 % del fondo de la escala, mientras que el patrón interno heptadecanoato metílico de los ésteres metílicos y etílicos debe alcanzar la totalidad del fondo de la escala.

Los parámetros de integración de los picos deben calcularse de modo que se logre una evaluación correcta de las áreas de los picos examinadas.

5.3. Realización del análisis

Tomar 10 µl de la solución con ayuda de la microjeringa de 10 µl; tirando del émbolo de la jeringa hasta que la aguja esté vacía. Introducir la aguja en el sistema de inyección y después de 1-2 segundos inyectar rápidamente; al cabo de unos 5 segundos, extraer lentamente la aguja.

Llevar a cabo el registro hasta la total elución de las ceras o los estigmastadienos, según la fracción analizada.

La línea de base debe satisfacer siempre las condiciones exigidas.

5.4. Identificación de los picos

La identificación de los distintos picos debe efectuarse a partir de los tiempos de retención, comparándolos con mezclas de ceras analizadas en las mismas condiciones y cuyos tiempos de retención sean conocidos. Los ésteres de alquilo se identifican a partir de mezclas de ésteres metílicos y etílicos de los principales ácidos grasos del aceite de oliva (palmítico y oleico).

La figura 1 representa un cromatograma de las ceras de un aceite de oliva virgen. Las figuras 2 y 3 representan los cromatogramas de dos aceites de oliva vírgenes extra vendidos en el comercio, uno con ésteres metílicos y etílicos y otro no. La figura 4 representa los cromatogramas de un aceite de oliva virgen extra de calidad óptima y del mismo aceite con un 20 % de aceite desodorizado.

5.5. Determinación cuantitativa de las ceras

Calcular con ayuda del integrador las áreas de los picos correspondientes al patrón interno araquidato de laurilo y a los ésteres alifáticos de C₄₀ a C₄₆.

Determinar el contenido total en ceras sumando las ceras de cada uno de los ésteres, en mg/kg de materia grasa, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Ceras, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

▼ **M23**

siendo:

A_x = área del pico de cada éster, en milímetros cuadrados;

A_s = área del pico del patrón interno araquidato de laurilo, en milímetros cuadrados;

m_s = masa del patrón interno araquidato de laurilo que se ha añadido, en miligramos;

m = masa de la muestra tomada para la determinación, en gramos.

5.5.1. *Determinación cuantitativa de los ésteres metílicos y etílicos*

Calcular con ayuda del integrador las áreas de los picos correspondientes al patrón interno heptadecanoato metílico y a los ésteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos C_{16} y C_{18} .

Determinar el contenido en cada uno de los ésteres de alquilo, en mg/kg de materia grasa, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Ésteres, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

siendo:

A_x = área del pico de cada éster C_{16} y C_{18} , en milímetros cuadrados;

A_s = área del pico del patrón interno heptadecanoato metílico, en milímetros cuadrados;

m_s = masa del patrón interno heptadecanoato metílico que se ha añadido, en miligramos;

m = masa de la muestra tomada para la determinación, en gramos.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Indicar la suma de los contenidos de las distintas ceras de C_{40} a C_{46} (*nota 7*), en mg/kg de materia grasa.

Indicar la suma de los contenidos de los ésteres metílicos y etílicos de C_{16} a C_{18} y el total de ambos.

Los resultados deben redondearse al mg/kg más próximo.

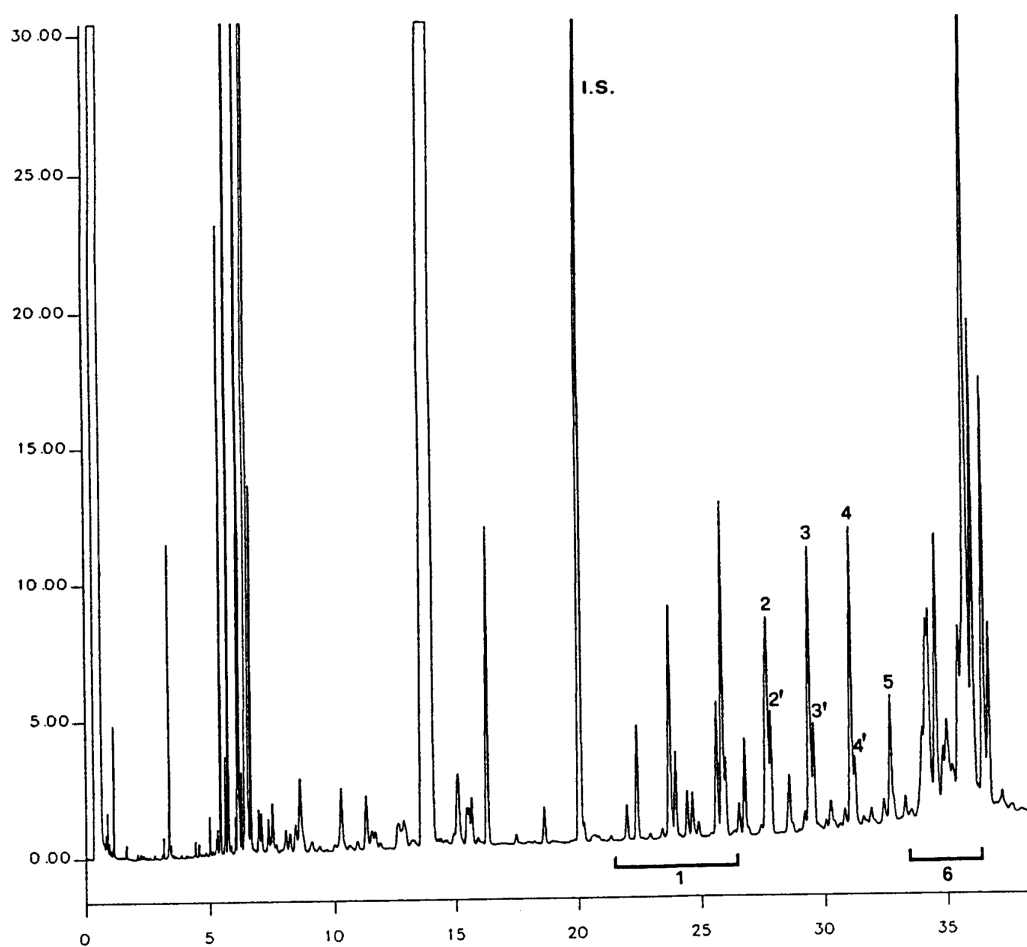
Nota 7: Los componentes que se deben cuantificar hacen referencia a los picos con un número par de carbonos, comprendidos entre los ésteres C_{40} y C_{46} , según el ejemplo del cromatograma de las ceras del aceite de oliva indicado en la figura siguiente. Si el éster C_{46} aparece dos veces, para identificarlo conviene analizar la fracción de las ceras de un aceite de orujo de oliva en que el pico C_{46} sea fácil de identificar por ser claramente predominante.

Indicar la relación entre ésteres etílicos y ésteres metílicos

▼ M23

Figura 1

Cromatograma de gas de las ceras de un aceite de oliva (1)



picos de los ésteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos con un tiempo de retención de entre 5 y 8 minutos

Leyenda:

I.S. = Araquidato de laurilo

1 = Ésteres diterpénicos

2+2' = Ésteres C₄₀

3+3' = Ésteres C₄₂

4+4' = Ésteres C₄₄

5 = Ésteres C₄₆

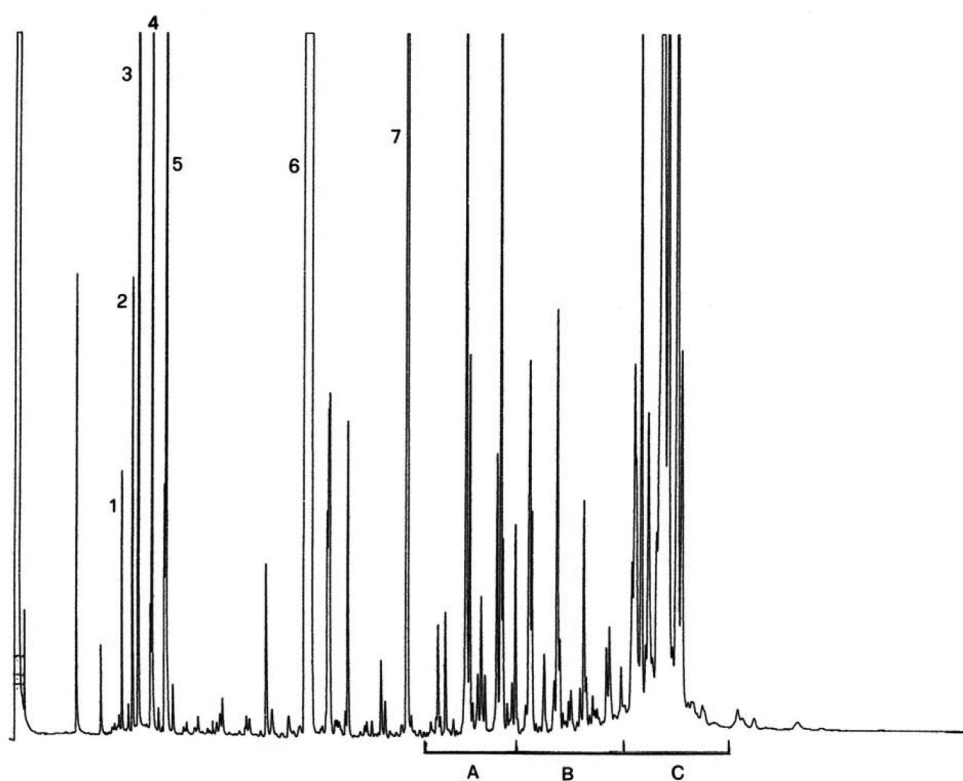
6 = Ésteres de esteroides y alcoholes triterpénicos

(1) Tras la elución de los ésteres de esteroides, el trazado cromatográfico no debe presentar picos significativos (triglicéridos).

▼ **M23**

Figura 2

Ésteres metílicos, ésteres etílicos y ceras en un aceite de oliva virgen



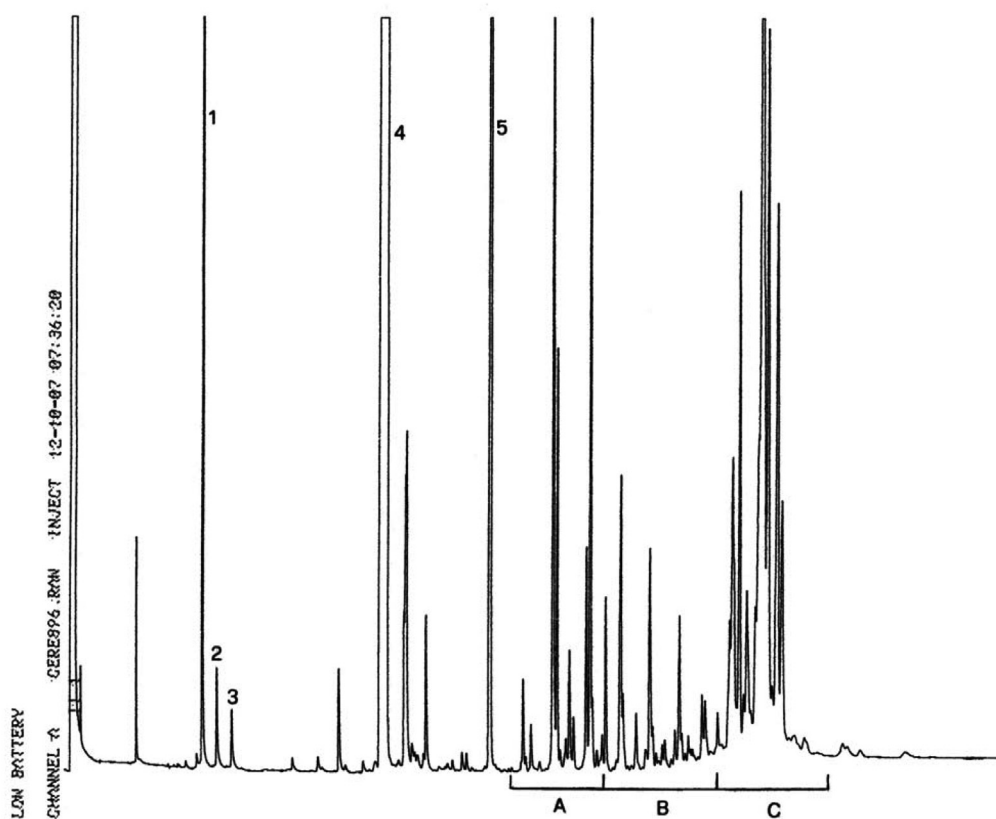
Leyenda:

- 1 - Metilo C₁₆
- 2 - Etilo C₁₆
- 3 - Heptadecanoato metílico P.I.
- 4 - Metilo C₁₈
- 5 - Etilo C₁₈
- 6 - Escualeno
- 7 - Araquidato de laurilo P.I.
- A - Ésteres diterpénicos
- B - Ceras
- C - Ésteres esterólicos y ésteres triterpénicos

▼ **M23**

Figura 3

Ésteres metílicos, ésteres etílicos y ceras en un aceite de oliva virgen extra



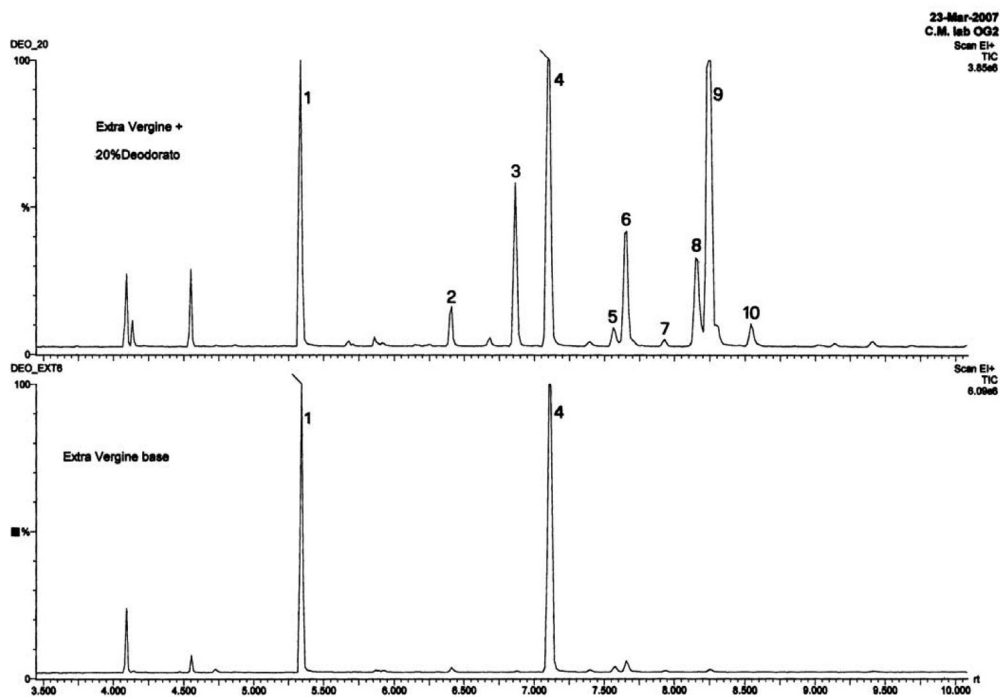
Leyenda:

- 1 - Heptadecanoato metílico P.I.
- 2 - Metilo C₁₈
- 3 - Etilo C₁₈
- 4 - Escualeno
- 5 - Araquidato de laurilo P.I.
- A - Ésteres diterpénicos
- B - Ceras
- C - Ésteres esterólicos y ésteres triterpénicos

▼ M23

Figura 4

Parte de un cromatograma de un aceite de oliva virgen extra y del mismo aceite con aceite desodorizado



Leyenda:

- 1 – Miristato metílico P. I.
- 2 – Palmitato metílico
- 3 – Palmitato etílico
- 4 – Heptadecanoato metílico P.I.
- 5 – Linoleato metílico
- 6 – Oleato metílico
- 7 – Estearato metílico
- 8 – Linoleato etílico
- 9 – Oleato etílico
- 10 – Estearato etílico

▼ M23*Apéndice A***Determinación de la velocidad lineal del gas**

Inyectar de 1 a 3 μl de metano (o propano) en el cromatógrafo de gases después de haberlo ajustado a las condiciones de trabajo normales. Cronometrar el tiempo que tarda el gas en recorrer la columna, desde el momento de su inyección hasta la aparición del pico (t_M).

La velocidad lineal, en cm/s , viene dada por la fórmula L/t_M , siendo L la longitud de la columna expresada en cm y t_M el tiempo cronometrado en segundos.