

Este texto es exclusivamente un instrumento de documentación y no surte efecto jurídico. Las instituciones de la UE no asumen responsabilidad alguna por su contenido. Las versiones auténticas de los actos pertinentes, incluidos sus preámbulos, son las publicadas en el Diario Oficial de la Unión Europea, que pueden consultarse a través de EUR-Lex. Los textos oficiales son accesibles directamente mediante los enlaces integrados en este documento

► B **REGLAMENTO (CEE) N° 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		
		n°	página	fecha
► <u>M1</u>	Reglamento (CEE) n° 3682/91 de la Comisión de 17 de diciembre de 1991	L 349	36	18.12.1991
► <u>M2</u>	Reglamento (CEE) n° 1429/92 de la Comisión de 26 de mayo de 1992	L 150	17	2.6.1992
► <u>M3</u>	Reglamento (CEE) n° 1683/92 de la Comisión de 29 de junio de 1992	L 176	27	30.6.1992
► <u>M4</u>	Reglamento (CEE) n° 1996/92 de la Comisión de 15 de julio de 1992	L 199	18	18.7.1992
► <u>M5</u>	Reglamento (CEE) n° 3288/92 de la Comisión de 12 de noviembre de 1992	L 327	28	13.11.1992
► <u>M6</u>	Reglamento (CEE) n° 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) n° 826/93 de la Comisión de 6 de abril de 1993	L 87	6	7.4.1993
► <u>M8</u>	Reglamento (CEE) n° 620/93 de la Comisión de 17 de marzo de 1993	L 66	29	18.3.1993
► <u>M9</u>	Reglamento (CE) n° 177/94 de la Comisión de 28 de enero de 1994	L 24	33	29.1.1994
► <u>M10</u>	Reglamento (CE) n° 2632/94 de la Comisión de 28 de octubre de 1994	L 280	43	29.10.1994
► <u>M11</u>	Reglamento (CE) n° 656/95 de la Comisión de 28 de marzo de 1995	L 69	1	29.3.1995
► <u>M12</u>	Reglamento (CE) n° 2527/95 de la Comisión de 27 de octubre de 1995	L 258	49	28.10.1995
► <u>M13</u>	Reglamento (CE) n° 2472/97 de la Comisión de 11 de diciembre de 1997	L 341	25	12.12.1997
► <u>M14</u>	Reglamento (CE) n° 282/98 de la Comisión de 3 de febrero de 1998	L 28	5	4.2.1998
► <u>M15</u>	Reglamento (CE) n° 2248/98 de la Comisión de 19 de octubre de 1998	L 282	55	20.10.1998
► <u>M16</u>	Reglamento (CE) n° 379/1999 de la Comisión de 19 de febrero de 1999	L 46	15	20.2.1999
► <u>M17</u>	Reglamento (CE) n° 455/2001 de la Comisión de 6 de marzo de 2001	L 65	9	7.3.2001
► <u>M18</u>	Reglamento (CE) n° 2042/2001 de la Comisión de 18 de octubre de 2001	L 276	8	19.10.2001
► <u>M19</u>	Reglamento (CE) n° 796/2002 de la Comisión de 6 de mayo de 2002	L 128	8	15.5.2002
► <u>M20</u>	Reglamento (CE) n° 1989/2003 de la Comisión de 6 de noviembre de 2003	L 295	57	13.11.2003
► <u>M21</u>	Reglamento (CE) n° 702/2007 de la Comisión de 21 de junio de 2007	L 161	11	22.6.2007
► <u>M22</u>	Reglamento (CE) n° 640/2008 de la Comisión de 4 de julio de 2008	L 178	11	5.7.2008
► <u>M23</u>	Reglamento (UE) n° 61/2011 de la Comisión de 24 de enero de 2011	L 23	1	27.1.2011
► <u>M24</u>	Reglamento de Ejecución (UE) n° 661/2012 de la Comisión de 19 de julio de 2012	L 192	3	20.7.2012

► <u>M25</u>	Reglamento de Ejecución (UE) nº 299/2013 de la Comisión de 26 de marzo de 2013	L 90	52	28.3.2013
► <u>M26</u>	Reglamento de Ejecución (UE) nº 1348/2013 de la Comisión de 16 de diciembre de 2013	L 338	31	17.12.2013
► <u>M27</u>	Reglamento Delegado (UE) 2015/1830 de la Comisión de 8 de julio de 2015	L 266	9	13.10.2015
► <u>M28</u>	Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1833 de la Comisión de 12 de octubre de 2015	L 266	29	13.10.2015
► <u>M29</u>	Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1227 de la Comisión de 27 de julio de 2016	L 202	7	28.7.2016

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 (183/93)
- **C3** Rectificación, DO L 63 de 4.3.1998, p. 34 (2472/97)
- **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)
- **C6** Rectificación, DO L 196 de 3.7.2014, p. 45 (1348/2013)

▼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**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

▼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 nº 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 nº 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 nº 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 nº 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 nº 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 nº 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 nº 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 8 del anexo I del presente Reglamento.

▼ M26*Artículo 2*

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

- a) para determinar los ácidos grasos libres, expresados en porcentaje de ácido oleico, el método recogido en el anexo II;
- b) para determinar el índice de peróxidos, el método recogido en el anexo III;
- c) para determinar el contenido de ceras, el método recogido en el anexo IV;
- d) para determinar la composición y el contenido de esteroides y diálcoholes triterpénicos mediante cromatografía de gases con columna capilar, el método recogido en el anexo V;
- e) para determinar el porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo, el método recogido en el anexo VII;
- f) para el análisis espectrofotométrico, el método recogido en el anexo IX;

▼ M28

- g) para determinar la composición de ácidos grasos, el método recogido en el anexo X,

▼ M26

- h) para determinar los disolventes halogenados volátiles, el método recogido en el anexo XI;
- i) para la valoración de las características organolépticas de los aceites de oliva vírgenes, el método recogido en el anexo XII;
- j) para determinar los estigmastadienos, el método recogido en el anexo XVII;
- k) para determinar el contenido de triglicéridos con ECN42, el método que figura en el anexo XVIII;

▼ M28

- l) para determinar el contenido de alcoholes alifáticos y triterpénicos, el método recogido en el anexo XIX;

▼ M26

- m) para determinar el contenido en ceras y en ésteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos, el método previsto en el anexo XX.

▼ M28
_____**▼ M26**

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.

▼ M26

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.

► **C6** En caso de que el panel autorizado no confirme tal declaración en lo que respecta a las características organolépticas, las autoridades nacionales o sus representantes ordenarán que se proceda, a petición del interesado, a realizar sin dilación 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.

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, respectivamente. Ahora bien, no obstante lo dispuesto en el punto 6.8 de la norma EN ISO 5555, respecto de los lotes de esos aceites presentados en envases inmediatos, la toma de muestras se realizará de acuerdo con el anexo I *bis* del presente Reglamento. En el caso de los aceites a granel para los que la toma de muestras no se pueda efectuar conforme a EN ISO 5555, dicha toma de muestras se realizará de conformidad con las instrucciones proporcionadas por la autoridad competente del Estado miembro.

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 quinto día hábil siguiente al de la toma de las muestras; de lo contrario, estas se deberán guardar de tal modo que no resulten deterioradas o dañadas durante el transporte o el almacenaje antes de ser enviadas al laboratorio.

4. Para la comprobación prevista en el apartado 3, los análisis a que se refieren los anexos II, III, IX, XII y XX así como, en su caso, los análisis contradictorios previstos por las legislaciones nacionales, se efectuarán antes de la fecha de caducidad mínima en el caso de los productos envasados. En el caso de la toma de muestras de aceites a granel, los análisis deberán llevarse a cabo a más tardar seis meses después del mes en que se tomó la muestra.

No se aplicará ningún plazo a los demás análisis previstos por el presente Reglamento.

Excepto si la toma de muestras se ha efectuado menos de dos meses 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.

▼ M26

5. Con vistas a la determinación de las características de los aceites de oliva efectuada con arreglo a los métodos contemplados en el apartado 1, párrafo primero, los resultados de los análisis se compararán directamente con los límites fijados en el presente Reglamento.

▼ M25*Artículo 2 bis*

1. A efectos del presente artículo, por «aceite de oliva comercializado» se entenderá la cantidad total de aceite de oliva y aceite de orujo de oliva de un determinado Estado miembro que se consuma en dicho Estado miembro o se exporte fuera del mismo.

2. Los Estados miembros se cerciorarán de que los controles de conformidad se lleven a cabo de forma selectiva, sobre la base de un análisis de riesgos, y con la frecuencia apropiada, con el fin de garantizar que el aceite de oliva comercializado se ajusta a la categoría declarada.

3. Los criterios para evaluar el riesgo podrán incluir:

- a) la categoría de aceite, el período de producción, el precio de los aceites en relación con otros aceites vegetales, la mezcla y las operaciones de embalaje, las instalaciones y condiciones de almacenamiento, el país de origen, el país de destino, los medios de transporte o el volumen del lote;
- b) la posición de los agentes económicos en la cadena de comercialización, el volumen o el valor comercializado por los mismos, la gama de categorías de aceite que comercializan, el tipo de operaciones llevadas a cabo, tales como molturación, almacenamiento, refinado, mezcla, embalaje o venta al por menor;
- c) los resultados obtenidos en controles anteriores, como número y tipo de defectos encontrados, calidad habitual de los aceites comercializados y rendimiento del equipo técnico utilizado;
- d) la fiabilidad de los sistemas de control de calidad o de autocontrol de los agentes económicos, relativos a la conformidad con las normas de comercialización;
- e) el lugar donde se realiza el control, sobre todo si se trata del punto de primera entrada en la Unión, del último punto de salida de la Unión o del lugar donde se producen, envasan, cargan o venden al consumidor final;
- f) cualquier otra información que pudiera indicar un riesgo de incumplimiento.

4. Los Estados miembros establecerán previamente:

- a) los criterios de evaluación del riesgo de no conformidad de los lotes;
- b) sobre la base de un análisis de riesgos con respecto a cada categoría de riesgo, el número mínimo de agentes económicos o de lotes y/o cantidades que deberán someterse a un control de conformidad.

▼ M25

Se efectuará anualmente al menos un control de conformidad por cada mil toneladas de aceite de oliva comercializado en el Estado miembro.

5. Los Estados miembros verificarán el cumplimiento:
- a) efectuando, en cualquier orden, los análisis contemplados en el anexo I, o
 - 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**▼ M25***Artículo 3*

En caso de que se compruebe que un aceite no corresponde a la descripción de su categoría, el Estado miembro de que se trate aplicará, sin perjuicio de cualesquiera otras sanciones, sanciones efectivas, proporcionadas y disuasorias que se determinarán en función de la gravedad de la irregularidad detectada.

En caso de que en los controles se detecten irregularidades importantes, los Estados miembros aumentarán la frecuencia de los controles en relación con la etapa de comercialización, categoría de aceite, origen, u otros criterios.

▼ M5*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,
- 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.

▼ B

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.

▼ M25*Artículo 7 bis*

Las personas físicas o jurídicas y las agrupaciones de personas que posean aceite de oliva y aceite de orujo de oliva desde la extracción en la almazara hasta la fase de embotellado inclusive, para cualesquiera fines profesionales o comerciales, deberán disponer de registros de entradas y salidas para cada categoría de estos aceites.

Los Estados miembros se cerciorarán de que la obligación prevista en el párrafo primero se respeta debidamente.

Artículo 8

1. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión las medidas adoptadas en aplicación del presente Reglamento. Informarán a la Comisión de cualquier modificación posterior.

2. A más tardar el 31 de mayo de cada año, los Estados miembros transmitirán a la Comisión un informe sobre la aplicación del presente Reglamento durante el año civil anterior. El informe contendrá, como mínimo, los resultados de los controles de conformidad efectuados sobre los aceites de oliva y se ajustarán a los modelos que figuran en el anexo XXI.

3. Las notificaciones contempladas en el presente Reglamento se realizarán de conformidad con el Reglamento (CE) n° 792/2009 de la Comisión ⁽¹⁾.

▼ B*Artículo 9*

Queda derogado el Reglamento (CEE) n° 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.

⁽¹⁾ DO L 228 de 1.9.2009, p. 3.

▼ **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 aceite de oliva o aceite de orujo de oliva entregado en envases inmediatos
Anexo I <i>ter</i> :	Esquema de decisiones para la comprobación de la conformidad de una muestra de aceite de oliva con la categoría declarada
Anexo II:	Determinación de los ácidos grasos libres, método en frío
Anexo III:	Determinación del índice de peróxidos
Anexo IV:	Determinación del contenido de ceras mediante cromatografía de gases con columna capilar
Anexo V:	Determinación de la composición y del contenido de esteroles y dialcoholes triperpénicos mediante cromatografía de gases con columna capilar
Anexo VII:	► M21 Determinación del porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo ◀
▼ M20 _____	
▼ B	
Anexo IX:	Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta
▼ M28	
Anexo X:	Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de gases
▼ B	
Anexo XI:	Determinación del contenido en ► C1 disolventes ◀ halogenados volátiles en el aceite de oliva
Anexo XII:	Método del consejo oleícola internacional para la valoración organoléptica de los aceites de oliva vírgenes
▼ 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:	Determinación de la diferencia entre el contenido real y el contenido teórico de triglicéridos con ECN 42
Anexo XIX:	► M28 Determinación del contenido de alcoholes alifáticos y triterpénicos mediante cromatografía de gases con columna capilar ◀
▼ 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
▼ M28 _____	
▼ M25	
Anexo XXI:	Resultados de los controles de conformidad realizados en los aceites de oliva a que se refiere el artículo 8, apartado 2

CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

Categoría	Ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) (*)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxido mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmas-tadienos mg/kg (1)	Diferencia: ECN 42 (HPLC) y ECN 42 (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ o K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación organoléptica Mediana del frutado (Mf) (*)
1. Aceite de oliva virgen extra	FAEEs ≤ 40 mg/kg (campaña 2013-2014) (2) FAEEs ≤ 35 mg/kg (campaña 2014-2016) FAEEs ≤ 30 (campañas posteriores a 2016)	≤ 0,8	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							
2. Aceite de oliva virgen	—	≤ 2,0	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							

▼ M27

Categoría	Ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) (*)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxido mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmas-tadienos mg/kg (1)	Diferencia: ECN 42 (HPLC) y ECN 42 (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ o K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación organoléptica Mediana del frutado (Mf) (*)
3. Aceite de oliva lampante	—	> 2,0	—	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 300 (3)	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (4)	—
					≤ 1,1 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							
4. Aceite de oliva refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							

▼ M27

Categoría	Ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) (*)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxido mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmatadienos mg/kg (1)	Diferencia: ECN 42 (HPLC) y ECN 42 (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ o K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación organoléptica Mediana del frutado (Mf) (*)
6. Aceite de orujo de oliva crudo	—	—	—	C40 + C42 + C44 + C46 > 350 (‡)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Aceite de orujo de oliva refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Aceite de orujo de oliva	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Total de isómeros que han podido (o no han podido) separarse con columna capilar.

(2) El límite se aplica a los aceites de oliva producidos a partir del 1 de marzo de 2014.

(3) Se considera que los aceites con un contenido de ceras entre 300 mg/kg y 350 mg/kg son aceites de oliva lampantes si el contenido total de alcoholes alifáticos es inferior o igual a 350 mg/kg o si el contenido de eritrodiol y uvaol es inferior o igual al 3,5 %.

(4) La mediana del defecto puede ser inferior o igual a 3,5 y la mediana del frutado igual a 0.

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

▼ M27

Categoría	Composición de ácidos grasos (1)						Sumas de los isómeros trans-oleicos (%)	Sumas de los isómeros trans-linoleicos + trans-linolénicos (%)	Composición de los esteroides						Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodiol y uvaol (%) (**)
	Mirístico (%)	Linolénico (%)	Araquídico (%)	Eicosenoico (%)	Behénico (%)	Lignocérico (%)			Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol (2) (%)	Estigmasterol (%)	β — sitosterol aparente (3) (%) (**)	Delta-7-estigmasterol (2) (%)		
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Aceite de oliva virgen	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Aceite de oliva lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (4)
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 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)	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 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 crudo	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (5)
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5

▼ M27

Categoría	Composición de ácidos grasos ⁽¹⁾						Sumas de los isómeros trans-oleicos (%)	Sumas de los isómeros trans-linoleicos + trans-linolénicos (%)	Composición de los esteroides						Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodiol y uvaol (%) (**)
	Mirístico (%)	Linolénico (%)	Araquídico (%)	Eicosenoico (%)	Behénico (%)	Lignocérico (%)			Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol ⁽²⁾ (%)	Estigmasterol (%)	β — sitosterol aparente ⁽³⁾ (%) (**)	Delta-7-estigmastanol ⁽²⁾ (%)		
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 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: 7,50-20,00; palmitoleico: 0,30-3,50; heptadecanoico: ≤ 0,30; heptadecenoico: ≤ 0,30; esteárico: 0,50-5,00; oleico: 55,00-83,00; linoleico: 2,50-21,00.

⁽²⁾ Véase el apéndice del presente anexo.

⁽³⁾ β-sitosterol aparente: delta-5,23-estigmastadienol + cleroesterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

⁽⁴⁾ Se considera que los aceites con un contenido de ceras entre 300 mg/kg y 350 mg/kg son aceites de oliva lampantes si el contenido total de alcoholes alifáticos es inferior o igual a 350 mg/kg o si el contenido de eritrodiol y uvaol es inferior o igual al 3,5 %.

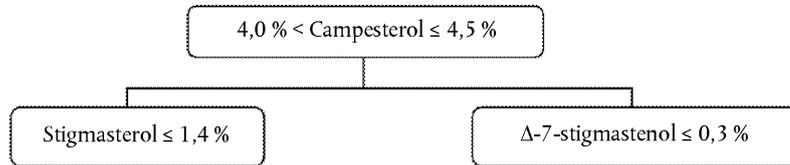
⁽⁵⁾ Los aceites con un contenido de ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva crudo si el contenido de alcoholes alifáticos totales es superior a 350 mg/kg o si el porcentaje de eritrodiol y uvaol es superior al 3,5 %.

Notas:

- 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.
- 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, a efectos del presente Reglamento.
- 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.
- Las características indicadas con dos asteriscos (**) implican que, en el caso de todos los aceites de orujo de oliva, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes.

▼ **M27***Apéndice***ÁRBOL DE DECISIONES**

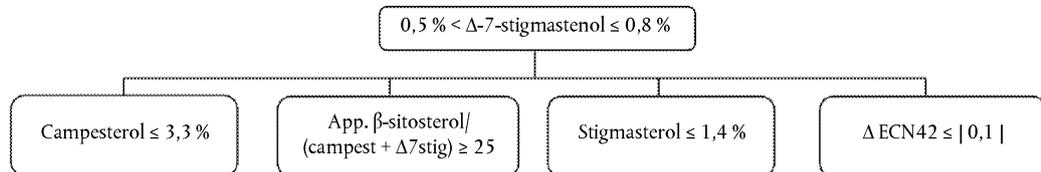
Árbol de decisiones del **campesterol** para los aceites de oliva virgen y virgen extra:



Los restantes parámetros se adaptarán a los límites que establece el presente Reglamento.

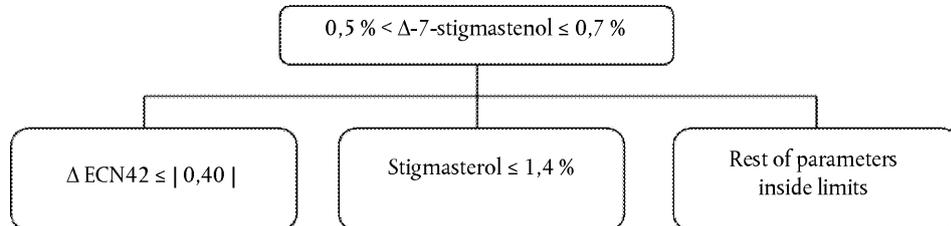
Árbol de decisiones del **delta-7-estigmastenol** para:

— Aceites de oliva virgen y virgen extra



Los restantes parámetros se adaptarán a los límites que establece el presente Reglamento.

— Aceites de orujo de oliva (crudo y refinado)



▼ **M26**

ANEXO I BIS

▼ **C6****MUESTREO DE ACEITE DE OLIVA O ACEITE DE ORUJO DE OLIVA
DISTRIBUIDO EN ENVASES INMEDIATOS**▼ **M26**

Este método de muestreo se aplica a lotes de aceite de oliva o aceite de orujo de oliva que se presenten en envases inmediatos. Se aplicarán distintos métodos de muestreo, en función de si los envases inmediatos superan o no los 5 litros.

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. La individualización de un lote debe hacerse de conformidad con la Directiva 2011/91/UE del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽¹⁾.

Se entenderá por «porción» la cantidad de aceite que contiene un envase inmediato tomada aleatoriamente del lote.

1. CONTENIDO DE UNA MUESTRA ELEMENTAL

1.1. Envases inmediatos de 5 litros como máximo

Se entenderá por «muestra elemental» para los envases inmediatos de 5 litros como máximo el número de porciones tomadas de un lote y de acuerdo con el cuadro 1.

Cuadro 1

El tamaño mínimo de las muestras elementales consistirá en lo siguiente

En caso de que los envases inmediatos tengan una capacidad	La muestra elemental debe extraerse del aceite de
a) superior o igual a 1 litro	a) un envase inmediato
b) inferior a 1 litro	b) el número mínimo de envases cuya capacidad total sea de al menos 1,0 litro

Cada Estado miembro podrá incrementar el número de envases a los que se hace referencia en el cuadro 1 que constituyan una muestra elemental, en función de sus necesidades específicas (por ejemplo, en caso de valoración organoléptica por parte de un laboratorio distinto del que llevó a cabo los análisis químicos, análisis contradictorios, etc.).

1.2. Envases inmediatos de más de 5 litros

Se entenderá por «muestra elemental» para los envases inmediatos de más de 5 litros una parte representativa del total de porciones, obtenida mediante un proceso de reducción y de acuerdo con el cuadro 2. ► **C6** La muestra elemental debe estar constituida por varios ejemplares. ◀

▼ **C6**

Se entenderá por «ejemplar» cada uno de los envases que componen la muestra elemental.

▼ **M26**

Cuadro 2

Número mínimo de porciones que elegir

Número de envases de que consta el lote	Número mínimo de porciones que elegir
Hasta 10	1
De 11 a 150	2

⁽¹⁾ Directiva 2011/91/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de diciembre de 2011, relativa a las menciones o marcas que permitan identificar el lote al que pertenece un producto alimenticio (DO L 334 de 16.12.2011, p. 1).

▼ **M26**

Número de envases de que consta el lote	Número mínimo de porciones que elegir
De 151 a 500	3
De 501 a 1 500	4
De 1 501 a 2 500	5
> 2 500 por cada 1 000 envases	1 porción más

Con objeto de reducir el volumen del muestreo de envases inmediatos, el contenido de las porciones de muestreo es homogeneizado para preparar la muestra elemental. Las partes de las distintas porciones se pasan a un recipiente común para ser homogeneizadas mediante agitación, con el fin de evitar al máximo el contacto con el aire.

▼ **C6**

El contenido de la muestra elemental se pasará a una serie de envases con una capacidad mínima de 1,0 litro, cada una de las cuales constituye un ejemplar de la muestra elemental.

▼ **M26**

Cada Estado miembro puede incrementar el número de muestras elementales en función de sus necesidades específicas (por ejemplo, la valoración organoléptica por parte de un laboratorio distinto del que llevó a cabo los análisis químicos, análisis contradictorios, etc.).

Cada uno de los envases debe rellenarse de forma que se minimice la capa de aire superior, para posteriormente ser cerrado y sellado de forma que garantice que el producto es inalterable.

▼ **C6**

Estos ejemplares deben estar etiquetados para garantizar su correcta identificación.

▼ **M26**

2. ANÁLISIS Y RESULTADOS

- 2.1. Cada muestra elemental debe subdividirse en muestras de laboratorio, con arreglo al punto 2.5 de la norma ISO 5555, y analizarse según el orden que se indica en el árbol de decisiones recogido en el anexo I *ter* o a cualquier otro orden aleatorio.
- 2.2. En caso de que todos los resultados de los análisis se ajusten a las características de la categoría de aceite declarada, todo el lote se declarará conforme.

Si un solo resultado de los análisis no se ajusta a las características de la categoría de aceite declarada, todo el lote se declarará no conforme.

3. VERIFICACIÓN DE LA CATEGORÍA DE LOTE

- 3.1. Con objeto de verificar la categoría del lote, las autoridades competentes podrán aumentar el número de muestras elementales tomadas en distintos puntos del lote con arreglo al siguiente cuadro:

Cuadro 3

Número de muestras elementales en función del tamaño del lote

Tamaño del lote (litros)	Número de muestras elementales
Inferior a 7 500	2
Entre 7 500 e inferior a 25 000	3
Entre 25 000 e inferior a 75 000	4
Entre 75 000 e inferior a 125 000	5
Igual y superior a 125 000	6 + 1 por cada 50 000 litros adicionales

▼ M26

Cada porción que constituya una muestra elemental deberá tomarse en un lugar continuo del lote; es necesario tomar nota de la ubicación de cada muestra elemental e identificarla de forma inequívoca.

Cada muestra elemental debe formarse con arreglo a los procedimientos mencionados en los puntos 1.1 y 1.2.

Posteriormente cada una de las muestras elementales es sometida a los análisis que se mencionan en el artículo 2, apartado 1.

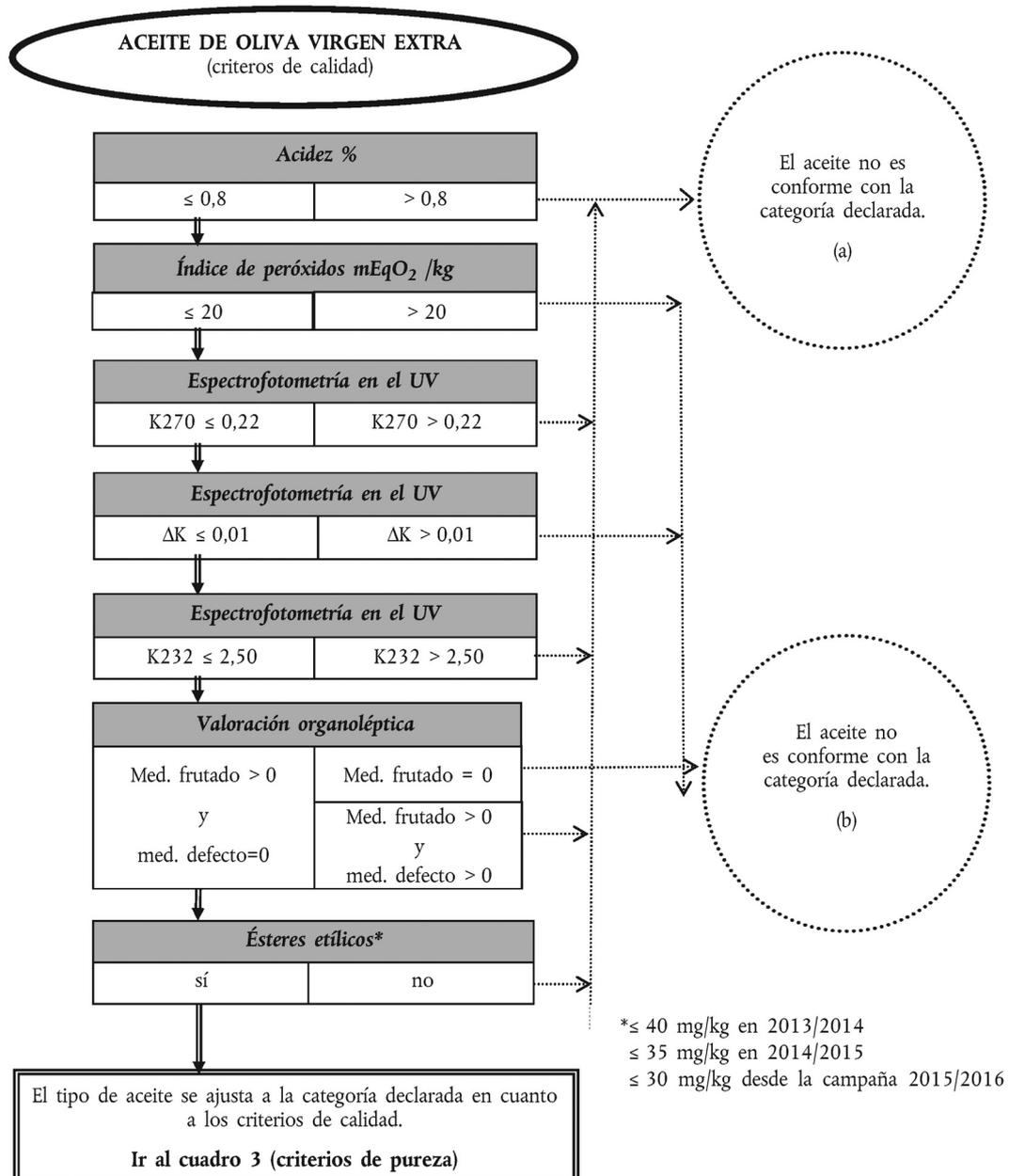
- 3.2. Cuando uno de los resultados de los análisis a los que se hace referencia en el artículo 2, apartado 1, de al menos una de las muestras elementales no se ajuste a las características de la categoría de aceite declarada, todo el lote muestreado se declarará no conforme.

▼ M26

ANEXO I ter

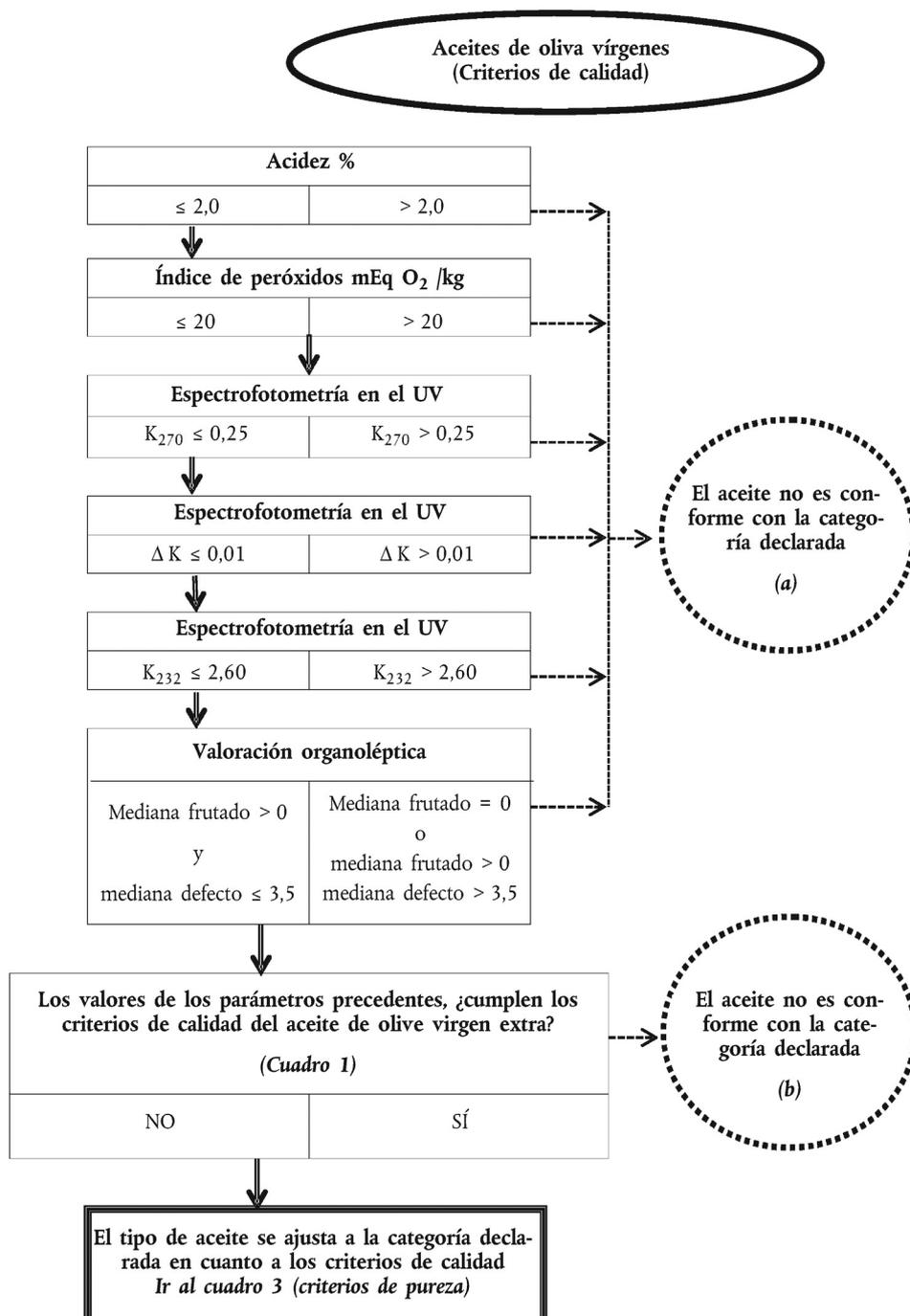
**ESQUEMA DE DECISIONES PARA LA COMPROBACIÓN DE LA CONFORMIDAD DE
UNA MUESTRA DE ACEITE DE OLIVA CON LA CATEGORÍA DECLARADA**

Cuadro 1



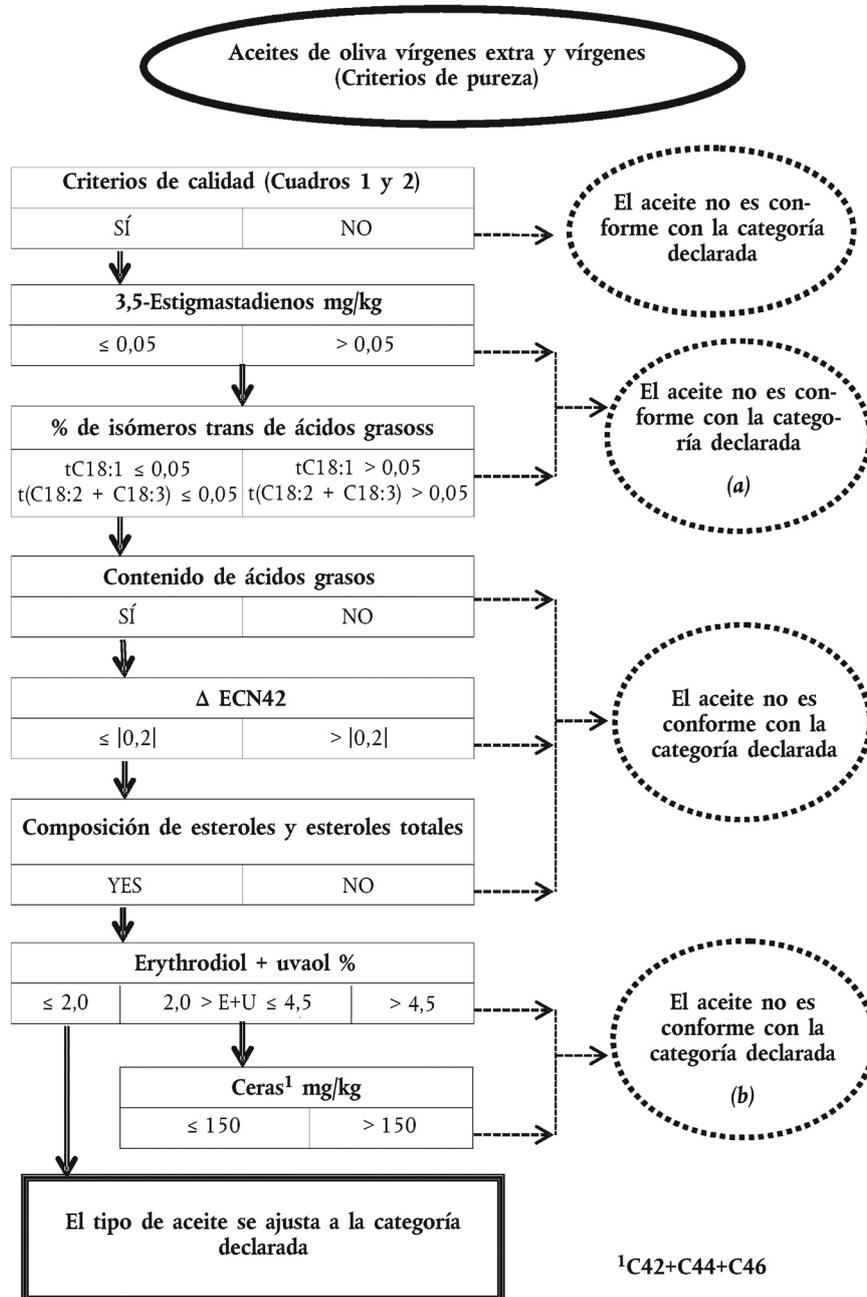
▼ M26

Cuadro 2



▼ M26

Cuadro 3



▼ **M26***Apéndice 1***Correspondencia entre los anexos del presente Reglamento y los análisis previstos en el árbol de decisiones**

— Acidez	Anexo II	Determinación de los ácidos grasos libres, método en frío
— 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
— Ésteres etílicos	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
— Estigmasta-3,5-dienos	Anexo XVII	Método para la determinación de los estigmastadienos en los aceites vegetales
▼ M28		
— Isómeros <i>trans</i> de ácidos grasos	Anexo X	Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de gases
— Contenido de ácidos grasos	Anexo X	Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de gases
▼ M26		
— 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 y dialcoholes triperpénicos mediante cromatografía de gases con columna capilar
— Eritrodiol y uvaol		
— Ceras	Anexo IV	Determinación del contenido de ceras mediante cromatografía de gases con columna capilar
▼ M28		
— Alcoholes alifáticos y triterpénicos	Anexo XIX	Determinación de los alcoholes alifáticos y triterpénicos mediante cromatografía de gases con columna capilar
▼ M26		
— Ácidos grasos saturados en la posición 2	Anexo VII	Determinación del porcentaje de mono-palmitato de 2-glicerilo

▼ **M29***ANEXO II***DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES, MÉTODO EN FRÍO****1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN**

El presente método describe la determinación de los ácidos grasos libres en los aceites de oliva y en los aceites de orujo de oliva. El contenido en ácidos grasos libres se expresa mediante la acidez calculada como el porcentaje de ácido oleico.

2. PRINCIPIO

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

3. REACTIVOS

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

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

Debe neutralizarse exactamente en el momento de su utilización con la solución de hidróxido potásico (3.2) en presencia de 0,3 ml de la solución de fenoltaleína (3.3) por cada 100 ml de mezcla.

Nota 1: El éter dietílico es muy inflamable y puede formar peróxidos explosivos. Debe utilizarse tomando especiales precauciones.

Nota 2: 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.

3.2 Solución etanólica o acuosa valorada de hidróxido potásico o hidróxido sódico, c(KOH) [o c(NaOH)] aproximadamente 0,1 M o, en caso necesario, c(KOH) [o c(NaOH)] aproximadamente 0,5 M. Pueden emplearse soluciones disponibles en los comercios.

Debe conocerse, y comprobarse antes de su utilización, la concentración exacta de la solución de hidróxido potásico (o de la solución de hidróxido sódico). 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.

Si se observa una separación de fases al utilizar la solución acuosa de hidróxido potásico (o de hidróxido sódico), sustituir la solución acuosa por una solución etanólica.

Nota 3: Se puede preparar una solución incolora y estable de hidróxido potásico (o de hidróxido sódico) de la manera siguiente: Llevar a ebullición, y mantener esta a reflujo durante una hora, 1 000 ml de etanol o agua con 8 g de hidróxido potásico (o de hidróxido sódico) y 0,5 g de virutas de aluminio. Destilar inmediatamente. Disolver en el destilado la cantidad requerida de hidróxido potásico (o de hidróxido sódico). Dejar reposar durante varios días y decantar el líquido claro sobrenadante, separándolo del precipitado de carbonato potásico (o de carbonato sódico).

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 (o de agua) y dejar reposar la mezcla durante algunos días. Decantar el líquido sobrenadante y disolver en él la cantidad necesaria de hidróxido potásico (o de hidróxido sódico). La solución está lista para ser utilizada.

▼ M29

3.3 Solución de 10 g/l de fenolftaleína en etanol de 95-96 % (V/V) o azul álcali 6B o solución de 20 g/l de timolftaleína en etanol de 95-96 % (V/V). En caso de aceites muy coloreados, se utilizará azul álcali o timolftaleína.

4. MATERIAL

Material habitual de laboratorio, y en particular:

4.1 Balanza analítica

4.2 Matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad

4.3 Bureta de 10 ml de capacidad clase A, con graduación de 0,05 ml, o bureta automática equivalente.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. **Preparación de la muestra de ensayo**

En caso de que la muestra esté turbia, debe filtrarse.

5.2. **Tamaño de la muestra**

Tomar una muestra, en función de la acidez prevista, de acuerdo con el cuadro siguiente:

Acidez prevista (acidez oleica en g/100g)	Peso de la muestra (en g)	Precisión de la pesada de la muestra (en g)
0 a 2	10	0,02
> 2 a 7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Pesar la muestra en el matraz Erlenmeyer (4.2).

5.3 **Determinación**

Disolver la muestra (5.2) en 50 a 100 ml de la mezcla de éter dietílico y etanol (3.1), previamente neutralizada.

Valorar, agitando, con la solución de hidróxido potásico (o de hidróxido sódico) de 0,1 M (3.2) (véase nota 4) hasta el viraje del indicador (la coloración del indicador coloreado debe permanecer al menos durante 10 segundos).

Nota 4: Si la cantidad necesaria de la solución de hidróxido potásico (o de hidróxido sódico) de 0,1 M supera los 10 ml, debe utilizarse una solución de 0,5 M o cambiar la masa de la muestra en función de la acidez libre prevista y del cuadro propuesto.

Nota 5: Si la solución se enturbia durante la valoración, añadir una cantidad suficiente de disolventes (3.1) para que la solución se aclare.

Efectuar una segunda determinación únicamente si el primer resultado es superior al límite especificado para la categoría del aceite.

▼ M29

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

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

$$V \times c \times \frac{M}{1\,000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

siendo:

V = volumen en ml de la solución valorada de hidróxido potásico (o de hidróxido sódico) utilizada.

c = concentración exacta, en moles por litro, de la solución de hidróxido potásico (o de hidróxido sódico) utilizada.

M = 282 g/mol, la masa molar, en gramos por mol, de ácido oleico.

m = la masa de la muestra, en gramos.

El ácido oleico se declara como sigue:

- a) con dos decimales para valores comprendidos entre 0 y 1, inclusive;
- b) con un decimal para valores comprendidos entre 1 y 100, inclusive.



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 borbotado de una corriente de gas inerte puro y seco.

6.2. Ácido acético glacial para análisis, exento de oxígeno por borbotado 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

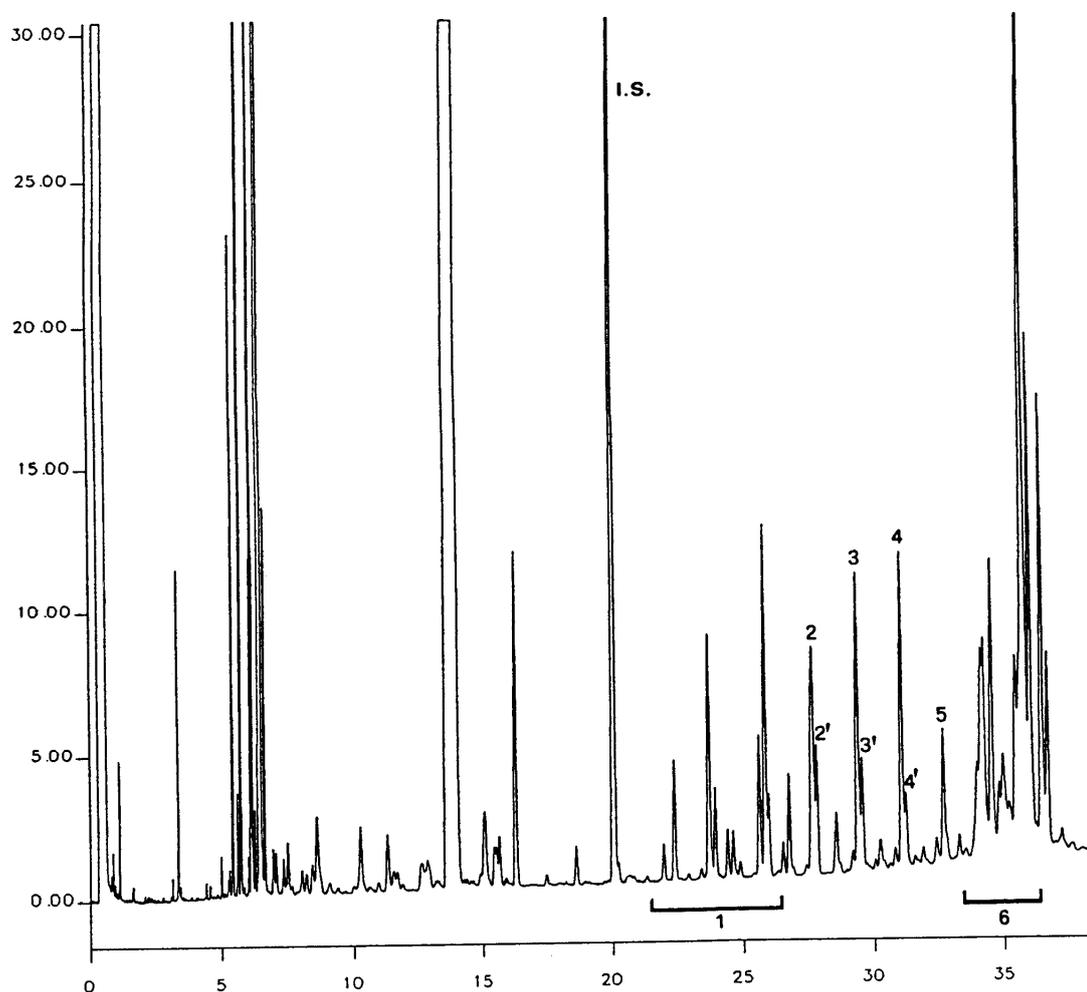
Indicar la suma de los contenidos de las distintas ceras de C₄₀ a C₄₆, en mg/kg de materia grasa (ppm).

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.

▼ **M26**

ANEXO V

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

1. **ÁMBITO DE APLICACIÓN**

El método describe un procedimiento para determinar el contenido individual y total de esteroides y de dialcoholes triterpénicos de los aceites de oliva y de orujo.
2. **PRINCIPIO**

Los aceites, con α -colestanol añadido como patrón interno, se saponifican con hidróxido potásico en solución etanólica y la materia insaponificable se extrae entonces con éter de etilo.

La fracción de esteroides y de dialcoholes triterpénicos se separa de la materia insaponificable mediante cromatografía en capa fina con una placa de gel de sílice básico. Las fracciones recuperadas del gel de sílice se transforman en éteres de trimetilsililo y se analizan entonces con cromatografía de gases con columna capilar.
3. **APARATOS**

El equipo de laboratorio habitual y, en particular, lo siguiente:

 - 3.1. Matraz de 250 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
 - 3.2. Ampolla de decantación de 500 ml.
 - 3.3. Matraces de 250 ml.
 - 3.4. Aparato completo para análisis mediante cromatografía en capa fina usando placas de vidrio de 20 × 20 cm.
 - 3.5. Lámpara ultravioleta con longitud de onda de 254 o 366 nm.
 - 3.6. Microjeringas de 100 μ l y 500 μ l.
 - 3.7. Embudo cilíndrico filtrante con filtro poroso G3 (porosidad 15-40 μ m) con un diámetro aproximado de 2 cm y una profundidad de 5 cm, apropiado para filtraciones al vacío, con junta esmerilada macho.
 - 3.8. Matraz cónico de vacío de 50 ml, con junta esmerilada hembra acoplable al embudo filtrante (punto 3.7).
 - 3.9. Tubo de ensayo de 10 ml con fondo cónico y tapón de vidrio de cierre hermético.
 - 3.10. Cromatógrafo de gases adecuado para su uso con columna capilar con inyector de fraccionamiento de flujo (split) formado por:
 - 3.10.1. Una cámara para columnas capaz de mantener la temperatura deseada con una precisión de ± 1 °C.
 - 3.10.2. Inyector termorregulable con elemento vaporizador de vidrio persilanzado y divisor.
 - 3.10.3. Detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés).
 - 3.10.4. Sistema de captura de datos para uso con el detector FID (punto 3.10.3), capaz de integrarse manualmente.
 - 3.11. Columna capilar de sílice fundida, de 20 a 30 m de longitud y de 0,25 a 0,32 mm de diámetro interno, recubierta con difenil (5 %) y dimetilpolisiloxano (95 %) (fase estacionaria SE 52 o SE 54 o equivalente), con un espesor uniforme que oscile entre 0,10 y 0,30 μ m.

▼ M26

- 3.12. Microjeringa, de 10 µl de capacidad, para cromatografía de gases, con aguja fija apropiada para división de flujo.
- 3.13. Desecador de dicloruro de calcio.
4. REACTIVOS
- 4.1. Hidróxido potásico (pureza mínima del 85%).
- 4.2. Hidróxido potásico, solución etanólica 2 N, aproximadamente:
Disolver, enfriando al mismo tiempo, 130 g de hidróxido potásico (punto 4.1) en 200 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol (punto 4.10). Conservar la solución en botellas de vidrio oscuro bien cerradas y almacenarla un máximo de dos días.
- 4.3. Éter etílico de calidad para análisis.
- 4.4. Hidróxido potásico, solución etanólica 0,2 N, aproximadamente:
Disolver 13 g de hidróxido potásico (punto 4.1) en 20 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol (punto 4.10).
- 4.5. Sulfato sódico anhidro, de calidad para análisis.
- 4.6. Placas de vidrio (20 × 20 cm) recubiertas con gel de sílice, sin indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor (disponibles en el comercio ya preparadas para el uso).
- 4.7. Tolueno, de calidad para cromatografía.
- 4.8. Acetona, de calidad para cromatografía.
- 4.9. n-Hexano, de calidad para cromatografía.
- 4.10. Éter etílico, de calidad para cromatografía.
- 4.11. Etanol, de calidad para análisis.
- 4.12. Acetato de etilo, de calidad para análisis.
- 4.13. Solución de referencia para cromatografía en capa fina: colesterol o fitoesteroles, y solución de eritrodil al 5% en acetato de etilo (punto 4.11).
- 4.14. 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 (punto 4.2).
- 4.15. Piridina anhidra, de calidad para cromatografía (véase nota 5).
- 4.16. Hexametildisilazano, de calidad para análisis.
- 4.17. Trimetilclorosilano, de calidad para análisis.
- 4.18. Solución patrón de los trimetilsililéteres de esteroides:
Preparar en el momento del uso a partir de esteroides y eritrodil obtenidos de aceites que los contengan.
- 4.19. α-Colestanol, de pureza superior al 99% (hay que comprobar la pureza mediante cromatografía de gases).
- 4.20. α-Colestanol, disolución al 0,2% (m/V) como patrón interno en acetato de etilo (punto 4.11).
- 4.21. Solución de fenolftaleína, 10 g/L en etanol (punto 4.10).
- 4.22. Gas portador: hidrógeno o helio, de calidad para cromatografía de gases.
- 4.23. Gases auxiliares: hidrógeno, helio, nitrógeno y aire, de calidad para cromatografía de gases.

▼ M26

- 4.24. Mezcla de n-hexano (punto 4.9)/éter etílico (punto 4.10) 65:35 (V/V).
- 4.25. Reactivo de sililación, consiste en una mezcla 9:3:1 (V/V/V) de piridina/hexametildisilazano/trimetilclorosilano.

5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. Preparación del insaponificable.
- 5.1.1. Con una microjeringa de 500 µl (punto 3.6) introducir en el matraz de 250 ml (punto 3.1) un volumen de solución de patrón interno de α -colestanol (punto 4.20) que contenga una cantidad de colestanol correspondiente a aproximadamente el 10% del contenido de esteroles de la muestra. Por ejemplo, para una muestra de aceite de oliva de 5 g añadir 500 µl de la solución de α -colestanol (punto 4.20) y 1 500 µl para el aceite de orujo. Evaporar hasta secar mediante una ligera corriente de nitrógeno en un baño de agua templado y, después de enfriar el matraz, poner $5 \pm 0,01$ g de muestra filtrada seca en el mismo matraz.

Nota 1: En el caso de aceites y grasas animales o vegetales 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.

- 5.1.2. Añadir 50 ml de solución etanólica de hidróxido potásico 2 N (punto 4.2) y algo de piedra pómez, ajustar el condensador de reflujo y calentar a ebullición suave hasta que tenga lugar la saponificación (la solución se vuelve incolora). Calentar durante 20 minutos más y, a continuación, añadir 50 ml de agua destilada por la parte superior del condensador; separar el condensador y enfriar el matraz a 30 °C aproximadamente.
- 5.1.3. Pasar el contenido del matraz cuantitativamente a una ampolla de decantación de 500 ml (punto 3.2) usando varias fracciones de agua destilada (50 ml). Añadir aproximadamente 80 ml de éter etílico (punto 4.10) y agitar con fuerza aproximadamente durante 60 segundos con liberación periódica de la presión invirtiendo la ampolla de decantación y abriendo la llave. Dejarla en reposo hasta que se produzca una completa separación en dos fases (nota 2).

Retirar entonces la solución de jabón lo más exhaustivamente posible y pasar a una segunda ampolla de decantación. Efectuar otras dos extracciones de la fase hidroalcohólica por el mismo procedimiento, utilizando cada vez de 60 a 70 ml de éter etílico (punto 4.10).

Nota 2: Las emulsiones pueden eliminarse añadiendo pequeñas cantidades de etanol (punto 4.11).

- 5.1.4. Combinar las tres extracciones de éter en una sola ampolla de decantación que contenga 50 ml de agua. Continuar lavando con agua (50 ml) hasta que el agua de lavado no adquiera un color rosa al añadirle una gota de solución de fenoltaleína (punto 4.21).

Una vez eliminada el agua de lavado, filtrar con sulfato sódico anhidro (punto 4.5) a un matraz de 250 ml previamente pesado, lavando el embudo y el filtro con pequeñas cantidades de éter etílico (punto 4.10).

- 5.1.5. Evaporar el disolvente mediante su destilación en un rotavapor a 30 °C al vacío. Añadir 5 ml de acetona y eliminar totalmente el disolvente volátil con una ligera corriente de aire. Secar el residuo en el horno a 103 ± 2 °C durante 15 min. Enfriar en desecador y pesar con precisión de 0,1 mg.

▼ M26

- 5.2. Separación de la fracción de esteroles y dialcoholes triterpénicos (eritrodíol + uvaol)
- 5.2.1. Preparación de placas para cromatografía en capa fina básicas. Sumergir las placas con gel de sílice (punto 4.6) unos 4 cm en la solución etanólica 0,2 N de hidróxido potásico (punto 4.5) durante 10 segundos; dejar secar las placas en una campana durante dos horas y, por último, mantenerlas en un horno a 100 °C durante una hora.

Sacarlas del horno y conservarlas en un desecador de cloruro de calcio (punto 3.13) hasta el momento del uso (las placas sometidas a este tratamiento deben utilizarse en el plazo de quince días como máximo).

Nota 3: 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.

- 5.2.2. Colocar la mezcla de hexano y éter etílico (punto 4.24) (nota 4) en la cubeta de desarrollo, con una profundidad aproximada de 1 cm. Cerrar la cubeta con la tapa adecuada y dejarla así durante al menos media hora, en un lugar frío, de manera que se establezca el equilibrio líquido-vapor; se pueden colocar tiras de papel de filtro que se sumerjan en el eluyente en las caras interiores de la cubeta. 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 4: A fin de que las condiciones de elución sean perfectamente reproducibles, la mezcla de desarrollo debe cambiarse en cada prueba. Alternativamente, se puede utilizar una mezcla de n-hexano/éter etílico 50:50 (V/V).

- 5.2.3. Preparar una solución del insaponificable (punto 5.1.5) al 5% aproximadamente en acetato de etilo (punto 4.12) y, utilizando una microjeringa de 100 µl, depositar 0,3 ml de solución sobre una línea fina e uniforme en el extremo inferior (2 cm) de la placa cromatográfica (punto 5.2.1). Paralela a esta línea, colocar de 2 a 3 µl de la solución de referencia (punto 4.13), de manera que pueda identificarse la banda de esteroles y de dialcoholes triterpénicos después del desarrollo.

- 5.2.4. Introducir la placa en la cubeta de desarrollo, preparada como se indica en el punto 5.2.2. Deberá mantenerse a una temperatura ambiente entre 15 y 20 °C (nota 5). 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.

Nota 5: Una temperatura más alta podría perjudicar la separación.

- 5.2.5. Pulverizar la placa ligera y uniformemente con la solución de 2,7-diclorofluoresceína (punto 4.14) y dejarla secar. Al examinar la placa a la luz ultravioleta pueden identificarse las bandas de esteroides y dialcoholes triperpénicos mediante comparación con las manchas obtenidas a partir de la solución de referencia (punto 4.13). Marcar con lápiz negro los límites de las bandas a lo largo de los márgenes de fluorescencia (véase la placa de la figura 3).

- 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 (punto 3.7); añadir 10 ml de acetato de etilo caliente (punto 4.12), mezclar cuidadosamente con la espátula metálica y filtrar en vacío, recogiendo el filtrado en el matraz cónico (punto 3.8) acoplado al embudo filtrante.

▼ M26

Lavar el residuo en el matraz tres veces con éter etílico (punto 4.3) (empleando cada vez unos 10 ml), recogiendo el filtrado en el mismo matraz 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 (punto 3.9) previamente pesado, evaporar hasta secar mediante calentamiento suave en corriente ligera de nitrógeno, recubrir con algunas gotas de acetona (punto 4.8), evaporar de nuevo hasta secar.

El residuo que queda en el tubo de ensayo debe estar formado por la fracción de esteroides y de dialcoholes triperpénicos.

5.3. Preparación de los trimetilsililéteres.

- 5.3.1. Añadir al tubo que contiene la fracción de esteroides y triterpenos el reactivo de sililación (punto 4.25) (nota 6) a razón de 50 µl por miligramo de esteroides y dialcoholes triperpénicos, evitando toda absorción de humedad (nota 7).

Nota 6: Existen soluciones comerciales listas para usar. Además, también existen otros reactivos de sililación, como la bis-trimetilsililtri-fluoroacetamida + trimetilclorosilano al 1%, que se diluye en el mismo volumen de piridina anhidra.

La piridina se puede sustituir por la misma cantidad de acetonitrilo.

- 5.3.2. Tapar el tubo y agitar cuidadosamente (sin invertir) hasta la completa disolución de los compuestos. Dejarlo en reposo durante al menos 15 min a temperatura ambiente y centrifugar durante algunos minutos; la solución límpida está lista para el análisis mediante cromatografía de gases.

Nota 7: La eventual formación de una ligera opalescencia es normal y no ocasiona ninguna anomalía. La formación de una floculación blanca o la aparición de una coloración rosa es indicativa de presencia de humedad o de deterioro del reactivo. En este caso deberá repetirse la prueba (solo cuando se utilice hexametildisilazano/trimetilclorosilano).

5.4. Cromatografía de gases.

- 5.4.1. Operaciones preliminares: acondicionamiento de la columna capilar.

- 5.4.1.1. Colocar la columna (punto 3.11) en el cromatógrafo de gases conectando el extremo de entrada al inyector de fraccionamiento y el extremo de salida 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 8). 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*), ignición de la llama, conexión con el sistema informático, regulación de la temperatura de la columna, 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.

▼M26

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

5.4.2. Condiciones de funcionamiento:

5.4.2.1. Las condiciones de trabajo son las siguientes:

- temperatura de la columna: 260 ± 5 °C;
- temperatura del inyector: 280-300 °C;
- temperatura del detector: 280-300 °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,
- sensibilidad de registro: 1 a 2 mV de fondo de escala;
- 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 gases, de modo que se obtengan cromatogramas que cumplan los siguientes requisitos:

- el tiempo de retención del pico del β-sitosterol debe ser de 20 ± 5 min;
- el pico del campesterol debe ser: para el aceite de oliva (contenido medio del 3%), $20 \pm 5\%$ del fondo de escala; para el aceite de soja (contenido medio del 20%), $80 \pm 10\%$ del fondo de escala;
- se deben separar todos los esteroides presentes; es necesario que los picos no solo 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 (sitostanol) 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 de la membrana del inyector y, después de 1 o 2 segundos, inyectar rápidamente; transcurridos unos 5 segundos, extraer la aguja lentamente.

También puede emplearse un inyector automático.

- 5.4.3.2. Continuar el registro hasta la completa elución de los TMSE de los dialcoholes triperpénicos presentes. La línea de base debe ajustarse en todo momento a las condiciones exigidas (punto 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 esteroides y dialcoholes triperpénicos analizada en las mismas condiciones (véase apéndice).

▼ M26

La elución de los esteroides y dialcoholes triperpénicos se efectúa en el orden siguiente: colesterol, brasicasterol, ergosterol, 24-metilencolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, Δ -7-campesterol, Δ -5,23-estigmastadienol, clerosterol, β -sitosterol, sitostanol, Δ -5-avenasterol, Δ -5,24-estigmastadienol, Δ -7-estigmastenol, Δ -7-avenasterol, eritrodol y uvaol.

En el cuadro 1 figuran los tiempos de retención correspondientes al β -sitosterol para las columnas SE 52 y SE 54.

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

5.4.5. Determinación cuantitativa.

5.4.5.1. Calcular las áreas de los picos del α -colestanol y de los esteroides y dialcoholes triperpénicos utilizando el sistema informático. No se tomarán en cuenta los picos de aquellos componentes que no figuren en el cuadro 1 (el ergosterol no debe calcularse). El factor de respuesta para el α -colestanol debe considerarse como 1.

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

$$\text{esterol } x = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

donde:

A_x = área del pico del esteroide x , en unidades de cuenta del sistema informático;

A_s = área del pico del α -colestanol, en unidades de cuenta del sistema informático;

m_s = peso de α -colestanol añadido, en miligramos;

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

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1. Se expresan las concentraciones de cada uno de los esteroides en mg/kg de materia grasa y su suma como «esteroides totales».

La composición de cada uno de los esteroides y del eritrodol y uvaol debe expresarse con una cifra decimal.

La composición de los esteroides totales debe expresarse sin ningún decimal.

▼ M28

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

$$\text{sterol}_x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

donde:

A_x = área del pico de x ;

$\sum A$ = suma de las áreas de todos los picos de esteroides;

▼ M26

6.3. β -sitosterol aparente: Δ 5-23-estigmastadienol+ clerosterol + β -sitosterol + sitostanol + Δ 5-avenasterol + Δ 5-24-estigmastadienol.

▼M26

6.4. Cálculo del porcentaje de eritrodiol y uvaol:

$$\text{Eritrodiol + uvaol} = \frac{\text{Er} + \text{Uv}}{\text{Er} + \text{Uv} + \Sigma\text{A}} \times 100$$

Donde

ΣA = suma de las áreas de los esteroides en unidades de cuenta del sistema informático;

Er = área del eritrodiol en unidades de cuenta del sistema informático;

Uv = área del uvaol en unidades de cuenta del sistema informático;

▼ **M26***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/tM, siendo L la longitud de la columna en cm y tM el tiempo, expresado en segundos.

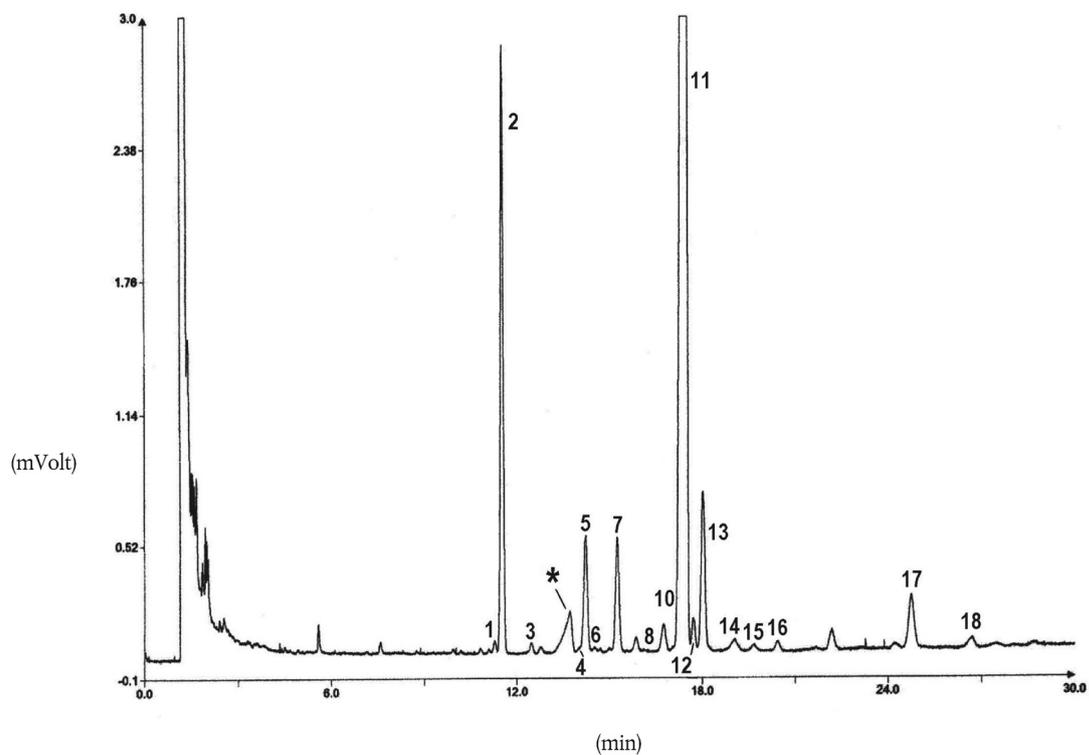
Cuadro 1**Tiempos de retención relativos de los esteroides**

Pico	Identificación		Tiempo de retención relativo	
			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
*	Ergosterol	[24S]-24-metil- Δ -5-7-22 colestatrien 3 β -ol	0,78	0,76
4	24-Metilencolesterol	24-metilen- 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	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-etil-colestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-Avenasterol	(24Z)-24-etiliden- Δ -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-colesten-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-Avenasterol	(24Z)-24-etiliden- Δ -7-colesten-3 β -ol	1,16	1,16
17	Eritrodiol	5 α -olean-12-en-3 β 28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-ursen-3 β 28-diol	1,52	1,52

▼ M26

Figura 1

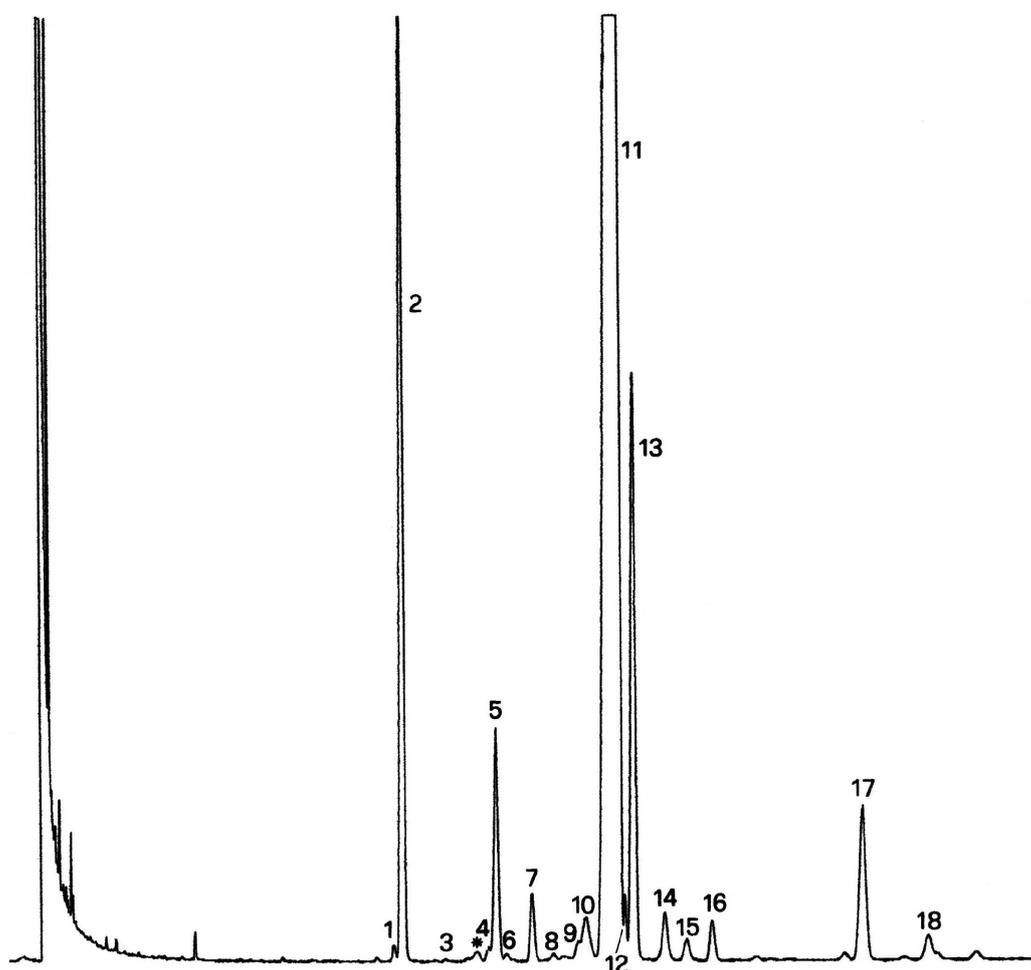
Cromatografía de gases de la fracción de esteroides y dialcoholes triperpénicos de aceite de oliva lampante (con ayuda de patrón interno)



▼ M26

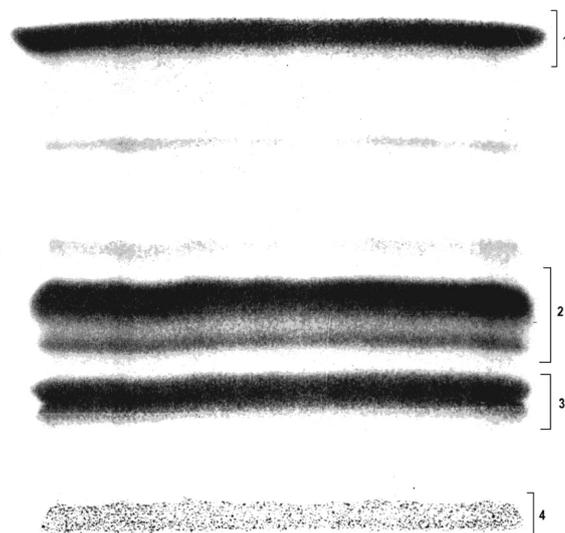
Figura 2

Cromatografía de gases de la fracción de esteroides y dialcoholes triperpénicos de aceite de oliva refinado (con ayuda de patrón interno)



▼ **M26***Figura 3*

Placa cromatográfica de aceite de orujo de oliva en la que se observa el área que debe rasparse para determinar el contenido de esteroides y dialcoholes triperpénicos



- 1 – Escualeno
- 2 – Alcoholes triperpénicos y alifáticos
- 3 – Esteroides y dialcoholes triperpénicos
- 4 – Inicio y ácidos grasos libres

▼ **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. Centrifuga 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 (mucilago 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

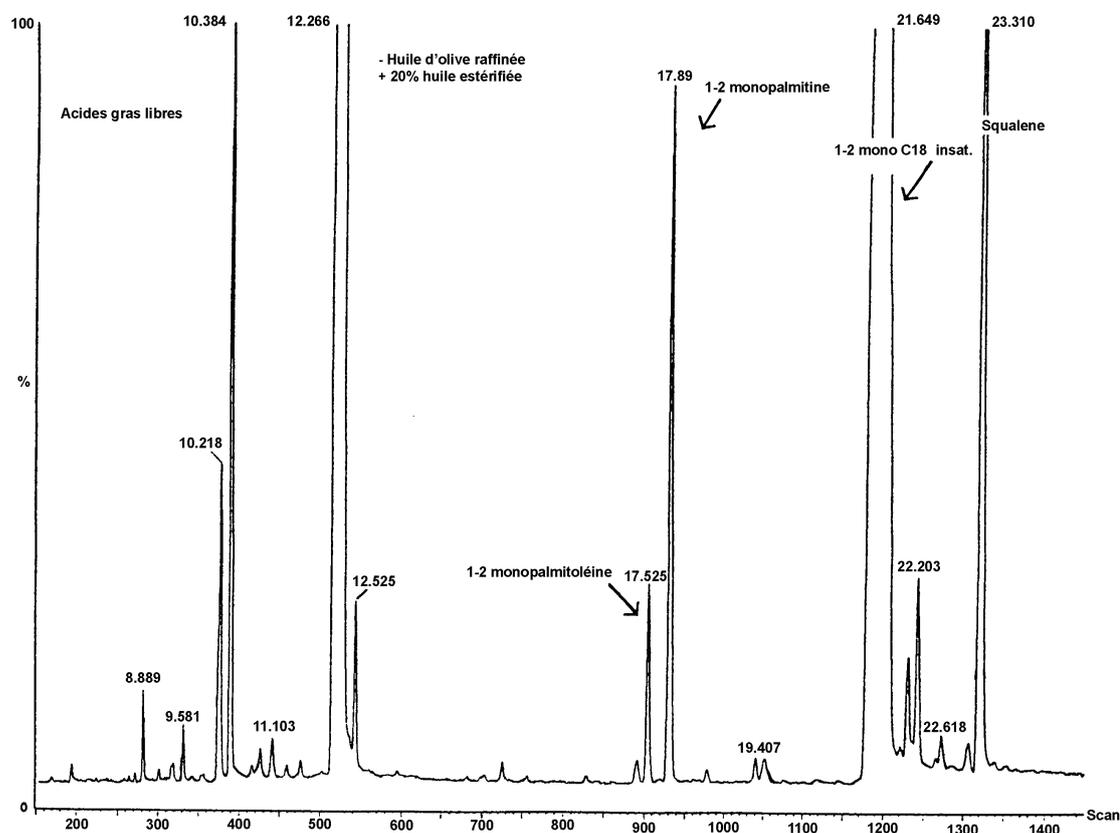
El informe del análisis deberá especificar:

- 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.

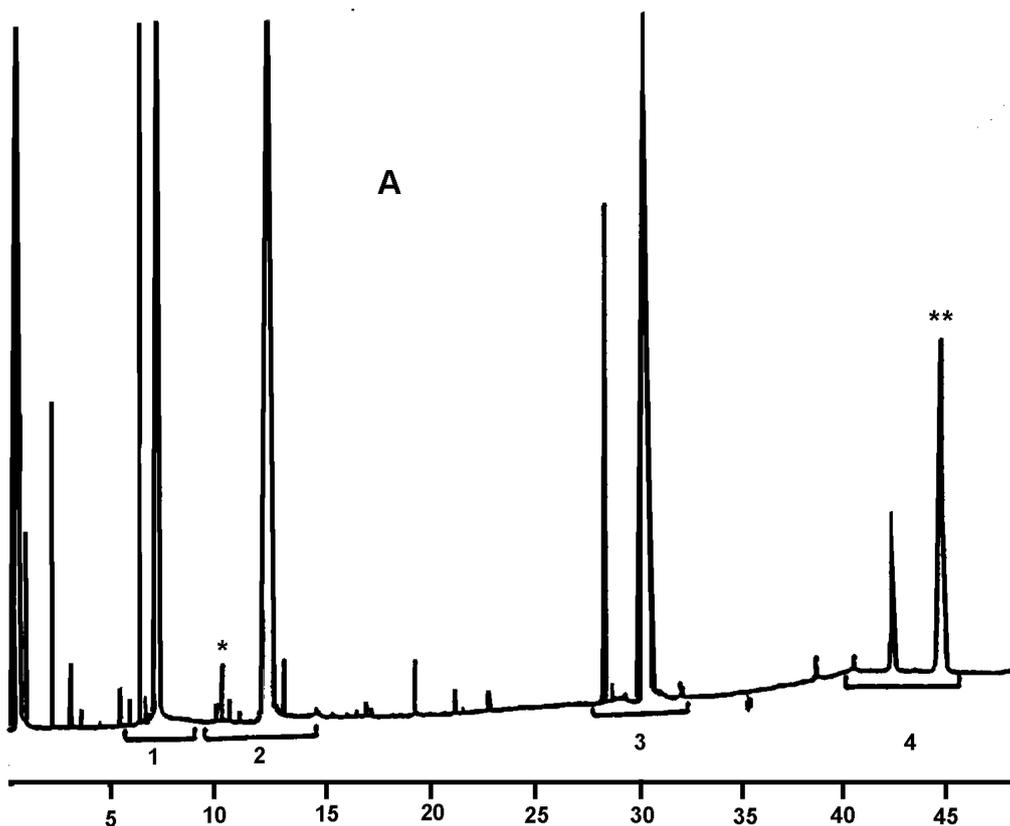
▼ M21

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 %



Legenda:

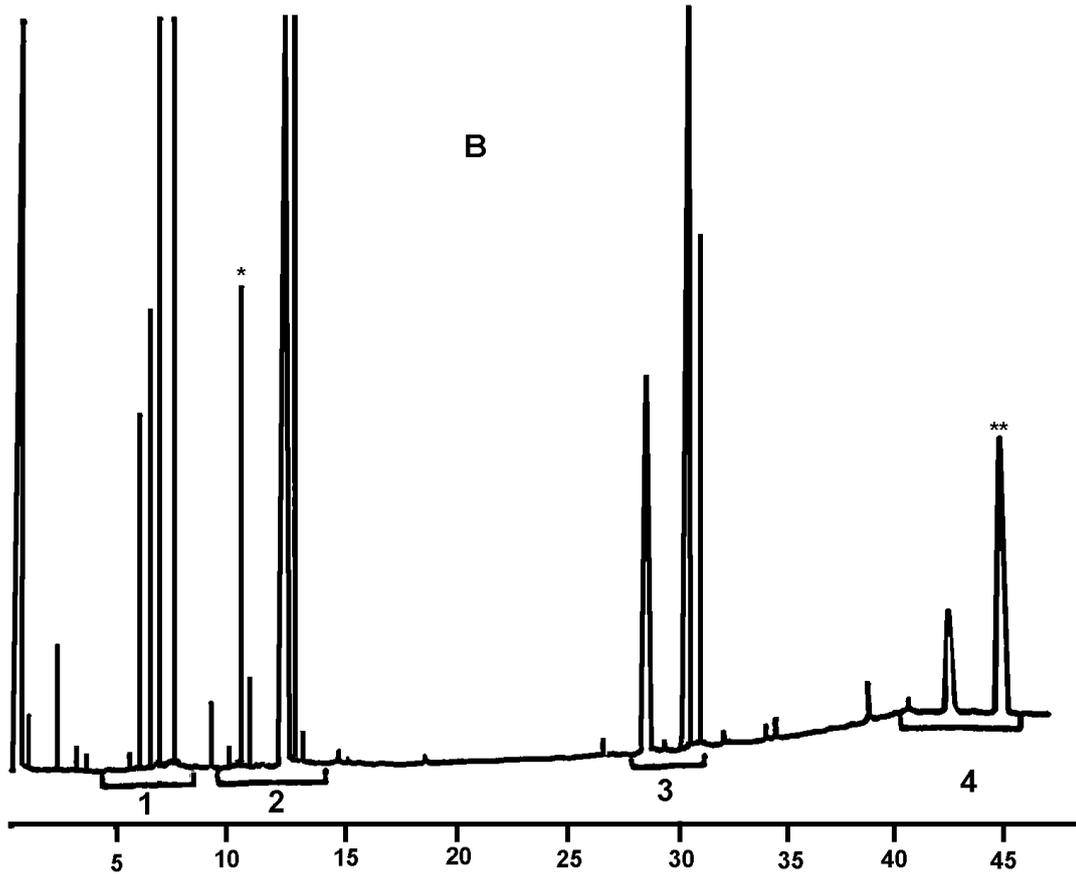
- 1 = Ácidos grasos libres
- 2 = Monoglicéridos
- 3 = Diglicéridos
- 4 = Triglicéridos
- * = 2-monopalmitina
- ** = Triglicérido C₅₄

▼ M21

Cromatograma de:

B) aceite esterificado previo tratamiento con lipasa y 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 %.



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**

ANEXO IX

PRUEBA ESPECTROFOTOMÉTRICA EN EL ULTRAVIOLETA

INTRODUCCIÓN

El examen espectrofotométrico en el ultravioleta puede proporcionar indicaciones sobre la calidad de una materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones inducidas en ella 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 conjugados que resultan de los procesos de oxidación y/o de las prácticas de refinera. Los valores de estas absorciones se expresan en extinciones específicas $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (extinción de una solución de la materia grasa al 1 % en el disolvente determinado, en un espesor de 10 mm) que se expresará convencionalmente como K (también denominado «coeficiente de extinción»).

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este anexo describe el procedimiento de ejecución de una prueba espectrofotométrica del aceite de oliva en la región ultravioleta.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se disuelve una muestra en el disolvente requerido y se determina la absorción de la solución a las longitudes de onda prescritas, respecto al disolvente puro.

Las extinciones específicas a 232 nm y 268 nm en isoocetano o a 232 nm y 270 nm en ciclohexano se calculan para una concentración del 1 % p/v en una cubeta de 10 mm.

3. EQUIPO

3.1. Un espectrofotómetro para medidas en longitudes de onda ultravioleta (de 220 nm a 360 nm), con capacidad de lectura para cada unidad nanométrica. Se recomienda realizar una comprobación periódica de la precisión y la reproducibilidad de la absorbencia y de las escalas de longitud de onda, así como de la luz parásita.

3.1.1. *Escala de onda*: puede comprobarse mediante un material de referencia que consta de un filtro de vidrio óptico que contiene óxido de holmio o una solución de óxido de holmio (sellado o no) con distintas bandas de absorción. El material de referencia está concebido para la verificación y calibración de las escalas de longitud de onda de espectrofotómetros de luz visible y ultravioleta con anchos nominales de banda espectral de 5 nm o menos. Las mediciones se efectúan con respecto a un blanco de aire en el rango de longitud de onda de 640 a 240 nm, de acuerdo con las instrucciones que se incluyen en los materiales de referencia. La corrección de la línea de base se realiza con un recorrido del haz vacío en cada alteración del ancho de ranura. Las longitudes de onda de la norma se enumeran en el certificado del material de referencia.

3.1.2. *Escala de absorbencia*: puede comprobarse con materiales de referencia sellados comercialmente disponibles que constan de soluciones ácidas de dicromato potásico, en determinadas concentraciones y valores de absorbencia certificados en su λ_{max} (de cuatro soluciones de dicromato potásico en ácido perclórico selladas en cuatro cubetas de cuarzo para UV para medir la linealidad y precisión fotométrica en el UV). Las soluciones de dicromato potásico se miden con respecto a un blanco del ácido utilizado, tras corregir la línea de base, de acuerdo con las instrucciones que se incluyen con el material de referencia. Los valores de absorbencia se enumeran en el certificado del material de referencia.

Otra posibilidad para controlar la respuesta de la célula fotoeléctrica y del fotomultiplicador es proceder 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.

▼M28

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 $0,200 \pm 0,005$.

- 3.2. Cubetas de cuarzo, con tapadera, para medidas en longitudes de onda ultravioleta (de 220 a 360 nm), con paso óptico de 10 mm. 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. Un matraz aforado con capacidad de 25 ml, de clase A.
- 3.4. Balanza analítica, capaz de leer con una precisión de 0,0001 g.

4. REACTIVOS

Durante el análisis, a menos que se indique lo contrario, deben utilizarse únicamente reactivos de calidad analítica reconocida y agua destilada, desmineralizada o de una pureza equivalente.

Disolvente: iso-octano (2,2,4-trimetilpentano) para la medición a 232 nm y 268 nm o ciclohexano para la medición a 232 nm y 270 nm, con una absorbencia inferior a 0,12 a 232 nm e inferior a 0,05 a 270 nm frente a agua destilada, medida en una cubeta de 10 mm.

5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. La muestra debe ser perfectamente homogénea y estar exenta de impurezas en suspensión. De no ser así, debe ser filtrada con papel a una temperatura de aproximadamente 30 °C.
- 5.2. Pesar en un matraz aforado de 25 ml unos 0,25 g (con precisión de 1 mg) de la muestra así preparada, enrasar con el disolvente especificado y homogeneizar. La solución resultante debe estar perfectamente clara. Si presenta opalescencia o turbidez, filtrar rápidamente con papel de filtro.

NOTA: por lo general, basta con una masa de 0,25-0,30 g para las medidas de absorbencia de aceites de oliva virgen y virgen extra a 268 nm y 270 nm. Para mediciones a 232 nm, se requieren normalmente 0,05 g de muestra, de modo que por lo general se preparan dos soluciones distintas. En el caso de medidas de absorbencia de los aceites de orujo de oliva, los aceites de oliva refinados y los aceites de oliva adulterados, por lo general se necesita una porción menor de muestra, por ejemplo 0,1 g, debido a su mayor absorbencia.

- 5.3. En caso necesario, corregir la línea de base (220-290 nm) con el disolvente en cubetas de cuarzo (muestra y referencia), a continuación, rellenar la cubeta de cuarzo de muestra con la solución de prueba y medir la extinciones a 232, 268 o 270 nm con respecto al disolvente utilizado como referencia.

Los valores de extinción obtenidos deben estar comprendidos en el intervalo entre 0,1 y 0,8 o dentro del rango de linealidad del espectrofotómetro, que debe verificarse. De lo contrario, es necesario repetir la medición utilizando soluciones más concentradas o más diluidas, según el caso.

- 5.4. Después de medir la absorbencia a 268 o 270 nm, medir la absorbencia a λ_{\max} , $\lambda_{\max} + 4$ y $\lambda_{\max} - 4$. Estos valores de absorbencia se utilizan para determinar la variación en la extinción específica (ΔK).

NOTA: λ_{\max} se considera que es igual a 268 nm cuando se utiliza isooctano como disolvente y 270 nm cuando se utiliza ciclohexano.

▼ M28

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

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

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c \times s}$$

donde:

$K\lambda$ = extinción específica a la longitud de onda λ ,

$E\lambda$ = extinción medida a la longitud de onda λ ,

c = concentración de la solución en g/100 ml,

s = longitud del paso de la cubeta de cuarzo en cm,

expresado con dos decimales.

6.2. **Variación de la extinción específica (ΔK)**

La variación del valor absoluto de la extinción (ΔK) se define como:

$$\Delta K = \left| K_m - \left(\frac{K_{\lambda m} - 4 + K_{\lambda m} + 4}{2} \right) \right|$$

donde K_m es la extinción específica a la longitud de onda de máxima absorción a 270 nm y 268 nm en función del disolvente utilizado.

El resultado ha de venir expresado con dos decimales.

▼ **M28**

ANEXO X

**DETERMINACIÓN DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES**

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este anexo ofrece orientación sobre la determinación de ácidos grasos libres y unidos mediante cromatografía de gases en las grasas y aceites vegetales tras su conversión en ésteres metílicos de ácidos grasos.

Los ácidos grasos unidos de los triglicéridos y, en función del método de esterificación, los ácidos grasos libres, se convierten en ésteres metílicos de ácidos grasos, que se determinan mediante cromatografía de gases con columna capilar.

El método descrito en el presente anexo permite determinar los ésteres metílicos de ácidos grasos de C₁₂ a C₂₄, incluidos los ésteres metílicos de ácidos grasos saturados, *cis* y *trans* monoinsaturados y *cis* y *trans* poliinsaturados.

2. PRINCIPIO

La cromatografía de gases (CG) se utiliza para el análisis cuantitativo de los ésteres metílicos de ácidos grasos. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se preparan con arreglo a la Parte A. A continuación, se inyectan y evaporan dentro del inyector. La separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos se lleva a cabo en columnas analíticas de polaridad y longitud específicas. Para detectar los ésteres metílicos de ácidos grasos se utiliza un detector de ionización de llama (DIL). Las condiciones del análisis figuran en la Parte B.

Podrá utilizarse hidrógeno o helio como gas portador (fase móvil) en la cromatografía de gases de ésteres metílicos de ácidos grasos con el DIL. El hidrógeno acelera la separación y produce picos más fuertes. La fase estacionaria es una capa microscópica de una fina película líquida en una superficie sólida inerte de sílice fundida.

A medida que pasan a través de la columna capilar, los compuestos volatilizados que se analizan interactúan con la fase estacionaria recubriendo la superficie interior de la columna. Debido a la distinta interacción de los compuestos, estos se eluyen en momentos diferentes, lo que se conoce como tiempo de retención del compuesto para un conjunto determinado de parámetros de análisis. La comparación de los tiempos de retención se utiliza para identificar los diferentes compuestos.

PARTE A

**PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE LOS ÁCIDOS
GRASOS DEL ACEITE DE OLIVA Y DEL ACEITE DE ORUJO DE
OLIVA**

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Esta parte especifica la preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Incluye los métodos para preparar ésteres metílicos de los ácidos grasos de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

La preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva se lleva a cabo por transesterificación con solución metanólica de hidróxido de potasio a temperatura ambiente. La necesidad de purificación de la muestra antes de la transesterificación depende del contenido de ácidos grasos libres de la muestra y del parámetro analítico que se vaya a determinar; puede elegirse en función de la tabla siguiente:

▼ **M28**

Categoría del aceite	Método
Aceite de oliva virgen con acidez $\leq 2,0$ %	1. Ácidos grasos 2. Ácidos grasos <i>trans</i>
Aceite de oliva refinado	3. Δ ECN42 (después de la purificación con gel de sílice SPE)
Aceite de oliva compuesto de aceite de oliva refinado y aceites de oliva vírgenes	
Aceite de orujo de oliva refinado	
Aceite de orujo de oliva	
Aceite de oliva virgen con acidez $> 2,0$ % Aceite de orujo de oliva crudo	1. Ácidos grasos (después de la purificación con gel de sílice SPE) 2. Ácidos grasos <i>trans</i> (después de la purificación con gel de sílice SPE) 3. Δ ECN42 (después de la purificación con gel de sílice SPE)

3. METODOLOGÍA

3.1. **Transesterificación con solución metanólica de hidróxido de potasio a temperatura ambiente.**3.1.1. *Principio*

Los ésteres metílicos se forman por transesterificación con una solución metanólica de hidróxido potásico como etapa intermedia antes de que se produzca la saponificación.

3.1.2. *Reactivos*

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

3.1.2.2. Hexano, para cromatografía.

3.1.2.3. Heptano para cromatografía.

3.1.2.4. Éter dietílico, estabilizado para su análisis.

3.1.2.5. Acetona para cromatografía.

3.1.2.6. Disolvente de elución para purificar el aceite mediante cromatografía en columna/SPE: mezcla de éter de hexano/éter dietílico 87/13 (v/v).

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

3.1.2.8. Cartuchos de gel de sílice, 1 g (6 ml), para extracción en fase sólida.

3.1.3. *Equipo*

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

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

▼ **M28**3.1.4. *Purificación de las muestras de aceite*

Cuando sea necesario, las muestras se purificarán pasando el aceite a través de un cartucho de gel de sílice para extracción en fase sólida. Se coloca un cartucho de gel de sílice (3.1.2.8) en un aparato de elución en vacío y se lava con 6 ml de hexano (3.1.2.2); el lavado se realiza sin vacío. A continuación, se introduce en la columna una solución de aceite (0,12 g aproximadamente) en 0,5 ml de hexano (3.1.2.2). Después se eluye con 10 ml de hexano/éter dietílico (87:13 v/v) (3.1.2.6). 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.

3.1.5. *Procedimiento*

En un tubo de rosca de 5 ml (3.1.3.1), pesar aproximadamente 0,1 g de la muestra de aceite. Añadir 2 ml de heptano (3.1.2.2) y agitar. Añadir 0,2 ml de la solución metanólica de hidróxido potásico (3.1.2.7), 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.

PARTE B

ANÁLISIS DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES1. **ÁMBITO DE APLICACIÓN**

Esta parte proporciona orientaciones generales para utilizar la cromatografía de gases en columna capilar para determinar la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos con arreglo al método especificado en la Parte A.

El método no es aplicable a los ácidos grasos polimerizados.

2. **REACTIVOS**2.1. **Gas portador**

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

Nota 1: El hidrógeno puede duplicar la velocidad de 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.

2.2.3. Nitrógeno (pureza > 99 %).

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. Los isómeros cis y trans de ésteres metílicos octadecenoicos, octadecadienoicos y octadecatrienoicos son útiles para la identificación de isómeros trans de ácidos insaturados.

Deberá evitarse la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados.

▼ M28**3. INSTRUMENTAL**

Las normas que figuran a continuación se refieren al equipo ordinario para cromatografía de gases, utilizando columnas capilares y un detector de ionización de llama.

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 con columnas capilares; en este caso, el sistema de inyección deberá estar especialmente diseñado para poder operar con esa clase de columnas. Podrá utilizarse un inyector con división de flujo o un inyector en columna sin fraccionamiento.

3.1.2. Horno

El horno podrá calentar la columna capilar a 260 °C como mínimo y mantener dicha temperatura con una oscilación máxima de 0,1 °C. 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 capilar

3.1.3.1. Tubo de un material inerte a las sustancias que vayan a analizarse (generalmente, vidrio o sílice fundida). El diámetro interior será de entre 0,20 y 0,32 milímetros. La superficie interior se someterá a un tratamiento adecuado (por ejemplo, preparación de la superficie, inactivación) antes de recibir el recubrimiento de fase estacionaria. Para los ácidos grasos y los isómeros cis y trans de los ácidos grasos basta con una longitud de 60 m.

3.1.3.2. En la fase estacionaria, son apropiadas las columnas de polisiloxano polar (cianopropilsilicona) de fase químicamente ligada.

Nota 2: Existe el riesgo de que los polisiloxanos polares dificulten la identificación y separación del ácido linoléico y de los ácidos C₂₀.

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

3.1.3.3. 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 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 3: En el comercio pueden obtenerse columnas adecuadas previamente acondicionadas.

3.1.4. *Detector de ionización de llama y convertidor-amplificador.*

3.2. Jeringa

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

3.3. Sistema de recopilación de datos

Sistema de recopilación de datos conectado en línea con los detectores y con un programa de software adecuado para la integración y normalización de los picos.

▼ **M28**

4. PROCEDIMIENTO

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

4.1. **Condiciones de ensayo:**4.1.1. *Selección de las condiciones de funcionamiento óptimas para las columnas capilares*

Debido a la eficacia y permeabilidad de las columnas capilares, la separación de los constituyentes y la duración del análisis dependen considerablemente del flujo del gas portador en la columna. Por lo tanto, será necesario optimizar las condiciones de funcionamiento mediante el ajuste de este parámetro (o la simple pérdida de carga de la columna) dependiendo de si el objetivo es mejorar la separación o la velocidad de análisis.

Las siguientes condiciones han demostrado ser adecuadas para la separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos (C₄ a C₂₆). En el apéndice B se muestran ejemplos de cromatogramas:

Temperatura del inyector:	250 °C
Temperatura del detector:	250 °C
Temperatura del horno:	de 165 °C (8 min.) a 210 °C a 2 °C/min.
Gas portador hidrógeno:	presión en la cabeza de la columna, 179 kPa
Flujo total:	154,0 ml/min
Relación de fraccionamiento:	1:100
Volumen de inyección:	1 µl

4.1.2. *Determinación de la resolución (véase el apéndice A)*

Calcular la resolución, R, de dos picos vecinos I y II, utilizando la fórmula:

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ o } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP) (Farmacopea de los Estados Unidos),}$$

O

$$R = 1,18 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{0,5(I)} + \omega_{0,5(II)})) \text{ (EP, BP, JP, DAB), (JP (Farmacopea japonesa), EP (Farmacopea europea), BP (Farmacopea británica))}$$

donde:

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

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

$t_{r(I)}$ es el tiempo de retención del pico I;

$t_{r(II)}$ es el tiempo de retención del pico II;

$\omega_{(I)}$ es la anchura de la base del pico I;

$\omega_{(II)}$ es la anchura de la base del pico II;

$\omega_{0,5}$ es la anchura del compuesto especificado a media altura del pico;

Si $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$, calcular R empleando las fórmulas siguientes:

$$R = (d_{r(II)} - d_{r(I)})/\omega = (d_{r(II)} - d_{r(I)})/4\sigma$$

donde:

σ es la desviación estándar (consulte el apéndice A, Figura 1).

▼ **M28**

Si la distancia d_r entre los dos picos $d_{r(II)} - d_{r(I)}$ es igual a 4σ , el factor de resolución es $R = 1$.

Si dos picos no están completamente separados, las tangentes a los puntos de inflexión de los dos picos se intersecan en el punto C. Para separar completamente los dos picos, la distancia entre los dos debe ser igual a:

$$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6 \sigma \text{ siendo } R = 1,5 \text{ (véase el apéndice A, figura 3).}$$

5. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

5.1. **Análisis cualitativo**

Identificar los picos de ésteres metílicos de la muestra a partir del cromatograma del apéndice B, figura 1, si es necesario por interpolación o por comparación con los de las mezclas de ésteres metílicos de referencia (tal como se indica en el punto 2.3).

5.2. **Análisis cuantitativo**5.2.1. *Determinación de la composición*

Calcular el porcentaje en peso w_i de cada éster metílico de ácidos grasos, expresado como un porcentaje en peso de los ésteres metílicos, de la siguiente manera:

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:

$$w_i = (A_i/\Sigma A) \times 100$$

donde:

A_i es la superficie debajo del pico de cada éster metílico de ácido graso i ;

ΣA es la suma de las superficies de todos los picos de todos los ésteres metílicos de ácidos grasos.

Los resultados se expresan con dos cifras decimales.

Nota 4: Para las grasas y aceites, la fracción de masa de los ésteres metílicos de ácidos grasos es igual a la fracción de masa de los triglicéridos en gramos por cada 100 g. 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 determinados casos, por ejemplo en presencia de ácidos grasos con menos de ocho átomos de carbono o de ácidos con grupos secundarios, las superficies se corregirán con factores de corrección específicos (F_{ci}). Estos factores se determinarán para cada uno de los instrumentos. Para ello se utilizarán materiales de referencia adecuados con composición de ácidos grasos certificada en el rango correspondiente.

Nota 5: Estos factores de corrección no son idénticos a los factores de corrección teóricos DIL que se indican en el apéndice A, ya que estos también incluyen el funcionamiento del sistema de inyección, etc. Sin embargo, en el caso de que haya diferencias mayores, debe revisarse el funcionamiento de todo el sistema.

▼ **M28**

La fórmula que se aplicará a la mezcla de referencia para obtener el porcentaje en peso de los ésteres metílicos de ácidos grasos i es la siguiente:

$$w_i = (m_i / \Sigma m) \times 100$$

donde

m_i es el peso de los ésteres metílicos de ácidos grasos i en la mezcla de referencia;

Σm es la suma de los pesos de los diversos componentes como los ésteres metílicos de ácidos grasos de la mezcla de referencia.

A partir del cromatograma de la mezcla de referencia, calcular el porcentaje en superficie de los ésteres metílicos de ácidos grasos i del siguiente modo:

$$w_i = (A_i / \Sigma A) \times 100$$

donde:

A_i es la superficie de los ésteres metílicos de ácidos grasos i en la mezcla de referencia;

ΣA es la suma de todas las superficies de todos los ésteres metílicos de ácidos grasos de la mezcla de referencia.

El factor de corrección F_c es entonces

$$F_c = (m_i \times \Sigma A) / (A_i \times \Sigma m)$$

En el caso de la muestra, el porcentaje en peso de cada éster metílico de ácidos grasos i es:

$$w_i = (F_i \times A_i) / \Sigma (F_i \times A_i)$$

Los resultados se expresan con dos cifras decimales.

Nota 6: El valor calculado se corresponde con el porcentaje en peso de cada ácido graso calculado como triglicérido por cada 100 g de materia grasa.

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:

$$w_i = (m_{IS} \times F_i \times A_i) / (m \times F_{IS} \times A_{IS})$$

donde:

A_i es la superficie de los ésteres metílicos de ácidos grasos i ;

A_{IS} es la superficie del patrón interno;

F_i es el factor de corrección del ácido graso i , expresado como éster metílico de ácidos grasos;

F_{IS} es el factor de corrección del patrón interno;

m es el peso de la porción analítica en miligramos

m_{IS} es el peso del patrón interno en miligramos.

Los resultados se expresan con dos cifras decimales.

▼ M28**6. INFORME DEL ENSAYO**

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. Se mencionarán, asimismo, cualesquiera procedimientos de trabajo que no se especifiquen en el presente método estándar 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.

7. PRECISIÓN**7.1. Resultados de la prueba interlaboratorios**

Los datos de la prueba interlaboratorios con respecto a la precisión del método figura en el anexo C a la norma COI/T. 20/Doc. N° 33. Los valores derivados de esta prueba interlaboratorios pueden no ser aplicables a matrices y gamas de concentración distintas de las indicadas aquí.

7.2. Repetibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados independientes y únicos de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material de prueba, en el mismo laboratorio, por el mismo operario, con el mismo equipo, dentro de un breve plazo, no superará en más del 5 % de los casos el valor r que figura en las tablas 1 a 14 del anexo C a la norma COI/T. 20/Doc. N° 33.

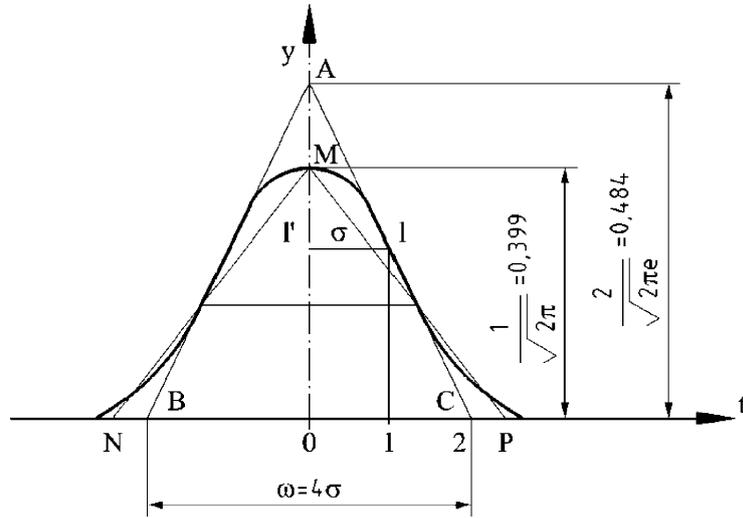
7.3. Reproducibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados particulares de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material de prueba, en distintos laboratorios, por distintos operarios, con distintos equipos, en más del 5 % de los casos no será mayor que el valor R que figura en las tablas 1 a 14 del anexo C a la norma COI/T. 20/Doc. N° 33.

▼ M28

Apéndice A

Figura 1



con anchura $\omega_{0,5}$ a media altura del triángulo (ABC) y anchura b a media altura del triángulo (NPM).

Figura 2

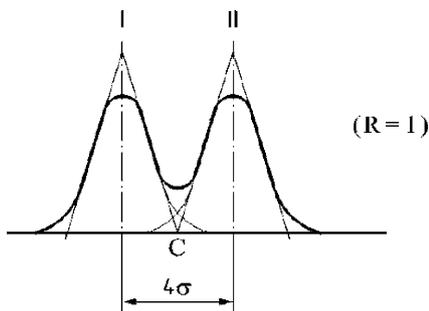
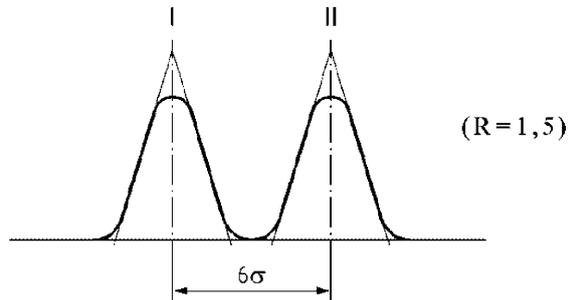


Figura 3

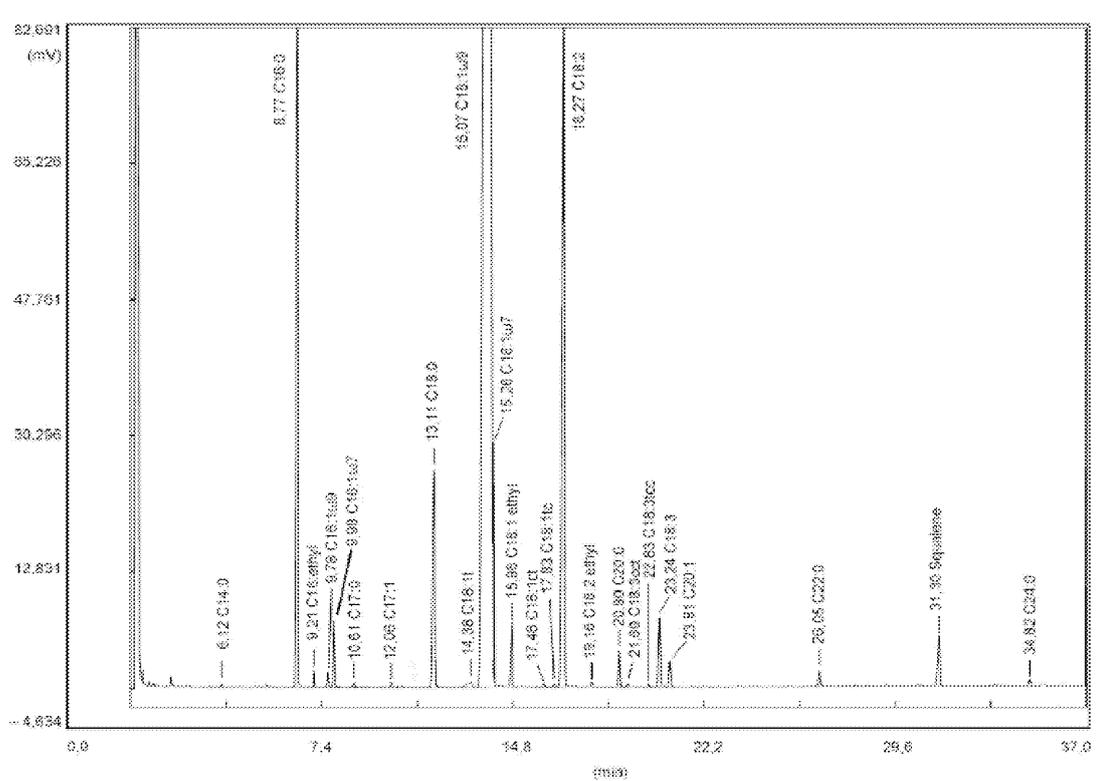


▼M28

Apéndice B

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.

▼ **M26**

ANEXO XII

MÉTODO DEL CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL PARA LA VALORACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LOS ACEITES DE OLIVA VÍRGENES▼ **M28**

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método 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 de la Parte VIII del anexo VII del Reglamento (UE) n° 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽¹⁾ 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 y del atributo frutado, determinados por un grupo de catadores seleccionados, entrenados y evaluados, constituidos en panel.

Las normas del COI que se mencionan en este anexo deben usarse en la versión más reciente disponible.

▼ **M26**

2. ANÁLISIS SENSORIAL: VOCABULARIO GENERAL BÁSICO

Remítase a la norma COI/T.20/Doc. N° 4 «Análisis sensorial: vocabulario general básico».

3. VOCABULARIO ESPECÍFICO

3.1. **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 frutos en las que se han desarrollado abundantes hongos y levaduras a causa de haber permanecido amontonadas con humedad varios días, o aceite obtenido de las aceitunas que han sido recogidas con tierra o barro y que no han sido lavadas.

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.

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

► **C6** *Aceitunas heladas (madera húmeda)*: ◀ Flavor característico de aceites que han sido extraídos de aceitunas que han sufrido un proceso de congelación en el árbol.

⁽¹⁾ Reglamento (UE) n° 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre de 2013, por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) n° 922/72, (CEE) n° 234/79, (CE) n° 1037/2001 y (CE) n° 1234/2007 (DO L 347 de 20.12.2013, p. 671).

▼ M283.1.1. *Otros atributos negativos*

<i>Cocido quemado</i>	o Flavor característico del aceite originado por un excesivo y/o prolongado calentamiento durante el procesado, muy particularmente durante el termo-batido de la pasta, si este se realiza en condiciones térmicas inadecuadas.
<i>Heno-madera</i>	Flavor característico de algunos aceites procedentes de aceitunas secas.
<i>Basto</i>	Sensación buco-táctil densa y pastosa producida por algunos aceites viejos.
<i>Lubricante</i>	Flavor del aceite que recuerda al gasóleo, a la grasa de lubricar o al aceite mineral.
<i>Alpechín</i>	Flavor adquirido por el aceite a causa de un contacto prolongado con alpechín que han sufrido procesos fermentativos.
<i>Salmuera</i>	Flavor del aceite extraído de aceitunas conservadas en salmuera.
<i>Metálico</i>	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.
<i>Esparto</i>	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.
<i>Gusano</i>	Flavor característico del aceite obtenido de aceitunas fuertemente atacadas por larvas de mosca del olivo (<i>Bactrocera oleae</i>).
<i>Pepino</i>	Flavor que se produce en el aceite cuando se mantiene en un envase hermético durante un tiempo excesivo, particularmente en hojalata, que se atribuye a la formación de 2,6-nonadienal.

3.2. **Atributos positivos**

<i>Frutado</i>	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.
<i>Amargo</i>	Sabor elemental característico del aceite obtenido de aceitunas verdes o en envero. Se percibe en las papilas circunvaladas de la uve lingual.
<i>Picante</i>	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.

▼ M293.3. **Terminología opcional para el etiquetado**

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

▼ **M29**

Atributos positivos (frutado, amargo y picante): En función de la intensidad de la percepción:

- *Robusto*, cuando la mediana del atributo sea superior a 6.
- *Medio*, cuando la mediana del atributo esté comprendida entre 3 y 6.
- *Delicado*, cuando la mediana del atributo sea inferior a 3.

Frutado Conjunto de sensaciones olfativas características del aceite, dependientes de la variedad de las aceitunas, procedentes de frutos sanos y frescos, en el que no predomina el sabor del fruto verde ni el del fruto maduro, y percibidas por vía directa y/o retronasal.

Frutado verde Conjunto de sensaciones olfativas características del aceite que recuerdan a los frutos verdes, dependientes de la variedad de las aceitunas, procedentes de aceitunas verdes, sanas y frescas, y percibidas por vía directa y/o retronasal.

Frutado maduro Conjunto de sensaciones olfativas características del aceite, que recuerdan a los frutos maduros, dependientes de la variedad de las aceitunas, procedente de aceitunas sanas y frescas, y percibidas por vía directa y/o retronasal.

Equilibrado Aceite que no presenta desequilibrio, entendiéndose por tal la sensación olfato-gustativa y táctil del aceite en el que la mediana de los atributos amargo y picante son como máximo dos puntos superiores a la mediana del atributo frutado.

Aceite dulce Aceite en el que la mediana de los atributos amargo y picante es inferior o igual a 2.

Lista de términos en función de la intensidad de la percepción:

Términos sujetos a la presentación de un certificado de ensayo organoléptico	Mediana del atributo
Frutado	—
Frutado maduro	—
Frutado verde	—
Frutado delicado	Inferior a 3
Frutado medio	Entre 3 y 6
Frutado robusto	Superior a 6
Frutado maduro delicado	Inferior a 3
Frutado maduro medio	Entre 3 y 6
Frutado maduro robusto	Superior a 6
Frutado verde delicado	Inferior a 3

▼ **M29**

Términos sujetos a la presentación de un certificado de ensayo organoléptico	Mediana del atributo
Frutado verde medio	Entre 3 y 6
Frutado verde robusto	Superior a 6
Amargo delicado	Inferior a 3
Amargo medio	Entre 3 y 6
Amargo robusto	Superior a 6
Picante delicado	Inferior a 3
Picante medio	Entre 3 y 6
Picante robusto	Superior a 6
Aceite equilibrado	La mediana de los atributos amargo y picante son como máximo dos puntos superiores a la mediana del atributo frutado.
Aceite dulce	La mediana de los atributos amargo y picante es inferior o igual a 2.

▼ **M26**

4. COPA PARA DEGUSTACIÓN DE ACEITES

Remítase a la norma COI/T.20/Doc. N° 5 «Copa para la degustación de aceites».

5. SALA DE CATA

Remítase a la norma COI/T.20/Doc. N° 6 «Guía para la instalación de una sala de cata»

6. ACCESORIOS

En cada cabina y a disposición del catador deben estar los utensilios necesarios para que éste pueda ejercer adecuadamente su cometido. Estos son:

- copas (normalizadas) que contengan las muestras, codificadas y recubiertas de un cristal de reloj y mantenidas a $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- ficha de cata (véase figura 1) en papel o en formato electrónico que cumplan con los requisitos de la hoja de perfil, que se completará si fuera preciso con las instrucciones de empleo;
- bolígrafo o tinta indeleble;
- bandejitas con rodajas de manzana y/o agua con o sin gas y/o tostadas;
- vaso de agua a temperatura ambiente;
- documento con las normas generales mencionadas en las secciones 8.4 y 9.1.1;
- escupideras.

▼ M26

7. JEFE DE PANEL Y CATADORES

7.1. El jefe del panel

El jefe del panel deberá tener una sólida formación y ser un conocedor experto de todos los tipos de aceite con los que habrá de tratar en el desempeño de su trabajo. Es la figura clave del panel y el responsable de la organización y del funcionamiento del mismo.

Su trabajo requiere la pertinente formación en análisis sensorial y las herramientas correspondientes, además de meticulosidad en la preparación de los ensayos y la organización y ejecución de estos, así como destreza y paciencia para planificar y efectuar los ensayos de forma científica.

También es de su exclusiva competencia proceder a la selección, el entrenamiento y el control de los catadores, para asegurarse de su nivel de aptitud, siendo por tanto responsable de la cualificación de estos. Dicha cualificación deberá ser en todo momento objetiva, por lo que deberá diseñar procedimientos específicos basados en ensayos y en criterios de aceptación y rechazo sólidamente fundamentados. Véase la norma COI/T.20/Doc. nº 14 «Guía para la selección, el entrenamiento y el control de los catadores cualificados de aceite de oliva virgen».

► **C6** Es asimismo responsable del desempeño del panel y, por consiguiente, de su evaluación, que deberá acreditar de forma fiel y objetiva. ◀ Deberá poder demostrar en todo momento que el método y los catadores están bajo control. Se recomienda llevar a cabo una calibración periódica del panel (COI/T.20/Doc. Nº 14, § 5).

Es el más alto responsable de los registros del panel y de la custodia de los mismos. Dichos registros deberán poder rastrearse en todo momento y ajustarse a los requisitos en materia de garantía de la calidad establecidos en las normas internacionales relativas al análisis sensorial, además de garantizar el anonimato de las muestras.

Es el responsable de los utensilios y del material necesario para el cumplimiento de las especificaciones del presente método, así como del inventario y de la perfecta limpieza y conservación de los mismos. Redactará un informe sobre todo cuanto antecede y sobre el cumplimiento de las condiciones del ensayo.

Es el responsable de la recepción y la conservación de las muestras desde su llegada al laboratorio hasta el análisis, garantizando en todo momento el anonimato de las mismas y su adecuada conservación. A tal efecto, deberá redactar procedimientos sobre todo cuanto antecede con vistas a garantizar la trazabilidad y la calidad de todo el proceso.

También es responsable de la preparación, codificación y presentación de las muestras a los catadores según el diseño experimental adecuado de acuerdo con el protocolo previamente establecido, de la recopilación de los datos de los catadores y del tratamiento estadístico de estos.

Es responsable de establecer y redactar todos los demás procedimientos que pudieran precisarse para completar la presente norma o para el adecuado funcionamiento del panel.

Deberá buscar la manera de comparar los resultados del panel con los de otros paneles de cata de aceite de oliva virgen para asegurarse de que el funcionamiento de su panel es el correcto.

▼ M26

Es misión del jefe de panel motivar a los componentes del grupo, fomentando entre ellos el interés, la curiosidad y el espíritu competitivo. Por este motivo se recomienda garantizar el intercambio fluido de información con los miembros del grupo, implicándolos en todas las tareas que realicen, así como en los resultados obtenidos. Debe evitar que su opinión sea conocida e impedir que los criterios de posibles líderes se impongan sobre los restantes catadores.

Convocará con tiempo suficiente a los catadores y responderá a cualquier consulta en cuanto a la realización de los ensayos, aunque se abstendrá de sugerirles ningún tipo de opinión sobre la muestra.

▼ M287.1.1. *Jefe en funciones del grupo*

El jefe del grupo podrá, por razones justificadas, ser reemplazado por un jefe en funciones que le sustituirá en el ejercicio de sus deberes en relación con la realización de los análisis. Este sustituto deberá tener todos los conocimientos especializados necesarios para el puesto de jefe de grupo.

7.2. **Catadores**

Las personas que intervengan en calidad de catadores en los ensayos organolépticos de aceites de oliva deberán hacerlo de forma voluntaria. Por este motivo, se recomienda exigir a los candidatos una petición por escrito. Los candidatos deberán ser seleccionados, formados y evaluados por el presidente de la comisión de acuerdo con su habilidad para distinguir entre muestras similares, debiéndose tener en cuenta que la precisión se mejorará con la práctica.

El catador deberá comportarse como un auténtico observador sensorial, dejando a un lado sus gustos personales para dar cuenta únicamente de las sensaciones que percibe. Por ello deberá realizar su trabajo en silencio, estar relajado y no tener prisa. Deberá prestar la máxima atención posible a la muestra que está catando.

Para la prueba se exige un número de 8 a 12 catadores, siendo conveniente disponer de algunos más en reserva, para cubrir posibles ausencias.

▼ M268. **CONDICIONES DE ENSAYO**8.1. **Presentación de la muestra**

La muestra de aceite que se vaya a analizar se presentará en las copas de degustación normalizadas con arreglo a la Norma COI/T.20/Doc. N° 5 «Copa para la degustación de aceites».

La copa deberá contener 14-16 ml de aceite, o bien entre 12,8 y 14,6 g si las muestras se pesan, y estar tapada con un vidrio de reloj.

Cada copa deberá estar marcada con un código numérico o alfanumérico aleatorio. El código se aplicará mediante un sistema inodoro.

8.2. **Temperatura de la muestra y durante el ensayo**

La muestra de aceite que se vaya a analizar deberá mantenerse en la copa a una temperatura de $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante todo el ensayo. Se ha elegido esta temperatura porque permite detectar con mayor facilidad que a temperatura ambiente las diferencias organolépticas. Además, a temperaturas más bajas se produce una escasa volatilización de los componentes aromáticos propios de estos aceites, y a temperaturas más altas se forman componentes volátiles propios de los aceites calentados. Véase la norma COI/T.20/Doc. N° 5 «Copa para la degustación de aceites» para consultar el sistema de calentamiento de las muestras que se ha de utilizar una vez que la muestra se haya introducido en la copa.

▼ M26

La sala de cata debe estar a una temperatura comprendida entre los 20° y los 25° C (véase COI/T.20/Doc. N° 6).

8.3. Horario del ensayo

Para la cata de aceites, las horas de trabajo óptimas son las de la mañana. Está demostrado que durante el día existen períodos de óptima percepción para el gusto y el olfato. Las comidas son precedidas de un período de incremento de la sensibilidad olfato-gustativa, seguidas de un decrecimiento de la misma.

Sin embargo, este criterio no debe ser llevado al extremo, hasta el punto de que el hambre pueda distraer a los catadores, haciendo descender en ellos su capacidad de discriminación. Por consiguiente, se recomienda que las sesiones de cata se realicen entre las 10 y las 12 de la mañana.

8.4. Normas generales de comportamiento para catadores

Las siguientes recomendaciones se refieren al comportamiento de los catadores durante su trabajo.

Al recibir la comunicación del jefe del panel para intervenir en un ensayo organoléptico, los catadores deberán estar en condiciones de realizarlo a la hora previamente señalada, ateniéndose a las siguientes normas:

- Se abstendrán de fumar o de beber café al menos 30 minutos antes de la hora fijada.
- No deberán haberse aplicado ningún perfume, cosmético o jabón cuya fragancia persista hasta el momento del ensayo. Para el lavado de las manos deberán utilizar un jabón no perfumado, procediendo a enjuagarse las manos y a secárselas tantas veces como sean necesarias para eliminar cualquier olor.
- No deberán haber tomado ningún alimento al menos una hora antes de realizar la cata.
- Si se encontrasen en condiciones de inferioridad fisiológica, particularmente si tienen afectado el sentido del olfato o del gusto, o bajo algún efecto psicológico que les impida concentrarse en su trabajo, deberán abstenerse de participar en la cata e informarán oportunamente al jefe del panel.
- Una vez que los catadores hayan cumplido las normas precedentes, procederán a ocupar su lugar en la cabina que les corresponda en silencio y de forma ordenada.
- Leerán detenidamente las instrucciones que detalle la ficha de cata y no comenzarán el examen de la muestra hasta estar totalmente preparados para el trabajo que deben realizar (relajados y sin prisas). En caso de duda, deben consultar privadamente al jefe del panel.
- Deberán permanecer en silencio mientras realizan su trabajo.
- Deberán mantener el móvil apagado en todo momento para proteger la concentración y el trabajo de sus colegas.

9. PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACIÓN ORGANOLÉPTICA Y LA CLASIFICACIÓN DE ACEITES DE OLIVA VÍRGENES**9.1. Técnica de cata****▼ M29**

- 9.1.1. Los catadores procederán a tomar la copa, manteniéndola cubierta con su vidrio de reloj, la inclinarán ligeramente, y en esta posición le darán un giro total a fin de mojar lo más posible la superficie interior. Hecha esta operación, separarán el vidrio de reloj y procederán a oler la muestra, haciendo inspiraciones lentas e intensas para evaluar el aceite. El período de olfacción no debería superar los 30 segundos. Si en este período no se ha llegado a ninguna conclusión, deberán tomarse un pequeño descanso, antes de proceder a un nuevo intento.

▼ **M29**

Una vez realizado el ensayo olfativo, los catadores procederán a valorar las sensaciones bucales (conjunto de las sensaciones olfato-gustativas por vía retronasal y táctiles). Para ello, tomarán un pequeño sorbo de aceite, de unos 3 ml aproximadamente. Es muy importante distribuir el aceite por toda la cavidad bucal, desde la parte anterior de la boca y la lengua, por los laterales y la parte posterior, hasta los pilares del paladar y la garganta, ya que, como se sabe, la percepción de los sabores y las sensaciones táctiles se hace con distinta intensidad según las zonas de la lengua, el paladar y la garganta.

Debe insistirse en la necesidad de que el aceite se extienda en cantidad suficiente y muy lentamente por la parte posterior de la lengua hacia los pilares del paladar y la garganta, concentrando la atención en el orden de aparición de los estímulos amargo y picante. Si no se procede así, en algunos aceites ambos estímulos pueden pasar inadvertidos o el amargo quedar oculto por el picante.

Las aspiraciones cortas y sucesivas, introduciendo aire por la boca, permiten, además de extender la muestra ampliamente por la cavidad bucal, percibir por vía retronasal los componentes volátiles aromáticos, al forzarse el uso de esta vía.

Nota: cuando los catadores no perciban el frutado en una muestra y la intensidad del atributo negativo de clasificación sea igual o inferior a 3,5, el jefe de panel puede decidir que los catadores analicen la muestra de nuevo a temperatura ambiente (COI/T.20/Doc. n.º 6/Rev. 1, septiembre de 2007, sección 3-Especificaciones generales de la instalación de una sala de cata), especificando el contexto y el concepto de temperatura ambiente. Cuando la muestra alcance la temperatura ambiente, los catadores deberán volver a evaluarla para verificar únicamente si se percibe el frutado. Si es así, deben anotar la intensidad en la escala.

La sensación táctil de picante debe tenerse en consideración. A tal fin, es aconsejable tragar el aceite.

▼ **M26**

- 9.1.2. ► **C6** En la valoración organoléptica del aceite de oliva virgen, se recomienda efectuar el análisis de un máximo de CUATRO MUESTRAS por sesión, con un máximo de tres sesiones diarias, al objeto de evitar el efecto de contraste que podría provocar la degustación inmediata de otros aceites. ◀

Puesto que las catas sucesivas producen fatiga o pérdida de sensibilidad, causadas por las muestras precedentes, es preciso utilizar un producto capaz de eliminar de la boca los restos de aceite de la cata anterior.

Se recomienda el uso de un pequeño trozo de manzana, el cual, después de masticado, puede ser vertido al escupidor, procediendo seguidamente a enjuagarse con un poco de agua a temperatura ambiente. Entre la sesión finalizada y la siguiente deben transcurrir al menos 15 minutos.

9.2. **Utilización de la ficha de cata por los catadores**

La ficha de cata que deben utilizar los catadores se recoge en la figura 1 del presente anexo.

Cada uno de los catadores que componen el panel olerá y degustará ⁽¹⁾ el aceite sometido a examen. Deben consignar en las escalas de 10 cm de la ficha de cata que se pondrá a su disposición la intensidad con la que perciben cada uno de los atributos negativos y positivos.

⁽¹⁾ Pueden abstenerse de catar un aceite cuando aprecien por vía olfativa directa algún atributo negativo sumamente intenso, en cuyo caso deberán registrar en la ficha de cata esta circunstancia excepcional.

▼ M26

En caso de que los catadores perciban atributos negativos no indicados en la sección 4, deberán consignarse en el apartado «otros», empleando el término o términos que los describan con mayor precisión.

▼ M28**9.3. Utilización de los datos por los jefes de panel**

El jefe del panel deberá recoger las fichas de cata cumplimentadas por cada uno de los catadores y revisar las intensidades asignadas a los diferentes atributos. De constatarse alguna anomalía, pedirá al catador que revise su ficha de cata y, si fuera necesario, que repita la prueba.

El jefe del grupo deberá introducir los datos de la valoración de cada miembro en un programa informático como el que se recoge en la norma COI/T.20/Doc. N° 15, con miras al cálculo estadístico de los resultados del análisis, basados en el cálculo de la mediana. Véase el punto 9.4 y el apéndice del presente anexo. La introducción de los datos correspondientes a cada muestra se realizará con ayuda de una matriz compuesta de nueve columnas que corresponden a los nueve atributos sensoriales y n líneas que corresponden a los n miembros del panel utilizados.

En caso de que en el apartado «otros» figure un defecto percibido y señalado por al menos el 50 % del panel, el jefe del panel calculará la mediana de dicho defecto y lo clasificará en consecuencia.

El valor del coeficiente de variación robusto que define la clasificación (defecto con la mayor intensidad y el mayor atributo frutado) deberá ser inferior o igual al 20 %.

Cuando no sea así, el jefe del panel deberá repetir la evaluación de la muestra específica en otra sesión de cata.

Si esta situación se produce con frecuencia, se recomienda al jefe del grupo que imparta formación específica adicional (COI/T.20/Doc. N° 14, § 5) y utilice el índice de repetibilidad y el índice de desviación para controlar el rendimiento del catador (COI/T.20/Doc. No 14, § 6).

▼ M29**9.4. Clasificación del aceite**

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.

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 rangos han sido establecidos teniendo en cuenta el error del método, por lo que son considerados como absolutos. Los programas informáticos permiten visualizar la clasificación 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 es superior a 0.
- b) Aceite de oliva virgen: la mediana de los defectos es superior a 0 pero inferior o igual a 3,5 y la del atributo frutado es superior a 0.
- c) Aceite de oliva virgen 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.

▼ **M29**

Nota 1: Cuando la mediana del amargo y/o picante sea superior a 5,0, el jefe de panel lo señalará en el certificado de análisis del aceite.

Cuando se trate de análisis efectuados en el marco de controles de conformidad con las normas, deberá realizarse un ensayo. En el caso de análisis contradictorios, el análisis debe efectuarse por duplicado en diferentes sesiones de cata. Los resultados de los análisis por duplicado deben ser estadísticamente homogéneos (véase el punto 9.5). En caso contrario, la muestra debe ser analizada de nuevo dos veces. El valor final de la mediana de los atributos de clasificación se calculará utilizando la media de ambas medianas.

9.5 Criterios de aceptación y de rechazo de duplicados

Para determinar si los dos resultados de un análisis duplicado son homogéneos o estadísticamente aceptables se utilizará el error normalizado definido a continuación:

$$E_n = \frac{|Me_1 - Me_2|}{\sqrt{U_1^2 + U_2^2}}$$

siendo Me_1 y Me_2 las medianas de los dos duplicados (respectivamente, primer y segundo análisis) y U_1 y U_2 , las incertidumbres expandidas obtenidas para los dos valores, calculadas como sigue según se especifica en el apéndice:

$$U_1 = c \times s^* \text{ y } s^* = \frac{(CV_r \times Me_1)}{100}$$

Para la incertidumbre expandida, $c = 1,96$; por consiguiente:

$$U_1 = 0,0196 \times CV_r \times Me_1$$

siendo CV_r el coeficiente de variación robusto.

Para poder afirmar que los dos valores obtenidos no son estadísticamente diferentes, E_n debe ser igual o inferior a 1,0.

▼ **M26***Apéndice***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 ese 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 más práctica es que la mediana es el percentil 50 de una distribución de números ordenados de modo creciente. Dicho de otro modo, representa el valor central de una serie ordenada impar o la media de los dos valores centrales de una serie ordenada par.

Desviación típica robusta

Para obtener una estimación fiable de la variabilidad que se produce en torno a la mediana, es necesario referirse a la estimación de la desviación típica robusta según Stuart y Kendall (4). La fórmula indica la desviación típica asintótica robusta, es decir, la estimación robusta de la variabilidad de los datos considerados, en la que N es el número de observaciones e IQR el intervalo intercuartil, el cual abarca exactamente el 50% de los casos de una distribución de probabilidad cualquiera.

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

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

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

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 e 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 e igual a dicha centésima. La centésima indica la fracción de distribución elegida. En el caso de la mediana esta es igual a 50/100.

$$\text{Percentil} = [p(X < x_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge p(X \leq x_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

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 percentil 25 representa el valor de distribución correspondiente a un área igual a 0,25 o 25/100.

En este método los percentiles se computan basándose en los valores reales que figuran en la matriz de datos (procedimiento de cómputo de percentiles).

Coefficiente de variación robusto (en %)

El $CV_r\%$ representa un número puro 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.

$$CV_r = \frac{s^*}{Me} \times 100$$

▼ M26**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 es posible repetirlo varias veces. El intervalo ayuda a evaluar, como en el caso del $CVr\%$, la fiabilidad de la prueba.

$$IC_{sup} = Me + (c \times s^*)$$

$$IC_{inf} = Me - (c \times s^*)$$

donde $C = 1,96$ en el caso del intervalo de confianza al 95%.

Puede encontrarse un ejemplo de la hoja de cálculo en el anexo I de la norma COI/T.20/Doc. N° 15.

Bibliografía

- (1) Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. Evanston, IL.SYSTAT Inc.
- (2) Cicchitelli, G. 1984. Probabilità e Statistica. Maggioli Editore, Rimini.
- (3) Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, Y.; Michotte, L. 1988. Chemometrics. A textbook. Elsevier. Amsterdam.
- (4) Kendall, M.G.; Stuart, A. 1967. The advanced theory of statistics. Vol. 1. Hafner Publishing Co.
- (5) McGill, R.; Tukey, J.W.; Larsen, W.A. 1978. Variation of Box Plots. The American Statistician, 32, (2), 12-16.
- (6) COI/T.28/Doc. N° 1 Septiembre de 2007, Directrices para la acreditación de los laboratorios de análisis sensorial de aceite de oliva virgen en particular, según la norma ISO/IEC 17025:2005
- (7) COI/T.20/Doc. N° 14.
- (8) COI/T.20/Doc. N° 15.
- (9) ISO/IEC 17025:05.

▼ 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 taponarla 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 $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ 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 $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ 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 $\text{ICl}_3 + 9 \text{ g}$ 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 colest-3,5-dieno (Sigma, 99 % de pureza) en hexano (10 mg en 50 ml).

- 5.7. Solución patrón de colest-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.

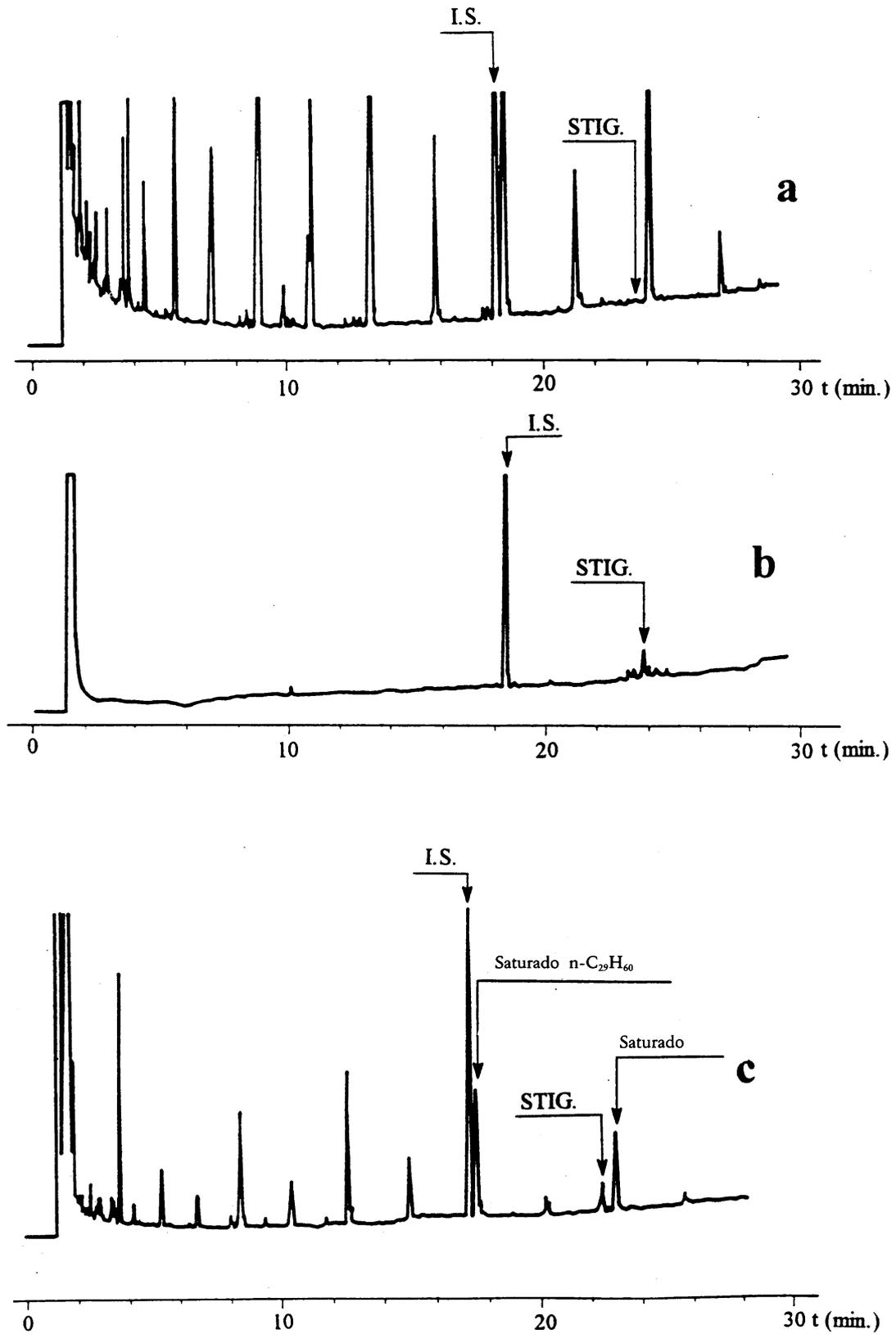
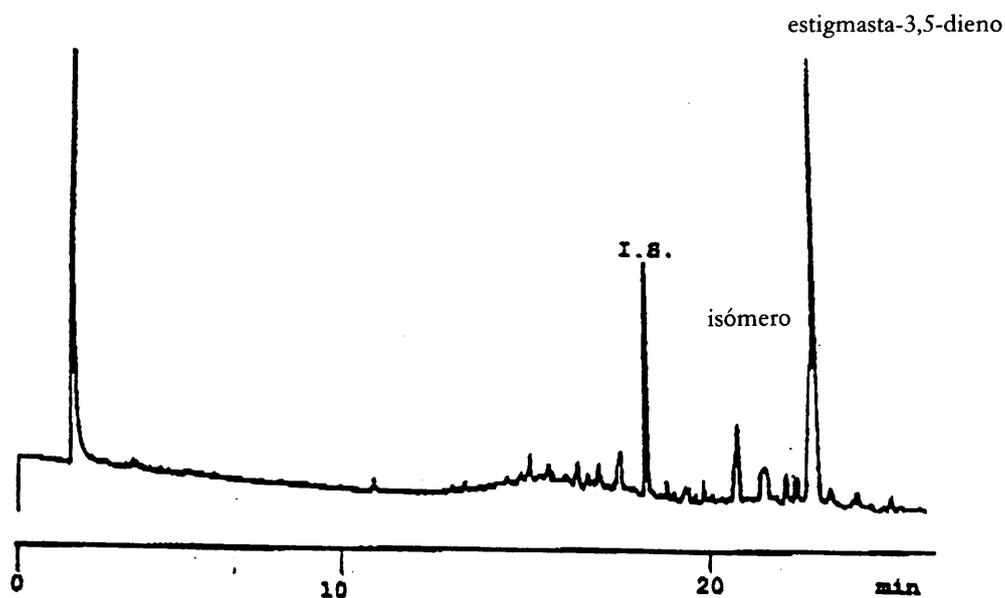
▼ M11

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.

▼ **M25***ANEXO XVIII***DETERMINACIÓN DE LA DIFERENCIA ENTRE EL CONTENIDO REAL Y EL CONTENIDO TEÓRICO DE TRIGLICÉRIDOS CON ECN 42****1. OBJETO**

Determinación de la diferencia absoluta entre los valores experimentales de triglicéridos (TG) con un número equivalente de carbonos igual a 42 (ECN 42_{HPLC}) obtenidos mediante determinación en el aceite por cromatografía de líquidos de alta resolución y el valor teórico de TG con un número equivalente de carbonos igual a 42 (ECN 42_{teórico}) calculado a partir de la composición de los ácidos grasos.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente método es aplicable a los aceites de oliva. 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 de triglicéridos con ECN 42 determinado por análisis con HPLC y el contenido teórico de triglicéridos con ECN 42 (calculado sobre la base de la determinación de la composición de ácidos grasos mediante GLC) se corresponden dentro de ciertos límites en el caso de los aceites de oliva auténticos. Una diferencia superior a los valores adoptados para cada tipo de aceite sería indicativa de que el aceite contiene aceites de semillas.

4. MÉTODO

El método para el cálculo del contenido teórico de triglicéridos con ECN 42 y de la diferencia con respecto a los datos obtenidos con HPLC consiste esencialmente en la coordinación de los datos analíticos obtenidos por medio de otros métodos. Pueden distinguirse tres fases: determinación de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con columna capilar, cálculo de la composición teórica de triglicéridos con ECN 42, determinación mediante HPLC de los triglicéridos con ECN 42.

4.1. Instrumental

- 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 llave y cono (hembra) normalizado en el extremo superior.
- 4.1.4. Ampollas de decantación, de 250 ml, con cono (macho) normalizado en el extremo inferior, adecuadas para conectarse al 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. Rotavapor.
- 4.1.10. Cromatógrafo 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 en toda la escala deberá ser como mínimo de 10^{-4} unidades de índice de refracción.

▼ M25

4.1.13. Columna: tubo de acero inoxidable de 250 mm de longitud × 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.

4.1.14. Programas de tratamiento de datos.

4.1.15. Frascos de aproximadamente 2 ml de volumen, con membranas revestidas de teflón y tapones de rosca.

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, de pureza de grado cromatográfico, o hexano.

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

4.2.3. Disolvente de elución para purificar el aceite mediante cromatografía 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 para HPLC.

4.2.7. Acetonitrilo o propionitrilo para HPLC.

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

4.2.9. Disolvente de solubilización: acetona.

4.2.10. Triglicéridos de referencia: es posible utilizar triglicéridos comerciales (tripalmitina, trioleína, etc.) y los tiempos de retención se representan entonces gráficamente frente al número equivalente de carbonos, o bien cromatogramas de referencia obtenidos de aceite de soja, de una mezcla 30:70 de aceite de soja y aceite de oliva, y de aceite de oliva puro (véanse las notas 1 y 2 y las figuras 1 a 4).

4.2.11. Columna de extracción en fase sólida con 1 g de fase de sílice en 6 ml.

4.3. Preparación de la muestra

Como hay una serie de sustancias interferentes que puede dar lugar a falsos resultados positivos, la muestra debe purificarse siempre según el método IUPAC 2507, utilizado para la determinación de compuestos polares en grasas para freír.

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 a continuación en la columna un poco de lana de vidrio (4.2.5) y empujarla hasta el fondo de la columna ayudándose con la varilla de vidrio (4.1.5).

Preparar en un vaso de precipitados de 100 ml una suspensión de 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 asegurarse de 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 la llave de la columna y dejar que salga el disolvente hasta que su nivel se sitúe aproximadamente 1 cm por encima del gel de sílice.

▼ M254.3.2. *Cromatografía en columna*

Pesar, con 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).

Disolverlos en 20 ml aproximadamente del disolvente de elución (4.2.3). En caso 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 la llave y dejar eluir el disolvente hasta el nivel de la capa de gel de sílice.

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

Recoger el eluido en un matraz redondo de 250 ml (4.1.1) previamente tarado en estufa y pesarlo exactamente. Eliminar el disolvente a presión reducida en un rotavapor (4.1.9) y pesar el residuo, con el cual se preparará la solución para el análisis por HPLC y para la obtención de los ésteres metílicos.

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

4.3.3. *Purificación por extracción en fase sólida (SPE)*

La columna de sílice de SPE se activa haciendo pasar 6 ml de hexano (4.2.3) en vacío, evitando la desecación.

Pesar, con una precisión de 0,001 g, 0,12 g en un frasco de 2 ml (4.1.15) y disolver con 0,5 ml de hexano (4.2.3).

Cargar la columna de SPE con la solución y eluir con 10 ml de mezcla hexano/éter dietílico (87:13 v/v) (4.2.3) al vacío.

La fracción recogida se evapora hasta su desecación en un rotavapor (4.1.9) a presión reducida y a temperatura ambiente. El residuo se disuelve en 2 ml de acetona (4.2.6) para realizar el análisis de triglicéridos (TG).

4.4. **Análisis por HPLC**4.4.1. *Preparación de las muestras para 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 flujo de 1,5 ml/min para purgar todo el sistema. Esperar hasta que se obtenga una línea de base estable.

Injectar 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 de áreas, es decir, considerar que la suma de las superficies de los picos correspondientes a los triglicéridos de ECN entre 42 y 52 es igual al 100%.

Calcular el porcentaje relativo de cada triglicérido mediante la fórmula siguiente:

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

Los resultados deben expresarse como mínimo con dos decimales.

Véanse las notas 1 a 4.

▼ **M25****4.5. Cálculo de la composición de triglicéridos (porcentaje de moles) a partir de los datos de composición de los ácidos grasos (porcentaje de superficie)**4.5.1. *Determinación de composición de ácidos grasos*

La composición de ácidos grasos se determina según la norma ISO 5508 por medio de una columna capilar. Los ésteres metílicos se preparan según el COI/T.20/Doc. no. 24.

4.5.2. *Ácidos grasos 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. Solo se han considerado los ácidos grasos con 16 y 18 átomos de carbono, ya que son los únicos importantes para el aceite de oliva. Los ácidos grasos deben normalizarse al 100%.

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

4.5.3. *Conversión de los % de superficie en moles respecto a todos los ácidos grasos (1)*

$$\text{moles P} = \frac{\% \text{ sup. P}}{\text{PM P}} \quad \text{moles S} = \frac{\% \text{ sup. S}}{\text{PM S}} \quad \text{moles Po} = \frac{\% \text{ sup. Po}}{\text{PM Po}}$$

$$\text{moles O} = \frac{\% \text{ sup. O}}{\text{PM O}} \quad \text{moles L} = \frac{\% \text{ sup. L}}{\text{PM L}} \quad \text{moles Ln} = \frac{\% \text{ sup. Ln}}{\text{PM Ln}}$$

4.5.4. *Normalización de los moles de los ácidos grasos al 100% (2)*

$$\% \text{ moles P (1,2,3)} = \frac{\text{moles P} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ moles S (1,2,3)} = \frac{\text{moles S} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ moles Po (1,2,3)} = \frac{\text{moles Po} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ moles O (1,2,3)} = \frac{\text{moles O} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ moles L (1,2,3)} = \frac{\text{moles L} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ moles Ln (1,2,3)} = \frac{\text{moles Ln} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

El resultado proporciona el porcentaje de cada ácido graso en porcentaje de 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 (3):

$$\% \text{ moles AGS} = \% \text{ moles P} + \% \text{ moles S}$$

$$\% \text{ moles AGI} = 100 - \% \text{ moles AGS.}$$

▼ **M25**4.5.5. *Cálculo de la composición de ácidos grasos en la posición 2 y en las posiciones 1 y 3 de los TG*

Los ácidos grasos se distribuyen en tres grupos del siguiente modo: uno para la posición 2 y dos idénticos para las posiciones 1 y 3, 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)] (4):

$$\% \text{ moles P(2)} = \% \text{ moles P (1,2,3)} * 0,06$$

$$\% \text{ moles S(2)} = \% \text{ moles S (1,2,3)} * 0,06$$

4.5.5.2. Ácidos grasos insaturados en la posición 2 [Po(2), O(2), L(2) y Ln(2)] (5):

$$\% \text{ moles Po(2)} = \frac{\% \text{ moles Po(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * (100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)})$$

$$\% \text{ moles O(2)} = \frac{\% \text{ moles O(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * (100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)})$$

$$\% \text{ moles L(2)} = \frac{\% \text{ moles L(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * (100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)})$$

$$\% \text{ moles Ln(2)} = \frac{\% \text{ moles Ln(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * (100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)})$$

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)] (6):

$$\% \text{ moles P(1,3)} = \frac{\% \text{ moles P(1,2,3)} - \% \text{ moles P(2)}}{2} + \% \text{ moles P(1,2,3)}$$

$$\% \text{ moles S(1,3)} = \frac{\% \text{ moles S(1,2,3)} - \% \text{ moles S(2)}}{2} + \% \text{ moles S(1,2,3)}$$

$$\% \text{ moles Po(1,3)} = \frac{\% \text{ moles Po(1,2,3)} - \% \text{ moles Po(2)}}{2} + \% \text{ moles Po(1,2,3)}$$

$$\% \text{ moles O(1,3)} = \frac{\% \text{ moles O(1,2,3)} - \% \text{ moles O(2)}}{2} + \% \text{ moles O(1,2,3)}$$

$$\% \text{ moles L(1,3)} = \frac{\% \text{ moles L(1,2,3)} - \% \text{ moles L(2)}}{2} + \% \text{ moles L(1,2,3)}$$

$$\% \text{ moles Ln(1,3)} = \frac{\% \text{ moles Ln(1,2,3)} - \% \text{ moles Ln(2)}}{2} + \% \text{ moles Ln(1,2,3)}$$

4.5.6. *Cálculo de triglicéridos*

4.5.6.1. TG con un solo ácido graso (AAA, aquí, LLL, PoPoPo) (7)

$$\% \text{ moles AAA} = \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles A(2)} * \% \text{ moles A(1,3)}}{10\ 000}$$

4.5.6.2. TG con dos ácidos grasos (AAB, aquí PoPoL, PoLL) (8)

$$\% \text{ moles AAB} = \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles A(2)} * \% \text{ moles B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\% \text{ moles ABA} = \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles B(2)} * \% \text{ moles A(1,3)}}{10\ 000}$$

▼ **M25**

4.5.6.3. TG con tres ácidos grasos diferentes (ABC; en este caso, OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln) (9)

$$\% \text{ moles ABC} = \frac{\% \text{ moles A(1,3)} * \% \text{ moles B(2)} * \% \text{ moles C(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\% \text{ moles BCA} = \frac{\% \text{ moles B(1,3)} * \% \text{ moles C(2)} * \% \text{ moles A(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\% \text{ moles CAB} = \frac{\% \text{ moles C(1,3)} * \% \text{ moles A(2)} * \% \text{ moles B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

4.5.6.4. Triglicéridos con ECN 42

Los triglicéridos con ECN 42 se calculan de acuerdo con las ecuaciones 7, 8 y 9 y se indican por orden de elución prevista en HPLC (normalmente solo tres picos).

LLL

PoLL y el isómero de posición LPoL

OLLn y los isómeros de posición OLnL y LnOL

PoPoL y el isómero de posición PoLPo

PoOLn y los isómeros de posición OPoLn y OLnPo

PLLn y los isómeros de posición LLnP y LnPL

PoPoPo

SLnLn y el isómero de posición LnSLn

PPoLn y los isómeros de posición PLnPo y PoPLn

Los triglicéridos con ECN 42 se obtienen mediante la suma de los nueve triglicéridos, incluidos sus isómeros de posición. Los resultados deben expresarse como mínimo con dos decimales.

5. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se comparan el contenido teórico calculado y el determinado por HPLC. Si la diferencia en valor absoluto entre los datos de HPLC y los datos teóricos es superior a los valores indicados para la categoría adecuada de aceite en la norma, se concluye que la muestra contiene aceite de semillas.

Los resultados se expresan con dos decimales.

6. EJEMPLO (LOS NÚMEROS SE REFIEREN A LAS SECCIONES DEL TEXTO DEL MÉTODO)

— 4.5.1. *Cálculo del porcentaje de moles de ácidos grasos a partir de datos de GLC (porcentaje de superficie normalizada)*

Los datos siguientes de la composición de ácidos grasos se obtienen mediante GLC:

FA	P	S	Po	O	L	Ln
PM	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Porcentaje de superficie	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M25**

- 4.5.3 *Conversión en moles de los porcentajes de superficie respecto a todos los ácidos grasos [véase la fórmula (1)]*

$$\text{moles } P = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles } P$$

$$\text{moles } S = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moles } S$$

$$\text{moles } Po = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moles } Po$$

$$\text{moles } O = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles } O$$

$$\text{moles } L = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles } L$$

$$\text{moles } Ln = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ moles } Ln$$

$$\text{total} = 0,35821 \text{ moles } TG$$

- 4.5.4 *Normalización de los moles de ácidos grasos al 100% [véase la fórmula (2)]*

$$\% \text{ moles } P(1,2,3) = \frac{0,03900 \text{ moles } P * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 10,887 \%$$

$$\% \text{ moles } S(1,2,3) = \frac{0,01054 \text{ moles } S * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 2,942 \%$$

$$\% \text{ moles } Po(1,2,3) = \frac{0,00393 \text{ moles } Po * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,097 \%$$

$$\% \text{ moles } O(1,2,3) = \frac{0,26549 \text{ moles } O * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 74,116 \%$$

$$\% \text{ moles } L(1,2,3) = \frac{0,03566 \text{ moles } L * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 9,955 \%$$

$$\% \text{ moles } Ln(1,2,3) = \frac{0,00359 \text{ moles } Ln * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,002 \%$$

$$\% \text{ total moles} = 100\%$$

Suma de los ácidos grasos saturados e insaturados en las posiciones 1, 2 y 3 de los TG [véase la fórmula (3)]:

$$\% \text{ moles } AGS = 10,887 \% + 2,942 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

$$\% \text{ moles } AGI = 100,000 \% - 13,829 \% = \mathbf{86,171 \%}$$

- 4.5.5. *Cálculo de la composición de ácidos grasos en la posición 2 y en las posiciones 1 y 3 de los TG*

- 4.5.5.1. *Ácidos grasos saturados en la posición 2 [P(2) y S(2)] [véase la fórmula (4)]*

$$\% \text{ moles } P(2) = 10,887 \% * 0,06 = 0,653 \% \text{ moles}$$

$$\% \text{ moles } S(2) = 2,942 \% * 0,06 = 0,177 \% \text{ moles}$$

- 4.5.5.2. *Ácidos grasos insaturados en la posición 2 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) y Ln(1,3)] [véase la fórmula (5)]*

$$\% \text{ moles } Po(2) = \frac{1,097 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \% \text{ moles}$$

$$\% \text{ moles } O(2) = \frac{74,116 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \% \text{ moles}$$

$$\% \text{ moles } L(2) = \frac{9,955 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \% \text{ moles}$$

$$\% \text{ moles } Ln(2) = \frac{1,002 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \% \text{ moles}$$

▼ **M25**

- 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)] [(véase la fórmula (6))]

$$\% \text{ moles P(1,3)} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \% \text{ moles}$$

$$\% \text{ moles S(1,3)} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \% \text{ moles}$$

$$\% \text{ moles Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \% \text{ moles}$$

$$\% \text{ moles O(1,3)} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \% \text{ moles}$$

$$\% \text{ moles L(1,3)} = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \% \text{ moles}$$

$$\% \text{ moles Ln(1,3)} = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \% \text{ moles}$$

- 4.5.6. *Cálculo de triglicéridos*

A partir de la composición calculada de ácidos grasos en las posiciones 2 y 1,3:

AG en	Posiciones 1 y 3	Posición 2
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
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

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 solo ácido graso (LLL, PoPoPo) [véase la fórmula (7)]

$$\% \text{ mol LLL} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,09706 \text{ mol LLL}}$$

$$\% \text{ mol PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,00013 \text{ mol PoPoPo}}$$

▼ **M25**

— 4.5.6.2 TG con dos ácidos grasos (PoLL, SLnLn, PoPoL) [véase la fórmula (8)]

$$\% \text{ mol PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,02141$$

$$\% \text{ mol LPoL} = \frac{9,204 \% * 1,262 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = 0,01069$$

0,03210 mol PoLL

$$\% \text{ mol SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,325 \% * 1,153 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00092$$

$$\% \text{ mol LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\ 000} = 0,00002$$

0,00094 mol SLnLn

$$\% \text{ mol PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00236$$

$$\% \text{ mol PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

— 4.5.6.3 TG con tres ácidos grasos diferentes (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) [véase la fórmula (9)]

$$\% \text{ mol PPOln} = \frac{16,004 \% * 1,262 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00374$$

$$\% \text{ mol LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,00012$$

$$\% \text{ mol PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,00375$$

0,00761 mol PPOln

$$\% \text{ mol OLLn} = \frac{68,526 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,14556$$

$$\% \text{ mol LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,296 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,14555$$

$$\% \text{ mol LLnO} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,14544$$

0,43655 mol OLLn

$$\% \text{ mol PLLn} = \frac{16,004 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,03399$$

$$\% \text{ mol LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00111$$

$$\% \text{ mol LLnP} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,03397$$

0,06907 mol PLLn

▼ M25

$$\% \text{ mol PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,296 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,01605$$

$$\% \text{ mol LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,262 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,01603$$

$$\% \text{ mol OLnPo} = \frac{68,526 \% * 1,153 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,01604$$

0,04812 mol PoOLn

ECN 42 = 0,69512 mol TG

Nota 1: El orden de elución puede determinarse calculando los números equivalentes de carbono, a menudo definidos por la relación $ECN = CN - 2n$, donde CN es el número de carbonos y n es el número de dobles enlaces; pueden calcularse con mayor precisión teniendo en cuenta el origen del doble enlace. Si n_o , n_l y n_{ln} son los números de enlaces dobles atribuidos a los ácidos oleico, linoleico y linolénico, respectivamente, el número equivalente de carbonos puede calcularse mediante la fórmula siguiente:

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

donde los coeficientes d_o , d_l y d_{ln} 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: Con varios triglicéridos de referencia también es posible calcular la resolución con respecto a la trioleína:

$$\alpha = TR^1 / TR \text{ trioleína}$$

utilizando el tiempo de retención reducido $TR^1 = TR - TR \text{ disolvente}$.

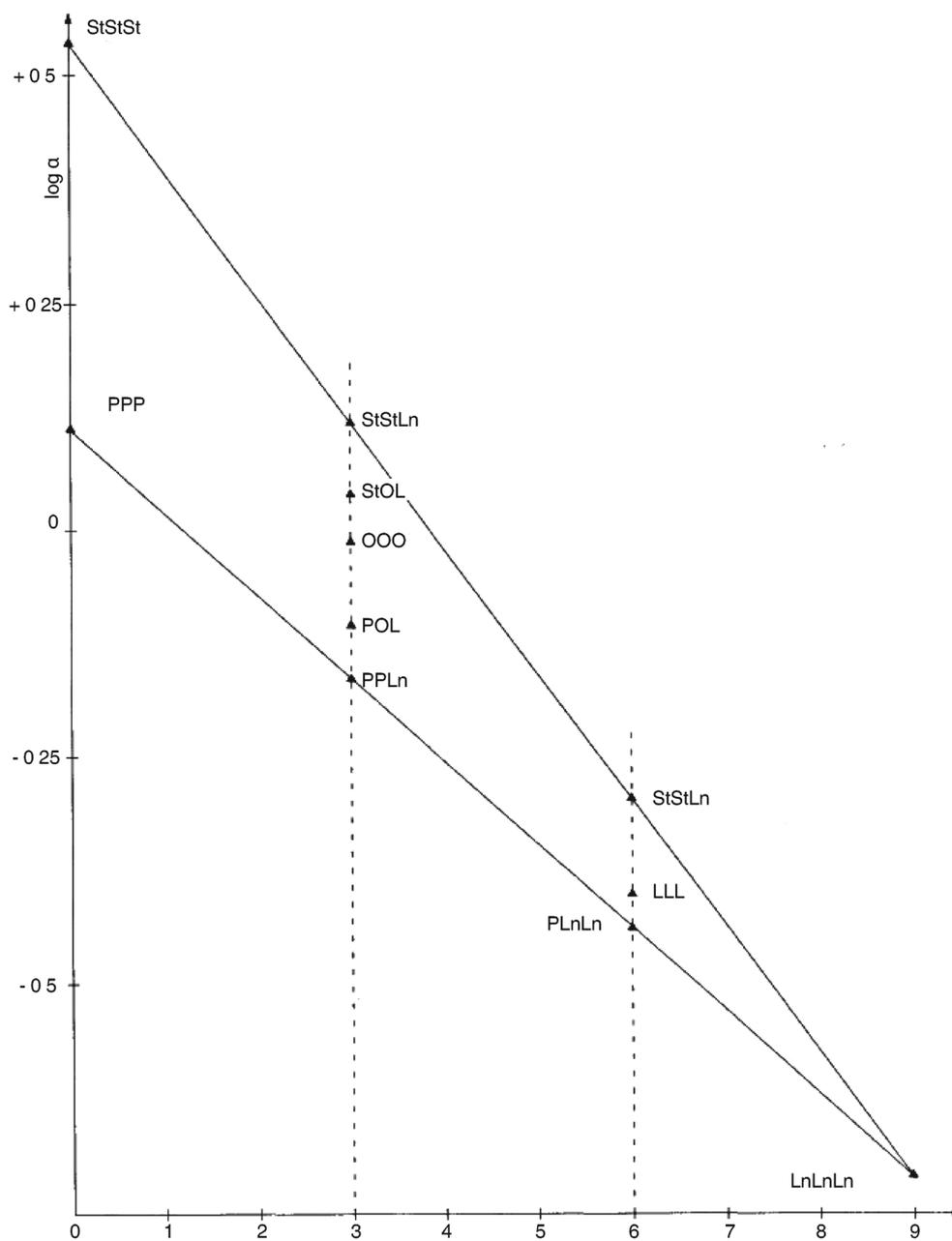
La representación gráfica del $\log \alpha$ frente a f (número de dobles enlaces) permite determinar los valores de retención de todos los triglicéridos de los ácidos grasos contenidos en los triglicéridos de referencia (véase la figura 1).

Nota 3: La resolución de la columna ha de 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 ECN 52.

Nota 4: Para poder medir correctamente las superficies de todos los picos de interés en la presente determinación, es necesario que el segundo pico correspondiente a ECN 50 equivalga al 50% de la escala completa del registrador.

▼ M25

Figura 1

Representación gráfica del $\log \alpha$ frente a f (número de dobles enlaces)

Número de dobles enlaces

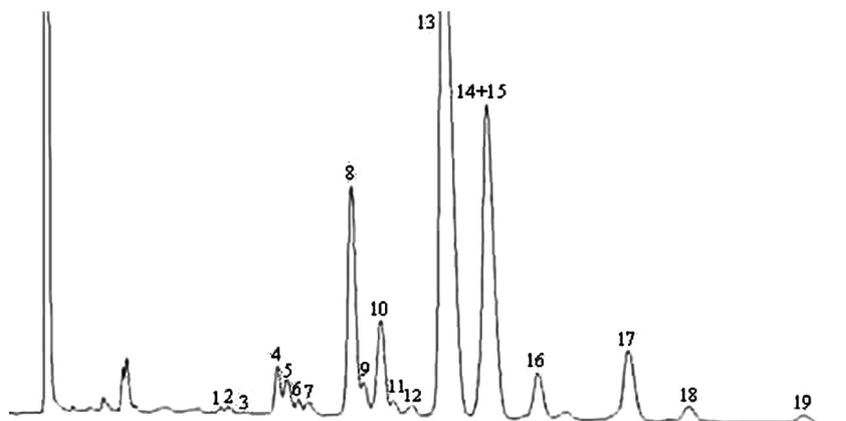
La: ácido láurico; My: ácido mirístico; P: ácido palmítico; S: ácido esteárico; O: ácido oleico; L: ácido linoleico; Ln: ácido linolénico.

▼ **M25**

Figura 2

Aceite de oliva con bajo contenido en linoleico

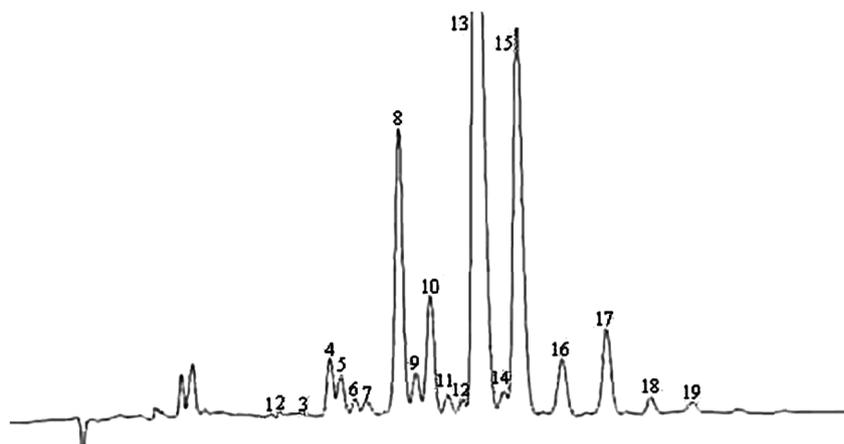
a



Con disolvente: acetona/acetonitrilo.

PERFIL a: Principales componentes de los picos cromatográficos: **ECN 42:** (1) LLL + PoLL; (2) OLLn + PoOLn; (3) PLLn; **ECN 44:** (4) OLL + PoOL; (5) OOLn + PLL; (6) POLn + PPOPo; (7) OOL + PoOO; **ECN 46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN 48:** (13) OOO + PoPP; (14 + 15) SOL + POO; (16) POP; **ECN 50:** (17) SOO; (18) POS + SLS.

b



Con disolvente: propionitrilo.

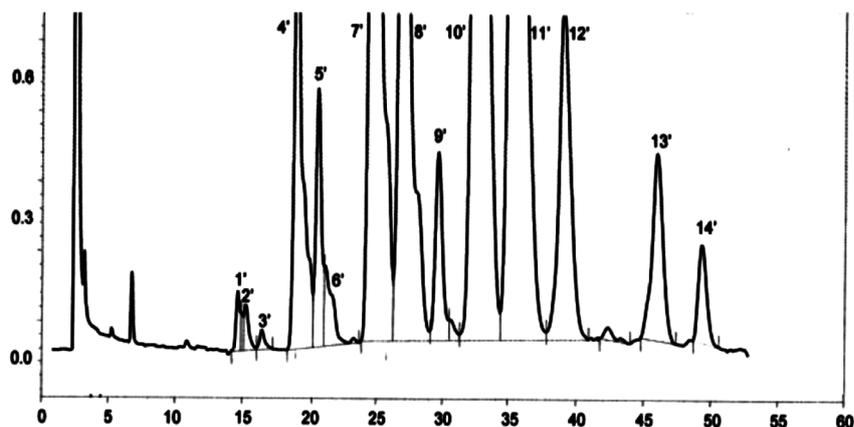
PERFIL b: Principales componentes de los picos cromatográficos: **ECN 42:** (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN 44:** (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN 46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN 48:** (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN 50:** (17) SOO; (18) POS + SLS

▼ M25

Figura 3

Aceite de oliva con alto contenido en linoleico

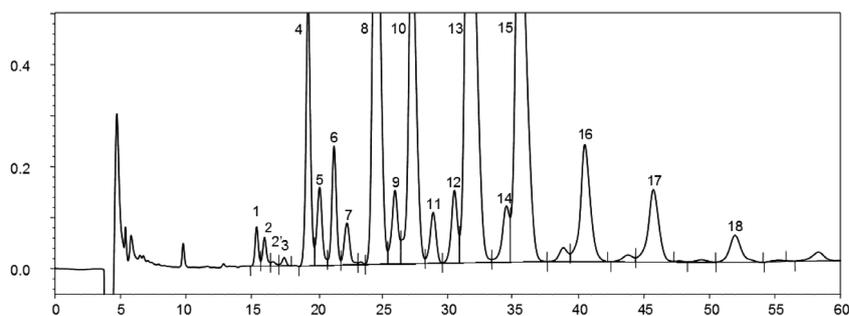
(a)



Con disolvente: acetona/acetonitrilo (50: 50).

Perfil a: Principales componentes de los picos cromatográficos: **ECN 42:** (1') LLL + PoLL; (2') OLLn + PoOLn; (3') PLLn; **ECN 44:** (4') OLL + PoOL; (5') OOLn + PLL; (6') POLn + PPoPo; **ECN 46:** (7') OOL + PoOO; (8') PLO + SLL + PoOP; (9') PLP + PoPP; **ECN 48:** (10') OOO; (11') POO + SLL + PPoO; (12') POP + PLS; **ECN 50:** (13') SOO; (14') POS + SLS

(b)



Con disolvente: propionitrilo.

Perfil b: Principales componentes de los picos cromatográficos: **ECN 42:** (1) LLL; (2 + 2') OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN 44:** (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; **ECN 46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; **ECN 48:** (12) PLP; (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN 50:** (17) SOO; (18) POS + SLS; **ECN 52:** (19) AOO.

▼ M19*ANEXO XIX***▼ M28****DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS Y TRITERPÉNICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON COLUMNA CAPILAR**

1. OBJETO

El presente anexo describe un procedimiento para determinar el contenido de alcoholes alifáticos y triterpénicos en los aceites y las materias grasas.

▼ M19

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.

▼ M28

- 4.11. Solución de referencia para cromatografía en capa fina: alcoholes C₂₀-C₂₈ al 0,5 % en cloroformo, o una fracción de alcoholes obtenida como se indica en el punto 5.2 a partir de materia insaponificable de un aceite de orujo de oliva.

▼ M19

- 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 trimetilsililéteres 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 esteroles.

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.

▼ M28

- 5.2.5. Pulverizar la placa ligera y uniformemente con la solución de 2', 7'-diclorofluoresceína cuando se examine la placa bajo la luz ultravioleta. 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).

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. Véase un ejemplo de la separación de cromatografía de capa fina en la Figura 1 del apéndice.

- 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 gel de sílice 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.

▼ M19**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-trimetilsililtrifluoroacetamida* + 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).

▼ M28

- 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.

Las Figuras 2 y 3 del apéndice muestran ejemplos de cromatograma de la fracción alcohólica de un aceite de oliva refinado.

▼ M19

- 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

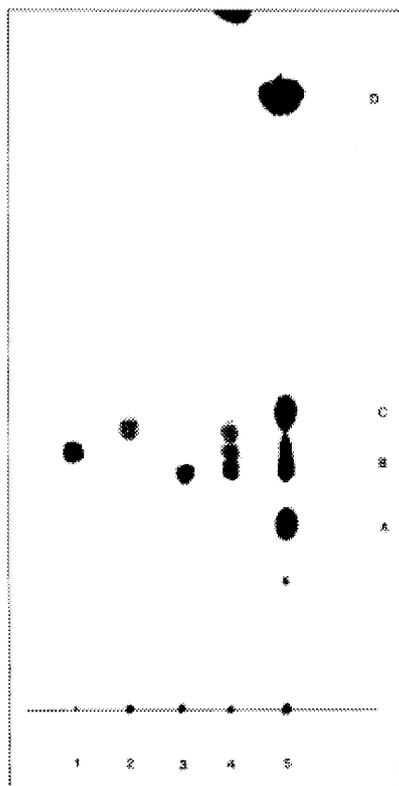
m = peso de la muestra tomada para la determinación, en gramos.

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.».

▼ **M28***Apéndice***Ejemplo de separación de cromatografía de capa fina y ejemplos de cromatogramas***Figura 1*

Placa de cromatografía en capa fina de la fracción insaponificable del aceite de oliva eluido con hexano/éter etílico (65/35)

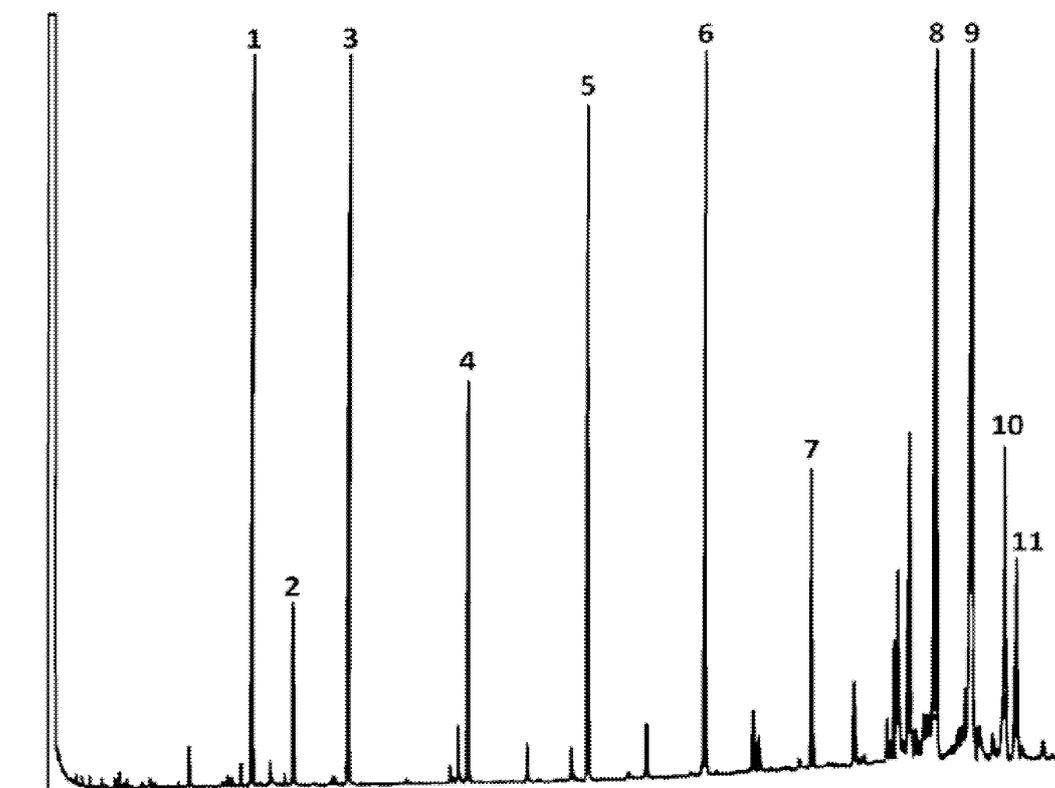


- | | | | |
|---|--|---|-------------------------|
| 1 | Alcohol C ₂₆ | A | Esteroles |
| 2 | Alcohol C ₃₀ | B | Alcoholes alifáticos |
| 3 | Alcohol C ₂₀ | C | Alcoholes triterpénicos |
| 4 | Mezcla de alcoholes C ₂₀₋₂₂₋₂₆₋₃₀ | D | Escualeno |
| 5 | Extra virgen insaponificable | | |

▼ M28

Figura 2

Cromatograma de la fracción alcohólica de un aceite de oliva refinado



1 = Fitol

2 = Geranilgeraniol

3 = Alcohol C₂₀ (IS)4 = Alcohol C₂₂5 = Alcohol C₂₄6 = Alcohol C₂₆7 = Alcohol C₂₈

8 = Cicloartenol

9 = 24-Metileno-cicloartenol

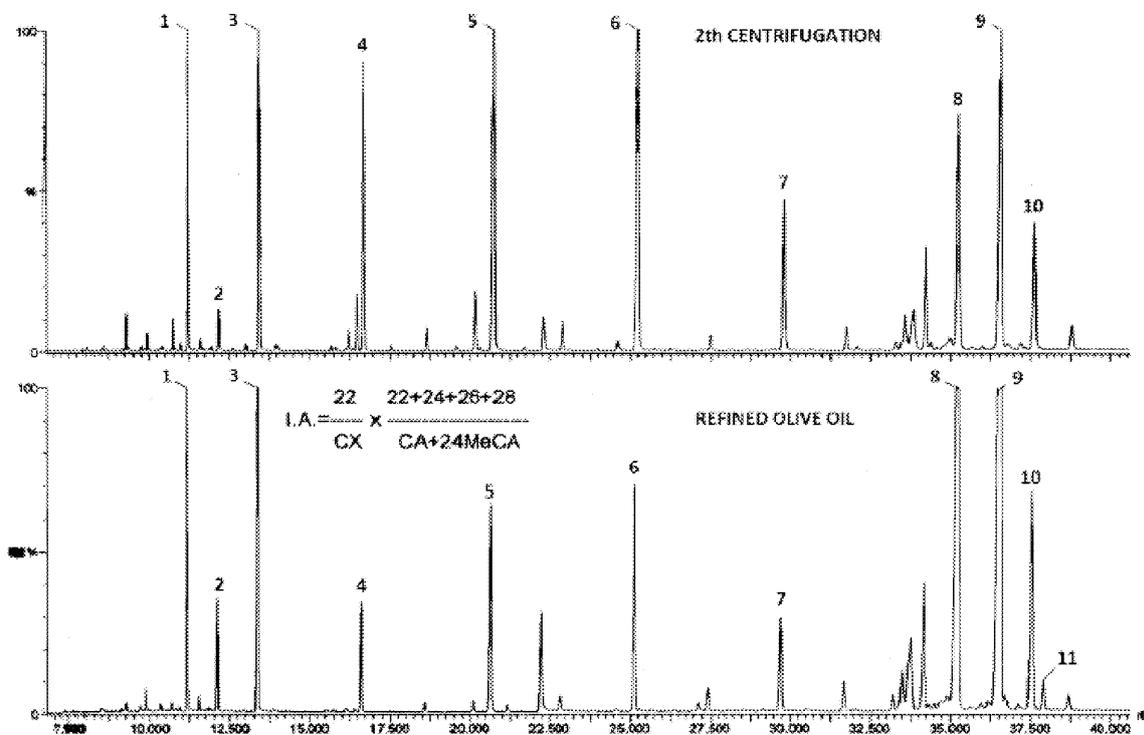
10 = Citrostadienol

11 = Ciclobranol

▼ M28

Figura 3

Alcoholes alifáticos y triterpénicos de un aceite de oliva refinado y un aceite de oliva de segunda centrifugación



1 = Fitol

2 = Geranilgeraniol (CX)

3 = Alcohol C₂₀4 = Alcohol C₂₂5 = Alcohol C₂₄6 = Alcohol C₂₆7 = Alcohol C₂₈

8 = Cicloartenol (CA)

9 = 24-Metileno-cicloartenol (24MeCA)

10 = Citrostadienol

11 = Ciclobranol

▼ **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 iso octano.

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.

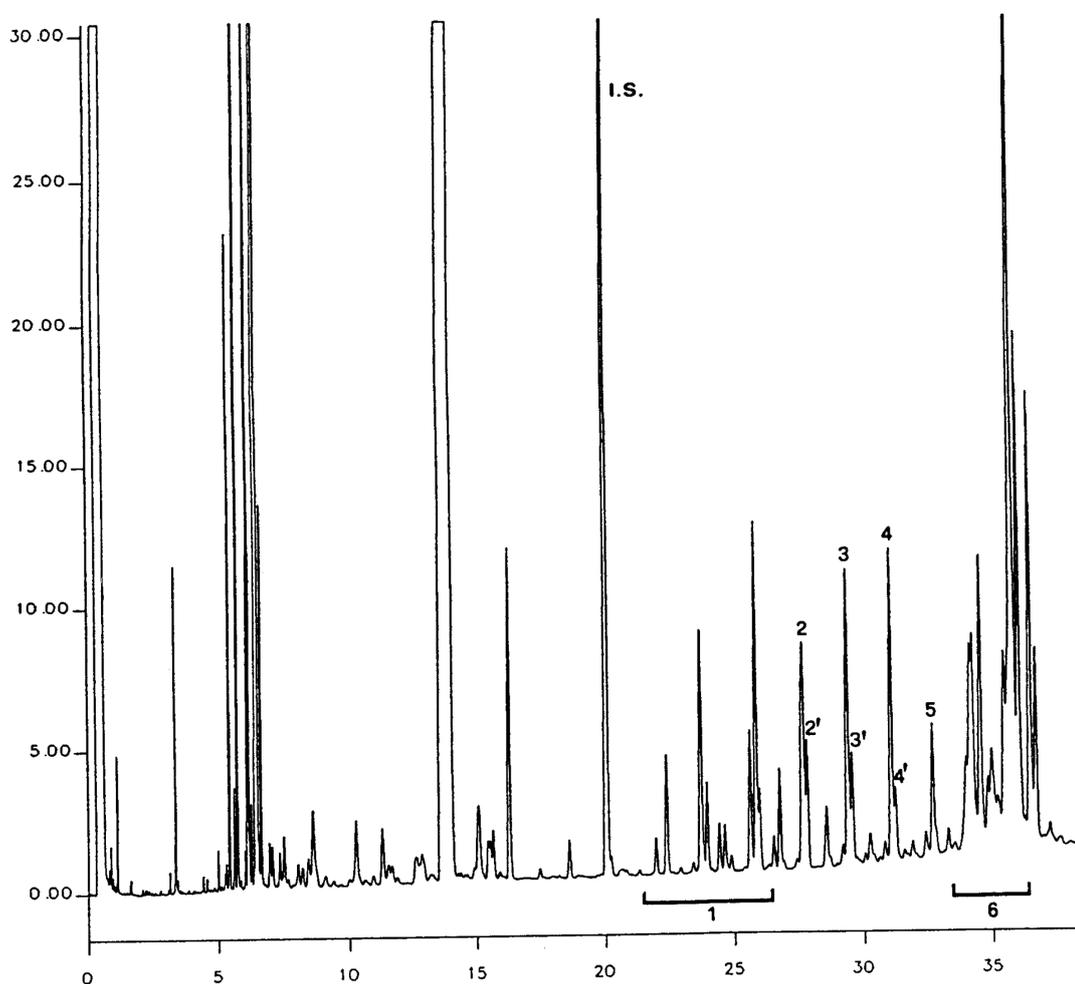
Nota 7: Los componentes que se deben cuantificar hacen referencia a los picos con un número par de carbonos, comprendidos entre los ésteres C_{40} y C_{46} , según el ejemplo del cromatograma de las ceras del aceite de oliva indicado en la figura siguiente. Si el éster C_{46} aparece dos veces, para 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

Legenda:

I.S. = Araquidato de laurilo

1 = Ésteres diterpénicos

2+2' = Ésteres C₄₀

3+3' = Ésteres C₄₂

4+4' = Ésteres C₄₄

5 = Ésteres C₄₆

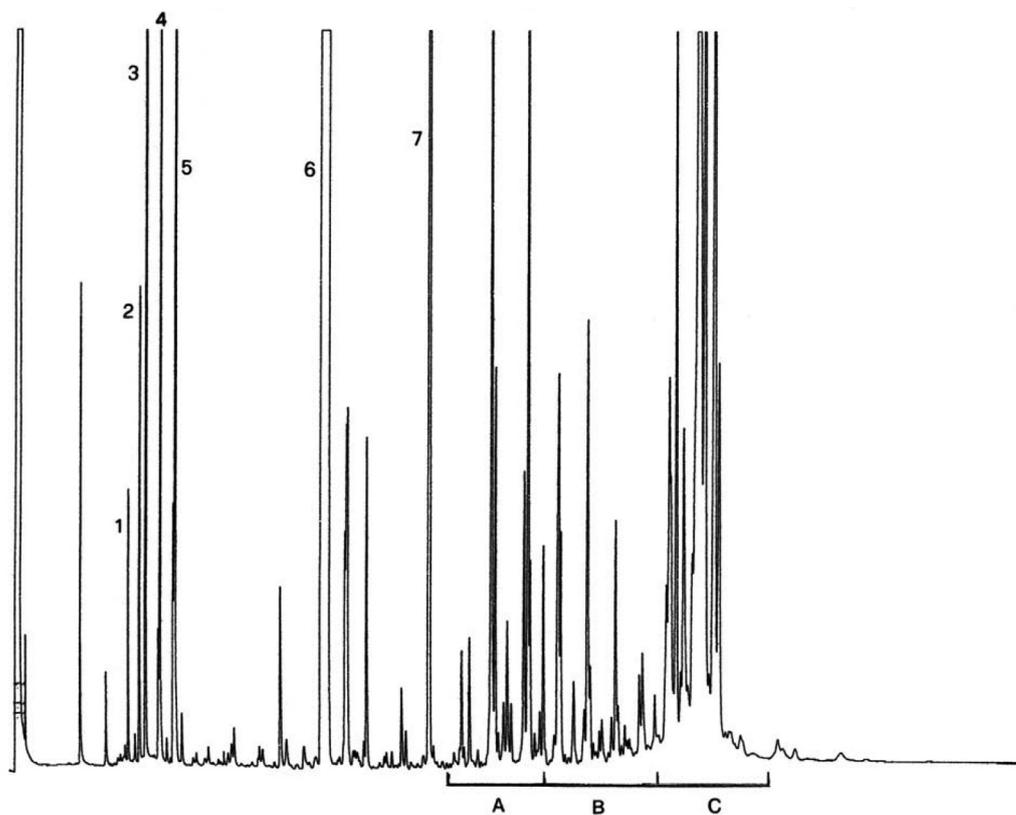
6 = Ésteres de esteroides y alcoholes triterpénicos

(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



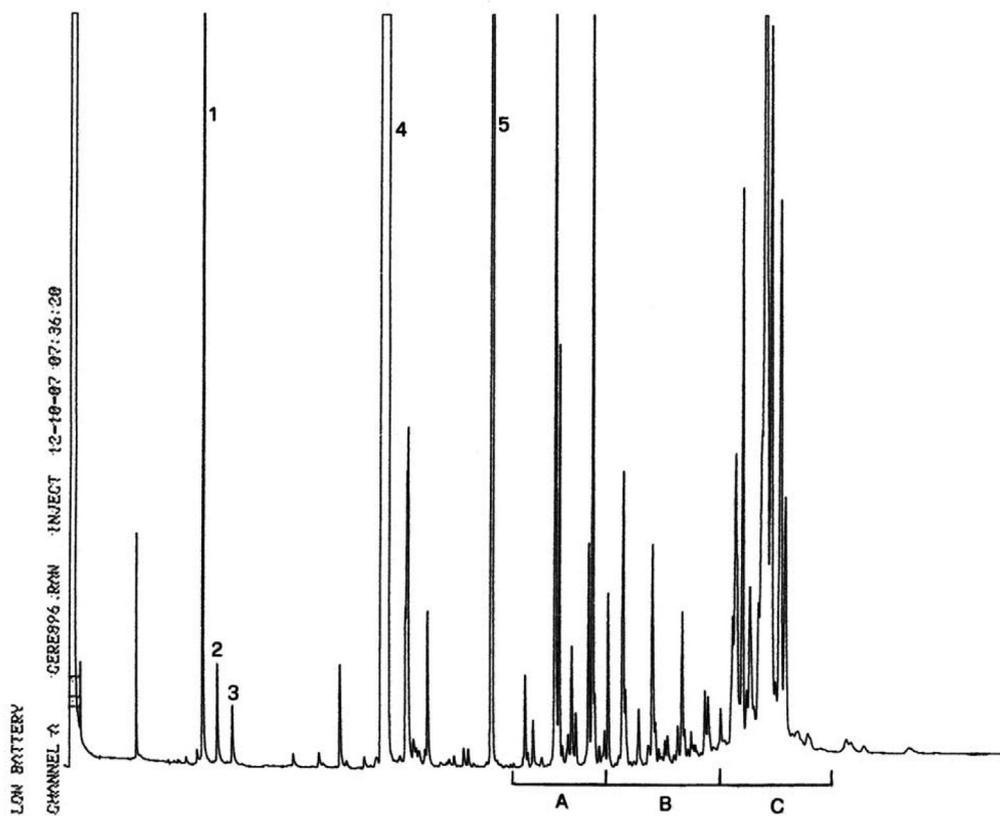
Leyenda:

- 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



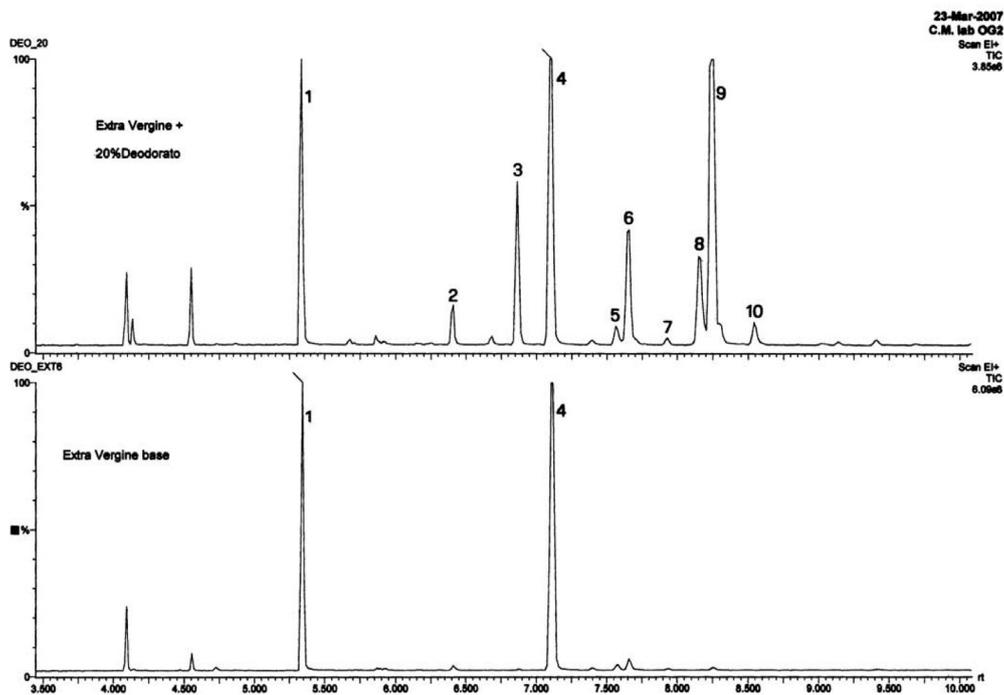
Leyenda:

- 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.

▼ M28

Resultados de los controles de conformidad realizados en los aceites de oliva a que se refiere el artículo 8, apartado 2

				Etiquetado						Parámetros químicos			Características organolépticas ⁽⁴⁾			Conclusión final	
Muestra	Categoría	País de origen	Lugar de inspección ⁽¹⁾	Denominación legal	Denominación de origen	Condiciones de almacenamiento	Información errónea	Legibilidad	C/NC ⁽³⁾	Parámetros fuera de límite S/N	En caso afirmativo, indique cuáles ⁽²⁾	C/NC ⁽³⁾	Mediana del defecto	Mediana del frutado	C/NC ⁽³⁾	Acciones requeridas	Sanción

⁽¹⁾ Mercado interior (almazara, embotelladores, fase de venta al por menor), exportación, importación.

⁽²⁾ Cada característica del aceite de oliva que figura en el anexo I tendrá un código.

⁽³⁾ Conforme o no conforme.

⁽⁴⁾ No requerido para aceite de oliva y aceite de orujo de oliva.