

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

► **B**

REGLAMENTO (UE) N° 61/2011 DE LA COMISIÓN

de 24 de enero de 2011

por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 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 23 de 27.1.2011, p. 1)

Rectificado por:

► **C1** Rectificación, DO L 78 de 24.3.2011, p. 69 (61/2011)

**REGLAMENTO (UE) Nº 61/2011 DE LA COMISIÓN****de 24 de enero de 2011****por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 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 EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CE) nº 1234/2007 del Consejo, de 22 de octubre de 2007, por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas (Reglamento único para las OCM) ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 113, apartado 1, letra a) y su artículo 121, letra h), leídos en relación con su artículo 4,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CEE) nº 2568/91 de la Comisión ⁽²⁾ define las características físicas y químicas de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva, así como los métodos de evaluación de estas características. Estos métodos y los valores límite relativos a las características de los aceites deben actualizarse teniendo en cuenta la opinión de los expertos químicos y en consonancia con los trabajos efectuados en el marco del Consejo Oleícola Internacional.
- (2) Concretamente, habida cuenta de que los expertos químicos han concluido que el contenido de ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) y de ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs) es un parámetro útil de calidad para los aceites de oliva vírgenes extra, es conveniente incluir los valores límite de estos ésteres, así como un método para la determinación de su contenido.
- (3) Con el fin de establecer un período de adaptación a las nuevas normas, permitir la implantación de los medios necesarios para su aplicación y no perturbar las transacciones comerciales, conviene aplicar las modificaciones aportadas por el presente Reglamento a partir del 1 de abril de 2011. Por los mismos motivos, es conveniente establecer que los aceites de oliva y de orujo de oliva fabricados y etiquetados legalmente en la Unión o importados legalmente a la Unión y despachados a libre práctica antes de la citada fecha puedan comercializarse hasta que se agoten sus existencias.
- (4) Procede, por tanto, modificar el Reglamento (CEE) nº 2568/91 en consecuencia.
- (5) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de Gestión de la Organización Común de Mercados Agrícolas.

⁽¹⁾ DO L 299 de 16.11.2007, p. 1.

⁽²⁾ DO L 248 de 5.9.1991, p. 1.

▼B

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El Reglamento (CEE) nº 2568/91 queda modificado como sigue:

- 1) En el artículo 2, apartado 1, se añade el guión siguiente:
«— para la determinación del contenido en ceras y en ésteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases con columna capilar, el método previsto en el anexo XX.».
- 2) En el índice de los anexos, se añade el siguiente:
«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».
- 3) El anexo I se sustituye por el texto que figura en el anexo I del presente Reglamento.
- 4) Se añade el anexo XX, tal como figura en el anexo II del presente Reglamento.

Artículo 2

Los productos que se hayan fabricado y etiquetado legalmente en la Unión o se hayan importado legalmente a la Unión y despachado a libre práctica antes del 1 de abril de 2011 podrán comercializarse hasta que se agoten sus existencias.

Artículo 3

El presente Reglamento entrará en vigor el tercer día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir del 1 de abril de 2011.

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

ANEXO I

«ANEXO I

CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

Categoría	Ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) y ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxidos mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadieno mg/kg (1)	Diferencia ECN42(H-PLC) y ECN42 (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación organoléptica Mediana del atributo frutado (Mf) (*)
1. Aceite de oliva virgen extra	Σ FAMES + FAEEs ≤ 75 mg/kg o 75 mg/kg < Σ FAMES + FAEEs ≤ 150 mg/kg y (FAEEs/FAMES) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Aceite de oliva virgen	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	► C1 Md ≤ 3,5 ◀	Mf > 0
3. Aceite de oliva lampante	—	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	► C1 Md > 3,5 (2) ◀	—
4. Aceite de oliva refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % ácido palmítico total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—

▼B

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

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

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

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

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

▼B

Categoría	Contenido de ácidos ⁽¹⁾						Sumas de los isómeros transo-leicos (%)	Sumas de los isómeros trans-lino-leicos + translino-lénicos (%)	Composición de los esteroides						Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodiol y uvaol (%) (**)
	Mirístico (%)	Linolé-nico (%)	Araquí-dico (%)	Eicose-noico (%)	Behé-nico (%)	Lignocé-rico (%)			Coleste-rol (%)	Brasicas-terol (%)	Campes-terol (%)	Estigmaste-rol (%)	Betasitos-terol (%) ⁽²⁾	Delta-7-estig-mastenol (%)		
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Aceite de oliva virgen	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Aceite de oliva lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Aceite de orujo de oliva bruto	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

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

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

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

⁽⁴⁾ Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva bruto si el contenido de alcoholes alifáticos totales es superior a 350 mg/kg y si el porcentaje de eritrodiol y uvaol es superior a 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.
- 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 (**), relativas a la calidad del aceite, implican que, en el caso de todos los aceites de orujo de oliva, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes.»

▼ B*ANEXO II**«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.**

▼ B

- 3.7. **Horno de mufla.**
- 3.8. Balanza **analítica** con una precisión de + 0,1 mg.
- 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)**

▼B**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.).

▼ B

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);

▼B

- 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 estigmas-tadienos, 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 (palmitico 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:

$$\text{Ceras, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

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.

▼ B5.5.1. *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 C₁₆ y C₁₈.

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 C₁₆ y C₁₈, 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 C₄₀ a C₄₆ (*nota 7*), en mg/kg de materia grasa.

Indicar la suma de los contenidos de los ésteres metílicos y etílicos de C₁₆ a C₁₈ y el total de ambos.

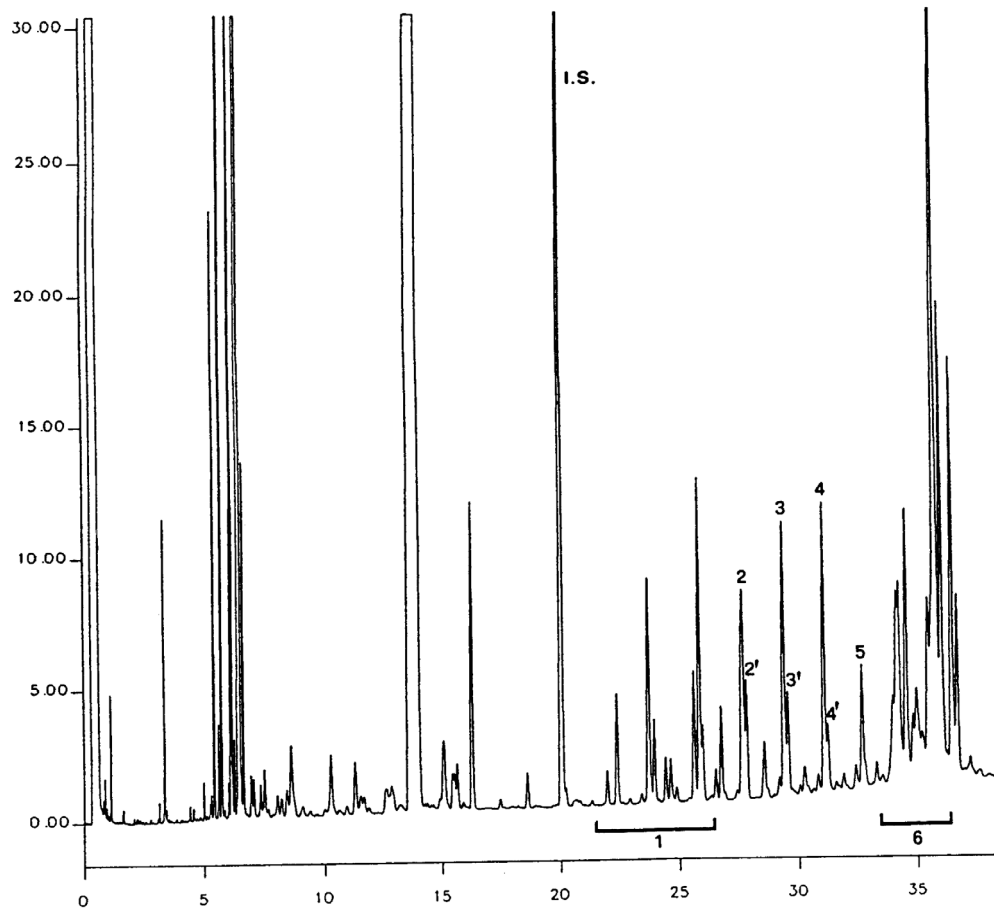
Los resultados deben redondearse al mg/kg más próximo.

Nota 7: Los componentes que se deben cuantificar hacen referencia a los picos con un número par de carbonos, comprendidos entre los ésteres 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 predominante.

Indicar la relación entre ésteres etílicos y ésteres metílicos

▼B

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

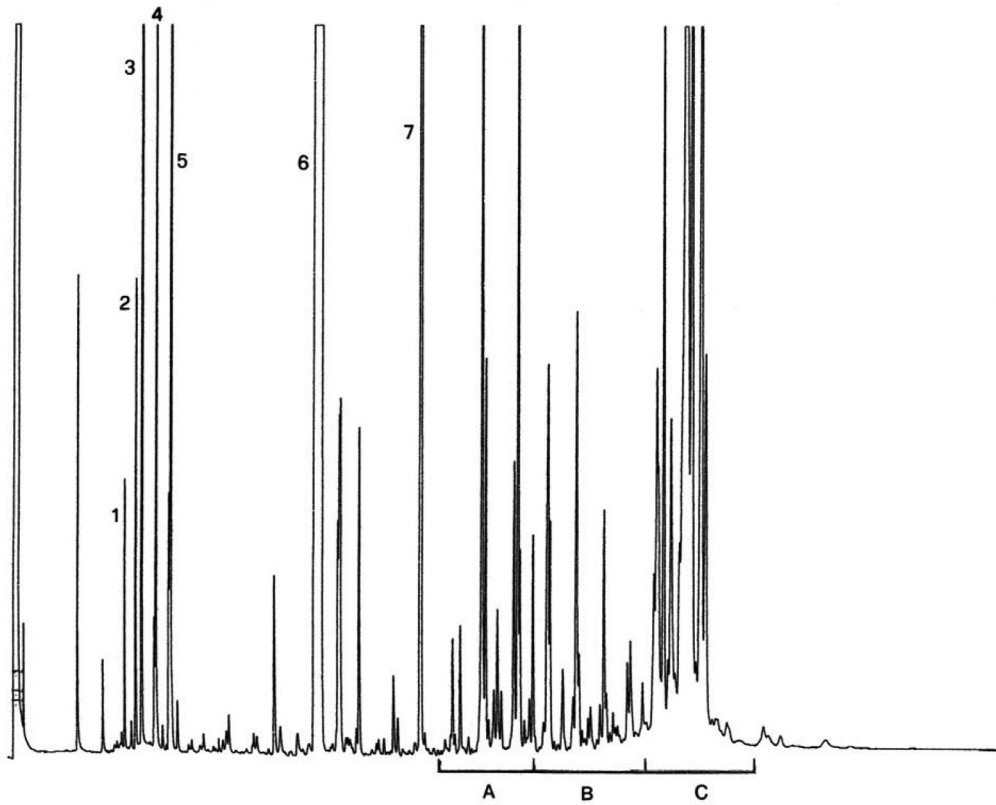
6 = Ésteres de esteroides y alcoholes triterpénicos

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

▼B

Figura 2

Ésteres metílicos, ésteres etílicos y ceras en un aceite de oliva virgen



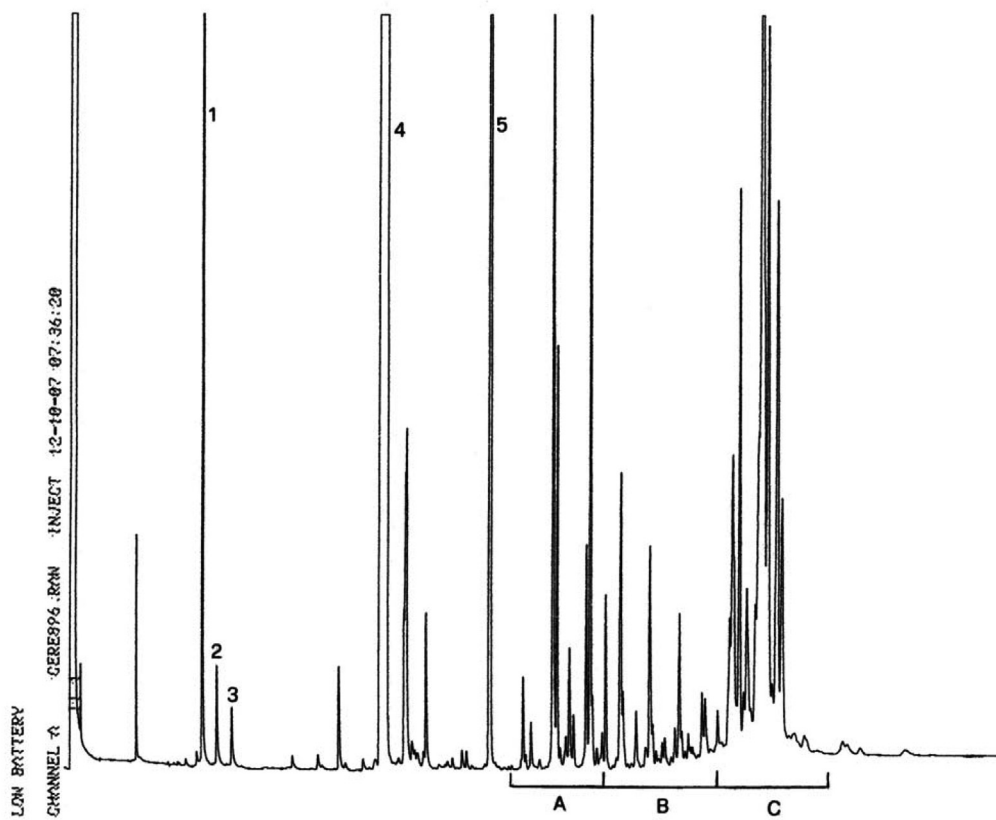
Leyenda:

- 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

▼B

Figura 3

Ésteres metílicos, ésteres etílicos y ceras en un aceite de oliva virgen extra



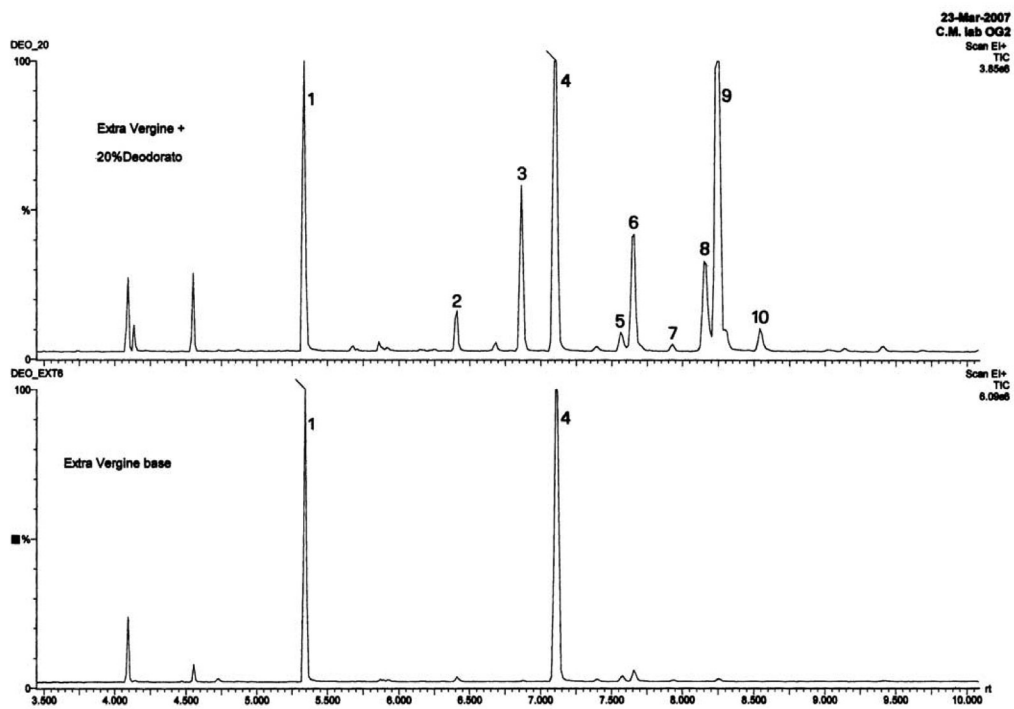
Leyenda:

- 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

▼ B

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

▼ B*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.»