

REGLAMENTO (CE) N° 702/2007 DE LA COMISIÓN**de 21 de junio de 2007****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**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CE) n° 865/2004 del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establece la organización común del mercado del aceite de oliva y de las aceitunas de mesa y se modifica el Reglamento (CEE) n° 827/68 ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 5, apartado 3,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CEE) n° 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) Los expertos químicos han considerado en particular que la cuantificación del porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo es más precisa para la detección de los aceites esterificados. La disminución del valor límite para el estigmastadieno en los aceites de oliva vírgenes permite asimismo una mejor separación de los aceites de oliva vírgenes y refinados.
- (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 aplazar la aplicación del presente Reglamento hasta el 1 de enero de 2008. Por los mismos motivos, es conveniente establecer que los aceites de oliva y de orujo de oliva fabricados y etique-

tados legalmente en la Comunidad o importados legalmente a la Comunidad y despachados a libre práctica antes de la citada fecha puedan comercializarse hasta que se agoten sus existencias.

- (4) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión del aceite de oliva y de las aceitunas de mesa.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El Reglamento (CEE) n° 2568/91 queda modificado como sigue:

- 1) En el artículo 2, apartado 1, el sexto guión se sustituye por el texto siguiente:

«— para determinar el porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo, el método recogido en el anexo VII.».

- 2) Los anexos se modifican con arreglo al anexo del presente Reglamento.

*Artículo 2*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 enero de 2008.

No obstante, los productos que se hayan fabricado y etiquetado legalmente en la Comunidad o se hayan importado legalmente a la Comunidad y despachado a libre práctica antes del 1 de enero de 2008 podrán comercializarse hasta que se agoten sus existencias.

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

Hecho en Bruselas, el 21 de junio de 2007.

Por la Comisión

Mariann FISCHER BOEL

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO L 161 de 30.4.2004, p. 97; versión corregida en el DO L 206 de 9.6.2004, p. 37.

⁽²⁾ DO L 248 de 5.9.1991, p. 1. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) n° 1989/2003 (DO L 295 de 13.11.2003, p. 57).

ANEXO

Los anexos del Reglamento (CEE) n° 2568/91 quedan modificados como sigue:

1) El índice queda modificado del siguiente modo:

a) el título del anexo II se sustituye por el título siguiente:

«Determinación de los ácidos grasos libres, método en frío»;

b) el título del anexo VII se sustituye por el título siguiente:

«Determinación del porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo».

2) El anexo I se sustituye por el texto siguiente:

«ANEXO I

CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

| Categoría | Acidez (%) (*) | Índice de peróxidos mEq O ₂ /kg (*) | Ceras mg/kg (**) | Monopalmitato de 2-glicenilo (%) | Estigmasadieno mg/kg (1) | Diferencia ECN42 (HPLC) y ECN42 (cálculo teórico) | K ₂₇₀ (*) | Delta-K (*) | Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*) | Evaluación organoléptica Mediana del atributo frutado (Mf) (*) |
|---|----------------|--|------------------|--|--------------------------|---|----------------------|-------------|---|--|
| 1. Aceite de oliva virgen extra | ≤ 0,8 | ≤ 20 | ≤ 250 | ≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 % | ≤ 0,10 | ≤ 0,2 | ≤ 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 | ≤ 0,25 | ≤ 0,01 | Md ≤ 2,5 | 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 | — | — | Md > 2,5 (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 | — | — |
| 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 2,5 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 eritrodio 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 eritrodio y uvaol es superior a 3,5.

| Categoría | Contenido de ácidos (1) | | | | | | Sumas de los isómeros transolefínicos (%) | Sumas de los isómeros noleínicos + translinolénicos (%) | Composición de los esteroides | | | | | | Esteroides totales (mg/kg) | Eritrodíol y uvaol (%) (**) |
|---|-------------------------|---------------|----------------|-----------------|--------------|-----------------|---|---|-------------------------------|--------------------|----------------|-------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | Mirístico (%) | Linoléico (%) | Araquídico (%) | Eicosenoico (%) | Behénico (%) | Lignocérico (%) | | | Colésterol (%) | Brassicasterol (%) | Campsterol (%) | Estigmasterol (%) | Beta-sitosterol (%) (2) | Delta-7-estigmastenol (%) | | |
| 1. Aceite de oliva virgen extra | ≤ 0,05 | ≤ 1,0 | ≤ 0,6 | ≤ 0,4 | ≤ 0,2 | ≤ 0,2 | ≤ 0,05 | ≤ 0,05 | ≤ 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 | ≤ 0,1 | ≤ 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 | ≤ 0,1 | ≤ 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 | ≤ 0,1 | ≤ 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 | ≤ 0,1 | ≤ 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 | ≤ 0,2 | ≤ 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 | ≤ 0,2 | ≤ 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 | ≤ 0,2 | ≤ 4,0 | < Camp. | ≥ 93,0 | ≤ 0,5 | ≥ 1 600 | > 4,5 | |

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

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

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

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

Notas:

a) Los resultados de los análisis deben expresarse indicando el mismo número de decimales que el previsto para cada característica. La última cifra expresada deberá redondearse hacia arriba si la cifra siguiente es superior a 4.

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

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

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

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

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

- 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.

- 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.).

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.

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:

$$\text{éster, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1\,000}{A_s \times m}$$

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.

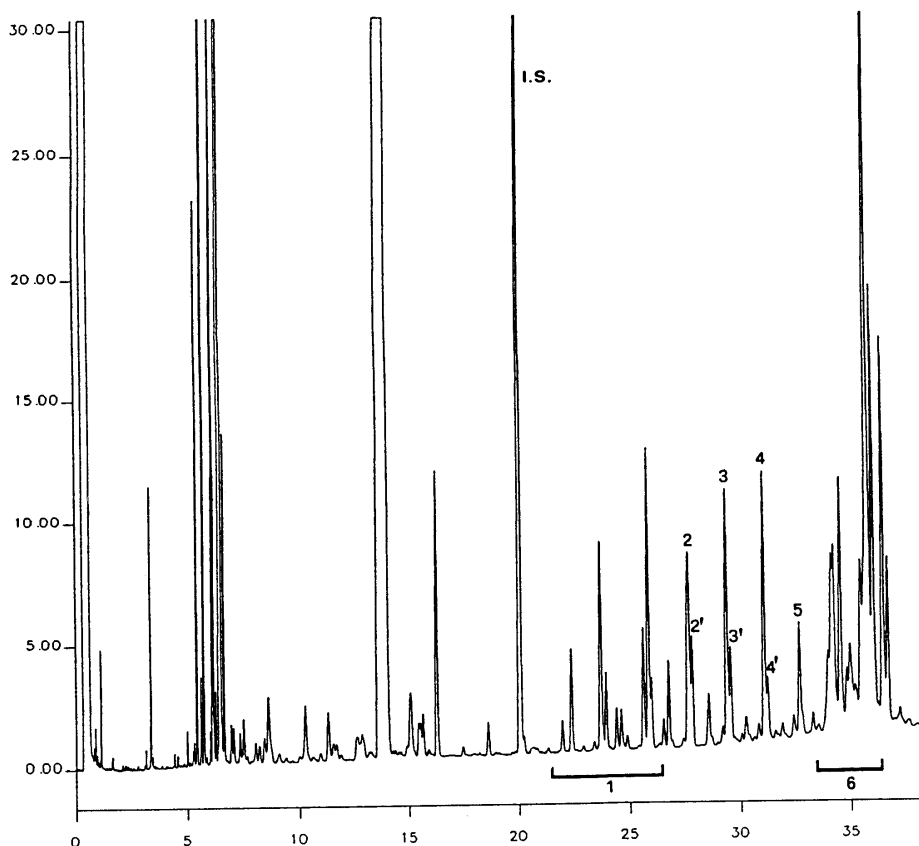
6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

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.

Figura
Cromatograma de las ceras de un aceite de oliva (*)



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

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

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.».

6) El anexo VII se sustituye por el texto siguiente:

«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 monoglicerídica, 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 °C ± 0,5 °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.
- 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. Fenoltaleína, 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.
- 5.1.1.1. En el embudo de 1 000 ml (3.13), poner 50 g de aceite y 200 ml de n-hexano. Añadir 100 ml de isopropanol y una cantidad de la solución de hidróxido de sodio al 12 % (4.11) correspondiente a la acidez libre del aceite más el 5 %. Agitar enérgicamente durante un minuto. Añadir 100 ml de agua destilada, agitar de nuevo y dejar en reposo.

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

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

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

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

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

- 5.1.3. *Preparación de la columna cromatográfica*

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

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

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

- 5.1.4. *Cromatografía en columna*

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

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

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

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

Pesar el matraz y calcular el extracto recuperado.

[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 $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 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 C₅₄ 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.),
- 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:

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

siendo:

A_x = el área del pico correspondiente al monopalmitato de glicerilo

ΣA = la suma de las áreas de todos los picos de los monoglicéridos.

El resultado debe expresarse con una cifra decimal.

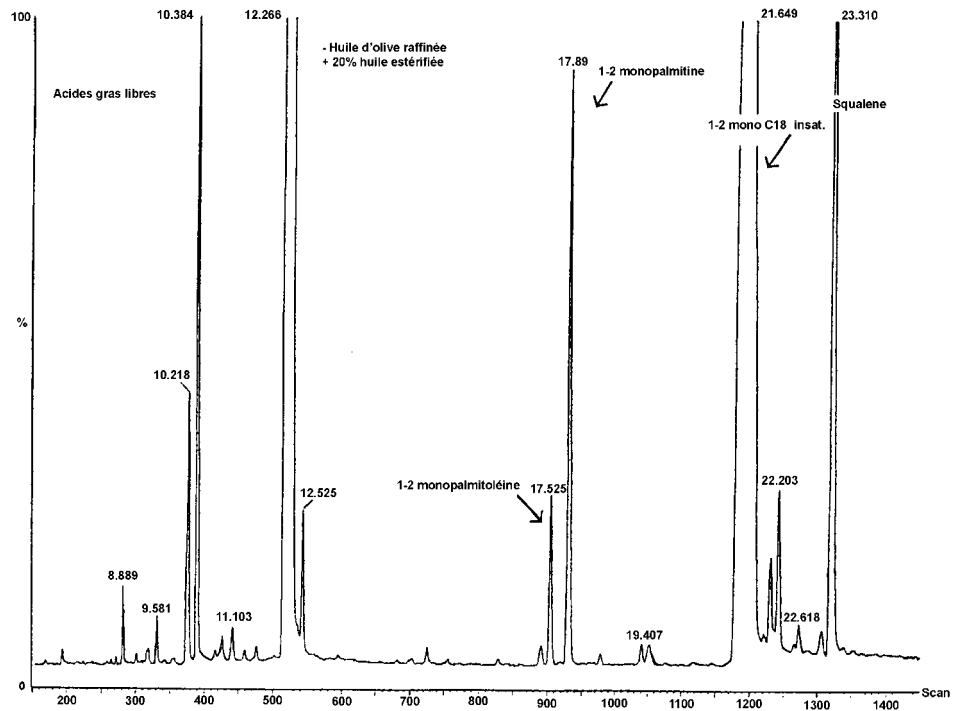
7. INFORME DEL ANÁLISIS

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.

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 %)



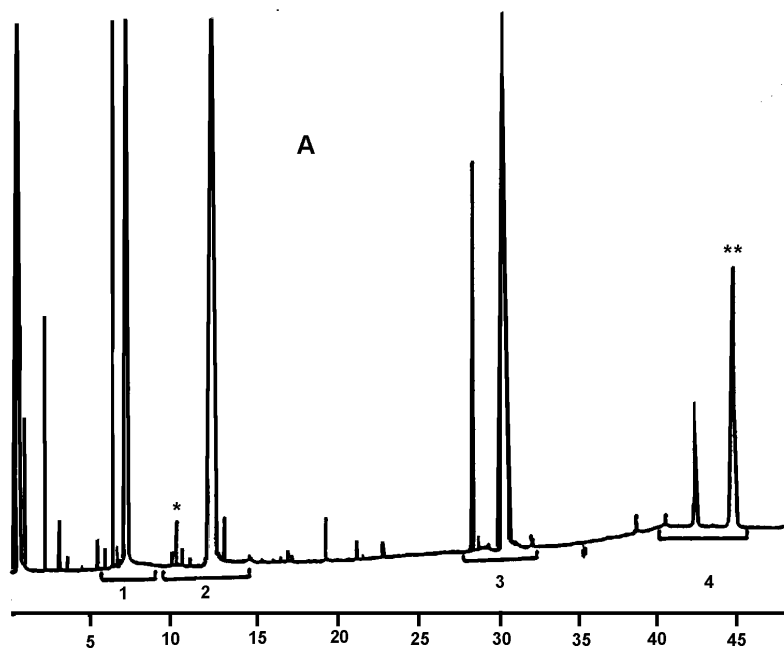
Leyenda: "acides gras libres" = Ácidos grasos libres; "Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée" = Aceite de oliva refinado + 20 % aceite de oliva esterificado; "1-2 monopalmitoléine" = 1-2 monopalmitina; "1-2 mono C₁₈ insat." = 1,2-mono C₁₈ insat.; "Squalene" = Escualeno; «1-2 monopalmitoléine»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

Figura 2

Cromatograma de:

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

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



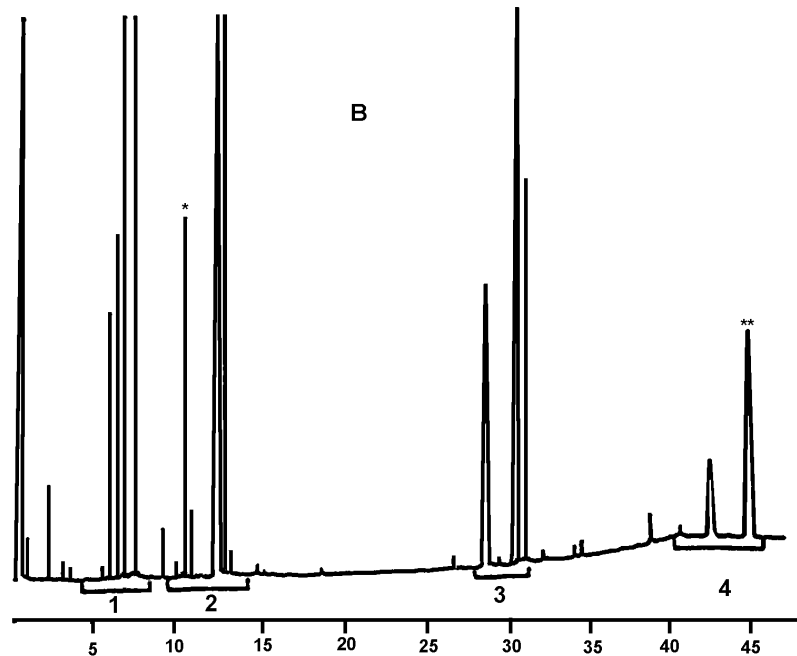
Leyenda:

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

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 %.



Leyenda:

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

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 tritarlo 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 arábica 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.»

7) En el anexo X A, el punto 6.2 se sustituye por el texto siguiente:

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