

**REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) N° 299/2013 DE LA COMISIÓN**

**de 26 de marzo de 2013**

**que 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 EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CE) n° 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) <sup>(1)</sup>, y, en particular, su artículo 113, apartado 1, letra a), y su artículo 121, párrafo primero, letra a), leídos en relación con su artículo 4,

Considerando lo siguiente:

- (1) El 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 <sup>(2)</sup>, define las características químicas y organolépticas de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva, así como los métodos de evaluación de tales características. Estos métodos 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 (en lo sucesivo, «COI»).
- (2) Según el artículo 113, apartado 3, del Reglamento (CE) n° 1234/2007, los Estados miembros deben cerciorarse de que los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva cumplen las normas de comercialización adoptadas en el Reglamento (CEE) n° 2568/91 y deben imponer las sanciones a que haya lugar. Los artículos 2 y 2 bis del Reglamento (CEE) n° 2568/91 establecen normas para tales controles de conformidad. Dichas normas deben garantizar que el aceite de oliva para el que se ha establecido una norma de calidad se ajusta efectivamente a la misma. Las normas deben ser más detalladas e incluir un análisis de riesgos. A efectos de dichos controles de conformidad, debe definirse el término «aceite de oliva comercializado».
- (3) La experiencia ha revelado algunos riesgos de fraude que impiden el pleno efecto de la protección del consumidor ofrecida por el Reglamento (CEE) n° 2568/91. Los propietarios de aceite de oliva deben, por tanto, disponer de registros de entradas y salidas para cada categoría de aceites. A fin de evitar una carga administrativa adicional, sin comprometer los objetivos del registro oleícola, la recopilación de información debe limitarse hasta la fase de envasado del aceite de oliva.
- (4) Con el fin de garantizar el seguimiento y la evaluación de las medidas previstas en el Reglamento (CEE) n° 2568/91, los Estados miembros deben notificar a la Comisión no solo las medidas nacionales de aplicación, sino también un informe de los resultados de los controles de conformidad.
- (5) A fin de proseguir el proceso de armonización con las normas internacionales establecidas por el COI, deben actualizarse determinados métodos de análisis establecidos en el Reglamento (CEE) n° 2568/91. Por lo tanto, el método de análisis establecido en el anexo XVIII de dicho Reglamento debe sustituirse por uno más eficiente. También procede eliminar algunas incoherencias e imperfecciones de los métodos de análisis establecidos en el anexo IX de dicho Reglamento.
- (6) Es necesario prever un período transitorio para que los Estados miembros puedan aplicar las nuevas normas establecidas por el presente Reglamento.
- (7) La Comisión ha puesto a punto un sistema de información que facilita la gestión electrónica de documentos y trámites en sus procedimientos de trabajo internos y en sus relaciones con las autoridades que participan en la política agrícola común. Se considera que ese sistema permite cumplir las obligaciones de notificación contempladas en el Reglamento (CEE) n° 2568/91 de conformidad con el Reglamento (CE) n° 792/2009 de la Comisión, de 31 de agosto de 2009, que establece las disposiciones de aplicación de la notificación a la Comisión por los Estados miembros de la información y los documentos relacionados con la ejecución de la organización común de mercados, el régimen de pagos directos, la promoción de los productos agrícolas y los regímenes aplicables a las regiones ultraperiféricas y a las islas menores del Mar Egeo <sup>(3)</sup>.
- (8) Procede, por tanto, modificar el Reglamento (CEE) n° 2568/91 en consecuencia.
- (9) El Comité de Gestión de la Organización Común de Mercados Agrícolas no ha emitido dictamen alguno en el plazo establecido por su presidente.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

*Artículo 1*

El Reglamento (CEE) n° 2568/91 se modifica como sigue:

1) El artículo 2 bis se sustituye por el texto siguiente:

*«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.

<sup>(1)</sup> DO L 299 de 16.11.2007, p. 1.

<sup>(2)</sup> DO L 248 de 5.9.1991, p. 1.

<sup>(3)</sup> DO L 228 de 1.9.2009, p. 3.

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.

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.».

2) El artículo 3 se sustituye por el texto siguiente:

«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.».

3) Se añade el artículo 7 bis siguiente:

«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.».

4) El artículo 8 se sustituye por el texto siguiente:

«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 (\*).

(\*) DO L 228 de 1.9.2009, p. 3.».

5) El anexo IX se sustituye por el texto que figura en el anexo I del presente Reglamento.

6) El anexo XVIII se sustituye por el texto que figura en el anexo II del presente Reglamento.

7) Se añade el anexo XXI, cuyo texto figura en el anexo III del presente Reglamento.

Artículo 2

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

Será aplicable a partir del 1 de enero de 2014. No obstante, el artículo 8, apartado 2, será aplicable a partir del 1 de enero de 2015.

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

Hecho en Bruselas, el 26 de marzo de 2013.

*Por la Comisión*  
*El Presidente*  
José Manuel BARROSO

---

## ANEXO I

## «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.

La absorción a las longitudes de onda indicadas en el método se debe a la presencia de sistemas diénicos y triénicos conjugados. Los valores de esta absorción se expresan en extinción específica  $E^{1\%}_{1\text{cm}}$  (extinción de una solución de la materia grasa al 1 % en el disolvente especificado, en un espesor de 1 cm) que se designa convencionalmente como K, también denominado "coeficiente de extinción".

## 1. OBJETO

El presente método describe el procedimiento para llevar a cabo un examen espectrofotométrico del aceite de oliva (tal como se describe en el apéndice) en el ultravioleta.

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La materia grasa se disuelve en el disolvente requerido y se determina la extinción de la solución a las longitudes de onda prescritas, respecto al disolvente puro. A partir de los valores espectrofotométricos se calculan las extinciones específicas. Se calcula la absorbancia específica a 232 nm y 268 nm en iso-octano, o a 232 nm y 270 nm en ciclohexano, a una concentración de 1 g por 100 ml en una cubeta de 10 mm.

## 3. EQUIPO

## 3.1. Espectrofotómetro para medidas de extinción en el ultravioleta entre 220 y 360 nm, con posibilidad de lectura por unidad nanométrica. Antes de su utilización, se recomienda que se comprueben de la manera siguiente las escalas de longitud de onda y de absorbancia del espectrómetro.

3.1.1. *Escala de longitud de onda:* Este aspecto puede comprobarse utilizando un material de referencia consistente en un filtro de vidrio óptico que contiene óxido de holmio con bandas de absorción bien distintas. 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. El filtro de vidrio de holmio se mide en modo de absorbancia frente a un blanco de aire, a lo largo de la gama de longitudes de onda de 640 a 240 nm. Para cada ancho de banda espectral (0,10 – 0,25 – 0,50 – 1,00 – 1,50 – 2,00 y 3,00), se efectúa una corrección de la línea de base con un soporte de cubetas vacío. Las longitudes de onda del ancho de banda espectral figuran en el certificado de material de referencia según la norma ISO 3656.

3.1.2. *Escala de absorbancia:* Este aspecto puede comprobarse utilizando un material de referencia constituido por cuatro soluciones de dicromato de potasio en ácido perclórico selladas en cuatro cubetas de cuarzo para UV, con el fin de medir la linealidad y la exactitud fotométrica en el UV. Las cubetas llenas con dicromato potásico (40 mg/ml, 60 mg/ml, 80 mg/ml y 100 mg/ml) se miden frente a un blanco de ácido perclórico. Los valores de absorbancia neta figuran en el certificado del material de referencia según la norma ISO 3656.

3.2. Cubetas de cuarzo rectangulares, con tapadera, con un paso óptico de 1 cm. Las cubetas, llenas de agua o de otro disolvente adecuado, no deben presentar entre sí diferencias superiores a 0,01 unidades de extinción.

3.3. Matraces aforados de 25 ml.

3.4. Balanza analítica, capaz de leer con una precisión de 0,0001 g.

## 4. REACTIVOS

Utilizar exclusivamente reactivos de grado analítico reconocido, a menos que se indique otra cosa.

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 absorbancia inferior a 0,12 a 232 nm e inferior a 0,05 a 250 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. Los aceites líquidos a temperatura ambiente se filtran con papel de filtro a una temperatura aproximada de 30 °C, las grasas sólidas se homogeneizan y se filtran a una temperatura superior en 10 °C como máximo a su temperatura de fusión.

- 5.2. 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, se filtrará rápidamente con papel de filtro.
- 5.3. Se llena una cubeta de cuarzo con la solución obtenida y se miden las extinciones, usando como referencia el disolvente empleado, a la longitud de onda adecuada comprendida entre 232 y 276 nm.

Los valores de extinción obtenidos deben estar comprendidos en el intervalo entre 0,1 y 0,8; en caso contrario es necesario repetir la medición utilizando soluciones más concentradas o más diluidas, según el caso.

*Nota:* Puede que no sea necesario medir la absorbancia en toda la gama de longitudes de onda.

## 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:

$$K_{\lambda} = \left( \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s} \right)$$

donde:

$K_{\lambda}$  = extinción específica a la longitud de onda  $\lambda$ ,

$E_{\lambda}$  = extinción medida a la longitud de onda  $\lambda$ ,

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

$s$  = espesor de la cubeta de cuarzo en cm.

Los resultados deben expresarse con dos cifras decimales.

### 6.2. Variación de la extinción específica ( $\Delta K$ )

El análisis espectrofotométrico del aceite de oliva de conformidad con el método oficial de la legislación de la Unión implica también la determinación de la variación del valor absoluto de la extinción específica ( $\Delta K$ ), que viene dada por la fórmula siguiente:

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

donde  $K_m$  es la extinción específica a la longitud de onda  $m$ , que es la longitud de onda a la que la absorción es máxima y que depende del disolvente utilizado: 270 nm con el ciclohexano y 268 nm con el isooctano.

CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE DE OLIVA

| Categoría   | Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) | Acidez (%) (*) | Índice de peróxido mEq O <sub>2</sub> /kg (*) | Ceras mg/kg (**) | Monopalmitato de 2-glicerilo (%)                 | Estigmastadieno mg/kg (1) | Diferencia: ECN 42 (HPLC) y ECN 42 (cálculo teórico) | K <sub>232</sub> (*) | K <sub>270</sub> (*) 'K 270 o K 268 (3)' | Delta-K (*) (3) | Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*) | Evaluación organoléptica Mediana del frutado (Mf) (*) |
|---|--|----------------|---|------------------|--|---------------------------|--|----------------------|--|-----------------|---|---|
| 1. Aceite de oliva virgen extra   | Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg o 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg y (FAEE/FAME) ≤ 1,5  | ≤ 0,8          | ≤ 20  | ≤ 250            | ≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 % | ≤ 0,10                    | ≤ 0,2  | ≤ 2,50               | ≤ 0,22                                   | ≤ 0,01          | Md = 0  | Mf > 0  |
|   |  |                |   |                  | 1,0 el % total de ácido palmítico es > 14%       |                           |  |                      |  |                 |   |   |
| 2. Aceite de oliva virgen   | —  | ≤ 2,0          | ≤ 20  | ≤ 250            | ≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14%  | ≤ 0,10                    | ≤ 0,2  | ≤ 2,60               | ≤ 0,25                                   | ≤ 0,01          | Md ≤ 3,5  | Mf > 0  |
|   |  |                |   |                  | ≤ 1,0 el % total de ácido palmítico > 14%        |                           |  |                      |  |                 |   |   |
| 3. Aceite de oliva lampante   | —  | > 2,0          | —   | ≤ 300 (3)        | ≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 % | ≤ 0,50                    | ≤ 0,3  | —                    | —  | —               | Md > 3,5 (2)  | —   |
|   |  |                |   |                  | ≤ 1,1 si el % total de ácido palmítico es > 14%  |                           |  |                      |  |                 |   |   |
| 4. Aceite de oliva refinado   | —  | ≤ 0,3          | ≤ 5   | ≤ 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  | ≤ 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%  |                           |  |                      |  |                 |   |   |
| 6. Aceite de orujo de oliva crudo   | —  | —              | —   | > 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) Total de isómeros que han podido (o no han podido) separarse con columna capilar.

(2) O en caso de que la mediana del defecto sea inferior o igual a 3,5 y la mediana del frutado sea igual a 0.

(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 eritrodil y uvaol es inferior o igual al 3,5 %.

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

(5) K 270 si el disolvente es el ciclohexano, K 268 si es el iso-octano.»

## ANEXO II

## «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<sub>HPLC</sub>) 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<sub>teórico</sub>) 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<sup>-4</sup> unidades de índice de refracción.
- 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.

#### 4.3.2. 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  $\mu$ 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:

$$\% \text{ del triglicérido} = \frac{\text{superficie del pico} \times 100}{\text{suma de las superficies de los picos}}$$

Los resultados deben expresarse como mínimo con dos decimales.

Véanse las notas 1 a 4.

#### 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)

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

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

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

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

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

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

## 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):

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

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

## 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)

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

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

##### 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   |

## — 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)]

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

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

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

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

— 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)]

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

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

— 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)]

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

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

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

**0,00761 mol PPLn**

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

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

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

**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**

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

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

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

**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:

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

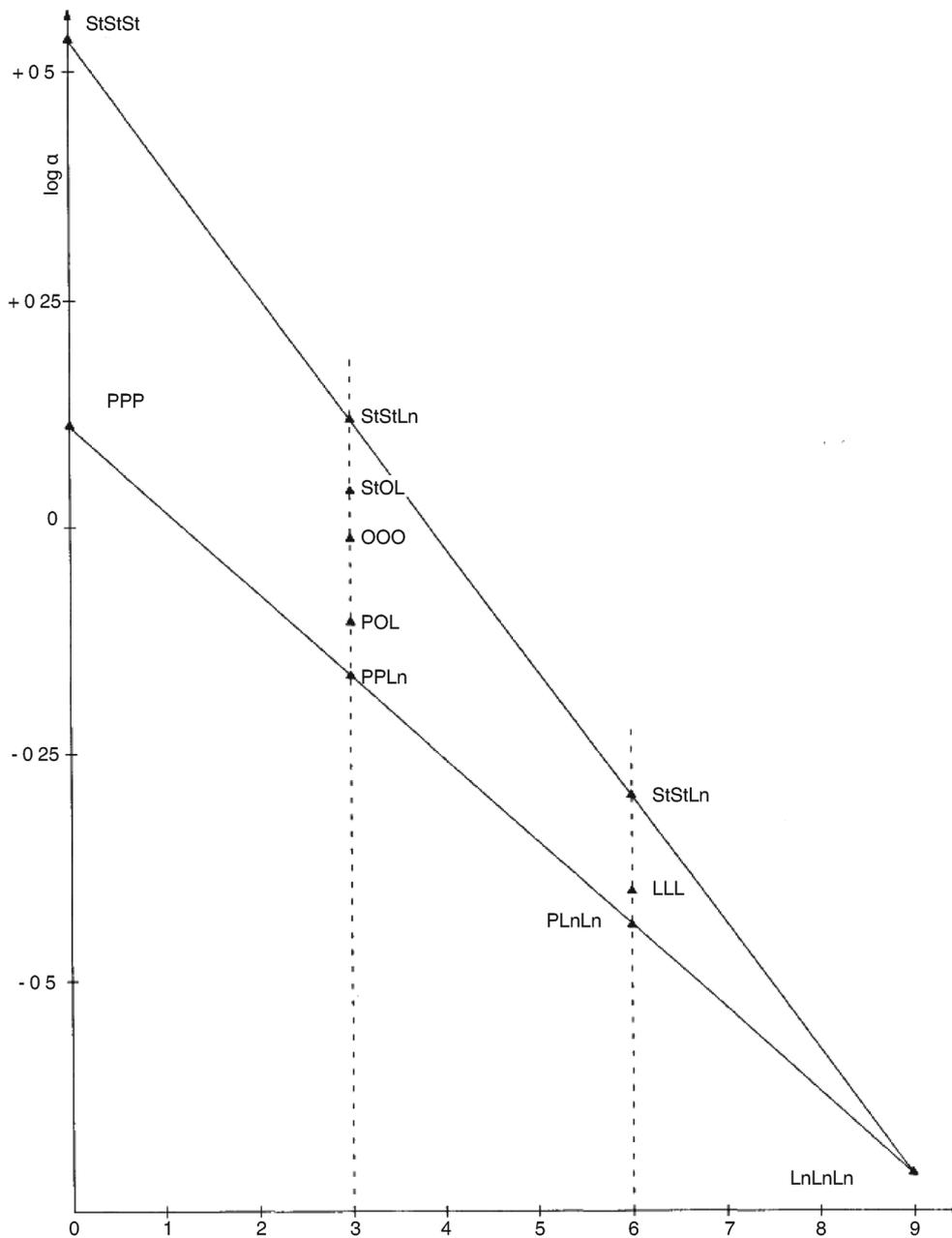
utilizando el tiempo de retención reducido  $TR^1 = TR - TR \text{ disolvente}$ .

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.

Figura 1

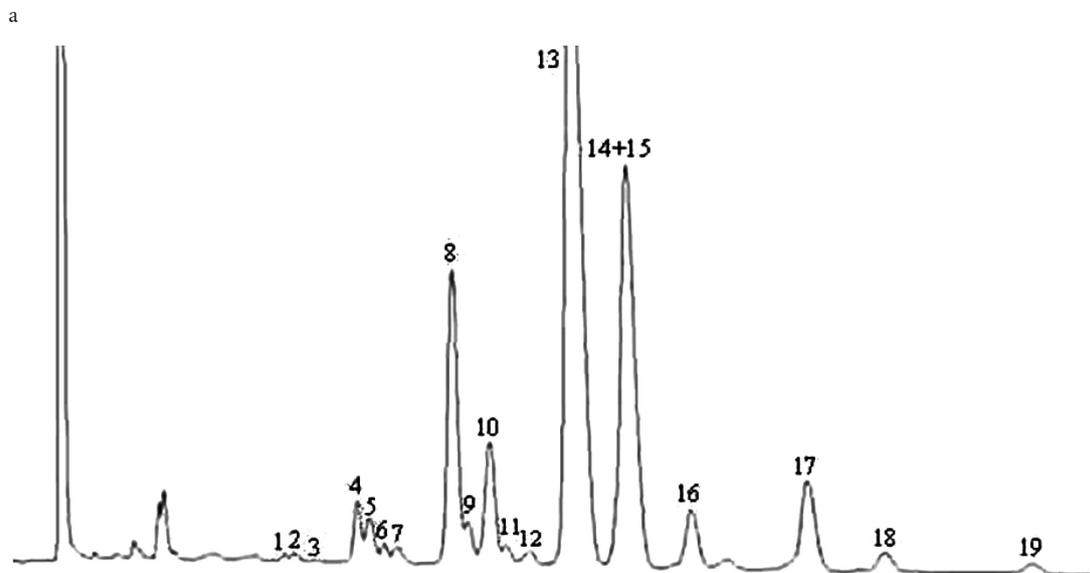
Representación gráfica del log  $\alpha$  frente a f (número de dobles enlaces)

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.

Figura 2

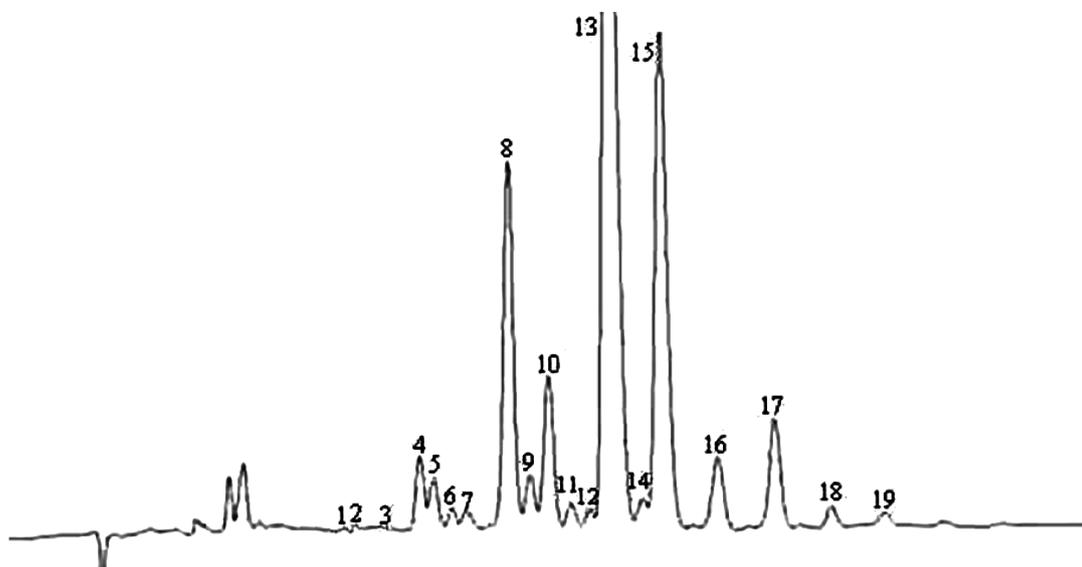
## Aceite de oliva con bajo contenido en linoleico



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

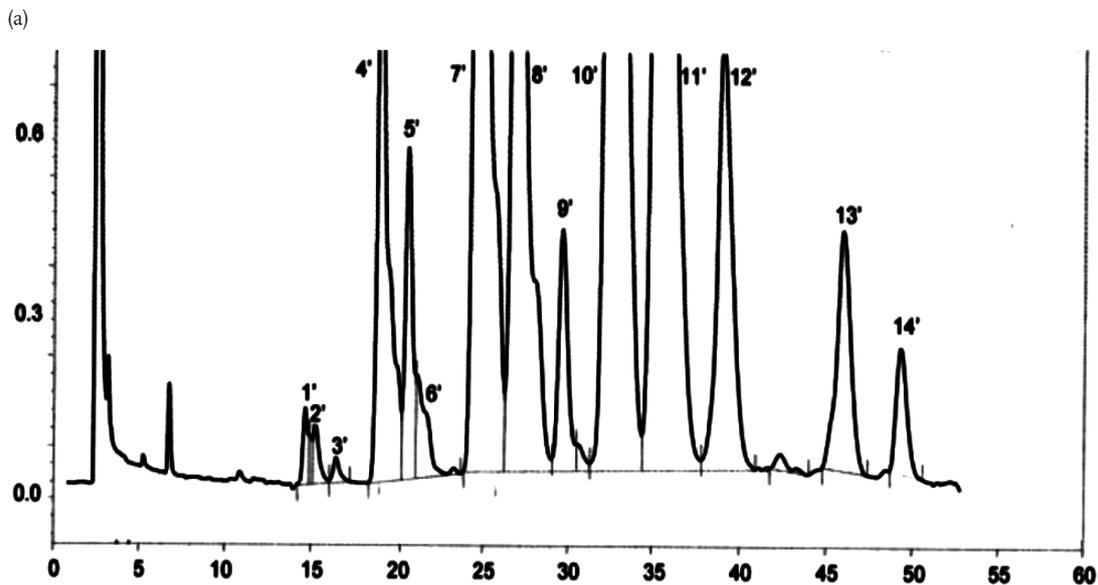


Con disolvente: propionitrilo.

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

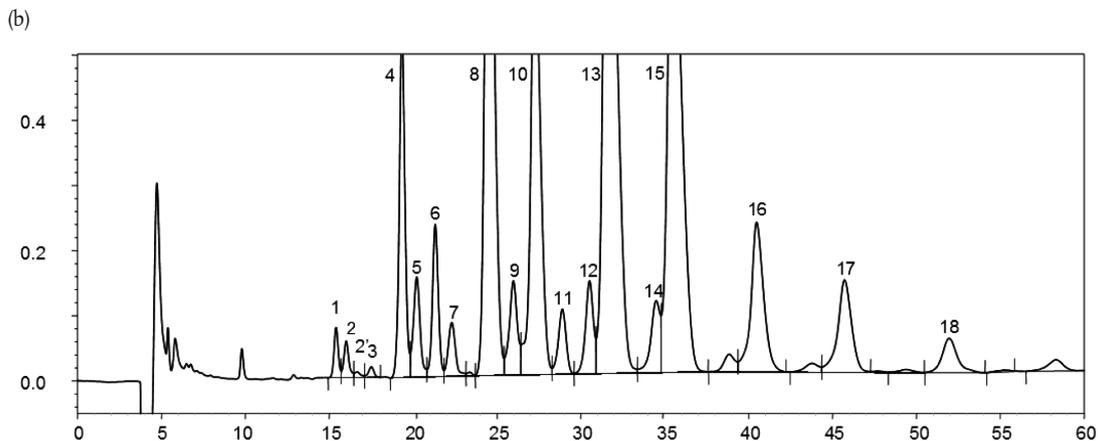
Figura 3

## Aceite de oliva con alto contenido en linoleico



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



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.»

ANEXO III

«ANEXO XXI

**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 (*) |                     |          | Conclusión final    |         |
|---------|-----------|----------------|-------------------------|--------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------|----------|--------------------------------|--|----------|------------------------------------|---------------------|----------|---------------------|---------|
| Muestra | Categoría | País de origen | Lugar de inspección (1) | Denominación legal | Denominación de origen | Condiciones de almacenamiento | Información errónea | Legibilidad | C/NC (2) | Parámetros fuera de límite S/N | En caso afirmativo, indique cuáles (2) | C/NC (2) | Mediana del defecto                | Mediana del frutado | C/NC (2) | 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.»