

## Recomendaciones para la aplicación de algunos métodos analíticos incluidos en el reglamento CEE 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de orujo de oliva

Por M. León Camacho y A. Cert.

Instituto de la Grasa (CSIC). Avda. Padre García Tejero, 4. 41012 Sevilla. España.

### RESUMEN

**Recomendaciones para la aplicación de algunos métodos analíticos incluidos en el reglamento CEE 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de orujo de oliva**

Entre los métodos analíticos aceptados oficialmente por la Unión Europea para su aplicación a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva, las determinaciones de esteroides, trilinoleína, isómeros trans de los ácidos grasos y ceras han mostrado algunas dificultades en su aplicación. El estudio de dichos problemas ha permitido establecer diversas modificaciones y recomendaciones que facilitan la práctica de los métodos y mejoran la fiabilidad de los resultados.

**PALABRAS-CLAVE:** *Aceite de oliva — Aceite de orujo — Cera (determinación) — Esterol (determinación) — Isómero trans (determinación) — Trilinoleína (determinación).*

### SUMMARY

**Suggestions for the application of some analytical methods included in the regulation EEC 2568/91 relative to the characteristics of the olive oils and olive pomace oils.**

Among the analytical methods officially adopted by the European Union to be applied to olive oils and olive pomace oils, some troubles have been found in the application of the procedures for the determination of sterols, trilinolein, trans isomers of fatty acids and waxes. The study of such difficulties suggests several modifications and recommendations facilitating the performance of methods and improving the reliability of results.

**KEY-WORDS:** *Olive oil — Olive pomace oil — Sterol (determination) — Trans isomer (determination) — Trilinolein (determination) — Wax (determination).*

### 1. INTRODUCCION

Con fecha 11 de Julio de 1991 se aprobó por la Comisión de la CEE el reglamento nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. En este reglamento y en algunas de sus modificaciones posteriores (Reglamentos CEE nº 1429/92 y 183/93), se recogen junto a métodos analíticos ampliamente experimentados con anterioridad, otros nuevos de reciente implantación que por tanto han sido poco utilizados, tales como la determinación de isómeros trans de los ácidos grasos y la determinación de ceras. Desde la publicación de estos métodos hasta la fecha nuestro laboratorio ha venido aplicándolos a un gran número de muestras muy diversas, lo que ha conducido a un conocimiento profundo de las metodologías y al ensayo de pequeñas modificaciones en las metodías.

El objeto del presente trabajo es exponer los ensayos realizados que justifican dichas modificaciones así como las notas aclaratorias del procedimiento que a nuestro juicio mejoran la fiabilidad de los métodos.

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1. Muestras

Se han utilizado muestras de aceite de oliva virgen, oliva refinado, y de orujo de oliva procedentes del mercado nacional.

#### 2.2. Materiales y reactivos

— Reactivos de calidad para análisis.

— Colorante Sudán I (SIGMA S8506).

— Cromatografía en capa fina mediante cromatoplasmas de silicagel 60, tamaño 20x20 cm y espesor 0,25 mm (MERCK 5721).

— Cromatografía en columna sobre Silicagel 60, tamaño de partícula de 0,063–0,200 mm (MERCK 7734).

— Cromatografía en columna sobre óxido de aluminio neutro, 100–125 mallas (FLUKA 06300).

— Extracción en fase sólida mediante cartuchos tipo SEP–PAK de silicagel, 500 mg, 6 ml (LIDA 2092–25).

— Filtros de 4 mm de diámetro y 0,2 µm de tamaño de poro (LIDA 9502–06).

— Cromatógrafo líquido Hewlett–Packard mod. 1050 equipado con detector de índice de refracción mod. 1047 A y registrador integrador mod. 3396 Serie II. Columna de fase reversa LiCrospher 100 RP–18, 5 µm tamaño de partícula 250x4 mm (MERCK 50983). Columna de fase reversa Superspher 100 RP–18, 4µm tamaño de partícula, 250x4 mm (MERCK 16056). Las columnas van dotadas de una precolumna Licrocart 4–4 (MERCK 50957).

— Cromatógrafo de gases Hewlett–Packard mod. 5890 serie II equipado con detector de ionización de llama y con registrador integrador mod. 3396 A.

a) Análisis de esteroides mediante inyección en split, integrador HP-3396 A, columna de sílice fundida SE-54 de 30 m x 0,32 mm y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase (SUPELCO 2-4127).

b) Análisis de isómeros trans de los ácidos grasos mediante inyección en split, integrador HP 3390 A y columna de sílice fundida SP-2380, 60m x 0,25 mm y 0,20  $\mu\text{m}$  de espesor de fase (SUPELCO 2-4111). También se utilizó una columna de sílice fundida BPX-70 de 50 m x 0,25 mm (SGE 50QC2).

c) Análisis de ceras mediante inyección on column en frío, registrador integrador HP 3396 A y columna de sílice fundida SPB-5, 15 m x 0,32 mm y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase (SUPELCO 2- 4101).

### 2.3. Métodos

Entre los métodos oficiales de análisis de la UE para los aceites de oliva y de orujo de oliva se han estudiado los siguientes:

-Esteroides. Obtención del insaponificable, separación de la fracción esteróica por CCF y análisis por cromatografía gas-líquido de alta resolución (Reglamento CEE nº 2568/91 anexo V).

-Trilinoleína. Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) con detector de índice de refracción (Reglamento CEE nº 2568/91 anexo VIII).

-Isómeros trans de ácidos grasos. Análisis por cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos (Reglamento CEE nº 1429/92).

-Ceras. Separación de la fracción de ceras por cromatografía en columna de silicagel y análisis por cromatografía gas-líquido de alta resolución (Reglamento CEE nº 183/93).

Otros métodos aplicados han sido:

-Para la purificación de aceites de orujo de oliva en la determinación de trilinoleína se ha empleado el paso a través de columnas de alúmina (método de purificación empleado para la determinación de ácidos grasos situados en la posición 2 de los triglicéridos. Reglamento 2568/91, anexo VII, punto 6.2), de columnas tipo SEP-PAK de sílice (Reglamento 1996/92) y de columnas de silicagel (IUPAC 1987 a).

-La preparación de ésteres metílicos de los ácidos grasos trans se ha realizado por cuatro procedimientos:

Calentamiento con metilato sódico según se describe en el Reglamento 2568/91, anexo X "B", método B.

Modificación del procedimiento anterior utilizando mayor proporción metanol/aceite. Una mezcla de 0,2 g de aceite, 5 ml de metanol y 1 ml de una disolución al 0,5% de sodio en metanol se calienta a 85-90°C en tubo cerrado durante 2 horas. Una vez enfriada la disolución se inyecta 1  $\mu\text{l}$  en el cromatógrafo.

Tratamiento en frío con potasa alcohólica según el procedimiento indicado para ácidos grasos de cadena corta (Norma UNE 55 118 79). Se disuelven 0,1 g de

aceite en 3 ml de hexano, se añaden 0,4 ml de disolución 2N de potasa metanólica se agita durante 20 segundos y se deja decantar, una vez clarificada la fase superior se inyecta 1  $\mu\text{l}$  en el cromatógrafo de gases.

Metanólisis alcalina seguida de esterificación en medio ácido (IUPAC 1987 b, párrafo 4).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Determinación de esteroides

El método para la determinación de esteroides está puesto en práctica desde hace muchos años utilizándose

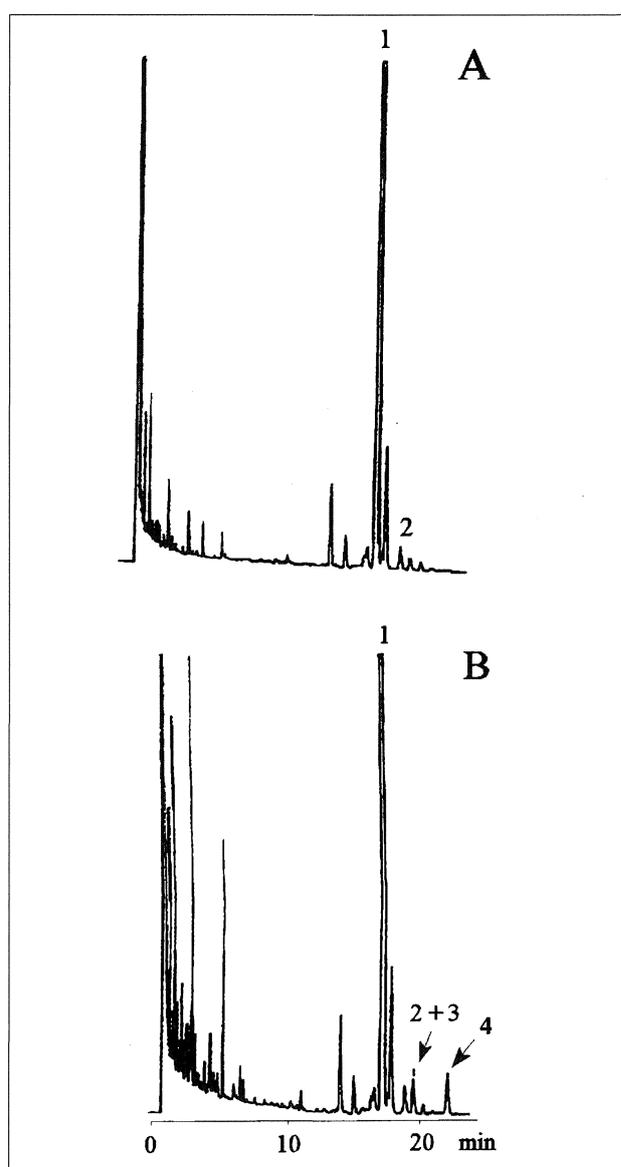


Figura 1

Cromatogramas de gases de la fracción esteróica obtenida depositando diversas cantidades de insaponificable de un aceite de oliva. A.- 200  $\mu\text{l}$  de solución clorofórmica al 5%. B.- 300  $\mu\text{l}$ . 1.-  $\beta$ -sitosterol; 2.-  $\Delta^7$ -estigmastero; 3.- cicloartenol; 4.- 24-metilcicloartanol.

columnas de relleno para el análisis por cromatografía de gases. En el nuevo reglamento esta cromatografía se lleva a cabo con columnas capilares, obteniéndose una mayor resolución, pero dando lugar a problemas en la determinación de los componentes presentes en baja concentración. Estas dificultades derivan de una imperfecta separación de la fracción de esteroides en la cromatografía de capa fina sobre gel de sílice, motivada por varias causas que atribuimos a un exceso de insaponificable depositado en la capa fina, desarrollo inadecuado de la placa y raspado imperfecto de la banda de esteroides.

El reglamento indica que deben depositarse 300  $\mu$ l de una disolución del insaponificable en cloroformo al 5%. Con estas cantidades, si el contenido en alcoholes triterpénicos es elevado, suele ocurrir una incompleta separación entre estos compuestos y los esteroides dando lugar a que pequeñas cantidades de cicloartenol y 24-metilencicloartanol queden al mismo  $R_f$  de los esteroides. Al efectuar el análisis por cromatografía de gases de la fracción de esteroides, el cicloartenol se solapa con el  $\Delta^7$ -estigmastenol, y el 24-metilencicloartanol da un pico a un tiempo de retención de 1,27 relativo al  $\beta$ -sitosterol (Figura 1B). Por tanto cuando en el registro cromatográfico de una fracción de esteroides aparece un pico a tiempo de retención relativo de 1,27, es probable que el valor de  $\Delta^7$ -estigmastenol se vea incrementado por el cicloartenol, dando lugar a errores por exceso. Por tanto, dado que la cromatografía gaseosa de alta resolución es en este caso suficientemente sensible, se recomienda depositar sobre la capa fina solamente unos 200  $\mu$ l de la disolución del insaponificable y de esta manera se elimina la interferencia (Figura 1A).

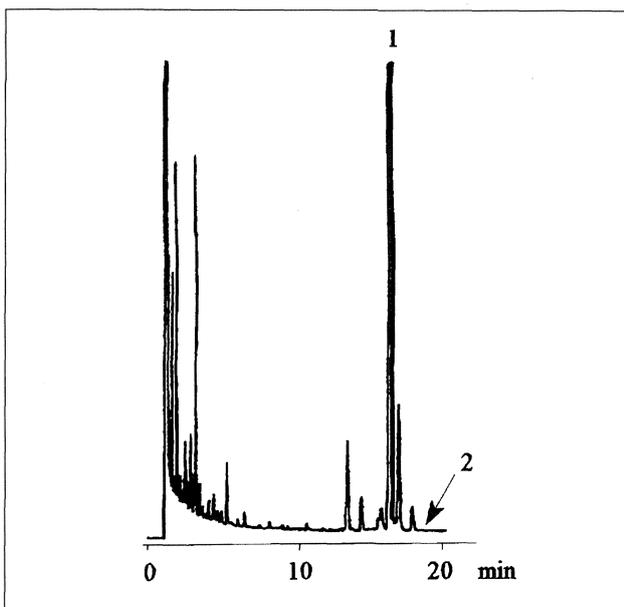


Figura 2

Cromatograma de gases de la fracción esteróica de un aceite de oliva en el que se aprecia la pérdida de los  $\Delta^7$ -esteroides por raspado incorrecto de la banda de esteroides en la placa de CCF. 1.-  $\beta$ -sitosterol; 2.-  $\Delta^7$ -estigmastenol.

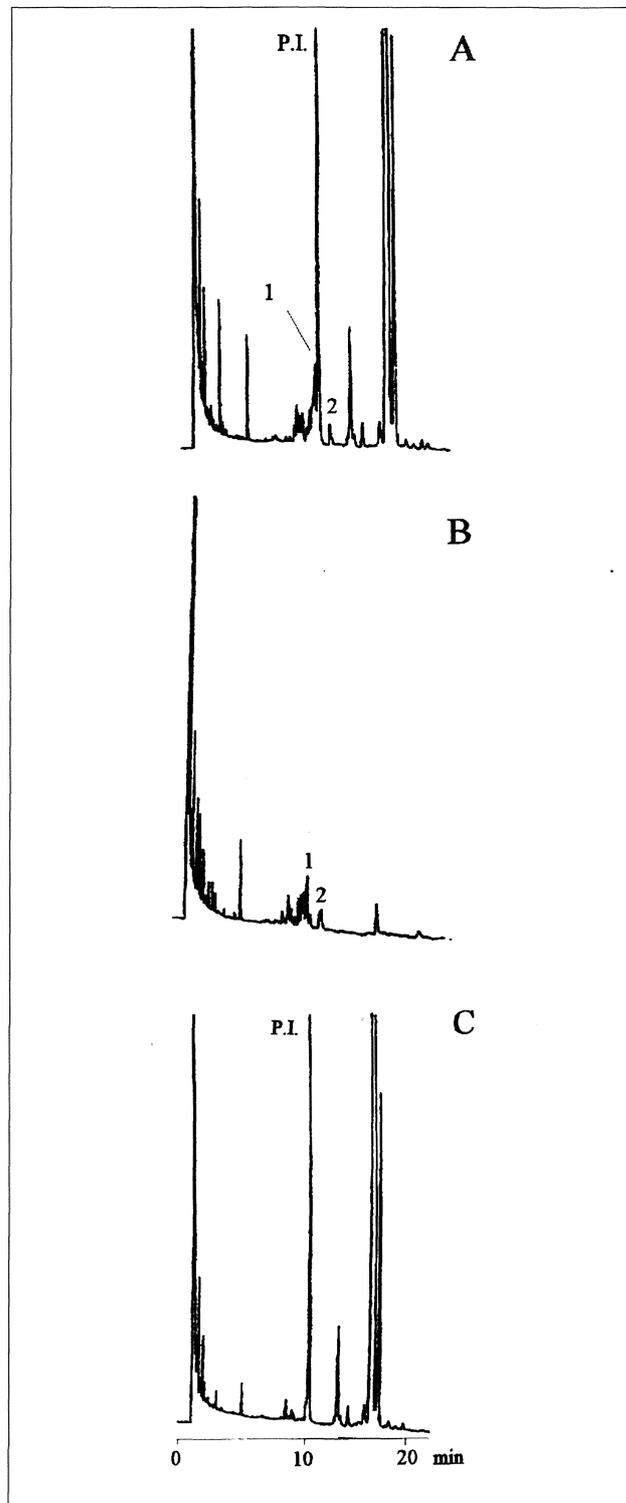


Figura 3

Cromatogramas de gases de las fracciones esteróicas de un aceite de oliva obtenidas raspando de modo diferente en la placa de CCF. A.- esteroides y dialcoholes triterpénicos. B.- zona comprendida entre esteroides y dialcoholes triterpénicos. C.- únicamente banda de esteroides. P.I. Patrón interno; 1.- interferencias en la zona del colesterol; 2.- interferencia en la zona del brasicasterol.

En el método oficial se indican como posibles fases móviles para la CCF benceno-acetona 95:5 (v/v) o hexano-éter etílico 65:35 (v/v), aplicando en ambos casos un solo desarrollo. Nuestra experiencia nos ha demostrado que para el caso de la mezcla hexano-éter etílico es necesario someter la placa a dos desarrollos para obtener una separación satisfactoria.

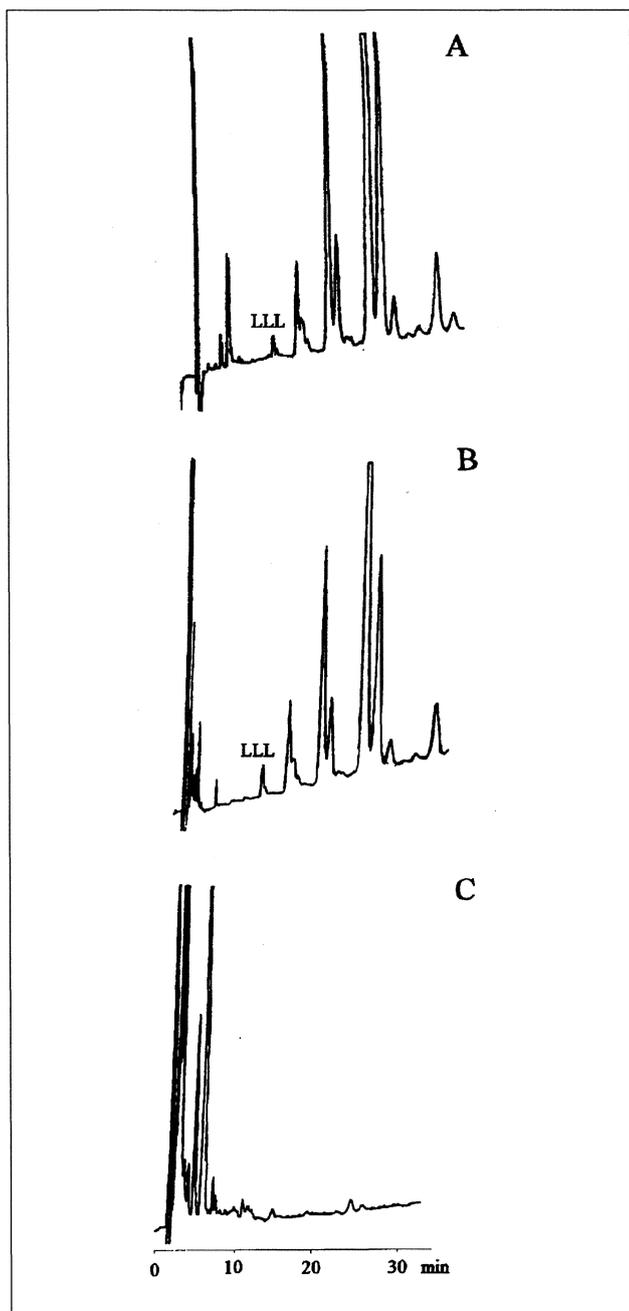


Figura 4

Cromatogramas de CLAE de triacilglicérols de un aceite de orujo, utilizando columna C-18 de 4  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y flujo de 1,15 ml/min de acetona-acetonitrilo 50:50. A.- Aceite sin purificación previa. B.- aceite purificado por paso a través de una columna de silicagel. C.- fracción polar retenida en la silicagel.

Se ha comprobado que los  $\Delta^7$ -esteroles presentan en la CCF un  $R_f$  ligeramente menor que los  $R_f$  del resto de los esteroides. En consecuencia si se raspa la banda de esteroides ciñéndose excesivamente a su borde inferior, pueden perderse cantidades importantes de estos esteroides (Figura 2). Si se raspan esteroides y eritrodol conjuntamente, en algunos casos aparecen picos extraños en la zona del colesterol y brasicasterol (Figura 3A). Los compuestos responsables de estos picos anómalos se encuentran en la placa de CCF en la zona de los dialcoholes triterpénicos (Figura 3B) y por tanto se recomienda que para el análisis de la fracción de esteroides se raspe únicamente esta banda, llegando por la parte inferior hasta el punto medio de separación entre ella y la del eritrodol (Figura 3C).

### 3.2. Determinación de trilinoleína (LLL)

En una modificación del reglamento (Reglamento CEE nº 1996/92) se indica que para los aceites de orujo crudo la muestra debe purificarse por cromatografía en columna de alúmina o a través de SEP-PAK de sílice, con objeto de eliminar compuestos oxidados que interfieren en la determinación de la trilinoleína (LLL). Utilizando ambos procedimientos es posible la retención selectiva de triacilglicérols según su polaridad y por tanto hay que proceder a una comprobación de la composición en ácidos grasos del aceite tras su purificación, por lo que el procedimiento es largo, tedioso y puede estar afectado de error. Se ha comprobado que la técnica descrita para el análisis de componentes polares en aceites (IUPAC 1987 a) es muy adecuada para efectuar la purificación. Por tanto el paso del aceite a través de una columna de silicagel, eluyendo con hexano-éter etílico 87:13 (v/v), nos permite obtener los triacilglicérols purificados. La posterior elución de la columna con éter etílico conduce al aislamiento de la fracción polar donde aparecen los compuestos que interfieren (Figura 4).

En el caso de análisis de aceites de orujo crudo es conveniente que una vez disuelta la muestra en acetona se pase a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro al objeto de eliminar posibles precipitados que pueden disminuir la vida útil de la columna cromatográfica.

Las condiciones operativas de la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) en fase inversa recomendadas en el método oficial son un flujo de 1,5 ml/min de una fase móvil acetona-acetonitrilo en proporciones que se deben ajustar hasta obtener una buena separación. Nuestra experiencia es que la mejor resolución para los picos de número de carbono equivalente (NCE) 42, donde se encuentra la LLL, se obtiene utilizando un flujo de 1,15 ml/min de la fase acetona-acetonitrilo 50:50 (V/V) (Figura 5A).

Recientemente han aparecido columnas para CLAE, rellenas con partículas de menor tamaño con las que se logra mayor resolución cromatográfica. La aplicación de columnas de RP-18 de 4mm de diámetro interno y 4 $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula al análisis de los triacilglicérols, da lugar a una mejor separación entre los componentes de NCE 42 (Figura 5B).

Se ha ensayado como fase móvil la mezcla acetonitrilo-diclorometano (Graciani y Delgado 1987) en distintas proporciones, obteniéndose los mejores resultados con la relación 75:25 a un flujo de 0.9 ml/min.

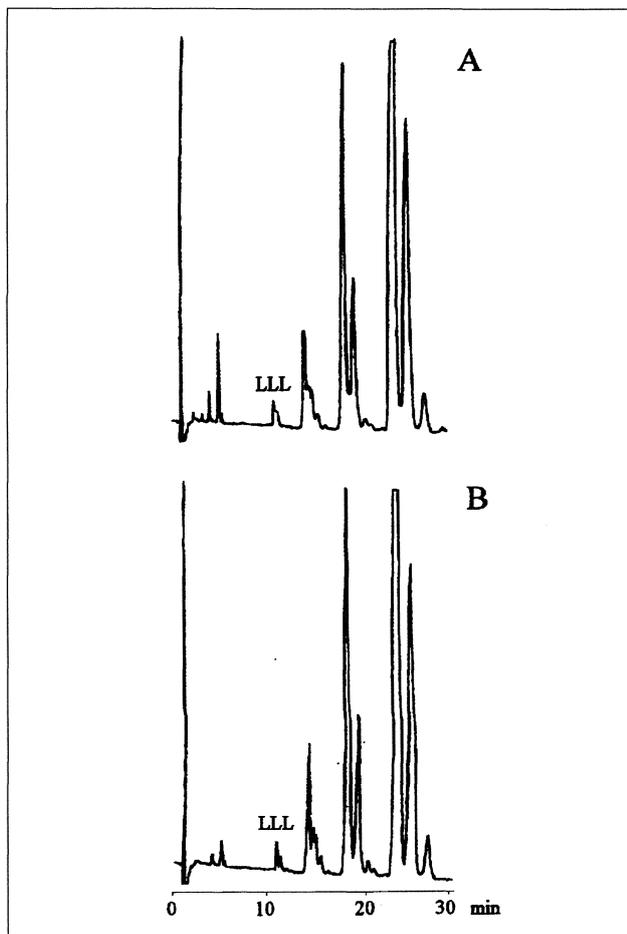


Figura 5

Cromatogramas de CLAE de triacilglicérols de un aceite de oliva obtenidos con flujo de 1,15 ml/min de acetona-acetonitrilo 50:50 sobre columnas de C-18 de distinto tamaño de partículas. A.- 5 µm y B.- 4µm.

(Figura 6). Puede observarse que, aunque en estas condiciones mejora la resolución de los picos que forman parte de los triacilglicérols NCE 44 y NCE 46, la separación de los componentes de NCE 42 es similar a la conseguida con la fase móvil acetona-acetonitrilo 50:50 (v/v) a un flujo de 1,15 ml/min (Figura 5B).

Teniendo en cuenta que la separación cromatográfica entre algunos triglicéridos es incompleta, se aconseja utilizar el modo de integración base-base con objeto de reducir al mínimo el error en la integración.

### 3.3. Determinación de isómeros trans de los ácidos grasos.

En la modificación del reglamento donde se introduce el método de determinación de los isómeros trans de los ácidos grasos (Reglamento CEE 1429/92) se indica que para la preparación de los correspondientes ésteres metílicos debe utilizarse el procedimiento B incluido en el anexo X "B" del reglamento 2568/91. Dicho método consiste en tratar 2 g de aceite con una cantidad muy pequeña de metilato sódico (0,4 ml) en un tubo cerrado a 90°C. En nuestra experiencia al cabo de dos horas de

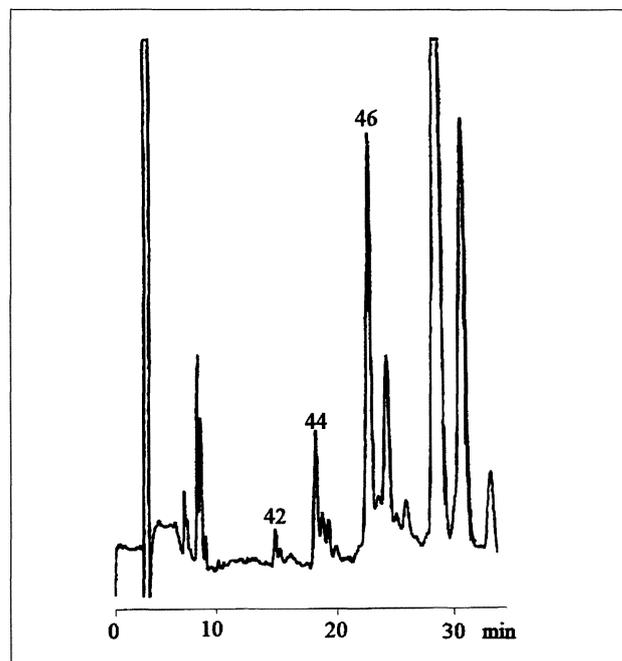


Figura 6

Cromatograma de CLAE de triacilglicérols de un aceite de oliva obtenido con flujo de 0,9 ml/min. de acetonitrilo-diclorometano 75:25 sobre columna de C-18 con tamaño de partículas de 4 µm.

calentamiento y de agitación eventual, todavía permanecen cantidades importantes de triacilglicérols inalterados, por lo que dicho procedimiento no es utilizable. Por tanto, para la obtención de ésteres metílicos se ensayaron otros tres métodos: a) metanólisis alcalina seguida de esterificación en medio ácido; b) método del metilato sódico, modificado incrementando la relación metanol/aceite y c) metilación en frío con potasa metanólica.

**Tabla I. Valores de isómeros trans obtenidos por cromatografía de gases de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de un aceite de oliva virgen preparados por tres procedimientos e inyectando cada muestra a dos temperaturas de inyector.**

**Método a: metanólisis alcalina seguida de esterificación en medio ácido. Método b: metilación en caliente con metilato sódico. Método c: metilación en frío con potasa metanólica**

	Método a		Método b		Método c	
Temperatura inyector (°C)	200	300	200	300	200	300
C18:1t (%)	0,026	0,042	0,017	0,030	0,016	0,024
C18:2ct (%)	0,012	0,090	0,012	0,013	0,015	0,013

Así mismo, ante la posibilidad de que hubiera isomerización de los ácidos grasos *cis* en el inyector cromatográfico, se ensayaron diferentes temperaturas de inyección. Los resultados del análisis de un aceite de oliva virgen con bajo contenido en isómeros *trans* (Tabla I) muestran que los métodos b y c dan resultados similares mientras que el método a da resultados ligeramente mayores de ácido eláidico (C-18:1t) lo cual está de acuerdo con un favorecimiento de la isomerización en medio ácido. Por otra parte se observa un aumento notable de ácido eláidico al aumentar la temperatura de inyección.

También hemos observado que al cabo de un elevado número de inyecciones se produce un incremento de los valores de ácido eláidico como consecuencia de la acción catalítica de la suciedad acumulada en el inyector. Por el contrario, la limpieza del inyector conduce a un descenso de los valores de dicho ácido.

En consecuencia se recomienda la metilación por el método de la potasa alcohólica, temperatura de inyección cromatográfica no mayor de 250°C y control de la limpieza del inyector mediante la inyección de un aceite de oliva virgen previamente contrastado.

Con respecto al análisis por cromatografía de gases el método indica que la cantidad de muestra inyectada debe ser tal que de lugar a un pico del ácido araquídico (C20:0)

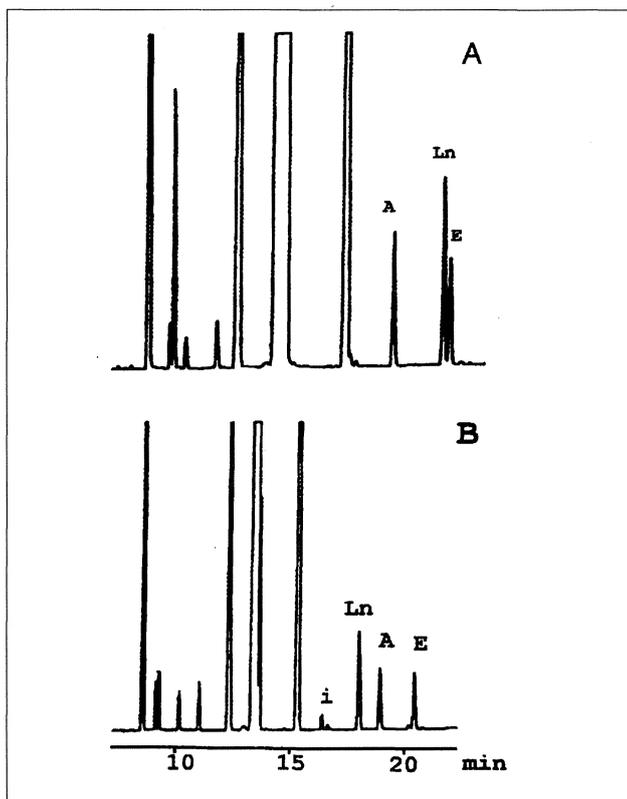


Figura 7

Cromatogramas de gases de los ésteres metílicos de un aceite de oliva virgen en columnas de diferente polaridad. A.- Columna SP-2380 (0,25 mm dia. int. por 60 m de longitud) con 0,25  $\mu$ m de espesor de fase. B.- Columna BPX-70 (0,25 mm dia. int. por 50 m de longitud). Ln = ácido linoico; A = ácido araquídico; E = ácido eicosenoico; i = interferencias en la zona de los ácidos *trans*-linoicóicos.

que suponga más del 20% del fondo de escala. La amplitud de este pico no debe sobrepasar el 50% del fondo de escala ya que se ha comprobado que puede haber solapamiento entre los picos correspondientes a los ácidos eláidico y oleico.

La columna a utilizar en el análisis por cromatografía de gases debe dar un perfil cromatográfico similar al presentado en la figura 2 del método (Reglamento CEE nº 1429/92), es decir con el ácido linoleico a tiempo ligeramente inferior al eicosenoico (Figura 7A). El uso de columnas de menor polaridad da lugar a la aparición de picos que interfieren en la determinación de los ácidos *trans*-linoicóicos (Figura 7B).

### 3.4. Determinación de ceras

Para la separación de las ceras mediante cromatografía en columna de silicagel, el método indicado en el Reglamento 183/93 recomienda preparar la columna con hexano, utilizar como fase móvil hexano-éter etílico 99:1 (v/v) y eluir a un ritmo de 2,1 ml/min. En estas condiciones hay que recoger más de 140 ml de eluido invirtiéndose más de una hora. Preparando la columna con la misma mezcla de elución y utilizando como fase móvil hexano-éter etílico 98,5:1,5 (v/v) a un flujo de elución de 4 ml/min, las ceras se recogen en 140 ml de eluido en un tiempo de 35 minutos.

Si en las condiciones de trabajo, la elución de las ceras en la columna de silicagel no es completa, pueden resultar errores por exceso, ya que el patrón interno (araquidato de laurilo) es el componente más polar de esta fracción y queda preferentemente retenido en columna. Para confirmar que la elución de las ceras ha sido completa, sería necesario eluir 50 ml adicionales y comprobar que dicha fracción está exenta de ceras,

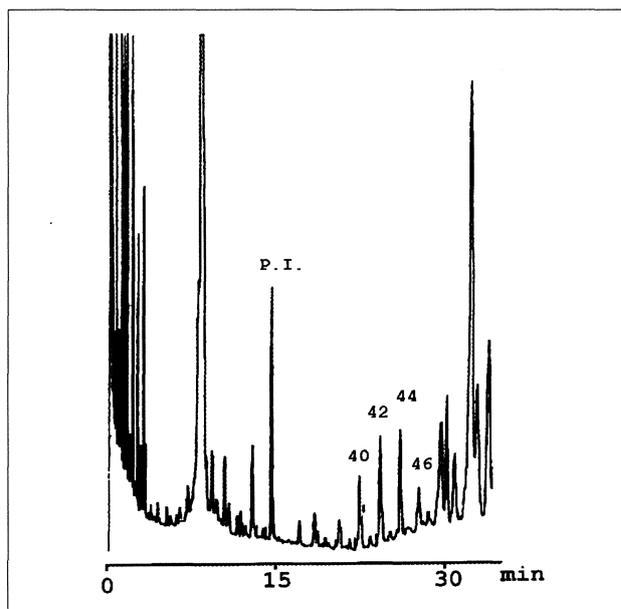


Figura 8

Cromatogramas de gases de las ceras de un aceite de oliva en el que se aprecia el desdoblamiento del pico correspondiente a las ceras de cuarenta átomos de carbono.

corriendo el riesgo de eluir triacilglicerolos. Una alternativa a este procedimiento consiste en añadir a la muestra de aceite 2 gotas de una solución de Sudán I al 1% preparada con el líquido de elución (De la Osa, 1993). Este colorante presenta un  $R_f$  comprendido entre el de las ceras y el de los triacilglicerolos lo que permite visualizar la completa elución de las ceras pues se recoge todo el eluido hasta que la banda coloreada alcanza la parte inferior de la columna de silicagel.

Hay que tener presente que en el análisis por cromatografía de gases los picos correspondientes a las ceras suelen estar formados por más de un compuesto con el mismo número de átomos de carbono y en algunos casos especialmente las ceras C40 y C42 pueden desdoblarse en dos picos (Figura 8). Si esto ocurre deben sumarse las áreas correspondientes. Para evitar este efecto se puede acortar la longitud de la columna o bien aumentar el flujo de gas portador.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo quieren hacer constar su más sincero agradecimiento a Dña. Ana Bernal, D. Carlos de la Osa, Dña. Antonia Escobar, D. Juan Herrera, Dña. M<sup>a</sup> Fernanda Leone, y Dña. Ana M<sup>a</sup> Suarez por la realización de la parte experimental y a la CICYT por la financiación del proyecto ALI-91-0492.

#### BIBLIOGRAFÍA

- De la Osa C. (1993).- Comunicación personal.- Instituto de la Grasa, Sevilla.
- Graciani Constante E., Delgado Noriega M<sup>a</sup> L. (1987).- "Caracterización del aceite de oliva virgen español. Estudio de las variables que intervienen en la separación de sus triacilglicerolos por cromatografía líquida de alta eficacia".- *Grasas y Aceites* **38**, 286-293.
- IUPAC (1987 a).- "2.507 Determination of polar compounds in frying fats" en "Standard Methods for the Analysis of Oil, Fats and Derivatives".- 7th edition, p. 216-219, Blackwell, Oxford.
- IUPAC (1987 b).- "2.301 Preparation of the fatty acid methyl esters" en "Standard Methods for the Analysis of Oil, Fats and Derivatives".- 7th edition, p. 123-129, Blackwell, Oxford.
- Reglamento de la Comisión CEE nº 2568/91 de 11 de julio de 1991 "Sobre las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis". D.O.C.E. **L 248**, 5 septiembre 1991, 1-83.
- Reglamento de la Comisión CEE nº 1429/92 de 26 de mayo de 1992 "Por el que se modifica el Reglamento CEE nº 2568/91". D.O.C.E. **L 150**, 2 junio 1992, 17-20.
- Reglamento de la Comisión CEE nº 1996/92 de 15 de julio de 1992 "Por el que se modifica el Reglamento CEE nº 2568/91". D.O.C.E. **L 199**, 18 julio 1992, 18-19.
- Reglamento de la Comisión CEE nº 183/93 de 29 de Enero de 1993 "Por el que se modifica el Reglamento CEE nº 2568/91". D.O.C.E. **L 22**, 30 Enero 1993, 58-68.

(Recibido: Mayo 1994)