



Determinación de aceites minerales en aceite de oliva mediante extracción en fase sólida en combinación con cromatografía de gases–detector de ionización de la llama

Determination of mineral oils in olive oil by solid-phase extraction combined with gas chromatography–flame ionization detector

María del Mar Rovira Cruz
Curso académico 2018/2019
Fecha: Junio 2019

Tutores:
Dr. José Luis Martínez Vidal
Dr. Francisco Javier Arrebola Liébanas
Departamento de Química y Física

Determinación de aceites minerales en aceite de oliva mediante extracción en fase sólida en combinación con cromatografía de gases-detector de ionización de la llama

Memoria del Trabajo Fin de Grado en Química presentada por

María del Mar Rovira Cruz

Almería, 26 de junio de 2019

Fdo: María del Mar Rovira Cruz

Fdo: José Luis Martínez Vidal

Fdo: Francisco Javier Arrebola Liébanas

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mi familia y amigos por el apoyo durante todos estos años y estos últimos meses durante la realización de este Trabajo Fin de Grado.

Especial agradecimiento a Dr. Francisco Javier Arrebola y a José Luis Hidalgo, por su dedicación día a día, por el apoyo y la confianza depositada desde el primer día. Y porque a pesar de haber sido negativos muchos de los resultados, siempre ha habido un clima favorable que ha hecho que sigamos adelante con la investigación.

Al Dr. José Luis Martín Vidal, por todos los conocimientos aportados durante la investigación ayudando a que este Trabajo Fin de Grado se hiciese posible.

A todos los que forman parte del grupo de investigación de “Química Analítica de Contaminantes” por hacer que el laboratorio sea casi como una segunda casa, haciendo que este trabajo sea mucho más fácil.

MEMORIA

ÍNDICE

1. RESUMEN	11
2. ABSTRACT	11
3. OBJETIVO	11
4. INTRODUCCIÓN	12
4.1 ACEITES	12
4.1.1 Tipos de aceites	13
4.2 COMPUESTOS DE INTERÉS: MOSH Y MOAH	14
4.2.1 Toxicidad	16
4.2.2 Fuentes de contaminación.....	17
4.2.3 Legislación.....	18
4.3 MÉTODO DE ANÁLISIS MOSH y MOAH	19
4.3.1 Extracción en fase sólida (SPE).....	19
4.3.2 Determinación de MOSH Y MOAH: Cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de llama (GC-FID)	21
4.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	26
5. MÉTODOS EXPERIMENTALES	27
5.1 REACTIVOS Y MATERIAL UTILIZADO	27
5.1.1 Reactivos.....	27
5.1.2 Materiales y equipos.....	29
5.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN	30
5.3 EXTRACCIÓN SPE Y SEPARACIÓN DE MOSH Y MOAH	30
5.4. DETERMINACIÓN DE MOSH Y MOAH POR GC-FID	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	32
6.1.1 Optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación de MOSH y MOAH	32
6.1.2 Optimización del método de extracción	37
6.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO	43
6.3 APLICACIÓN DEL MÉTODO	44
7. CONCLUSIONES	45
8. BIBLIOGRAFÍA	46
9. ACRÓNIMOS	48

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Distintos tipos de MOSH.

Figura 2. Ejemplos de MOAH.

Figura 3. Etapas del proceso de SPE.

Figura 4. Tipos de envase de la fase estacionaria en SPE.

Figura 5. Esquema cromatógrafo de gases.

Figura 6. Esquema general de un inyector de GC.

Figura 7. Esquema de un inyector de tipo “*splitless*”.

Figura 8. Esquema de un inyector de grandes volúmenes.

Figura 9. Esquema FID.

Figura 10. Cromatogramas obtenidos para las distintas temperaturas del inyector para el mix de alcanos. La figura de arriba muestra el C16, la figura central muestra el C26 y la figura de abajo muestra el C38.

Figura 11. Cromatogramas obtenidos para las distintas temperaturas del inyector para el mix de patrones internos en aceite de oliva virgen extra.

Figura 12. Cromatogramas obtenidos para el estudio de la temperatura de la rampa del horno cromatografico para el mix de alcanos (azul, 15 °C/in; rojo, 25 °C/min; verde, 35 °C/min; naranja, 50 °C/min).

Figura 13. Cromatogramas obtenido para MOSH (cromatograma superior) y MOAH (cromatograma inferior) en aceite de oliva virgen extra.

Figura 14. Cromatogramas obtenidos para MOSH y MOAH, respectivamente, en aceite de girasol refinado.

Figura 15. Cromatogramas obtenidos para distintas cantidades de muestra introducidas en el cartucho y cantidad de muestra inyectada. Cromatograma superior, C18 en el análisis de MOSH; cromatograma central, colestano en el análisis de MOSH; cromatograma inferior, cromatograma completo en el análisis de MOAH.

Figura 16. Cromatograma obtenido en el análisis de muestras reales.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los principales ácidos grasos

Tabla 2. Clasificación de los hidrocarburos de origen mineral en función de su estructura química

Tabla 3. Clasificación hidrocarburos altamente refinados de acuerdo a los criterios establecidos por la JECFA

Tabla 4. Análisis de distintos aceites usando un límite de cuantificación del 0,5 mg/kg

Tabla 5. Compuestos presentes en el mix de patrones internos

Tabla 6. Compuestos presentes en el mix de PAH

Tabla 7. Comparación de la sensibilidad para las técnicas de inyección splitless y LVI

Tabla 8. Sensibilidad del método en función de la temperatura del detector FID

Tabla 9. Perfil de elución de colestano y TBB en columnas de 3,4,5 y 6 g de sílica argentada al 1%. Área de pico cromatográfico (mV/s)

Tabla 10. Veracidad (R%) y precisión expresada como intradía e interdía del método analítico para MOSH

Tabla 11. Veracidad (R%) y precisión expresada como intradía e interdía del método analítico para MOAH

Tabla 12. Resultados obtenidos para MOSH y MOAH totales en muestras de aceite de oliva virgen extra reales

Tabla 13. Resultados obtenidos en el análisis intercomparativo de MOSH en diferentes tipos de muestras de aceite de oliva

1.RESUMEN

En el presente trabajo fin de grado se ha desarrollado y validado un método de análisis para la determinación de las fracciones de hidrocarburos saturados (MOSH, *Mineral Oil Saturated Hydrocarbons*) y aromáticos (MOAH, *Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons*) de aceites minerales (MOH, *Mineral Oil Hydrocarbons*) que puedan estar presentes como contaminantes en aceite de oliva. Para su separación de la matriz de la muestra se ha utilizado extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) y se han determinado mediante cromatografía de gases con detector de ionización de la llama (GC-FID, *Gas Chromatography - Flame Ionization Detector*). El método ha sido validado con valores de recuperación promedio del 95,6% para MOSH y del 87,0% para MOAH. El método ha sido aplicado al análisis de muestras reales.

Palabras clave: *MOSH, MOAH, aceite de oliva, SPE, GC/FID*

2.ABSTRACT

In this final project an analytical method has been developed and validated for determining the fraction of saturated hydrocarbons (MOSH, *Mineral Oil Saturated Hydrocarbons*) and aromatic hydrocarbons (MOAH, *Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons*) in mineral oils (MOH, *Mineral Oil Hydrocarbons*) that could be present as contaminants in olive oil. For its separation it has been applied Solid Phase Extraction (SPE) and they have been determined using Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID). The method has been validated with average values of recovery of 95,6% for MOSH and values of recovery of 87,0% for MOAH. The method has been applied to the analysis of real samples.

Keywords: *MOSH, MOAH, olive oil, SPE, GC/FID*

3.OBJETIVO

El principal objetivo de este Trabajo Fin de Grado es el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de aceites minerales en aceites de oliva utilizando la técnica analítica de cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos.

Dado que los aceites minerales se pueden subclasificar atendiendo a si son saturados o aromáticos y deben ser determinados separadamente, la metodología analítica que se desarrolle debe ser capaz de separar y purificar dichos compuestos de la matriz objeto de estudio y diferenciarlos entre si. Por ello, se ha incluido en los objetivos de este trabajo la aplicación de los conocimientos adquiridos en extracción en fase sólida y mejorar las habilidades en purificación y separación en muestras complejas.

A fin de conseguir el objetivo principal planteado, se pretende también llevar a cabo las siguientes actividades:

- Optimizar las variables del método instrumental para la determinación mediante GC-FID y con ello mejorar mis competencias en uso de técnicas instrumentales cromatográficas.
- Optimizar un método de extracción llevado a cabo mediante SPE que fuera capaz de separar y purificar en fracciones diferentes los MOSH y MOAH y con ello mejorar mis competencias en el tratamiento de muestras complejas como son los aceites, los procesos de extracción y si fuera necesario de purificación y concentración.
- Validación del método mediante el cálculo de parámetro analíticos como son la veracidad (expresada como recuperación), precisión y límites de cuantificación y con ello mejorar mis competencias en cualimetría en Química Analítica.
- Aplicación del método al análisis de muestras reales y verificar la aplicabilidad del método analítico que se desarrolle.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 ACEITES

El aceite es la fuente de grasa vegetal más saludable a la que podemos acceder. Aunque hoy en día el término grasa reciba a veces una connotación negativa en la sociedad, llegando incluso a plantearse hace unos años que no cumplía ninguna función en el organismo. La grasa es imprescindible para la vida, ya que ayuda a satisfacer las demandas de energía. Si bien se pueden clasificar desde diversos puntos de vista, con frecuencia se considera que existen dos tipos de grasas, la grasa de origen vegetal y la grasa de origen animal, siendo la de origen vegetal aquella más saludable para el organismo. El exceso de este nutriente puede desencadenar problemas energéticos que favorezcan la aparición de sobrepeso y otros problemas tales como diversas enfermedades cardiovasculares.

La longitud de la cadena de los ácidos grasos, junto al grado de insaturación (número de dobles enlaces presentes en la molécula), determinan las propiedades físico-químicas y los efectos metabólicos de las grasas. En función del número de insaturaciones, existen tres clases básicas de ácidos grasos, saturados, monoinsaturados y poliinsaturados sobre los que se informa en la **Tabla 1**.¹

Tabla 1. Clasificación de los principales ácidos grasos.

Familias		Ácido graso principal	Fuentes
Saturados (Carecen de dobles enlaces)		Palmítico C16 Estearico C18	Grasa animal y de algún vegetal, como coco...
Monoinsaturados (Contienen un único doble enlace)		Oleico C18	Grasa animal y vegetal, aceite de oliva.
Poliinsaturado	n-6	Linoleico C18:2*	Aceite de maíz, girasol
	n-3	Eicosapentaenoico, EPA. C20:5*	Pescados y aceites marinos

-C indica número de átomos de Carbono y n la localización del primer doble enlace a partir del grupo metilo-terminal.

* Número de insaturaciones en la molécula

Los aceites minerales son productos obtenidos de la destilación del petróleo y están formados mayormente por hidrocarburos.² Existe gran cantidad de usos de estos, como aditivos alimentarios, en medicina, etc. Los hidrocarburos pueden formarse de manera natural por la acción de bacterias, hongos... pero también pueden aparecer en el procesado de algunos alimentos, como ocurre en el refinado de aceites. El resultado es que los alimentos que ingerimos diariamente pueden contener hidrocarburos de este tipo porque contengan algunos de ellos de manera natural o que su presencia se deba a aditivos, ya sea de manera indirecta, debido a contaminación ambiental, o durante el proceso de manipulación del alimento.

Los aceites minerales se encuentran formados en su mayoría por hidrocarburos. Existen tres tipos principales de hidrocarburos en aceites minerales. **Tabla 2.**

Tabla 2. Clasificación de los hidrocarburos de origen mineral en función de su estructura química.

Tipos	Estructura	Ejemplos
Parafinas	Alcanos lineales y ramificados	Octano
Naftenos	Cicloalcanos con sustituyentes alquílicos	Ciclohexano, 1,1-dimetilciclopentano...
Aromáticos	Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH)	Naftaleno,antraceno...

Algunos tipos de aceites comestible, antes de ser ofrecidos al consumidor, sufren un proceso conocido como refinado. El refinado del aceite de oliva consiste en la eliminación mediante procesos químicos y físicos de los olores y sabores desagradables de un aceite de oliva virgen de baja calidad, así como de la rectificación de la acidez.³

4.1.1 Tipos de aceites

El aceite de oliva es un producto muy versátil, es por ello que existen distintos tipos de aceites de oliva dependiendo de los procesos que se llevan a cabo una vez es obtenido a partir del fruto del olivo.

A. Aceites de oliva vírgenes.

Aceites obtenidos a partir del fruto del olivo por procedimiento mecánicos o físicos, que no alteren al aceite, y sin sufrir tratamiento alguno distinto del lavado, decantación, centrifugado. Se excluye así a los aceites obtenidos mediante disolvente, o por procedimiento de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza. Podemos clasificarlos en:

- **Aceite de oliva virgen extra:** aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresa en ácido oleico, como máximo de 0,8 g/100 g.
- **Aceite de oliva virgen:** aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresa en ácido oleico, como máximo 2 g/100 g.

- **Aceite de oliva lampante:** aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, superior a 2 g/100 g.
- B. Aceite de oliva refinado
Aceite de oliva obtenido mediante el refinado de aceites de oliva vírgenes, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no es superior al 0,3 g/100 g.
- C. Aceite de oliva
Aceite de oliva formado por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del aceite lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no será superior a 1 g/100 g.
- D. Aceite de orujo de oliva crudo
Aceite obtenido a partir del orujo de oliva mediante tratamiento con disolvente o por medios físicos, pudiendo coincidir con un aceite de oliva lampante a excepción de algunas características determinadas.
- E. Aceite de orujo de oliva refinado
Aceite obtenido mediante refinado de aceite de orujo de oliva crudo, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no puede ser superior a 0,3 g/100 g.
- F. Aceite de orujo de oliva
Aceite formado por una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos al lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no puede ser superior a 1 g/100 g.⁴

4.2 COMPUESTOS DE INTERÉS: MOSH Y MOAH

Los MOH forman un grupo amplio de compuestos y normalmente suelen estar presentes en forma de una mezcla de muchos hidrocarburos con diferentes estructuras y tamaños distintos. Son derivados principalmente del petróleo crudo pero también pueden ser sintetizados a partir de carbón, gas natural y biomasa. La composición química de la mayoría es desconocida. Es por ello que no se clasifican en función de su identidad química sino de sus propiedades físico-químicas. Esto da como resultado productos de composición muy distinta, pero con propiedades técnicas similares.⁵ En 1995, la JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) clasificó los MOH de alto refinado en los aceites minerales de alta viscosidad y los diferenció en tres clases: media viscosidad, baja viscosidad y ceras. Esta clasificación se basa en su masa molecular media, viscosidad y número de carbonos al 5% de su punto de destilación. En la **Tabla 3** se muestra dicha clasificación en función a sus principales propiedades:

Tabla 3. Clasificación de hidrocarburos altamente refinados de acuerdo a los criterios establecidos por la JECFA.⁶

Nombre	Clase	Masa molecular media (g/mol)	Viscosidad (nm ² /s)	Número de carbonos al 5% p.destilación
Aceite mineral, media y baja viscosidad	I	480-500	8,5-11	≥25
	II	400-480	7.9-8,5	≥22
	III	300-400	3.0-7-0	≥17
Aceite mineral, alta viscosidad		≥500	≥11	≥28
Ceras		≥500	≥11	≥25

Los MOH aparecen en los alimentos como consecuencia de la contaminación ambiental o bien por la contaminación con lubricantes de maquinaria empleada durante la recolección, molturado o empaquetamiento.

Las **Figuras 1 y 2** muestran algunos de los diferentes MOSH y MOAH que se pueden encontrar en una muestra de aceite de oliva como contaminantes.

Como antes se ha expresado, los MOSH comprenden los hidrocarburos de cadena abierta, parafinas, hidrocarburos cíclicos y naftenos. Las parafinas se distinguen de los naftenos en que se pueden agrupar en *n*-alcanos lineales, aquellos con más de 20 átomos de carbonos se encuentran formando ceras, y los hidrocarburos ramificados, que pueden ser líquidos. En cambio, los naftenos, contienen al menos un anillo saturado, son altamente alquilados y se originan a partir de aceite mineral o a partir de la hidrogenación de compuestos aromáticos.⁷

Los MOSH se acumulan en tejidos, nódulos linfáticos, bazo e incluso pueden generar micro granulomas.⁸ Su modo de acumularse se debe a su estructura y masa molecular.

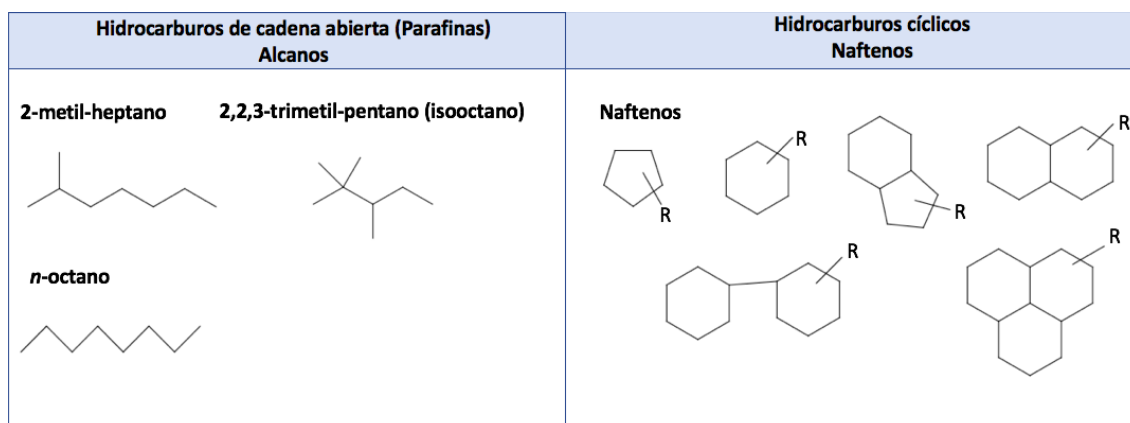


Figura 1. Distintos tipos de MOSH.

Los MOAH son compuestos aromáticos, contienen al menos un anillo aromático, incluyendo los compuestos poliaromáticos, pero hay que diferenciarlos de los

hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*), siendo el más conocido el benzo(a)pireno, los cuales se forman a elevadas temperaturas. Entre las diferencias que se pueden establecer entre ellos, los PAH suelen estar solamente alquilados ligeramente mientras que, los MOAH están alquilados casi el 100% de ellos.⁵ Consisten en un amplio número de compuestos y generan amplias señales cromatograficas, tantas que casi ninguna de sus señales cromatográficas pueden ser separadas correctamente formando una montaña compleja en los cromatogramas.⁷

Además estos compuestos presentan un elevado riesgo ya que pueden incluir compuestos policíclicos cancerígenos y mutágenos.⁶ En las preparaciones técnicas de MOH, el contenido de MOAH suele ser minoritario.⁵

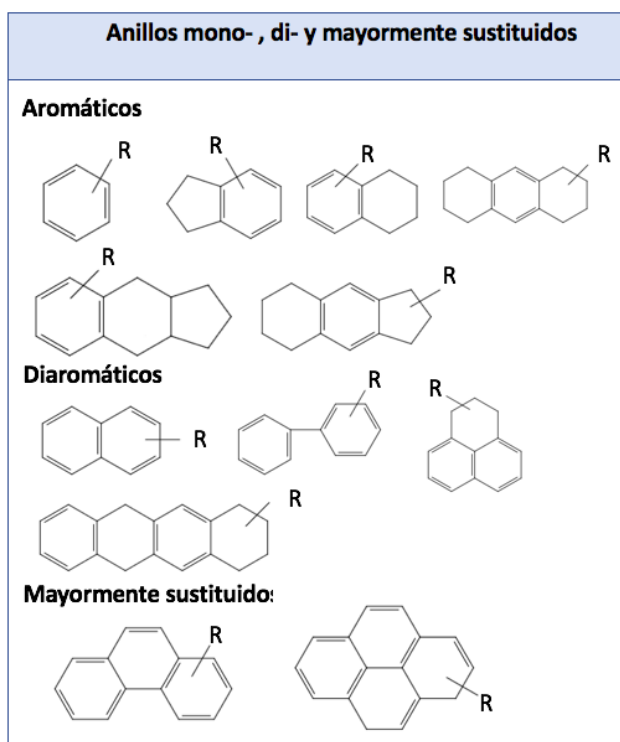


Figura 2. Ejemplos de MOAH.

4.2.1 Toxicidad

La EFSA, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, avisa del potencial riesgo de los MOAH⁵ y que por ello no deben estar presentes en los alimentos. Se ha comprobado que una presencia elevada de MOSH influye en la aparición de MOAH, por lo que también conviene limitarlos.

Los aceites minerales están compuestos de forma general por un 75-85% de MOSH y un 15-25% de MOAH. En el caso de los aceites minerales para uso alimentario el contenido de MOAH desciende por debajo de 3%.

La toxicidad del aceite mineral depende de la distribución de peso molecular de los hidrocarburos y de la presencia de MOAH, que representa la fracción más tóxica. De hecho, los aceites minerales obtenidos a partir de derivados del petróleo, como son por

ejemplo los aceites de motor o aceites hidráulicos, presentan mayor probabilidad de contener MOAH y por ello son clasificados como cancerígenos para los humanos. En 2012, la EFSA expresó que los MOSH pueden acumularse en tejidos y formar micro granulomas y que los MOAH pueden ser mutagenicos y cancerígenos, provocando una preocupación respecto a la cantidad máxima de ingesta de estos. Dado que no se puede definir una dosis segura para compuestos genéticamente tóxicos no hay valores establecidos para su tolerabilidad. Se estimó la exposición de MOSH en el rango de 0,03 a 0,3 mg/kg al día, lo que significa que un adulto de 60 kg puede estar expuesto a 18 mg de MOSH por día, 6,6 g al año,⁹ si bien, el estudio de MOAH es mucho más amplio respecto a su toxicidad. En relación a los PAH, componentes habituales de los MOAH, su estructura química y el tamaño de las partículas sobre las que se adsorben, determinan el proceso de adsorción pulmonar. Estos compuestos incrementan su toxicidad durante el metabolismo a través de las heces y orina, proceso que se ha relacionado con la aparición de cáncer de colon.¹⁰

4.2.2 Fuentes de contaminación

Estos hidrocarburos, MOSH y MOAH, pueden estar presentes en los alimentos a través de diversas fuentes, ya sea por el uso intencionado de aditivos alimentarios, o por contaminación ambiental.

En concreto, las posibles fuentes de contaminación de aceites minerales son:

- Materiales en contacto con alimentos: papel y cartón reciclados, tintas de impresión *offset* aplicadas al papel y cartón para envases de alimentos, en aceites minerales utilizados como aditivos en la fabricación de plásticos en contacto con alimentos.
- Contaminantes ambientales: normalmente provenientes de contaminaciones ambientales producidas por aceite lubricante de los motores sin catalizador (principalmente diésel), aceite combustible sin quemar, los residuos de neumáticos y asfalto de la carretera.
- Contaminantes derivados del uso de aceites minerales en maquinaria de cosecha: gasóleo, aceite lubricante o aceites lubricantes para bombas.
- Los aditivos alimentarios, auxiliares tecnológicos y otros usos: como agentes de liberación para productos de panadería y productos del azúcar, aceites para tratamiento de alimentos, como el arroz, aceites minerales en alimentación animal.

Dependiendo de la fuente de contaminación, los hidrocarburos de los aceites minerales, MOH, pueden contener básicamente MOSH, como por ejemplo los MOH de grado alimentario (aceites blancos, que han sido tratados y que prácticamente están libres de MOAH), o pueden contener entre un 10-35% de MOAH, como es el caso de los lubricantes.

En los alimentos estudiados, las concentraciones medias más altas de MOSH se detectaron en la categoría “Pan y panecillos” (261 mg/kg) y “cereales para consumo humano” (principalmente representado por el arroz, 131 mg/kg). La fracción de MOAH solo se pudo determinar en unas pocas muestras.²

Asimismo se ha descrito la presencia natural baja de estas sustancias en los aceites de oliva vírgenes.¹¹ En cambio, en aceites con mas de un refinado y en los de orujo dicha presencia puede ser apreciablemente mayor. En determinadas ocasiones, la presencia endógena de estos hidrocarburos puede llevarse a la propia aceituna que se crezca de manera contaminada o en hojas, siempre en concentraciones muy bajas.

El contenido de PAH en las aceitunas depende de la contaminación ambiental. Éstos compuestos se depositan en la piel del fruto y se transfieren al aceite durante la extracción del mismo. La mayor fuente de contaminación ambiental de PAH en los aceites de oliva virgen procede de la exposición de las aceitunas a los escapes de motores, por lo que se prefiere modos de recolección y almacenamiento de aceituna manuales.¹³

4.2.3 Legislación

En 2012, la Comisión Técnica de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (Contam) de la EFSA llegó a la conclusión de que los posibles efectos sobre la salud humana de los grupos de sustancias de este tipo podían variar considerablemente. Los MOAH, actuando como agentes cancerígenos, mientras que, los MOSH pudiendo provocar efectos nocivos en el hígado.

Para garantizar la fiabilidad de los datos analíticos obtenidos, antes de elaborar resultados analíticos los Estados miembros deben garantizar la disponibilidad de equipos de análisis adecuados, métodos de análisis y adquirir la experiencia suficiente en análisis de MOH, tanto en alimento como en materiales en contacto con dichos alimentos. La vigilancia debe abarcar las grasas animales, pan, productos de panadería fina, cereales para el consumo humano, helados, pastas, aceites y muestras en contacto con los alimentos usados.^{14,15}

Respecto a los límites legislados para los MOSH y MOAH de momento no hay legislación en la Unión Europea. Es por ello, que en la mayoría de laboratorios de análisis de MOH, es suficiente con analizar el aceite y asegurar una contaminación menor de 50 mg/kg de MOH en la muestra.

En enero de 2017, la Comisión Europea adoptó una recomendación según la cual los Estados miembros debían controlar la presencia de MOH en los alimentos y materiales contaminados, Recomendación (UE) 2017/84 de la CE de 16 de enero 2017 sobre la vigilancia de hidrocarburos de aceites minerales en alimentos y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos. Fue en Alemania, en marzo de 2017, donde se llevó a cabo la elaboración de una “Regulación nacional de aceite mineral”, con la intención de limitar la concentración de MOSH y MOAH en materiales en contacto con alimentos. En consecuencia no podrían comercializarse si superan un nivel máximo de 24 mg/kg de MOSH y 6 mg/kg de MOAH. Debido a las características de los MOAH, la intención y así lo demandan ya determinados países, es que el nivel máximo contenido en alimentos sea de 0,5 mg/kg.

Los mercados alemanes, los cuales solicitan frecuentemente cuantificar a niveles de 0,5 mg/kg, ofertan técnicas acreditadas según la ISO 17025 por DAkkS (*Die Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH*) la entidad alemana de acreditación equivalente a la española ENAC. En determinados laboratorios, se ha llevado a cabo un estudio usando

como límite de cuantificación 0,5 mg/kg, obteniéndose los siguientes resultados. **Tabla 4.**¹²

Tabla 4. Análisis de distintos aceites usando un límite de cuantificación del 0,5 mg/kg.

Contenido en MOSH	Mediana (mg/kg)	Valor máximo (mg/kg)	Positivos (>0,5 mg/kg)
AOV*	6,5	70,0	87%
Oliva y Orujo de Oliva	14,0	82,1	100%
Contenido en MOAH	Mediana (mg/kg)	Valor máximo (mg/kg)	Positivos (>0,5 mg/kg)
AOV*	<0,5	11,0	40%
Oliva y Orujo de Oliva	5,7	21,2	100%

*AOV, *Aceite de Oliva Virgen*.

Si el valor de cuantificación máximo finalmente establecido fuese de 0,5 mg/kg resultaría un problema para el sector del aceite, ya que la gran mayoría de éstos presentan contaminaciones de MOSH y MOAH por encima de este valor. Es por ello, que hay que realizar estudios sobre las fuentes de contaminación, medidas necesarias para rebajar la presencia de estas sustancias y establecer unos valores de referencia.

4.3 MÉTODO DE ANÁLISIS MOSH y MOAH

La complejidad de estos compuestos hace imposible separarlos en elementos individuales y analizarlos, incluso cromatográficamente donde suelen producir montañas cromatográficas inseparables conformadas por los diferentes hidrocarburos. El método llevado a cabo consiste en medir la concentración de las fracciones correspondientes a hidrocarburos saturados y aromáticos, por separado. Por ello, la determinación de MOSH y MOAH se suele dar en resultados divididos en fracciones según el número de átomos de carbono del hidrocarburo. Esta división podría detectar la fuente de contaminación que tiene el producto. Las divisiones que se llevan a cabo son: C16-C20, C20-C25, C25-C35, C35-40 y C40-50. En los procesos de purificación previa normalmente requeridos, típicamente mediante sorbentes sólidos usados *on-line* u *off-line* con GC, es el compuesto colestano el marcador de inicio de los MOSH y el TBB (*1,3,5-tri-tert-butilbenceno*) el marcador del comienzo de los MOAH.

4.3.1 Extracción en fase sólida (SPE)

A mediados de los años 70 se introduce un método alternativo de extracción, llamado extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) que es un proceso cromatográfico de líquidos desarrollado a baja o media presión y que consiste en un dispositivo en forma de jeringa en el cual se introduce un material sorbente (fase estacionaria) que cumple la función de retener una sustancia que está contenida en un disolvente determinado (fase móvil). Por ello, la SPE comprende la interacción de tres componentes descritos: el material sorbente, el analito y el disolvente.¹⁶ A pesar de que sus primeras aplicaciones se llevaron a cabo hace unos cincuenta años, es en los últimos tiempos cuando se está

llevando a cabo su desarrollo más notable, usándose como un enfoque alternativo a la extracción líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*). Además, aunque su principal objetivo ha sido para llevar a cabo la pre-concentración de microcontaminantes orgánicos, numerosos estudios han demostrado el gran potencial de esta técnica para estudios de especiación.¹⁶

El principio de la SPE es similar al de LLE, el cual implica una división de solutos entre dos fases líquidas inmiscibles. Sin embargo, la SPE implica la separación entre una fase líquida (o matriz de la muestra solvente con los analitos) y una fase sólida o fase estacionaria (material adsorbente). Se trata de una técnica que evita el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos en los pasos de pre- concentración y extracción.

La SPE en fase normal hace referencia a un sistema en el cual el material sorbente es más polar que la fase móvil o la solución de la muestra. La SPE en fase reversa se refiere a un sistema en el cual el material sorbente es menos polar que la fase móvil o la solución de la muestra.¹⁷

El método de SPE consiste de tres a cuatro pasos consecutivos que se esquematizan en la **Figura 3**.

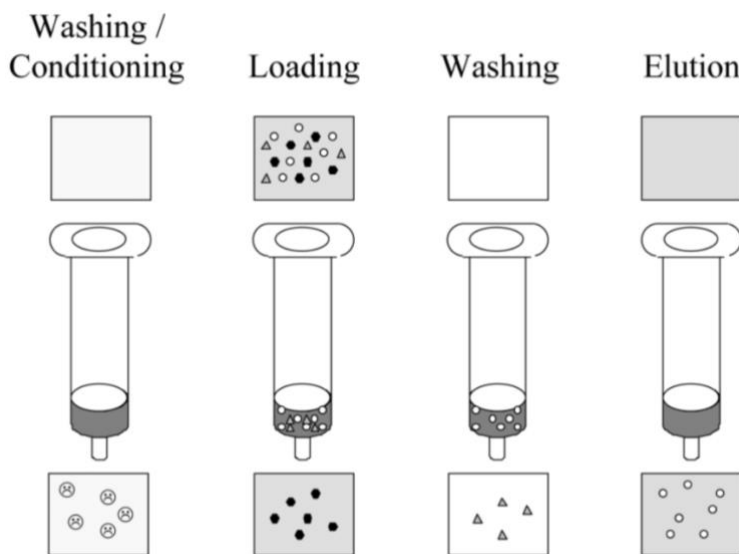


Figura 3. Etapas del proceso SPE.¹⁶

El primer paso, consiste en el acondicionamiento del sorbente sólido usando un disolvente apropiado seguidamente del disolvente que se va a usar con la muestra. Este paso es crucial, ya que permite la humectación del material de empaque, elimina las posibles impurezas y el aire presente en la columna. La naturaleza del disolvente acondicionador depende de la naturaleza del sorbente sólido.

El segundo paso, es el paso de la muestra a través de la fase estacionaria, sorbente sólido, produciéndose la concentración de éstos. La muestra puede ser añadida por gravedad, bombeo, aspirado por vacío o mediante sistemas automatizados. La velocidad de flujo de

la muestra debe ser baja para permitir así la retención de los analitos, pero no demasiado baja para evitar una duración excesiva del proceso.

El tercer paso, opcional, consiste en el lavado de la fase estacionaria con el disolvente de la muestra para eliminar los componentes de la matriz que han sido retenidos por el sorbente sólido, sin desplazar a los analitos. En matrices acuosas, es aconsejable una etapa de secado, eliminando así un exceso de agua en el extracto final.

El paso final consiste en la elución de los analitos de interés con disolvente apropiado. El volumen de disolvente se optimiza para que la recuperación cuantitativa de los analitos se logre con una dilución baja.¹⁶

Existen distintas formas de envasar la fase estacionaria, como son microcolumnas, cartuchos, barras de jeringa y discos. **Figura 4.**

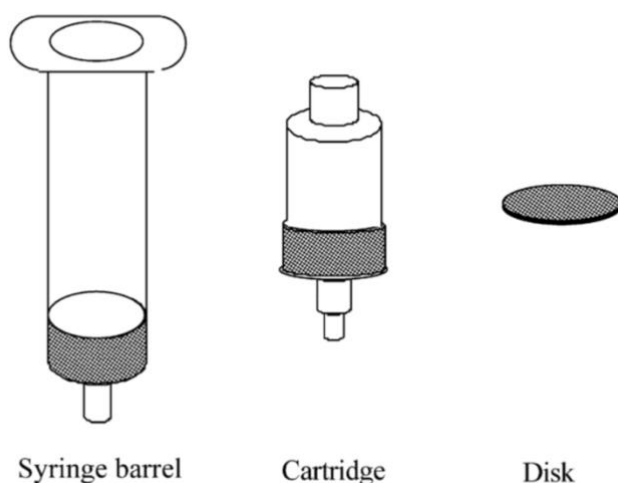


Figura 4. Tipos de envases de la fase estacionaria.¹⁶

4.3.2 Determinación de MOSH Y MOAH: Cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de llama (GC-FID)

La cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*) es una técnica muy extendida en los laboratorios avanzados de análisis químico, cuyas primeras aplicaciones se remontan a principios de los años 40. En su comienzo, sus aplicaciones iban dirigidas al control de fracciones de petróleo, pero desde entonces, su desarrollo no ha parado siendo hoy en día una técnica con gran sensibilidad y una gran polivalencia.¹⁸

La GC esta basada en la separación de moléculas que presentan diferencias en su estructura química y por tanto en sus propiedades físico-químicas. En este sentido, los métodos de GC son muy eficaces cuando se aplican a muestras orgánicas complejas, a organometálicos y a sistemas bioquímicos formados por especies volátiles o por especies que pueden someterse a un proceso para producir sustancias volátiles. Desde el punto de vista cualitativo, la GC es una técnica más limitada que la mayoría de los métodos espectroscópicos. Por eso, una tendencia importante en este campo ha sido combinar las

notables cualidades para la separación que tiene la GC con las mejores propiedades de identificación que poseen instrumentos como los espectrómetros de masas, de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear.¹⁹

Las técnicas cromatográficas pueden dividirse en diferentes categorías según las características de la fase móvil y estacionaria. Entre sus principales características encontramos que la separación se realiza en columna, se trabaja por elución, es capaz de separar mezclas complejas o incluso solutos muy parecidos, es rápida y con una cantidad pequeña de muestra es capaz de proporcionar información cualitativa y cuantitativa. Las sustancias se separan por distribución entre una fase estacionaria, puede ser sólida o líquida, y la fase móvil, cuya principal función es transportar los solutos. En GC esta fase móvil es un gas inerte, comúnmente He, N₂ o H₂, la elección de uno u otro dependerá de la fase estacionaria y las características del detector que se usará. En la **Figura 5** se muestra un esquema general de un cromatógrafo de gases:

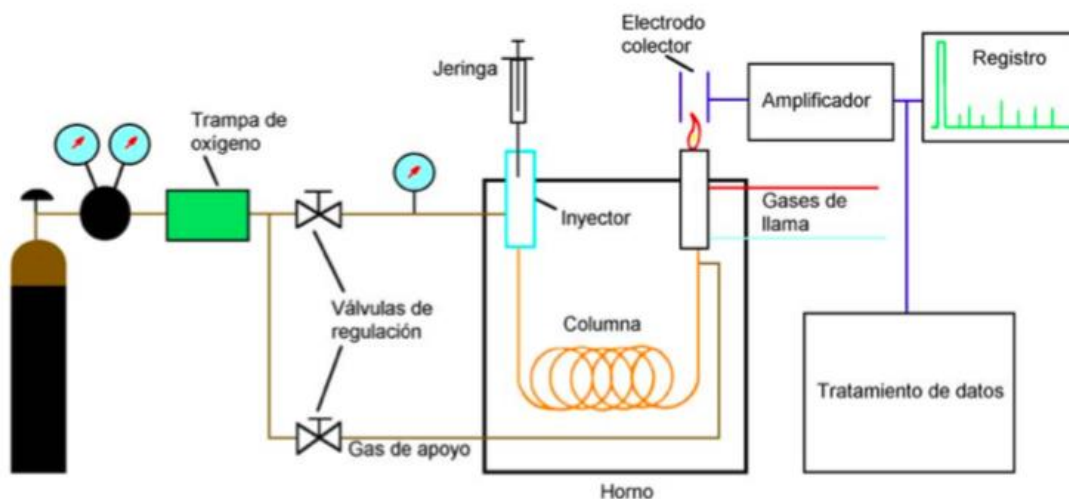


Figura 5. Esquema general de un cromatógrafo de gases.²⁰

Al cromatógrafo de gases se le pueden acoplar distintos sistemas de detección, entre ellos podemos mencionar el espectrómetro de masas, detector de ionización de llama, etc. En el presente estudio para la determinación de MOSH y MOAH, el cromatógrafo de gases empleado se encuentra equipado con un detector FID ya que la espectrometría de masas no suele ofrecer resultados adecuados cuantitativamente para este tipo de aplicaciones,¹³ el cual se explica a continuación.

Existen distintos sistemas de introducción de la muestra en el cromatógrafo. Todos los dispositivos de inyección presentan la misma finalidad, vaporizar la muestra e introducirla en la corriente de gas portados que se dirige hacia la columna. La evaporación e introducción de las muestra en el sistema, se debe realizar siguiendo una serie de requisitos:

- La evaporación de la muestra debe ser lo más rápida posible.
- La evaporación debe realizarse sin discriminar ningún componente de la muestra.

-La muestra debe llegar a la columna como una banda, lo más fina posible.

Un inyector está formado por un bloque metálico, un conductor del calor provisto de un sistema de calentamiento, un termostato capaz de mantener su temperatura constante y aislamiento térmico adecuado. En la **Figura 6** puede verse un esquema general de un inyector de GC.

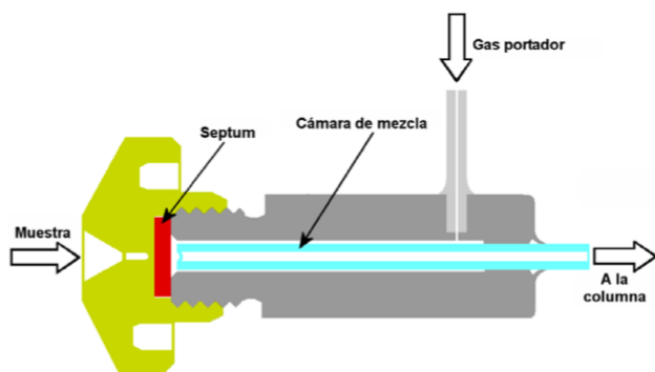


Figura 6. Esquema general de un inyector de GC.²⁰

En el inyector, el gas portador pasa de forma continua por el sistema. La muestra es inyectada en el interior de la cámara por medio de una micro jeringa a través de un septum con capacidad de auto sellado en el momento que se retira la aguja. Una vez inyectada la muestra, ésta es capaz de evaporarse de manera casi instantánea mezclándose con el gas portador en la cámara de mezcla, también llamado “*liner*”. Cuando se evapora, es arrastrada rápidamente por la corriente de gas portador en dirección a la columna.

El sistema de inyección de un cromatógrafo juega un papel muy importante. La utilización de una técnica de inyección inadecuada puede llevar a perder completamente la capacidad de separación de una columna. Por ello, existen distintos tipos de sistema de inyección en función de la cantidad de volumen a inyectar, la manera de inyección (fraccionada o directa) y el tipo de columna que se va a usar posteriormente.

Entre ellos podemos destacar el sistema de inyección “*splitless*” e inyección de grandes volúmenes (LVI, *Large Volume Injection*).

En la técnica de inyección ‘*splitless*’ la mayoría de la muestra inyectada se dirige a la columna, la cual se mantiene durante toda la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra. La totalidad de la muestra inyectada se acumula en la cabeza de la columna, actuando el disolvente concentrado en la columna a modo de trampa donde se concentran los componentes a analizar. Seguidamente, se abre una válvula de purga con el fin de eliminar a la atmósfera el disolvente vaporizado que pudiera quedar en el inyector. La utilización de la modalidad ‘*splitless*’ supone una ventaja ya que al no haber división de la muestra, permite un aumento notable de la sensibilidad con respecto a otras técnicas que solo introducen en la columna cromatográfica una pequeña fracción de la muestra (*split*). Por otra parte, la reconcentración de la muestra en la cabeza de la columna origina pérdidas de eficacia

debidas a una inyección inadecuada.²⁰ En la **Figura 7** se observa un esquema de un inyector de GC operando en modo 'splitless'.

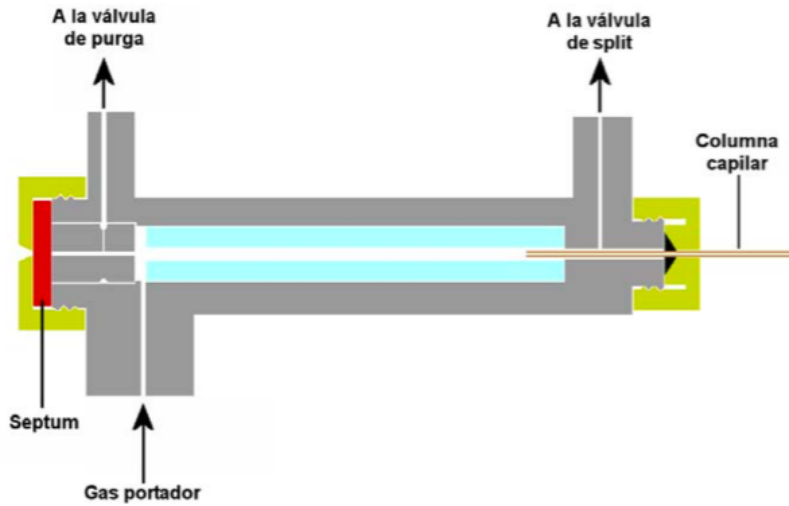


Figura 7. Esquema de un inyector de tipo *splitless*.²⁰

Por otro lado, la técnica de LVI es usada para el análisis de componentes de la muestra que han de ser determinados en niveles de concentración muy bajos. La inyección de una mayor cantidad de muestra incrementa la sensibilidad y reduce, incluso puede llegar a eliminar, las etapas previas necesarias para la concentración de la muestra. En la **Figura 8** se muestra el esquema general de un inyector empleado para LVI:

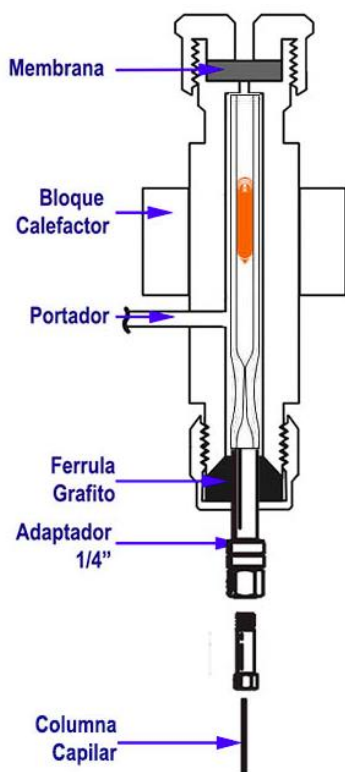


Figura 8. Esquema de un inyector de grandes volúmenes.²¹

La cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de llama, *GC-FID*, es una técnica analítica muy común cuyo uso está muy extendido en los mercados petroquímicos, farmacéuticos y de gas natural.

El FID es uno de los detectores más extensamente utilizado, y por lo general, uno de los más aplicables en GC. En un quemador el efluente de la columna se mezcla con H_2 y aire para luego encenderse eléctricamente. La mayoría de los compuestos orgánicos, cuando se pirolizan a la temperatura de la llama producen iones y electrones que pueden conducir la electricidad a través de la llama.

El FID es además extremadamente sensible a las impurezas de hidrocarburo del suministro de hidrógeno y aire de la llama. Estas impurezas pueden aumentar el ruido de línea base y reducir la sensibilidad del detector. De ahí que sea común la calibración rutinaria del analizador mediante el uso de una mezcla de calibración.²⁰ La **Figura 9** muestra un esquema de un detector FID:

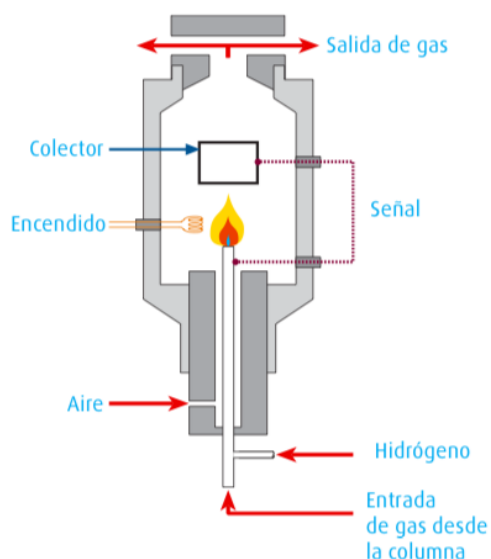


Figura 9. Esquema FID.²²

Su alta sensibilidad, la respuesta uniforme a los hidrocarburos y el amplio rango lineal han hecho del detector FID uno de los más usados en GC, especialmente en el análisis de aceites. El detector FID responde al número de átomos de carbono que entra en él por unidad de tiempo, por ello, es un detector sensible a la masa y no a la concentración. Grupos funcionales como carbonilo, alcohol o halógenos originan en la llama pocos iones o prácticamente ninguno. Además, este detector es insensible a los gases no combustibles como H₂O, CO₂, etc. Esto hace del FID uno de los detectores más usados para el análisis de la mayoría de los compuestos orgánicos. Sin embargo, para determinar la respuesta del FID con exactitud, se precisa de un enfoque integral de manera que se pueda desarrollar un sistema aplicable para predecir la respuesta. Hoy en día se precisa de instrumentación capaz de realizar mediciones de respuestas altamente precisas para la gran variedad de sustancia. Además, las predicciones de respuesta podrían automatizarse en sistemas de datos computerizados para facilitar en gran medida el análisis de mezclas orgánicas complejas y reducir así el requisito de analizar grandes cantidades de estándar auténticos.²³

El detector FID posee una elevada sensibilidad de (10^{-13} g/s), un gran intervalo de respuesta lineal (10^7), un bajo ruido además de ser resistente y fácil de utilizar. Este detector ha sido utilizado para la determinación de contaminantes emergentes como productos de cuidado personal, compuestos orgánicos como son los hidrocarburos, plaguicidas, antidepresivos...²⁴

4.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es un paso fundamental a la hora de su desarrollo, ya que hay que asegurar que los resultados obtenidos son correctos. Por ello, es necesario minimizar errores, conseguir resultados reproducibles y fiables, además de evitar falsos positivos o falsos negativos. Para poder validar un método es necesario conocer si existe una normativa en torno al método que queremos validar, por ejemplo, un valor paramétrico establecido para los analitos y la matriz objeto del estudio analítico. La validación puede llevarse a cabo por un único laboratorio o por un conjunto de éstos.

Existen distintos organismos internacionales con programas de validación como la Guía Sante,²⁵ la Guía de la Red Europea Eurachem²⁶ y la Guía ISO 17025²⁷. Los principales parámetro para llevar a cabo la validación de un método son:

Precisión: Grado de concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetitivamente el mismo método analítico a alícuotas distintas de la misma muestra. La precisión de un método se expresa en términos de desviación estándar.

Selectividad/Especificidad: La especificidad es el método que da una respuesta para un único analito, mientras que, la selectividad hace referencia al método que proporciona resultados para un número de analitos pero con respuestas diferencias entre sí.

Veracidad/Recuperaciones: Grado de concordancia entre el valor medio y el valor verdadero. La veracidad del método analítico se expresa en términos de error o recuperaciones en el caso de que se produzcan pérdidas del analito. La recuperación obtenida dependerá de la matriz de la muestra, tratamiento de la muestra y concentración del analito.

Linealidad y curva de calibración: Es la capacidad de un método de proporcionar resultados, señales analíticas, que son directamente proporcionales a la concentración de analito. La linealidad puede evaluarse de manera gráfica, observando la gráfica en la cual se representan las señales en función de la concentración de analito, o matemática.

Rango: El rango es el intervalo entre la mayor y la menor concentración que pueden ser determinadas con precisión, exactitud y linealidad.

LOD (Límite de detección): Concentración más baja de analito en una muestra que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar.

LOQ (Límite de cuantificación): Concentración más baja de analito en una muestra que puede cuantificarse con una adecuada precisión y exactitud.³⁴

5. MÉTODOS EXPERIMENTALES

5.1 REACTIVOS Y MATERIAL UTILIZADO

5.1.1 Reactivos

- *n*-hexano fue suministrado por VWR Chemicals. (Radnor, PA, EEUU)
- Tolueno suministrado por Panreac (Barcelona, ESPAÑA)
- Sílica argentada (99,8%) suministrada por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)
- Nitrato de plata (99%) suministrada por Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)
- Diclorometano sumistrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)

• Mix de patrones internos empleados típicamente en el análisis de MOSH y MOAH. Este mix es una mezcla comercial suministrada por Restek (Bellefonte, PA, EEUU) y que contiene un conjunto de 9 patrones internos de hidrocarburos alifáticos y aromáticos que se indican en la **Tabla 5**. Los patrones se encontraban en concentraciones que están indicadas en dicha tabla.

Tabla 5 – Compuestos presentes en el mix de patrones internos.

Sustancia	Formula molecular	Abreviatura	Concentración	Fracción
<i>n</i>-undecano	C ₁₁	n-C ₁₁	300 µg/mL	MOSH
<i>n</i>-tridecano	C ₁₃	n-C ₁₃	150,7 µg/mL	
Biciclohexil	C ₁₂ H ₂₂	Cycy	300,6 µg/mL	
Colestano	C ₂₇ H ₄₈	Cho	600 µg/mL	
1-metilnaftaleno	C ₁₁ H ₁₀	1 MN	300 µg/mL	MOAH
2-metilnaftaleno	C ₁₁ H ₁₀	2 MN	300,7 µg/mL	
1,3,5-tri-tert-butilbenceno	C ₁₈ H ₃₀	TBB	300,6 µg/mL	
Perileno	C ₂₀ H ₁₂	Per	601,3 µg/mL	
<i>n</i>-pentilbenceno	C ₁₁ H ₁₆	5B	301,1 µg/mL	

No existen patrones comerciales de MOSH y MOAH.²⁸ Por ello, para optimizar y validar la metodología analítica que en el presente trabajo se propone, se emplearon como patrones analíticos los siguientes:

- Mix de alcanos lineales de C7-C40 (1000 µg/mL de cada uno de los compuestos, *n*-Hexano, 1 mL/ampolla) suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Se empleó para validar el método de análisis de MOSH.
- C18 (99%) suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Se empleó como patrón interno de cuantificación de MOSH.
- Mix de hidrocarburos aromáticos policíclicos (2000 µg/mL de cada uno de los compuestos, Cloruro de metileno, 1 mL/ampolla) suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Se empleó para validar el método de análisis de MOAH.

Este mix esta formado por 17 hidrocarburos aromáticos policíclicos. En la **Tabla 6** aparecen ordenados según su orden de elución y se indican sus concentraciones.

Tabla 6 – Compuestos presentes en el mix de PAH.

Analito	Pureza cromatografica (%)	Concentración (µg/mL)
Naftaleno	99,9	2086,1
Acenaftileno	99,9	2083,2
2-Bromonaftaleno	99,9	2089,1
Acenafteno	99,9	2088,4
Fluoreno	99,1	2085,2
Fenantreno	99,0	2086,7
Antraceno	99,4	2093,9
Estandar Interno	N/A	N/A
Fluorantreno	98,4	2086,6
Pireno	90,3	2087,4
Benzo(a)antraceno	99,5	2092,7
Criseno	99,9	2093,3
Benzo(b)fluoroantraceno	97,3	2092,4
Benzo(a)pireno	99,3	2098,7
Indeno (1,2,3-CD)pireno	98,8	2093,9
Dibenz(a,h)antraceno	99,6	2092,0
Benzo(g,h,i)perileno	99,3	2094,4

- Helio calidad 3x, aire comprimido puro sintético calidad 3x e hidrógeno puro calidad 3x de Praxair (Madrid, ESPAÑA).

5.1.2 Materiales y equipos

- Columnas de vidrio con llave de vidrio, para llevar a cabo la extracción en fase sólida, marca Pobel (Madrid, ESPAÑA) (referencia: 34.02.12). Diámetro 10 mm, altura 200 mm y capacidad 15 mL Dichas columnas presentan un fritado que impide la salida de la sílica.
- Vortex de Heidolph (Schwabach, ALEMANIA).
- Pipetas automáticas de 10 - 100 µL, 100 - 1000 µL y 1 - 5 mL suministradas por Thermo Scientific (Waltham, MA, EEUU).
- Pipetas Pasteur de vidrio suministradas por Dicsa (Almería, ESPAÑA).
- Vasos de precipitado de 50 mL suministrados por Dicsa (Almería, ESPAÑA).
- Rotavapor de Büchi, R-114 (Flawil, SUIZA).
- Granatario de Mettler Toledo (Greifensee, SUIZA).
- Matraces de fondo redondo suministrados por Dicsa (Almería, ESPAÑA).
- Tubos de ensayo de 15 mL suministrados por Dicsa (Almería, ESPAÑA).

- Matraces aforados de 10 mL suministrados por Dicsa (Almería, ESPAÑA).

Para llevar a cabo los experimentos se empleó un cromatógrafo de gases de Bruker Corporation (Freemont, CA, EEUU) modelo Scion 456-GC equipado con inyector de *splitless* e inyector de LVI, control electrónico de flujo y automuestreador tipo Combi-PAL. Como columna cromatográfica se empleó una columna DB-1HT de 15 m x 0.32 mm x 0,10 μm que permite trabajar entre -60°C y $+400^{\circ}\text{C}$ de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU). El cromatógrafo estaba equipado con un detector FID.

5.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN

Para llevar a cabo el análisis de MOSH y MOAH se precisa preparar previamente tres disoluciones patrón.

En primer lugar, preparamos 10 mL de disolución a una concentración individual de cada compuesto de 100 mg/L del mix de patrones internos y otra de C18. Para ello, añadimos 335 μL del mix de patrones internos, que se encuentra a 3000 mg/l en una ampolla de 1 mL. Y añadimos 2150 μL de C18, que se encuentra a 464 mg/l en 50 mL.

Se diluyó la disolución hasta enrasar el matraz usando tolueno como disolvente de dicha disolución. Esta disolución se prepara semanalmente, y es añadida como control de calidad de cada análisis, además permite cuantificar la fracción MOSH debido a la presencia de C18.

Se prepara también una disolución de 10 mL a una concentración individual de 100 mg/L de cada uno de los alcanos lineales, considerando desde C16 hasta C40. Tomamos 1000 μL del patrón de alcanos lineales, a una concentración inicial de 1000 mg/l en 1 mL, y enrasamos usando tolueno como disolvente.

Finalmente, se prepara una disolución de 10 mL a una concentración de 100 mg/L de PAH. Para ello, tomamos 500 μL de disolución de PAH a partir de una disolución inicial de 2000 mg/L en una ampolla de 1 mL. Diluimos con tolueno hasta enrasar el matraz.

Todas estas disoluciones fueron conservadas en frigorífico a una temperatura de 3°C , además de ser etiquetadas con la fecha de preparación y las iniciales del analista que la preparó.

5.3 EXTRACCIÓN SPE Y SEPARACIÓN DE MOSH Y MOAH

Para la extracción de MOSH y MOAH en aceites minerales, se utilizó un procedimiento de extracción utilizando SPE *off-line*.

En primer lugar, se lleva a cabo la activación de la sílica argentada. Para ello, se pesa 100 g de ésta y se activa a 600°C durante 6 horas en una mufla. Una vez enfriada, se añade a la sílica activada 100 ml de una disolución acuosa de nitrato de plata al 1% y se agita durante 3 horas en un agitador rotatorio. La sílica argentada se seca en la estufa a 125°C durante 12 horas. Fue conservada en botella de vidrio topacio cerrada y recubierta de papel de aluminio para evitar su exposición a la luz solar durante su almacenamiento.

Para preparar los cartuchos de SPE, se pesa 6 gramos de la sílica argentada y se introduce en la columna de vidrio con llave. Para acondicionar la columna, añadimos 10 mL de *n*-hexano. Agitamos durante 1 minuto la columna en el vortex para eliminar burbujas de aire que pueda haber en su interior ocluidas en el relleno.

Por otro lado, para preparar la muestra se pesan 0,5 g de muestra de aceite y se le añaden 400 μ L de disolvente (*n*-hexano:tolueno, 1:1 v/v) y 100 μ L de la disolución de patrones internos y C18 a 100 mg/L. Tras homogeneizar convenientemente la mezcla, se añaden a la columna SPE un total de 500 μ L.

Para llevar a cabo la elución de los MOSH, utilizamos 10 mL de *n*-hexano, los cuales son recogidos en un tubo de ensayo. Tras su elución completa, son traspasados a un matraz de fondo redondo. El disolvente es llevado a justa sequedad con una temperatura de baño de 32 °C y una presión de 98 mbar. Una vez evaporado, redisolvemos el residuo sólido con 500 μ L de *n*-hexano:tolueno (1:1 v/v) y 50 μ L se inyecta en el cromatógrafo.

Para la elución de los MOAH del cartucho, utilizamos 15 mL de una mezcla *n*-hexano:tolueno:diclorometano (40:40:20 v/v). El eluato es recogido en un tubo de ensayo y evaporados en un rotavapor en las condiciones de presión y temperatura antes indicadas. Una vez evaporados, resolveremos el residuo sólido utilizando 500 μ L de tolueno. En este caso, el disolvente es llevado a justa sequedad con una temperatura de baño de 32 °C y una presión de 111 mbar.

Todo el proceso de extracción se lleva a cabo con material de vidrio ya que se ha observado que la utilización de algunos materiales plásticos puede producir un incremento significativo del ruido cromatográfico.

5.4. DETERMINACIÓN DE MOSH Y MOAH POR GC-FID

Para el análisis de MOSH y MOAH, se empleó el siguiente método cromatográfico: se utilizó un flujo de helio de 3 mL/min en columna que se mantuvo constante durante todo el análisis como gas portador. La muestra (50 μ L inyectados) se volatilizaba en el inyector LVI cuya temperatura inicial era 60 °C (mantenida 1 min), luego se calentaba a 200 °C/min hasta 300 °C (mantenida 10 min). La programación de la válvula de división fue: inicialmente abierta con una relación de división 30:1 pero nada más realizar la introducción de la muestra, se incrementó la relación de división hasta 200:1 para facilitar la evaporación de disolventes. Al minuto de análisis, se cerró la válvula de división para volatilizar los analitos y transferirlos a la columna cromatográfica (2 min) y posteriormente se volvió a abrir con una relación de división de 100:1 para limpiar el inyector y evitar contaminación cruzada. La columna cromatográfica inició su programación térmica a 65 °C (mantenida 10 min) y luego se calentó a 24 °C/min hasta 330 °C (mantenida 15 min). El detector FID trabajó a 330 °C con un flujo auxiliar de 27,0 mL/min, hidrógeno de 35 mL/min y aire de 300 mL/min.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

6.1.1 Optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación de MOSH y MOAH

La técnica de inyección juega un papel importante en la determinación de estos compuestos en aceites comestibles. La mayoría de los métodos publicados utilizan la técnica de inyección en columna²⁹ dado que, a pesar de que las concentraciones que se pueden encontrar de MOH en algunos aceites puede ser elevada (del orden de varios cientos de mg/kg), la sensibilidad de estas metodologías no es suficientemente alta y requiere ser mejorada a través de la introducción de una elevada cantidad de muestra en el instrumento. Dado que el instrumento empleado en el presente trabajo no contaba con dicho tipo de inyector, alternativamente se llevó a cabo un estudio empleando las técnicas de inyección disponibles y de mayor sensibilidad, esto es, inyección *splitless* y LVI. Para ello, se trabajó con una disolución patrón conteniendo los patrones internos proporcionados por Restek a una concentración de 300 µg/mL, excepto colestano y perileno que se encuentran a una concentración de 600 µg/mL, y *n*-tridecano que se encuentra a una concentración de 150 µg/mL. Dicho patrón contiene un número significativo de compuestos similares física y químicamente a los MOSH y MOAH objeto de estudio y son muy útiles para optimizar condiciones experimentales con compuestos de concentración conocida.

Para llevar a cabo la optimización del método se ensayó la inyección de 10 µL en modo *splitless* (aunque dicho volumen puede considerarse en el límite para este tipo de técnica pero intentando maximizar la sensibilidad de dicho modo de inyección). Para ello, el inyector se calentó a 330 °C y se mantuvo la válvula de división cerrada 2 min. Por otra parte, se evaluó la técnica LVI inyectando 50 µL de la misma disolución. En este caso, se evaporó el disolvente a 65 °C durante 1 min y luego se volatilizó la muestra calentando hasta 330 °C (a razón de 200 °C/min). Los mejores resultados, en términos de sensibilidad, se obtuvieron con la técnica de inyección LVI. En la **Tabla 7** se muestra el área de pico obtenida para los compuestos del mix de patrones internos estudiados:

Tabla 7. Comparación de la sensibilidad para las técnicas de inyección splitless y LVI.

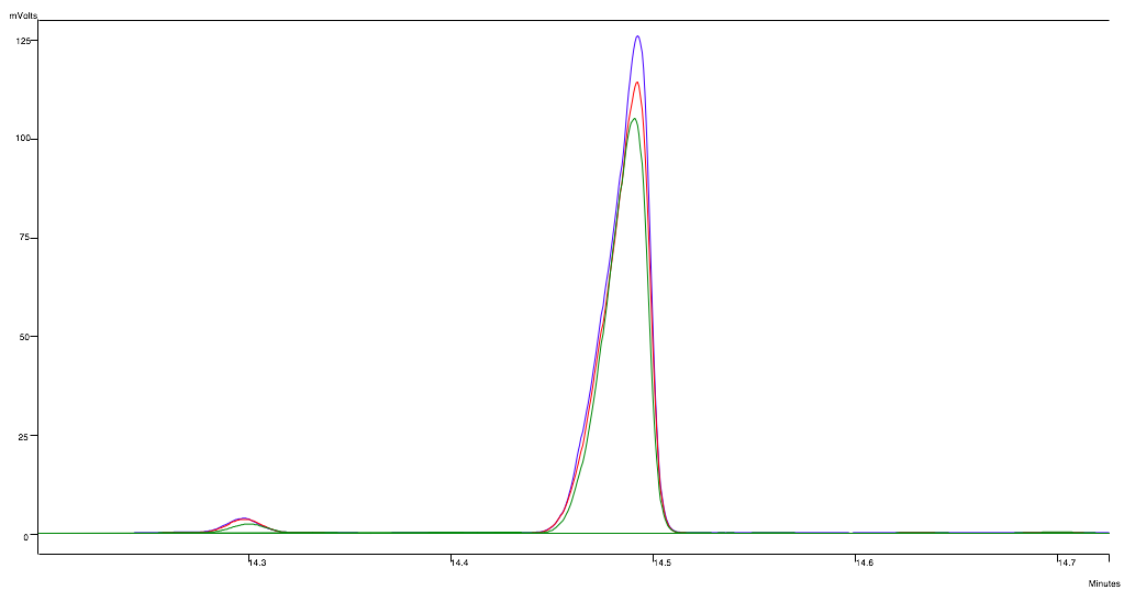
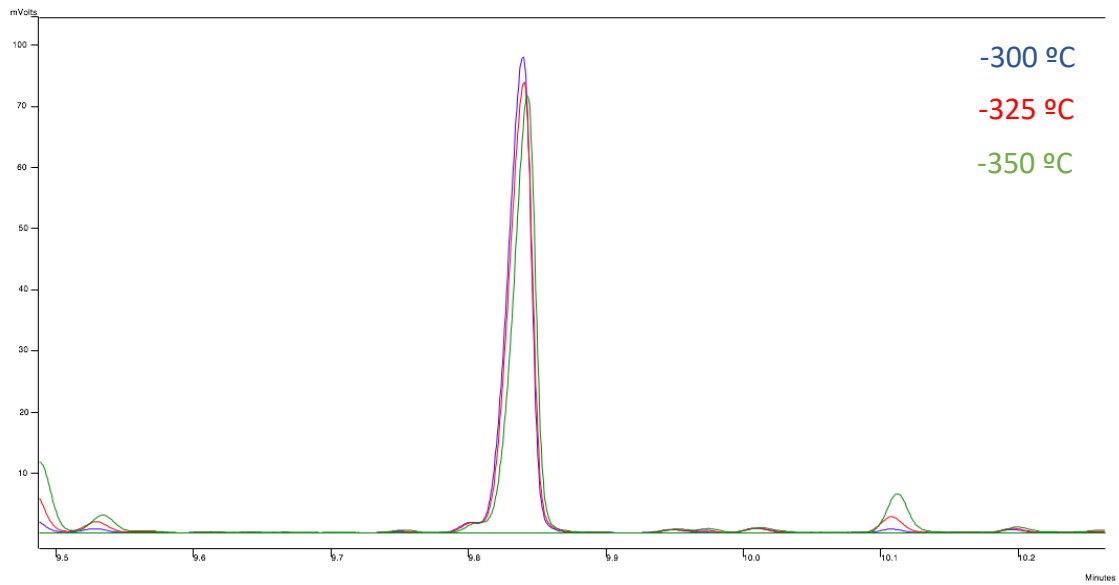
Sustancia	Área pico splitless (mV/s)	Área pico LVI (mV/s)
n-undecano	2234	14231
n-tridecano	1621	7790
Biciclohexil	3455	16765
Colestano	5678	27765
1-metilnaftaleno	3767	18754
2-metilnaftaleno	3565	17876
1,3,5-tri-tert-butilbenceno	3221	15431
Perileno	5444	26776
n-pentilbenceno	2223	12223

En general, la sensibilidad del método se incrementó sensiblemente al utilizar LVI con respecto a la técnica de inyección splitless. Especialmente se observó mayor mejora en algunos de los compuestos de mayor volatilidad, por ejemplo, n-undecano y n-tridecano por lo que probablemente, la volatilización de compuestos más volátiles se vea más favorecida por la técnica de inyección de grandes volúmenes que comenzaba la volatilización en frío e iba incrementando la temperatura de manera gradual hasta alcanzar la temperatura máxima.

Como se acaba de comentar en base a los primeros datos experimentales relativos a la volatilización de la muestra, la volatilidad de hidrocarburos analizados por GC puede variar en función de parámetros como la temperatura de volatilización y el tipo de disolvente empleado para disolver la muestra. Algunos hidrocarburos con número bajo de carbonos, entre C7 y C15 pueden ser perdidos en mayor o menor extensión por volatilidad en el instrumento durante el proceso de eliminación del disolvente. Por ello, es importante seleccionar unos parámetros de volatilización adecuados que minimicen o eliminen dicha pérdida en el inyector. Dicho fenómeno ha sido descrito por diversos autores.³⁰ También pueden ser potencialmente perdidos estos compuestos por su elevada volatilidad durante el proceso de evaporación en el rotavapor. Dicha volatilidad en el rotavapor fue minimizada ajustando cuidadosamente la evaporación del disolvente antes de la etapa cromatográfica. Las condiciones de temperatura y vacío fueron ajustadas acorde a las recomendaciones del fabricante del rotavapor a fin de que la pérdida por evaporación de los hidrocarburos más volátiles fuese mínima. También era importante ajustar la evaporación hasta justa sequedad a fin de ayudar a tal fin y no exponer a sobre- evaporación durante excesivo tiempo el residuo seco una vez obtenido.

A fin de minimizar la evaporación de los hidrocarburos más ligeros en el inyector cromatográfico, se llevó a cabo un estudio de la sensibilidad del método a dichos hidrocarburos a diversas temperaturas de inyección. Para ello, se empleó una disolución de una mezcla de hidrocarburos alifáticos lineales que van desde C7 a C40 a una concentración de 2 mg/mL. Dichos compuestos fueron evaporados en el inyector a diferentes temperaturas: 300, 325 y 350 °C (se evaporó inicialmente el disolvente a 65 °C durante 1 min y luego se volatilizó la muestra calentando hasta las temperaturas estudiadas a razón de 200 °C/min). En la **Figura 10** se pueden observar los

cromatogramas obtenidos para algunos de los hidrocarburos. La primera figura corresponde con un hidrocarburo de bajo peso y mayor volatilidad, C16, la segunda corresponde a un hidrocarburo de medio peso, C26, y la última corresponde a un hidrocarburo de elevado peso y menor pérdida por volatilidad, C38.



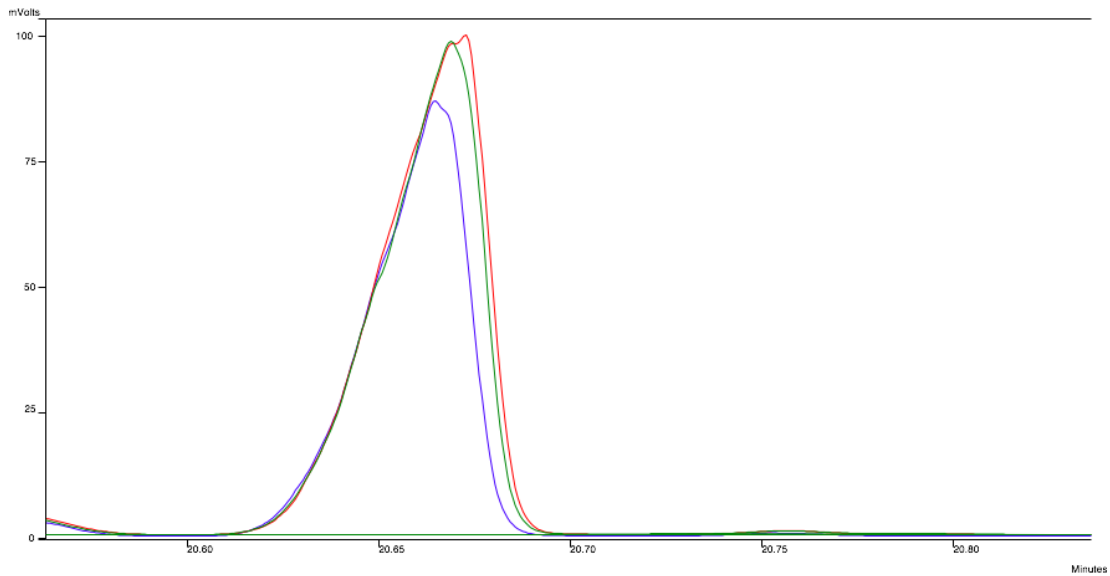
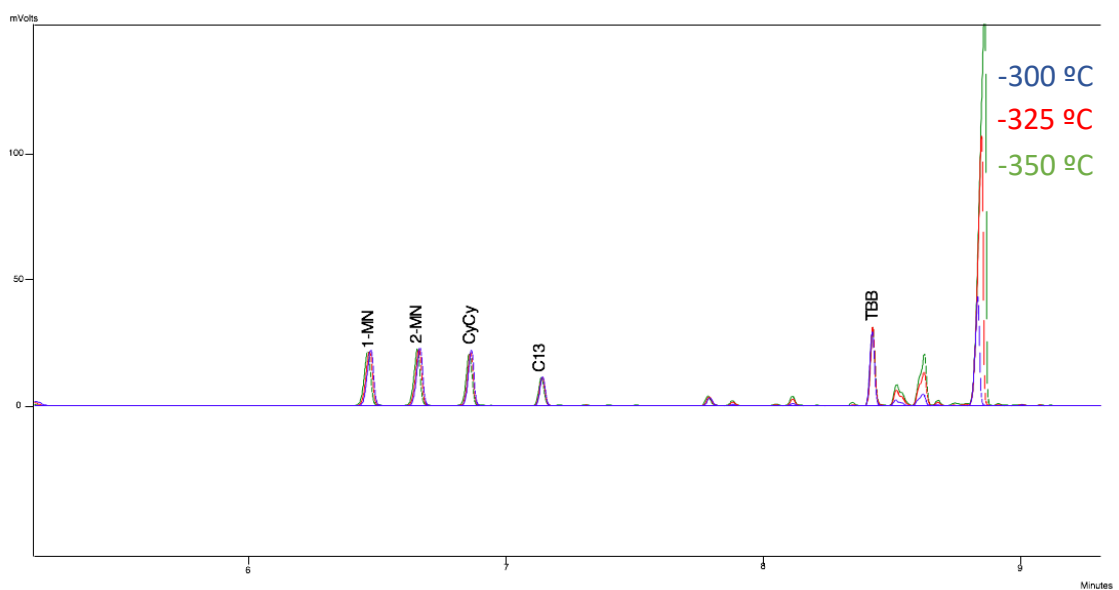


Figura 10. Cromatogramas obtenidos para las distintas temperaturas del inyector para el mix de alcanos. La figura de arriba muestra el C16, la figura central muestra el C26 y la figura de abajo muestra el C38.

Los mejores resultados en términos de sensibilidad se obtuvieron a 300 °C para la mayoría de los compuestos estudiados. A dicha temperatura se maximiza la sensibilidad de aquellos alcanos de elevado número de carbonos (C35-C40) minimizando las pérdidas por volatilidad de los alcanos de bajo número de carbonos (C7-C15).

Para corroborar los resultados obtenidos, se realizó un análisis de aceite de oliva virgen extra fortificado a 50 mg/kg con el mix de patrones internos y probamos estas tres últimas temperaturas.



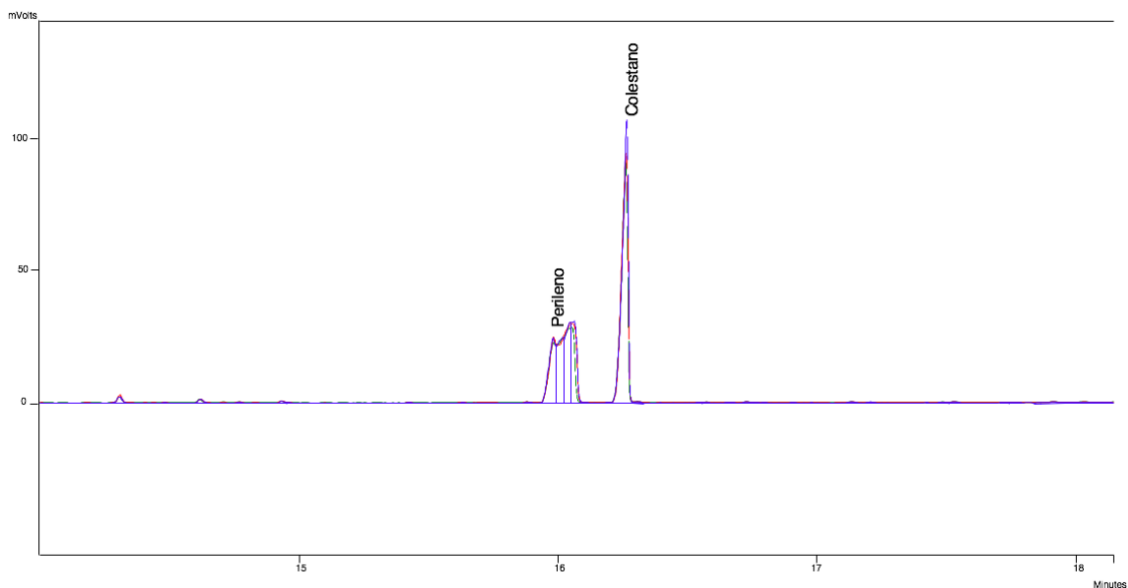


Figura 11. Cromatogramas obtenidos para las distintas temperaturas del inyector para el mix de patrones internos en aceite de oliva virgen extra.

Los resultados obtenidos en aceite de oliva fueron similares a los obtenidos con patrones disueltos en disolvente. Por lo tanto, se seleccionó una temperatura final de inyector de 300°C.

A continuación, se optimizó la temperatura del detector. Para ello se ensayaron temperaturas que variaron desde 330 a 390°C y se analizó la mezcla de mix de patrones internos a 2 mg/kg.

En la siguiente tabla se puede observar cómo varió la sensibilidad del método analítico en función de la temperatura del detector FID:

Tabla 8. Sensibilidad del método en función de la temperatura del detector FID.

Sustancia	330°C	360°C	390°C
<i>n</i>-undecano	16232	15443	11287
<i>n</i>-tridecano	7998	6556	3878
Biciclohexil	18765	16776	13349
Colestano	29870	15639	13876
1-metilnaftaleno	19871	16765	13349
2-metilnaftaleno	16785	14381	10981
1,3,5-tri-tert-butilbenceno	16353	12310	9087
Perileno	27876	23561	18987
<i>n</i>-pentilbenceno	11768	9873	5657

Los resultados indicaron que la mejor temperatura para el detector fue 330°C ya que a temperaturas mayores se observó que los picos cromatográficos de los compuestos perdían intensidad llegando a suponer incluso una sustancial pérdida de sensibilidad para algunos de éstos (por ejemplo, *n*-pentilbenceno, *n*-tridecano, colestano).

A continuación, se llevo a cabo la optimización de la temperatura de la rampa del horno cromatografico. Para ello, se utilizó la disolución de hidrocarburos lineales desde C7 a C40 a 2 mg/L. Las temperaturas ensayadas para el gradiente de temperatura fueron: 15, 25, 35 y 50°C/min. En la **Figura 12** se observan los cromatogramas obtenidos para dicho estudio.

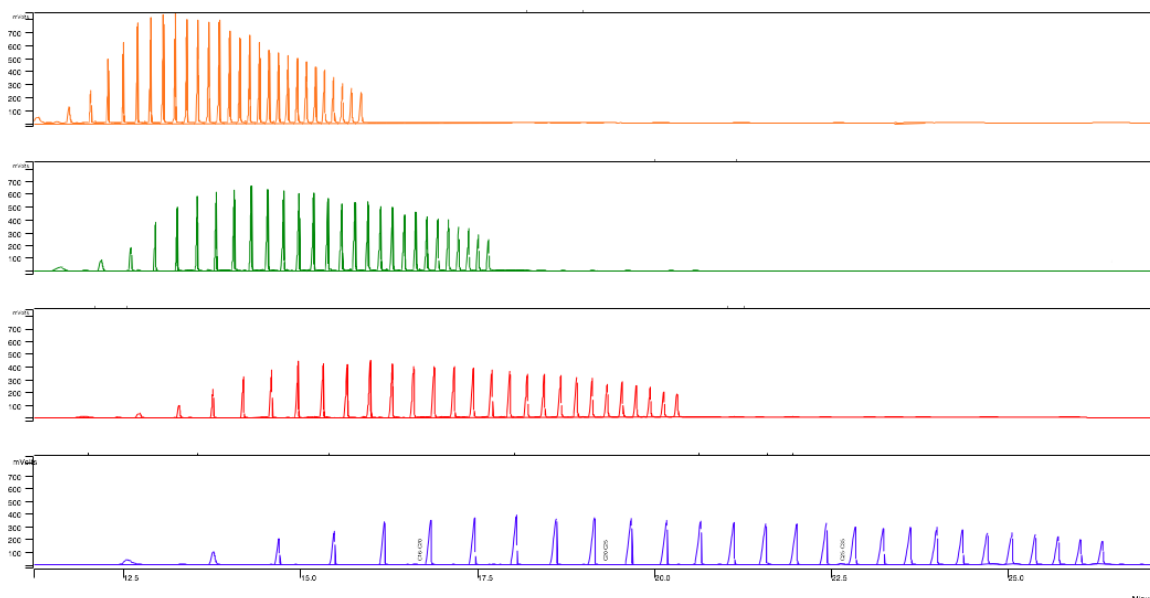


Figura 12. Cromatogramas obtenidos para el estudio de la temperatura de la rampa del horno cromatografico para el mix de alcanos (azul, 15°C/min; rojo, 25°C/min; verde, 35°C/min; naranja, 50°C/min).

En los cromatogramas se observan los típicos perfiles cromatográficos que se obtienen para hidrocarburos alifáticos de cadena lineal, normalmente separados a tiempos de retención muy similares. Con la rampa a mayor temperatura conseguimos condensar el cromatograma o, los patrones aparecen antes y de este modo, el análisis se desarrolla de manera más rápida, reduciendo el tiempo total de análisis. Podemos observar que la temperatura más adecuada para la rampa del horno cromatografico es 25°C/min ya que los compuestos aparecen con igual sensibilidad, no produciéndose una pérdida de sensibilidad en los alcanos más pesados, como ocurre cuando la rampa se encuentra a 35 o 50 °C/min. Además, dado que los compuestos objeto de estudio van a producir una montaña de señales no separable cromatográficamente, la sensibilidad del método aumentará conforme más estrecha sea dicha montaña de señales.³¹

6.1.2 Optimización del método de extracción

Los métodos de extracción acoplados *on-line* a un cromatógrafo de gases requieren acoplar instrumentalmente un cromatógrafo de líquidos de alta presión que son costosos y complejos en su optimización. Por ello, se diseñó el estudio empleando cartuchos de SPE *off-line*, que, si bien no permiten automatizar el proceso, son mucho más económicos y sencillos de optimizar. Para ello, se decidió utilizar un sorbente basado en gel de sílice a la que se le añade nitrato de plata para retener con mayor fuerza compuestos con dobles enlaces. Inicialmente, se planteó utilizar un 1% de nitrato de plata. Se estudió la cantidad de sílica argentada necesaria para llevar a cabo la separación de MOSH y MOAH

potencialmente presentes en una muestra de aceite. Se llevaron a cabo diversos experimentos usando 3, 4, 5 y 6 g de sílica argentada al 1% empaquetada en una columna de vidrio. Se cargó en la columna de sílica argentada 0,5 g de aceite conteniendo 20 mg/kg de cada uno de los compuestos presentes en el mix de patrones internos. Dichos compuestos presentan propiedades físicas y químicas muy similares a las de los compuestos objeto de estudio y su estudio puede ser extrapolable al comportamiento de MOSH y MOAH. Para la elución de los compuestos de interés, MOSH y MOAH, se pasó por la columna 20 mL de *n*-hexano que se recogieron en tubos de ensayo en fracciones de 1 mL y que se analizaron individualmente mediante GC-FID. Los resultados experimentalmente obtenidos, demostraron que la mejor separación entre compuestos MOSH y MOAH se obtuvo utilizando 6 g de sílica argentada al 1%. Cantidades de sorbente menores no eran capaces de separar adecuadamente los compuestos de interés entre sí. Los compuestos que indican el corte entre las fracciones de elución MOSH y MOAH son colestano y TBB.²⁹ El colestano fue eluído en las fracciones de 6-8 mL mientras que el TBB se eluía en las fracciones 10-11 mL. Estos resultados evidenciaron que se disponía de un margen de 2 mL para poder separar las fracciones de MOSH y MOAH en la extracción previa a la determinación GC-FID. En la **Tabla 9** se observan los perfiles de elución de dichos compuestos en función de la cantidad de sorbente empleada:

Tabla 9. Perfil de elución de colestano y TBB en columnas de 3, 4, 5 y 6 g de sílica argentada al 1%. Área de pico cromatográfico (mV/s).

Fracción (mL)	3 g		4 g		5 g		6 g	
	TBB	Cho	TBB	Cho	TBB	Cho	TBB	Cho
5	1732	-	-	-	-	40,8	-	-
6	-	-	1,7	-	-	1071	-	11,6
7	-	-	1,2	-	-	578	-	853
8	-	-	-	-	-	-	-	1051
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	1259	-
11	-	-	-	-	-	-	1367	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-

A continuación, una vez conocida la cantidad de *n*-hexano necesaria para eluir los MOSH separadamente de los MOAH y a fin de acelerar la elución de estos últimos compuestos, se evaluó la mezcla de disolventes *n*-hexano:tolueno:diclorometano (40:40:20 v/v) tal y como se describe en bibliografía.³²

Para conocer cuándo termina de ser eluída la fracción MOAH en el cartucho SPE, se utilizó como indicador el compuesto perileno (también incluido como patrón interno en

el mix empleado) que ha sido descrito en bibliografía²⁹ como indicador para tal fin. Además, dicho compuesto presenta un color verdoso que ayuda a seguir su elución a través de la columna de sílica argentada de color blanco a simple vista.

La elución de estos compuestos (evidenciada por la elución del perileno) se pudo llevar a cabo con esta nueva mezcla de disolventes más rápido (15 mL) que utilizando exclusivamente *n*-hexano (30 mL).

A modo de ejemplo, en la **Figura 13** se muestran los cromatogramas obtenidos en las condiciones experimentales seleccionadas tanto para MOSH como para MOAH y en donde se encontraban los compuestos del mix de patrones internos a una concentración de 10 mg/kg en aceite de oliva virgen extra.

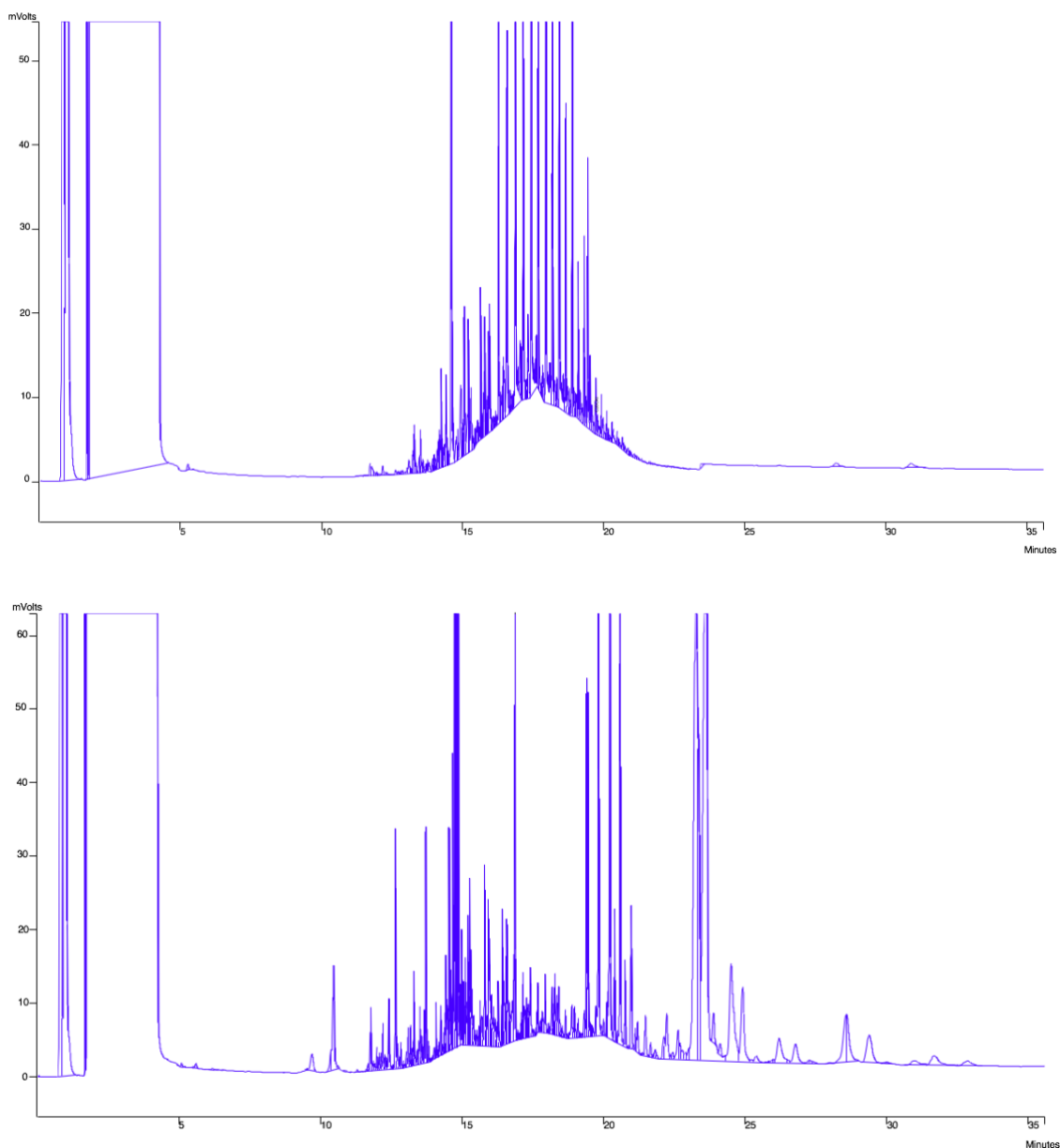


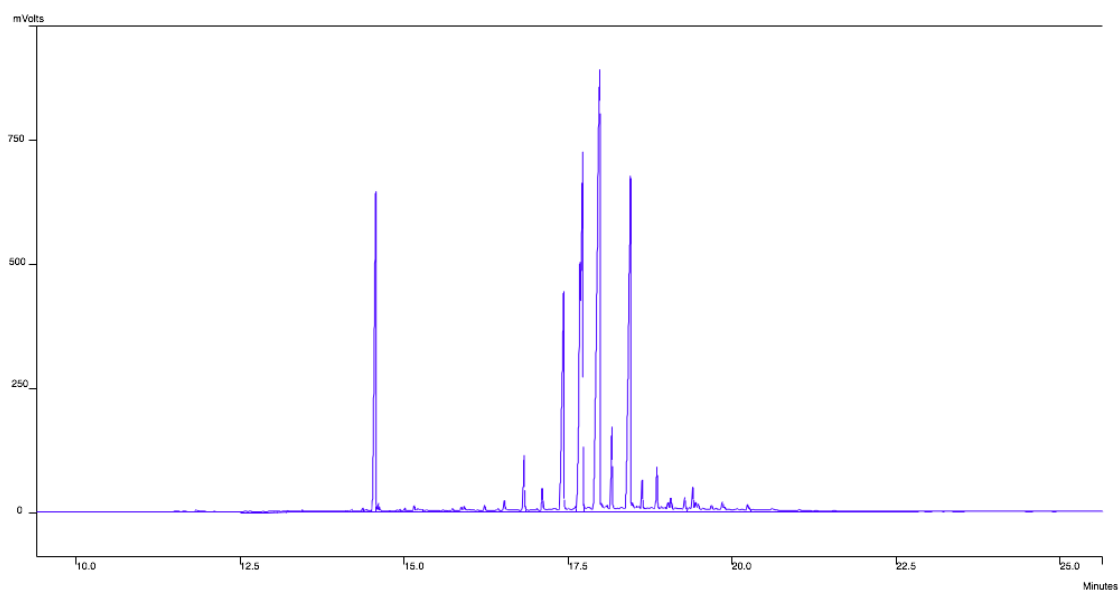
Figura 13. Cromatogramas obtenido para MOSH (cromatograma superior) y MOAH (cromatograma inferior) en aceite de oliva virgen extra.

Como puede observarse al comparar los cromatogramas, los MOSH nativos presentes en la muestra de aceite de oliva se muestran como una montaña de compuestos no separables cromatográficamente. Dichos compuestos son técnicamente imposibles de separar entre sí y de hecho, son descritos así con frecuencia en bibliografía³³ como jorobas cromatográficas imposibles de resolver.

Además, se observan una serie de picos cromatográficos que sobresalen por encima de la montaña de MOSH y que corresponden con compuestos presentes de manera nativa en las muestras de aceites. Dichos compuestos suelen ser alcanos de origen natural, mayoritariamente de número impar de carbonos. El cromatograma que se obtiene para MOAH es similar, con una montaña no separable cromatográficamente y que eleva la línea base y que corresponde con los MOAH presentes en la muestra. También tiene compuestos que están presentes de manera nativa en la muestra y que son los picos cromatográficos que sobresalen por encima de la joroba.

A la hora de establecer la cantidad de MOSH o MOAH presentes en la muestra, hay que averiguar por integración el área de la montaña de MOSH o MOAH más los picos que sobresalen por encima de ella y a continuación, integrar solamente dichos picos que sobresalen para sustraer su área a la del total antes calculada. El software de gestión de cromatogramas del instrumento empleado puede ser programado para llevar estas actividades de manera automatizada y obtener los resultados en el formato deseado.

Con frecuencia, se utiliza aceite de girasol refinado para establecer la influencia de blancos en el proceso de medida de la señal analítica.³¹ En la **figura 14** se muestra el blanco obtenido al analizar un aceite de girasol refinado a modo de blanco tanto para MOSH como para MOAH. La joroba cromatográfica que se obtiene también debe ser procesada como se ha descrito arriba y el valor obtenido substraherse a los valores que se obtienen al analizar las muestras.



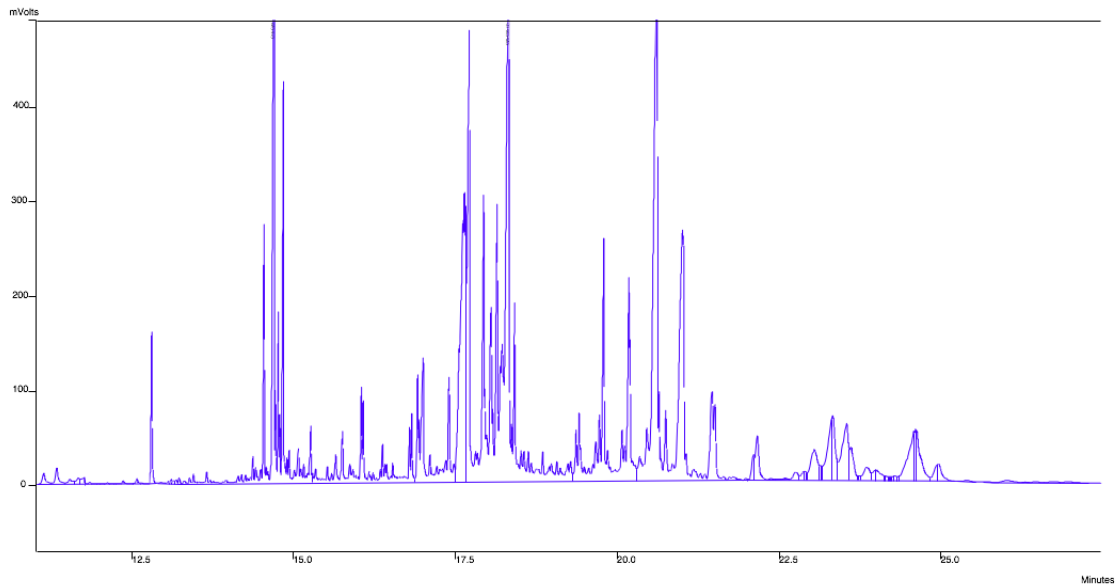
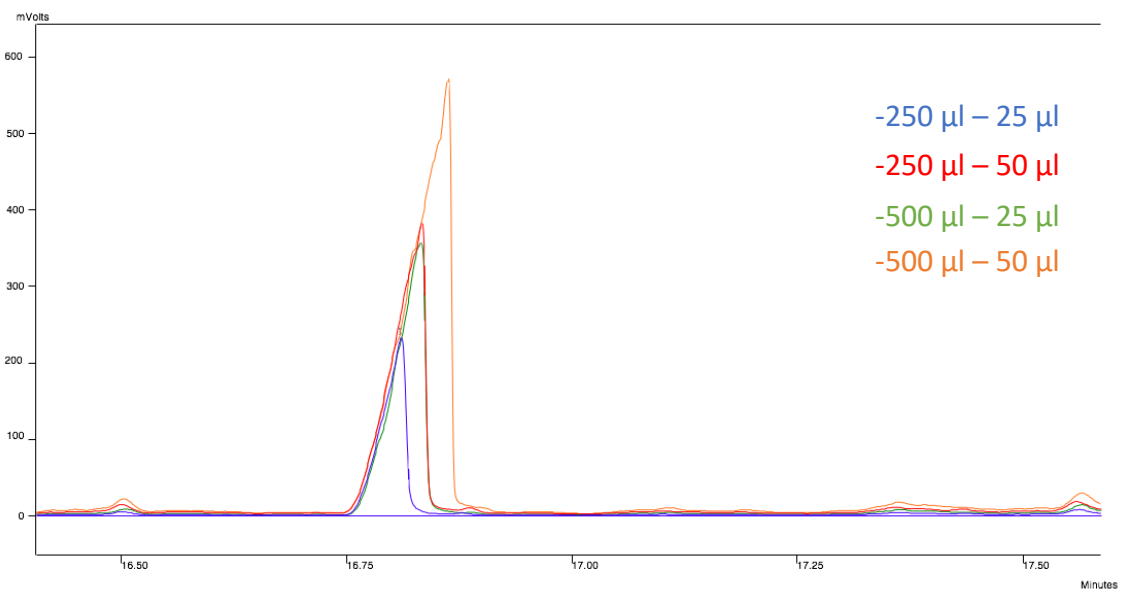


Figura 14. Cromatogramas obtenidos para MOSH y MOAH, respectivamente, en aceite de girasol refinado.

También se evaluó la cantidad de muestra a ser utilizada y la cantidad de muestra que se inyecta. Cada muestra se preparó pesando 0,5 g de muestra de aceite y añadiendo 100 μ L de patrón interno y 400 μ L de disolvente (*n*-hexano:tolueno 1:1 v/v). Se realizaron 2 ensayos a 25 mg/kg de patrón, introduciendo en el cartucho de SPE un total de 250 μ L y 500 μ L de la mezcla e inyectando en el cromatógrafo 25 μ L y 50 μ L a fin de evaluar si con la citada cantidad de aceite se saturaba el sistema cromatográfico. La **Figura 15** muestra los resultados obtenidos con las dos cantidades de muestra ensayadas.



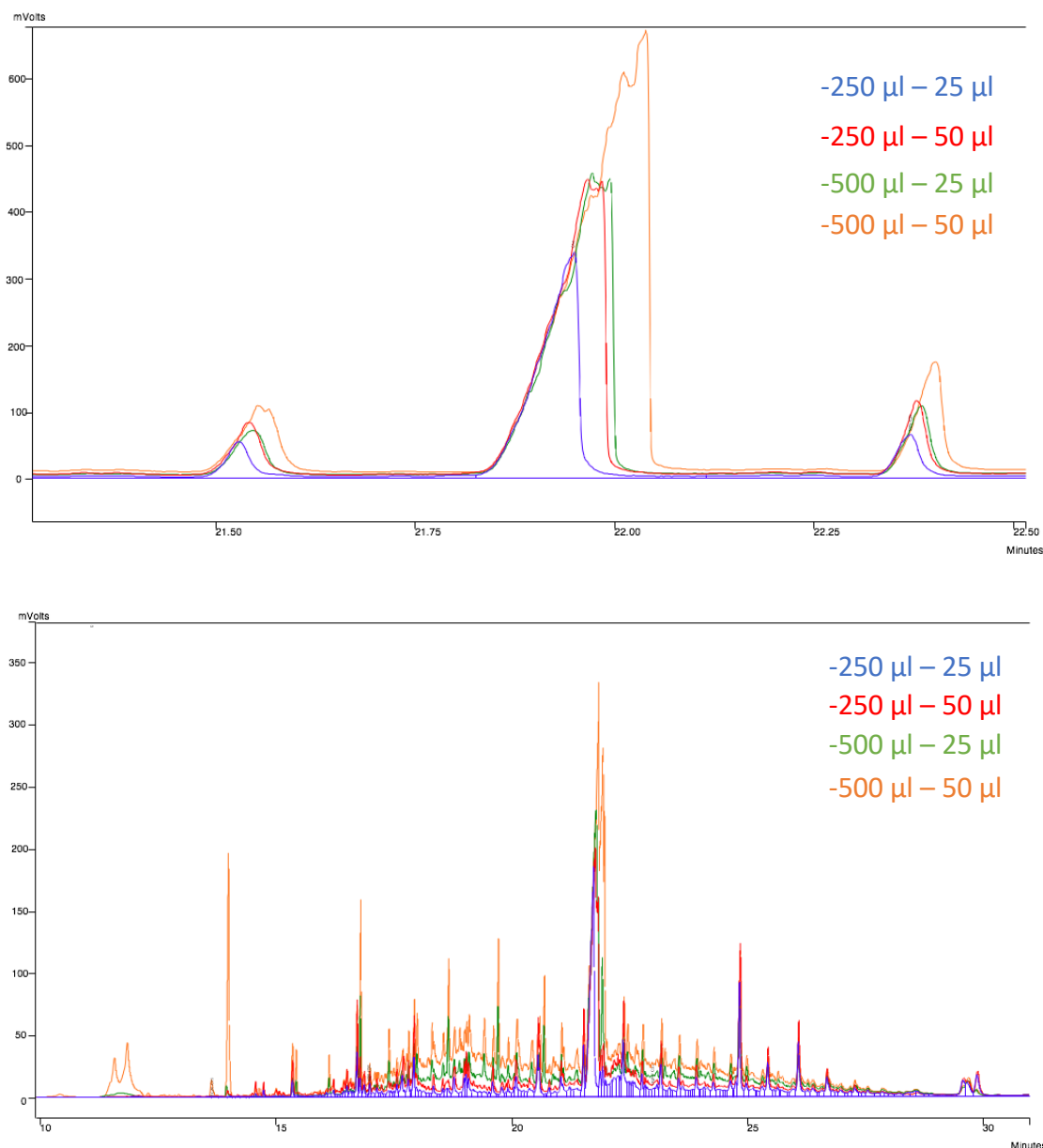


Figura 15. Cromatogramas obtenidos para distintas cantidades de muestra introducidas en el cartucho y cantidad de muestra inyectada. Cromatograma superior, C18 en el análisis de MOSH; cromatograma central, colestano en el análisis de MOSH; cromatograma inferior, cromatograma completo en el análisis de MOAH.

Los dos primeros cromatogramas corresponden a las señales obtenidas para los compuestos C18 y Colestano, respectivamente, compuestos de interés en el análisis de MOSH. Se muestran a modo de ejemplo como detalles del comportamiento observado durante el experimento. En ellos podemos ver que cuando introducimos en el cartucho de SPE 250 µL de muestra y inyectamos 25 µL y 50 µL no encontramos prácticamente diferencia. Mientras que, cuando introducimos 500 µL de muestra en el cartucho y inyectamos 25 µL y 50 µL observamos que sí hay diferencia en la sensibilidad del método analítico observando que la mayor sensibilidad obtenida de entre estas dos opciones es cuando inyectamos 50 µL de muestra.

El último cromatograma, el correspondiente a un cromatograma completo del análisis de MOAH, en el cual podemos observar la misma tendencia, cuando añadimos 500 μL en el cartucho de SPE y inyectamos 50 μL es cuando obtenemos una mayor sensibilidad. Por ello, en los siguientes experimentos utilizamos estas condiciones tanto de cantidad de muestra como de cantidad de extracto inyectado.

6.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Una vez optimizada la metodología de análisis se procedió a su validación con la finalidad de conocer estadísticamente su comportamiento y validez analítica. Los parámetros de validación estudiados fueron: veracidad (expresada como porcentaje de recuperación), precisión intradía, precisión interdía y LOQ. No se evaluó linealidad porque el método de calibración fue mediante el uso de patrón interno.

Para evaluar la veracidad y precisión intradía del método, 5 alícuotas de 0,5 g de una muestra de aceite de oliva virgen extra fueron fortificadas añadiéndoles la cantidad necesaria del mix de alcanos para que tuviesen una concentración total final de los mismos de 25 mg/kg (considerados desde C16 a C40) y del mix de PAH para obtener la misma concentración. Las muestras fueron extraídas y procesadas con el método propuesto y la cuantificación se realizó utilizando un patrón de C18 que se añadía a 100 mg/kg (cuantificación de MOSH) y utilizando TBB que también se añadía a una concentración de 100 mg/kg (cuantificación de MOAH). La señal cromatográfica empleada para cuantificar los MOSH requería restar previamente la señal de C18 del blanco y la del mix de alcanos. El proceso fue repetido también a una concentración de estudio de 100 mg/kg. Los resultados se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 10. Veracidad (R%) y precisión expresada como intradía e interdía del método analítico para MOSH.

25 mg/kg			100 mg/kg		
R %	RSD %	RSD %	R %	RSD %	RSD %
promedio	intradía	interdía	promedio	intradía	interdía
95,6	18,5	22,3	94,6	16,2	20,1

Tabla 11. Veracidad (R%) y precisión expresada como intradía e interdía del método analítico para MOAH.

25 mg/kg			100 mg/kg		
R %	RSD %	RSD %	R %	RSD %	RSD %
promedio	intradía	interdía	promedio	intradía	interdía
87,0	8,2	20,5	91,9	7,3	17,5

Los datos experimentalmente obtenidos demuestran que la recuperación promedio obtenida tanto para MOSH como para MOAH se puede considerar cuantitativa (comprendida entre 87,0 y 95,6%) y las precisiones intradía fueron en todo caso menores de 18,5%. La precisión interdía se evaluó estudiando muestras preparadas y analizadas

en 5 días consecutivos y como puede observarse en las **Tablas 10 y 11**, fue inferior al 22,3 % en todos los casos.

Para el cálculo del LOQ, se fortificó unas alícuotas (n=3) de una muestra de aceite de oliva virgen extra con una concentración total de alcanos (considerados desde C16 a C40) de 1 mg/kg y de PAH de 1 mg/kg. Los resultados de recuperación al analizar dicha concentración y tras restar el blanco fueron 92,4% para MOSH y 82,9% para MOAH con una precisión de 20,3% y 17,4%, respectivamente. Los valores de recuperación obtenidos, así como la precisión intradía obtenida para dicha concentración, nos ayudó a establecer el LOQ del método propuesto en ese valor de concentración.

6.3 APLICACIÓN DEL MÉTODO

A fin de evaluar la aplicabilidad del método analítico desarrollado, se analizaron 5 muestras reales de aceites de oliva virgen extra obtenidos en supermercados locales. Los resultados obtenidos fueron los mostrados en la **Tabla 12**:

Tabla 12. Resultados obtenidos para MOSH y MOAH totales en muestras de aceite de oliva virgen extra reales.

Número de muestra	MOSH (mg/kg)	MOAH (mg/kg)
1	30,8	2,9
2	28,4	3,1
3	8,3	<LOQ
4	19,4	2,8
5	29,5	3,5

Adicionalmente, se analizaron 3 muestras de aceite de oliva suministradas por un laboratorio especializado en el análisis de aceites y grasas de la provincia de Jaén a modo de ejercicio intercomparatorio. Solo pudieron compararse los resultados obtenidos para la determinación de MOSH ya que el laboratorio de Jaén no analizó los MOAH. El laboratorio con el que se realizó el ejercicio de intercomparación indicó que una de las muestras era aceite de oliva virgen extra (referencia 11574), otra era aceite de oliva refinado (referencia 14920) y la tercera aceite de orujo de oliva refinado (referencia 14921). Los resultados se muestran en la **Tabla 13**:

Tabla 13. Resultados obtenidos en el análisis intercomparativo de MOSH en diferentes tipos de muestras de aceite de oliva.

Número de muestra	MOSH UAL (mg/kg)	MOSH Jaén (mg/kg)	Variación %
11574	6,1	7,5	-18,6
14920	72,2	64,3	+12,2
14921	122,4	117,0	+4,6

En general, los resultados obtenidos en la UAL fueron ligeramente superiores a los obtenidos en el laboratorio de Jaén excepto para la muestra 11574, en los que fueron algo inferiores. En cualquier caso, la variación obtenida entre los resultados de los dos

laboratorios nunca fue superior al 18,6 % (valor absoluto) lo cual se puede interpretar como aceptable. Además, se sospecha que dicha diferencia se debe fundamentalmente a que el método empleado por el laboratorio de Jaén tenía un LOQ de 5 mg/kg, significativamente superior al propuesto en este trabajo. La muestra 11574 presentaba una concentración de MOSH próxima al LOQ del laboratorio de Jaén.

En la **Figura 16**, se muestran los cromatogramas obtenidos para las citadas muestras.

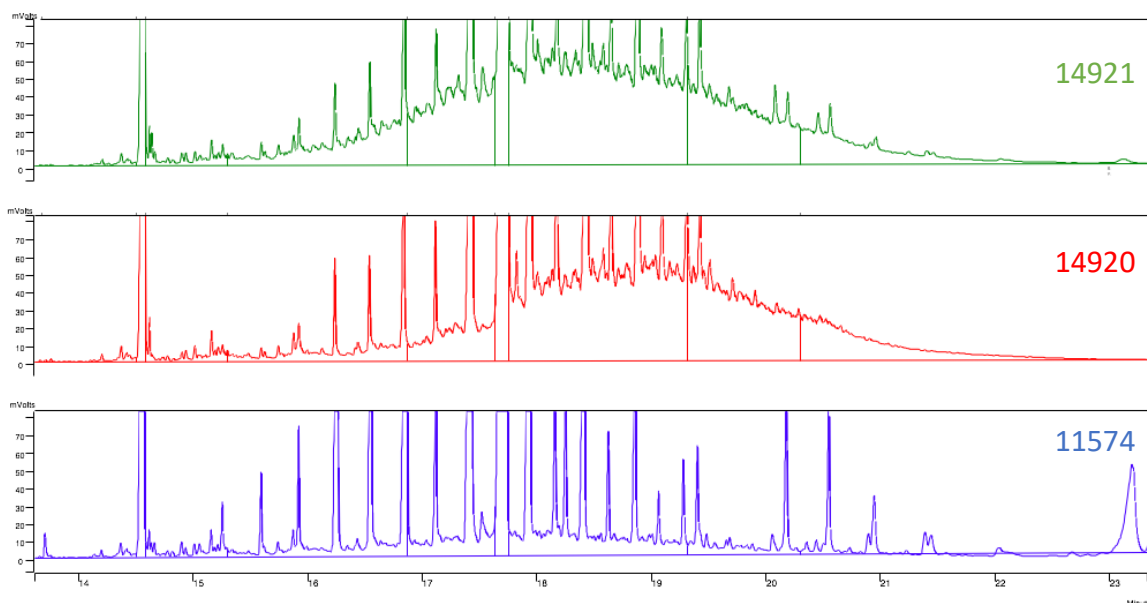


Figura 16. Cromatogramas obtenidos para el análisis de muestras reales.

7. CONCLUSIONES

En el presente estudio se ha desarrollado un método analítico para la determinación cuantitativa de MOSH y MOAH en aceite de oliva de diversos tipos. Para ello, se ha llevado a cabo una separación de la fracción MOSH y la fracción MOAH del aceite mediante SPE *off-line* y posterior determinación mediante GC-FID. Se ha comprobado que para alcanzar valores de sensibilidad adecuados se recomienda utilizar la técnica de inyección LVI, la cual fue optimizada convenientemente, al igual que el proceso de evaporación en el rotavapor para minimizar las potenciales pérdidas de hidrocarburos de alta volatilidad. El método de extracción *off-line* resultó adecuado y razonablemente rápido y evita a los laboratorios tener que invertir en un equipo de cromatografía de líquidos de alta presión que sea acoplado *on-line* a un GC-FID y cuyo coste es tremendamente elevado (superior a los 100.000 euros). Además, dicha instrumentación tiene un alto coste de mantenimiento por la gran cantidad de disolventes que se requiere. La separación de fracciones MOSH/MOAH se ha llevado a cabo de manera plena y efectiva evitando interferencias de una sobre la otra gracias al empleo de 6 g de sílica argentada al 1%. La preparación de cartuchos, si bien se realiza de manera manual en el laboratorio, ha resultado rápida y reproducible como demuestran los datos de precisión intra- e inter-día del método propuesto (inferior al 18,5 y 22,3%, respectivamente).

Dichos valores de precisión, junto con los de recuperación (comprendidos entre 87 y 95,6%) se consideran excelentes teniendo en cuenta la complejidad del método analítico y de la matriz a analizar. También se consideran adecuados los LOQ calculados (1 mg/kg), significativamente mejores que la mayoría de los métodos *off-line* ya publicados que suelen oscilar entre los 5 y 15 mg/kg³¹ y en el rango de concentraciones exigidos en los laboratorios centroeuropeos más sensibles y que emplean la metodología *on-line*.

La aplicación del método propuesto al análisis de muestras de aceite de oliva adquiridas en supermercados locales demostró que es válido para el análisis de muestras reales, encontrando concentraciones de MOSH que oscilaron entre 8,3 y 30,8 mg/kg para MOSH y entre <LOQ y 3,5 mg/kg para MOAH. Además, a fin de verificar la capacidad del método desarrollado, se realizó para MOSH un ejercicio de intercomparación con uno de los mejores laboratorios de aceites de España de la provincia de Jaén. Los resultados al analizar 3 muestras diferentes (un aceite de oliva virgen extra, un aceite de oliva refinado y un aceite de orujo de oliva refinado) demostraron que los resultados eran similares con variaciones inferiores al 18,6% en el peor de los casos. Sin embargo, a diferencia con el método del citado laboratorio, el LOQ del método analítico que se propone en el presente trabajo resultó ser 5 veces menor que el del laboratorio de Jaén con la consiguiente mejora en fiabilidad en el análisis de muestras reales a baja concentración. Además, la metodología desarrollada permite el análisis de MOAH también, a diferencia del de Jaén que solo analiza los hidrocarburos alifáticos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. <https://www.colesterolfamiliar.org/habitos-de-vida-saludables/dieta-y-nutricion/grasas-y-aceites/>
2. http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/amplificacion/aceites_minerales.htm
3. <https://teleoliva.com/aceite-oliva-refinado-se/>
4. Reglamento (CE) nº 1513/2001 del Consejo, de 23 de julio de 200, En lo que respecta a la prolongación del régimen de ayuda y la estrategia de la calidad para el aceite de oliva (DOL 201 de 26.7.2001)
5. EFSA. 2012. Scientific Opinion on mineral oil hydrocarbons in food. EFSA Journal. 10(6), 2704.
6. JECFA. 1995. Evaluation of certain food additives and contaminants: Forty - fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series. 859
7. Biedermann M., Grob K. "On-line coupled high performance liquid chromatography–gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 1: Method of analysis" *Journal of Chrom. A* **2012**, 1255, 56
8. Barp L.; Kornauth C.; Wuerger T.; et al. "Mineral oil in human tissues" Part 1: Concentrations and molecular mass distributions. *Food Chem Toxicol.* **2014**, 72, 312.
9. Barp L.; Kornauth C.; Würger T.; Rudas M.; Biedermann M.; Reiner A.; Concina N. and Grob K.; "Mineral oil in human tissues, Part I: Concentrations and molecular mass distributions" *Food Chem. Toxicol.*, **2014**, 72, 312.

10. Purcaro G.; Barp L.; Moret S.; "Determination of hydrocarbon contamination in foods", *Anal Methods*, **2016**, 8, 5755.
11. Cert A.; Romero A.; Mateos R.; Alcudia-González F.; Espartero J.L.; Trujillo Pérez-Lanzac M.; "Procedimiento de obtención de aceites o grasas de alto contenido antioxidante" *Grasas y aceites*, **2012**, 58, 125
12. <http://www.jatello.com/noticias/63-contaminantes-en-aceite-de-oliva-ii-mosh-y-moah>
13. Rodríguez-Acuña R.; Pérez-Camino M.; Cert A.; Moreda W. ; "Sources of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in Spanish virgin olive oils", *Food Additives & Contaminants: Part A*, **2008**, 25, 115
14. Reglamento (CE) n.º 333/2007 de la Comisión, de 28 de marzo de 2007, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo(a)pireno en los productos alimenticios (DO L 88 de 29.3.2007, p. 29).
15. Reglamento (CE) n.º. 2023/2006 de la Comisión, de 22 de diciembre 2066, sobre buenas prácticas de fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos (DO L 384 de 29.12.2006, p.75)
16. Camel, V; "Solid Phase Extraction of trace elements". *Spectrochemica Acta*, Part B, **2003**, 58, 1177
17. C.F. Poole; Solid-phase extraction, *Encyclopedia of Separation Science*, 3, Academic Press, Cambridge, MA **2000**, p. 1405.
18. Rouessac F.; Rouessac A. "Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas". Mc Graw Hill. Madrid. **2003**, p. 165
19. Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., "Principios de análisis instrumental" Cengage Learning Editores, Mexico D.F., **2008**, p.356
20. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf
21. <http://blog.cromlab.es/tecnicas-de-inyeccion-en-hrgc-seleccione-el-inserto-adeecuado/>
22. https://www.abellolinde.es/es/images/Cromatograf%C3%ADa%20de%20Gases%20Ionizaci%C3%B3n%20y%20Termoi%C3%B3nico%2019007-01_tcm316-120153.pdf
23. Jorgensen, A.D.; Picel, K. C.; & Stamoudis, V.C. "Prediction of gas chromatography flame ionization detector response factors from molecular structures". *Analytical Chemistry*. **1990**. 62, 683.
24. <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/flame-ionization-detector-capabilities-0001>
25. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/111945/2015.Supersedes SANCO/112571/2013.Implemented by 01/001/2016.EEUROPEAN COMMISSION.
26. "V. Barwick (Ed), *Eurachem/CCITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry*": An Aid to Accreditation (33rd ed. **2016**). Available from www.eurachem.org
27. ISO, *International Organization for Standardization*) (ISO/IEC 17025:2005, **2005**, General requirement for the competence of testing and calibration laboratories.
28. Zoccali M., Barp. L., Beccaria M., Sciarrone D., Purcaro G., Mondello L.; Improvement of mineral oil saturated and aromatic hydrocarbons determination

- in edible oil by liquid-liquid-gas chromatography with dual detection. *J. Sep. Sci.* **2016**, 39, 623.
29. <http://www.chemiservice.it/en>
 30. BfR (German Federal Institute for Risk Assessment). **2012**. “Determination of hydrocarbons from mineral oil (MOSH & MOAH) or plastics (POSH & PAO) in packaging materials and dry foodstuffs by solid phase extraction and GC-FID”, Available from <https://www.bfr.bund.de/cm/349/determination-of-hydrocarbons-from-mineral-oil-or-plastics.pdf>
 31. Lingling L.; Hua H.; Yanwen W.; Bingning L.; Ouyang J.; “*Offline Solid-phase Extraction Large-volume Injection-Gas chromatography for the Analysis of Mineral Oil-saturated Hydrocarbons in Commercial Vegetable Oils*”. *Journal of Oleo Science*, **2017**, 66, 981.
 32. Gomez-Coca RB, Pérez-Camino MC, Moreda W. “Determination of saturated aliphatic hydrocarbons in vegetable oils”. *Grasas Aceites*. **2016**. 67, 14.
 33. Sabrina M, Barp L, Grob B, S.Conte L. Optimised off-line SPE-GC-FID method for the determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) in vegetable oils. *Food Chemistry* **2011**, 129, 1898.
 34. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Methodology, adopted in 1996, Geneva.

9. ACRÓNIMOS

MOSH: Mineral Oil Saturated Hydrocarbons
MOAH: Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons
MOH: Mineral Oil Hydrocarbons
PAH: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
SPE: Solid Phase Extraction
LLE: Liquid-Liquid Extraction
GC: Gas Chromatography
FID: Flame Ionization Detector
LVI: Large Volumen Inyection
AOV: Aceite de Oliva Virgen
AOVE: Aceite de Oliva Virgen Extra
Cho: Colestano
Per: Perileno
TBB: 1,3,5-tri-tert-butylbenceno
JECFA: Joint FAO/Who Expert Committee on Food Additives
EFSA: Autoridad Europea de Sanidad Alimentaria
CE: Comunidad Europea
DAKKS: Die Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH
ENAC: Entidad Nacional de Acredicatóción
SANTE: Acrónimo del francés Santé Consumers
ISO: International Organization for Standarization
LOQ: Límite de cuantificación
LOD: Límite de detección