

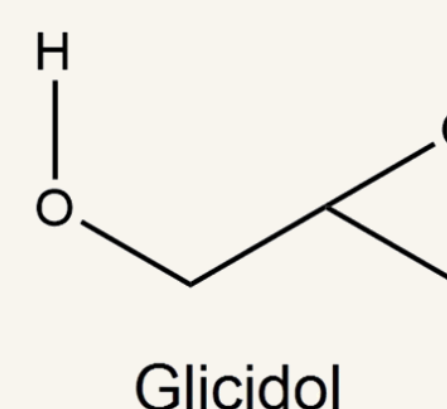
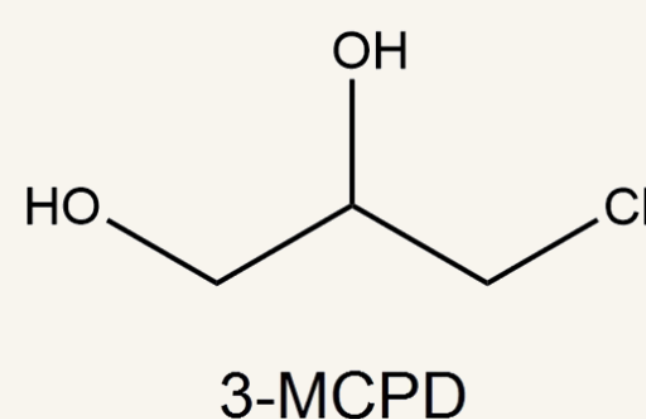
DETERMINACIÓN DE ÉSTERES DE 3-MONOCLOPROPANODIOL (3-MCPD) Y ÉSTERES GLICIDÍLICOS EN ACEITE DE OLIVA

José L. Hidalgo-Ruiz, Roberto Romero-González, José Luis Martínez Vidal, Antonia Garrido French
Departamento de Química y Física, Área de Química Analítica, Universidad de Almería, Centro de Investigación en Biotecnología Agroalimentaria (CIAIMBITAL), Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Carretera de Sacramento s/n, Almería
jhr228@ual.es, Tlf: +34-950-214-720, Fax: +34-950-015-008.



Introducción

El proceso de refinado del aceite debe realizarse cuando una o más características fisicoquímicas u organolépticas no se encuentran dentro del rango permitido. Este proceso elimina sabores, colores, olores y componentes no deseados que afectan negativamente a la calidad del aceite¹. En este proceso se produce una reacción de ácido clorhídrico con triacilglicérols, fosfolípidos y glicerol y, como consecuencia directa, se forma 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD). El glicidol está asociado a ellos y suele formar monoésteres con ácidos grasos durante el proceso de refinado². La Unión Europea ha establecido recientemente un límite de 1000 µg/kg para los ésteres de glicidilo en los aceites y grasas comestibles, así como un límite de 1250 µg/kg (2500 µg/kg para aceites de orujo) para la suma de ésteres de 3-MCPD en aceites y grasas vegetales³. Para analizar los ésteres de 3-MCPD y ésteres de glicidilo se distingue entre métodos directos e indirectos. Los métodos indirectos transforman dichos ésteres en 3-MCPD y glicidol libres, mientras que los con los directos, como el que se ha desarrollado y validado en este estudio mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con analizador de triple cuadrupolo (LC-QqQ-MS/MS), se pueden analizar cada uno de esos ésteres de manera individual.



Método de extracción

Preparación de la muestra

Pesar 1 g de aceite, añadir 50 µl de una disolución de patrones internos a 10 mg/l. Enrasar a 5 ml con una disolución de tert-butil metil éter:acetato de etilo (8:2, v/v).

Homogeneización

Homogeneizar en vórtex durante 30 segundos y poner en ultrasonidos durante 10 minutos.

Extracción

Transferir 3 ml a un tubo Falcon que contiene 300 mg de la siguiente mezcla de sales: 2 mg de Si-SAX, 148 mg de PSA y 150 mg de Z-sep+. Tapar y agitar. Mezclar en agitador rotatorio 10 minutos.

Preparación para análisis

Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm y filtrar en filtro de nylon de 0,2 µm en un vial e inyectar.

Instrumental

Cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas usando como analizador un triple cuadrupolo (QqQ), siendo el modo de ionización, electronebulización (ESI), UHPLC-QqQ-MS/MS



UHPLC-QqQ-MS/MS

Condiciones Cromatográficas

Columna: Zorbax Plus C18 (100 × 2,1 mm, tamaño de partícula de 1,8 µm)
Tª Columna: 25 °C
Fase móvil: Fase binaria metanol:H₂O (90:10, v/v) (A) e isopropanol:H₂O (98:2, v/v) (B) ambas con 2 mM de formiato amónico y 0,05% (v/v) de ácido fórmico.
Flujo: 0,2ml/min
Volumen de inyección: de 5 µl
Tiempo de análisis: 22 min

Gradiente de elución

Tiempo (min)	% A	% B
0,00	90	10
3,00	90	10
14,50	30	70
20,50	30	70
22,00	90	10

Condiciones MS

Voltaje del capilar: 3500 V
Voltaje del cono: 500 V
Temperatura del gas de la fuente: 325 °C
• Flujo: 5 l/min
Temperatura del gas de secado: 400 °C
• Flujo: 11 l/min
Presión nebulizador: 45 psi

Parámetros de validación

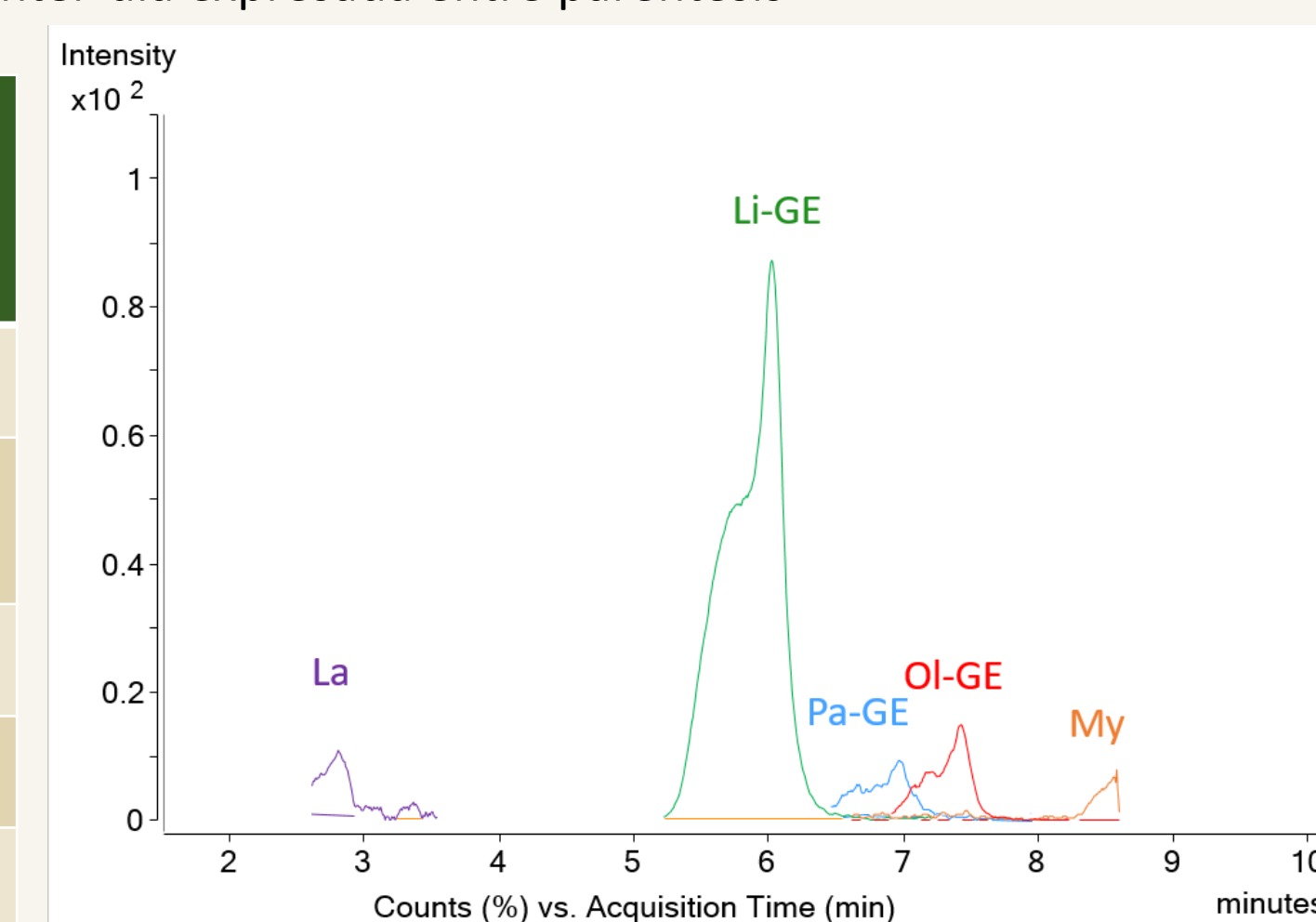
Compuestos	Recuperación (%) ^a	Precisión intra-día (%)	Límite de cuantificación (µg/kg)
Ésteres de 3-MCPD	71,8-119,9	5,0-19,6 (<19,8) ^b	10-100
Ésteres glicidílicos	95,6-106,8	9,0-19,1 (<19,0)	10-50

^a Recuperaciones y precisión calculadas en base n=5, a 10 y 200 µg/kg
^b Precisión inter-día expresada entre paréntesis

Análisis de resultados

El método desarrollado se aplicó a la determinación de 26 ésteres de 3-MCPD y ésteres glicidílicos en las 20 muestras de aceite analizadas. Según la normativa vigente, los resultados se deben expresar como suma de ésteres de 3-MCPD y ésteres glicidílicos. Se obtuvo un máximo de contaminación de ésteres de 3-MCPD a 2515 µg/kg en una muestra de aceite de maíz y un máximo de ésteres glicidílicos a 7840 µg/kg en una muestra de aceite de soja. Sólo una muestra de aceite de oliva superó el límite máximo permitido de ésteres de 3-MCPD con un valor de 1715 µg/kg. Se observó que los ésteres obtenidos son los provenientes del ácido oleico, linoleico y linoléico, mayoritarios en los aceites vegetales. Finalmente, un 25% de las muestras superaron límites establecidos.

Tipo de aceite	Ésteres de 3-MCPD (µg/kg)	Ésteres glicidílicos (µg/kg)
Vegetal	83-2515	154-7840
Aceite de oliva virgen extra	36-137	53-72
Aceite de oliva	194-1715	<LOQ-946
Aceite de oliva refinado	106-165	509-604
Aceite de orujo refinado	662-1300	449-1286



Aceite de soja contaminado con 7840 µg/kg de ésteres glicidílicos y 1378 µg/kg de ésteres de 3-MCPD.

Conclusiones

- Se desarrolló un método analítico sensible para la determinación de 26 ésteres de 3-MCPD y ésteres glicidílicos en aceites vegetales.
- Se optimizó un método de extracción basado en el uso de disolventes y limpieza del extracto basada en el uso de sales limpiadoras de interferentes grasos. Se evaluaron los parámetros de validación, cumpliendo con los criterios establecidos, con límites de cuantificación entre 10 y 100 µg/kg.
- El análisis de los extractos se realizó mediante LC-QqQ-MS/MS con un tiempo de solo 22 minutos.
- Se analizaron un total de 20 muestras, encontrando contaminación por encima de los límites establecidos en un 25% de ellas.
- Debido a la posible contaminación que los aceites pueden sufrir por estos compuestos, su seguimiento parece necesario y este método es una herramienta robusta y fiable para controlarlas.

Referencias

1. L. Carrillo, 1. Mohos y Micotoxinas, Mohos y Micotoxinas, 1991, 1-24.
2. I.A. for R. on C. World Health Organization, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene., IARC Press. 2002, 82, 1-556.
3. European Commission, COMMISSION REGULATION (EU) 2020/1322 of 23 September 2020 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of 3-monochloropropanediol (3-MCPD), 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in certain foods, Official Journal of the European Union. 2020, 1332, 2-5.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las entidades participantes del proyecto, especialmente al Laboratorio Tello por proporcionar gran parte de las muestras. Además, agradecen al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España y FEDER (proyecto ref. RTC-2017-6170-2) por el apoyo financiero.