



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales
Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

Determinación de los niveles de contaminantes emergentes en aceites vegetales

Alumno: Juan Parras Armenteros

Junio, 2016



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales
Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

Determinación de los niveles de contaminantes emergentes en aceites vegetales

Alumno: Juan Parras Armenteros

Junio, 2016

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Cloropropanoles	3
2.2 Glicidol	7
2.3 Mecanismos de formación del 3-MCPD y glicidol	8
2.4 Estrategias de mitigación	11
2.5 Niveles de concentración en alimentos	12
2.6 Métodos de análisis	14
2.6.1 Métodos directos	15
2.6.2 Métodos indirectos	16
2.6.3 Comparación entre métodos directos e indirectos	18
2.6.4 Requerimientos de los métodos de análisis	19
3. CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS	19
4. OBJETIVOS	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Reactivos	24
5.1.1 Reactivos y disolventes	24
5.1.2 Disoluciones	25
5.2 Materiales e instrumentos	26
5.3 Método analítico	27
5.3.1 Preparación de la muestra	28
5.3.1.1 Ensayo A	28
5.3.1.2 Ensayo B	29
5.3.2 Medida analítica	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1 Principio del método	30
6.2 Pruebas preliminares	32
6.3 Optimización de variables	35
6.3.1 Estudio de la influencia de la cantidad de PBA.	36

6.3.2 Estudio de la influencia de la naturaleza de la sal no clorada y del tiempo de sonicación	37
6.3.3 Estudio de la influencia del disolvente utilizado en la etapa de clean-up.	38
6.4 Parámetros analíticos	39
6.4.1 Calibración	40
6.4.2 Determinación del factor de conversión (t) del glicidol en 3-MCPD	41
6.4.3 Límites de detección y cuantificación	42
6.4.4 Evaluación de la precisión	43
6.5 Aplicaciones analíticas	43
7. CONCLUSIONES	45
8. BIBLIOGRAFÍA	45

1. RESUMEN/ ABSTRACT

En este Trabajo Fin de Grado se ha desarrollado la validación de un método analítico para la determinación en grasas y aceites de 3-monocloropropanodiol y glicidol, dos contaminantes clasificados como cancerígenos por la *Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer*.

En los últimos años ha habido un creciente interés por el estudio de estos compuestos ya que, aunque inicialmente se encontraron en proteína vegetal hidrolizada y salsa de soja, más tarde se han detectado en alimentos de consumo habitual tales como pan, café, aceites, grasas, bollería, carnes y pescados cocinados, etc. De hecho, la Unión Europea emitió recientemente una *Recomendación* a los Estados Miembros acerca de la necesidad de evaluar los niveles de concentración de estos contaminantes en determinados alimentos, así como desarrollar nuevos métodos de análisis para su determinación y mejorar los ya propuestos en bibliografía. La finalidad de ello es la de establecer posiblemente en el futuro concentraciones máximas tolerables de estos compuestos en diferentes alimentos, a fin de proteger la salud de los consumidores europeos.

Los métodos de análisis propuestos en bibliografía para la determinación de estos contaminantes son complicados y presentan numerosos inconvenientes, debido especialmente a la posibilidad de interconversión de unos compuestos en otros a lo largo de su desarrollo. Esto hace necesario un estricto control de las diferentes variables de trabajo a fin de obtener resultados veraces y reproducibles.

En este Trabajo se ha partido de uno de los métodos propuestos recientemente en bibliografía, basado en la técnica Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas, y se ha introducido una importante innovación al trabajar en modo Masas-Masas con trampa iónica. El método ha sido aplicado al estudio de los niveles de concentración de 3-monocloropropanodiol y glicidol en aceites vegetales y productos derivados, mostrando así su aplicabilidad.

The aim of this final Project is to develop the validation of an analytical method in order to evaluate in fats and oils bound 3-monochloropropanediol and glycidol. Both are two contaminants which have been classified as carcinogenic by the *International Agency for Research on Cancer*.

In recent years, the interest of the study about this subject has been increased. Firstly, these compounds were found just in hydrolyzed vegetable protein and soy sauce. However, nowadays they have been detected in wide range of food such as: bread, coffee, oil, grease, pastries, meats and fish, and so on. Indeed, the European Union issued a Recommendation to Member States about the need to assess the concentration levels of these contaminants in certain foods, as well as to develop new analytical methods for their determination and to improve those already proposed in the bibliography. Probably the objective will be to establish the maximum tolerable concentrations of these compounds in different foods in order to protect the health of European consumers.

Analytical methods proposed are ambiguous and have many disadvantages, due to the possibility of interconversion of compounds along the method. Strict control of different variables is required in order to obtain trustworthy result.

This Project is based on one of the methods proposed in bibliography, based on the Gas chromatography- Mass Spectrometry technique. An important innovation has been introduced since Mass-Mass mode with ion trap has been the working mode used. The method has been applied in the study of 3-monochloropropanediol and glycidol concentrations in vegetable fats and derivatives products, demonstrating its applicability.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Cloropropanoles

Los cloropropanoles son una familia de compuestos tóxicos que se generan durante la producción de algunos alimentos. Estos compuestos están formados por una cadena de tres átomos de carbono, átomos de cloro y grupos alcohol. Son cinco los cloropropanoles que se encuentran habitualmente en los alimentos, distinguiéndose entre sí por el número de átomos de cloro, de grupos hidroxilo y de su posición: 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD), 2-monocloropropano-1,3-diol (2-MCPD), 1,3-dicloropropanol (1,3-DCP), 2,3-dicloropropanol (2,3-DCP), y 3-cloropropan-1-ol. (Figura 1).

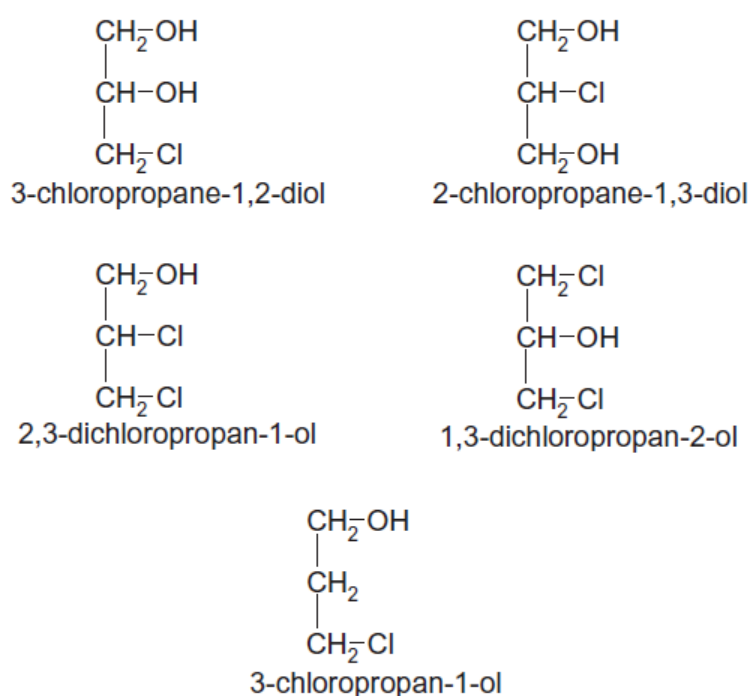


Figura 1: Cloropropanoles encontrados en proteína vegetal hidrolizada
Fuente: (Hamlet, 2008)

Algunos de sus efectos sobre la salud humana son:

- El 3-MCPD es cancerígeno.
- El 1,3- DCP es hepatóxico (nocivo para las células del hígado).

- Del 2,3- DCP no se tienen muchos datos, pero se sabe que puede ser metabolizado para producir epiclorhidrina, y posteriormente glicidol, siendo ambos compuestos tóxicos.

Estos compuestos se detectaron por primera vez en proteína vegetal hidrolizada con ácido (PVH-ácido), y poco después en salsa de soja, donde se usaba la PVH-ácido como ingrediente. La PVH es usada para mejorar el sabor de los alimentos, permitiendo obtener un sabor más intenso y, por tanto, que los alimentos estén más sabrosos usando un número inferior de ingredientes. Para la fabricación de PVH se lleva a cabo un proceso en el que las proteínas de los vegetales se descomponen en sus respectivos aminoácidos constituyentes, empleando para ello altas temperaturas. En PVH se han encontrado diferentes cloropropanoles, siendo el 3-MCPD el que se detecta en mayor proporción, seguido del 2-MCPD, y por último en menor cantidad 1,3-DCP, 2,3-DCP y 3-cloropropan-1-ol.

Además de en PVH, estos contaminantes se encontraron posteriormente en grasas y aceites animales y vegetales refinados, y en los alimentos que los contienen. En aceites y grasas, los cloropropanoles se originan cuando los triglicéridos se hidrolizan a mono- y diglicéridos y éstos sufren luego una reacción de sustitución con átomos de cloro, siendo necesario para ello temperaturas superiores a 140°C. Por tanto, la fase de la refinación donde se generan los cloropropanoles (principalmente el 3-MCPD) es la desodorización, en la que se alcanzan temperaturas de 180-270°C a fin de eliminar compuestos volátiles que alteran el sabor o aroma de los aceites. En consecuencia, en los aceites vegetales que no requieren para su producción la refinación no se detectan cloropropanoles (Jedrkieicz et al., 2016), como es el caso del aceite de oliva virgen.

Los cloropropanoles se han encontrado también en aperitivos a base de patatas fritas, en margarina y bollería fina, etc., debido a que para su producción se utilizan aceites refinados. Así para la preparación de bollería fina se usa generalmente aceite de palma y para los aperitivos de patatas fritas aceite de girasol o aceite de oliva refinado. Estos son sólo algunos ejemplos de la gran cantidad de alimentos que pueden contener estos contaminantes, debido a la multitud de alimentos en los que para su producción se usan aceites vegetales refinados.

Estos contaminantes se encuentran también en una amplia gama de otros alimentos procesados que son sometidos a altas temperaturas como es el caso del pan, cereales, café, carne, etc., lo que sugiere que la formación puede ocurrir por una variedad de mecanismos. También se han detectado en productos alimenticios que no son sometidos a altas temperaturas, como las salchichas, salami y el pescado ahumado en frío. En el caso de salchichas y salami el 3-MCPD parece provenir de distintos tipos de resinas empleadas en su producción. En el caso de los productos ahumados, el 3-MCPD proviene del humo generado a partir de madera durante el proceso o del “humo líquido”, un ingrediente utilizado como aditivo que proporciona sabor ahumado a las comidas (Hamlet, 2008).

Los compuestos más importantes de esta familia de contaminantes desde el punto de vista de su ocurrencia en alimentos y efectos en la salud son dos cloropropanodiolos, el 3-MCPD y el 2-MCPD (Figura 2).

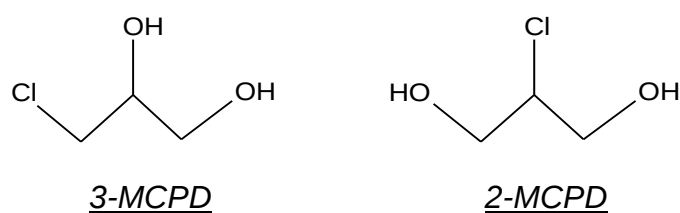


Figura 2: Estructuras del 3-MCPD y el 2-MCPD.

El 3-MCPD, detectado por Velisek en 1978 en PVH (Velisek, 1978), es el compuesto que se encuentra en mayor cantidad en los alimentos y el que ocupa la mayor parte de las investigaciones actualmente. Los estudios de toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad que se han realizado sobre el 3-MCPD en ratas y ratones, concluyen que el riñón y los testículos son los órganos principalmente afectados por la toxicidad de este compuesto, disminuyendo el rendimiento de la actividad inmunológica y causando infertilidad, lo que provoca cáncer de testículo y de riñón. En el caso del riñón, se produce por una dosis de ingesta incluso inferior a 1,1 mg/kg de peso corporal por día. La *Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer* (IARC) ha clasificado el 3-MCPD como “posible carcinógeno para humanos” (grupo 2B)” (IARC, 2012).

También se ha demostrado que el 3-MCPD tiene actividad mutagénica in vitro. En una serie de ensayos llevados a cabo sobre micronúcleos en la médula ósea de ratas y una síntesis no programada de ADN en un hígado de rata se ha demostrado que esta actividad expresada in vitro no se expresa in vivo (Robjohns et al., 2003). Por ello, los posibles tumores producidos por el 3-MCPD se producen por la existencia de una concentración por encima del umbral en el ser vivo que contenga dichos tumores.

En cuanto al 2-MPCD, en un estudio realizado en ratas en el que se le inyectaban dosis de 2, 16 y 30 mg/kg durante 28 días, se observó que con la dosis más altas se producían efectos graves en los músculos estriados, corazón, riñón e hígado. Sin embargo, a día de hoy no se ha podido comprobar el potencial toxicológico de este compuesto (Ermacora, 2014).

En aceites y grasas, el 3-MCPD y el 2-MCPD no sólo se encuentran libres sino también esterificados. La primera vez que se detectaron ésteres del 3-MCPD fue en mezclas modelo de ácido clorhídrico con triglicéridos, en fosfolípidos, en aceites de soja y en lípidos aislados de la harina de soja y gluten de trigo (Svejkovská et al., 2004). Los ésteres del 2- y 3-MCPD están presentes en aceites vegetales refinados y alimentos procesados a altas temperaturas que tienen bajo contenido en agua, altos niveles de cloruro sódico y que se almacenan durante largos períodos (FAO, 2007). También se han detectado estos ésteres en la leche de fórmula usada como alimento para bebés (Jedrkwicz et al., 2016), lo que actualmente supone uno de los mayores problemas a resolver.

La formación de ésteres del 2- y 3-MCPD en aceites vegetales refinados es similar a la de los acilglicerol, siendo estos últimos ésteres de ácidos grasos con glicerol.

De forma análoga, los ácidos grasos libres presentes en los aceites y grasas reaccionan con 2- y 3-MCPD formando ésteres. En el caso del 3-MCPD, dependiendo de la identidad del ácido graso, pueden formarse 14 monoésteres y 49 diésteres diferentes. De los resultados obtenidos en diferentes estudios, se puede afirmar que, en los alimentos que contienen ésteres del 3-MCPD la concentración de éstos es más elevada incluso que la de 3-MCPD libre.

En 2008 la Comisión Europea solicitó al *Panel Científico sobre Contaminantes en la Cadena Alimentaria (CONTAM)* de la *Autoridad Europea de Seguridad*

Alimentaria (EFSA) una Opinión Científica en relación con los altos niveles de ésteres 3-MCPD hallados en Alemania unos meses antes en aceites vegetales comestibles refinados, margarina, aceite para freír, pasta de avellanas para untar y preparados infantiles (porción grasa). Dicha solicitud al CONTAM tenía como fin apoyar a la Comisión Europea en la elaboración de su posicionamiento respecto al problema de la presencia de 3-MCPD en los condimentos líquidos con PVH-ácido, para la reunión del *Comité sobre Contaminantes de los Alimentos* del Codex en abril de 2008. El CONTAM informó acerca de que existían suficientes evidencias científicas acerca de que en humanos los ésteres de 3-MCPD y 2-MCPD son una fuente de 3-MCPD libre y 2-MCPD libre; esto es debido a que ambos liberan el 100% del contaminante al tracto gastrointestinal durante la digestión como consecuencia de su hidrólisis (reacción catalizada por las lipasas gastrointestinales). En marzo de 2016, EFSA ha emitido un nuevo informe científico sobre los peligros para la salud derivados de la presencia de estos contaminantes en los alimentos (EFSA, 2016)

2.2. Glicidol

El glicidol es un compuesto orgánico formado por un anillo epóxido y un grupo alcohol. En estado puro es un líquido viscoso y muy inestable. Este compuesto (Figura 3) tiene un carácter bifuncional que le permite tener variedad de usos industriales.

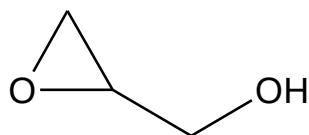


Figura 3: Estructura del glicidol

El glicidol es un irritante de la piel, los ojos, las membranas mucosas y el tracto respiratorio superior. La exposición a glicidol puede causar depresión del sistema nervioso central, seguida de estimulación del mismo; también puede dañar el ADN, causar mutaciones y provocar cáncer.

La IARC ha clasificado el glicidol como “probablemente carcinógeno para humanos” (grupo 2A) (IARC, 2000).

En lo que respecta a las exposiciones ocupacionales, la *Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA)* de EEUU ha establecido un límite de exposición permisible de 50 ppm durante una jornada de trabajo de ocho horas, mientras que el *Instituto Nacional para la Seguridad y Salud en el Trabajo (INSHT)* de España recomienda un límite de 25 ppm durante una jornada de trabajo de ocho horas.

Este compuesto fue detectado por primera vez en el aceite de palma (Weibhaar and Pertz, 2010), debido a su alto contenido en diglicéridos (4-12%) y a las elevadas temperaturas utilizadas en su refinación (270 °C), que ha de ser física debido a su alta acidez. Se ha encontrado también en otros aceites vegetales refinados, aunque en muy pequeñas cantidades. Al igual que el 3-MCPD y el 2-MCPD, en los aceites vegetales refinados los ésteres del glicidol se forman a partir de los diglicéridos; sin embargo se requieren en este caso temperaturas mucho más altas (por encima de 230 °C).

La liberación del glicidol desde sus ésteres en el tracto gastrointestinal se produce de forma similar a la del 2- y 3-MCPD, en una reacción catalizada por las lipasas gastrointestinales. En la actualidad, existe una gran preocupación con este compuesto ya que está presente, al igual que el 3-MCPD, en fórmulas infantiles.

En este Trabajo Fin de Grado los analitos objetos de estudio son el 3-MCPD y el glicidol, dada la relevancia de su presencia en los alimentos debido a su toxicidad y carácter carcinogénico.

2.3. Mecanismos de formación del 3-MCPD y glicidol

En los alimentos, el 3-MCPD se genera principalmente a través de 4 vías de formación (FAO, 2007):

a) Hidrólisis ácida de proteínas vegetales (PVH-ácido)

Los principales precursores de los cloropropanoles en las materias primas utilizadas para preparar PVH son: ácido clorhídrico, triglicéridos, fosfolípidos y glicerol.

A nivel comercial, la PVH se obtiene desde muestras vegetales llevando a cabo una hidrólisis con HCl 4–6M y una temperatura entre 100°C y 130°C durante 4-24h, todo esto seguido de una neutralización con hidróxido de sodio.

En este proceso el 3-MCPD se forma por la reacción del ácido con el aceite vegetal residual. Entre las materias primas donde ocurre esto podemos encontrar harina de soja, grano de soja, trigo, maíz, grano de semillas de colza y patatas.

b) Procesado térmico de los alimentos

En este caso, la causa de formación de 3-MCPD es la presencia de lípidos y cloruro sódico en la materia prima durante la fabricación de los alimentos o en el cocinado de éstos (horneado, asado a la parrilla, etc.). En alimentos como el pan, productos de panadería y malta los principales precursores son los fosfolípidos y el glicerol. El contenido de humedad de los alimentos también influye, siendo el glicerol el principal precursor en los alimentos con un bajo contenido en agua (menor al 15%) y la lecitina en alimentos con un contenido mayor de agua. También se forman monoésteres o diésteres de ácidos grasos de 3-MCPD, que son una fuente adicional de 3-MCPD.

La cantidad de glicerol que está disponible para convertirse en 3-MCPD va a depender de los ingredientes crudos y las condiciones previas al procesado del producto. Por ejemplo, en la fabricación de pan los componentes de la cebada o granos de trigo son suficientes para provocar la síntesis de 3-MCPD. No obstante, la cantidad de glicerol de la masa depende de la edad de la harina (puede ser fresca o llevar tiempo almacenada), la cantidad de levadura y el tiempo de reposo de la masa. Cuando se lleva a cabo el tostado del pan, las altas temperaturas hacen posible la hidrólisis de los triglicéridos y el glicerol resultante actúa como precursor del 3-MCPD.

Los factores que influyen principalmente en la formación del 3-MCPD en este caso son la temperatura y el pH. El 3-MCPD se forma a temperaturas superiores de 170 °C y es inestable a un pH mayor de 6. De hecho se ha comprobado que aditivos tales como el bicarbonato de sodio inhiben la formación del 3-MCPD o aceleran su degradación.

c) Hidrólisis de ésteres de ácidos grasos

Como se dijo anteriormente, la hidrólisis de los ésteres de ácidos grasos de 3-MCPD por acción de las lipasas representa otra fuente de éste en los alimentos debido a que liberan el 100% del contaminante in vivo.

Esta hidrólisis también puede producirse en el propio alimento, como es el caso del pan tratado con lipasa en el que se han encontrado concentraciones importantes de 3-MCPD debido a su liberación por hidrólisis de los ésteres durante el proceso de horneado.

d) Transformación de la epiclorhidrina

El origen del 3-MCPD puede ser ciertos tipos de resinas a base de epiclorhidrina resistentes a la humedad. Estas resinas son utilizadas en cubiertas de papel y celulosa, como por ejemplo envoltorios de salchichas, bolsitas de té y filtros de papel para el café. A fin de reducir al mínimo la exposición al 3-MCPD procedente de esta fuente, la UE ha establecido para la epiclorhidrina un límite máximo de migración específica en materiales y plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos de 1 mg/kg (UE, 2011).

En cuanto a la formación de glicidol, se ha informado recientemente de que existe una estrecha correlación entre los niveles de diglicéridos y la cantidad de ésteres de glicidol encontrados en el aceite de palma (Craft et al., 2012). Resultados similares se han encontrado en otros aceites obtenidos también de la pulpa de frutos, y que contienen altos niveles de diglicéridos. Además de los diglicéridos, hasta la fecha sólo se ha demostrado la existencia de otros precursores, los monoglicéridos. En los aceites refinados, los ésteres de glicidol se forman a partir de los diglicéridos en la etapa de desodorización, a partir de una temperatura de 230 °C (Destailats et al., 2012). Los mismos autores propusieron que el glicidol puede formarse a partir de diglicéridos por tratamiento térmico de éstos, que origina un mecanismo de reorganización interna del compuesto seguida de la eliminación de una molécula de ácido graso. En el caso de que el precursor sea un monoglicérido, el mecanismo de formación de glicidol es similar, eliminándose en este caso una molécula de agua.

2.4. Estrategias de mitigación

Las estrategias de mitigación requieren aclarar la relación entre la formación de 3-MCPD, glicidol y sus ésteres con los compuestos implicados y las condiciones del proceso. Se basan principalmente en introducir cambios en los procesos de producción, en la eliminación de los precursores procedentes de la materia prima o en la eliminación de los ésteres del producto ya preparado.

En el caso de productos de bollería, se ha intentado reducir el 3-MCPD libre mediante el aumento del pH de la materia prima, pero esto da lugar a la formación de acrilamida, otro contaminante no deseado (ILSI, 2009).

La optimización del proceso de refinado es el gran desafío para la mitigación de estos contaminantes en los alimentos. Como se comentó anteriormente, el proceso crítico de la refinación en el que se forman ésteres de 3-MCPD y de glicidol es la desodorización y los principales factores que afectan a esta formación son la presencia de iones cloruro, glicerol, tri, di y monoglicéridos, la temperatura y el tiempo.

Las estrategias actuales para reducir la presencia de ésteres del 3-MCPD y glicidol en aceites refinados son:

- Reducir los niveles de diglicéridos en aceites crudos cambiando las prácticas de cosechado, ya que se ha comprobado que la relación entre la formación de ésteres de 3-MCPD y de glicidol y el contenido de diglicéridos en el aceite es lineal (ILSI, 2009). Se ha demostrado que cuando el contenido en diglicéridos es mayor al 4% aumenta significativamente la formación de dichos ésteres. Por tanto, la recogida de fruto/semilla y su procesado posterior deben ser tales que se minimice la generación de diglicéridos.
- Lavar los aceites crudos a fin de remover los iones cloruro.
- Si es posible, llevar a cabo una refinación química en lugar de física. Debido a que en la desodorización a altas temperaturas se produce un aumento de los ésteres de glicidol y 3-MCPD, se ha recomendado el uso de un refinado químico en lugar de físico a fin de poder reducir la temperatura de esta etapa (ILSI, 2011). Además, parece que el hidróxido sódico utilizado en la refinación química para neutralizar el aceite remueve en gran medida los iones cloruro presentes.

- Usar tierras decolorantes neutras en lugar de activadas con ácido para minimizar los iones cloruro. El ácido clorhídrico puede provenir de las tierras decolorantes que son activadas con ácidos, por lo que el empleo de tierras naturales puede reducir significativamente la generación de ésteres de 3-MCPD.
- Retirar los ésteres del 3-MCPD y glicidol de los aceites refinados mediante adsorbentes. Una propuesta reciente es el uso de zeolita durante la desodorización, aunque se necesita una gran cantidad de ésta para la eliminación de los ésteres. También se ha ensayado el uso del silicato de magnesio en sistemas modelo, encontrando también una reducción de los ésteres de MCPD y glicidol (ILSI, 2011).

2.5. Niveles de concentración en los alimentos

El Comité Científico sobre la Alimentación Humana (SCF) de la UE estableció en el año 2001 un límite de ingesta diaria tolerable (TDI) de 2 µg por kg de peso corporal para el 3-MCPD; en 2007, el Instituto Alemán *Bundesinstitut Für Risikobewertung (BFR)* afirmó que con la ingesta de 100 g de grasa vegetal se superaba en 5 veces el TDI establecido. En 2006 la UE, en colaboración con el *Instituto Internacional de Ciencias de la Salud (ILSI)*, estableció un contenido máximo de 3-MCPD de 20 µg/kg en PVH y en salsa de soja (UE, 2006).

En 2013 la *EFSA* publicó un informe sobre la presencia de 3-MCPD en alimentos en Europa, en el que se hace una evaluación preliminar de los niveles de exposición de la población europea a este contaminante a través de la dieta. En este estudio, en el que se recogen los datos de 1235 muestras de alimentos analizadas por los Estados Miembros de la UE entre 2009 y 2011 (EFSA, 2013), se pone de manifiesto que los contenidos más altos de 3-MCPD se encuentran en la margarina y en el aceite de palma. En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de 3-MCPD encontradas en los aceites y grasas analizados y en algunos otros alimentos.

Estos datos están de acuerdo con los resultados encontrados por diferentes autores en los que se pone de manifiesto, que las grasas y aceites tanto animales como vegetales, con la excepción del aceite de nuez y productos derivados, son los alimentos que contienen una cantidad mayor de estos contaminantes (Weibhaar, 2011; Willits J., 2013).

Tabla 1: Concentraciones (mg/kg) de 3-MCPD en algunos grupos de alimentos entre 2009-2011.

Food groups ^(b)	Concentration range MB (LB-UB) (µg/kg) ^(e)	
	mean	P95
Almonds, sweet (roasted)	5(0 - 10) ^(b)	-
Animal and vegetable fats and oils	1 020(960 - 1 090)	4 400
Fats of mixed origin (*)	1 230(1 170 - 1 290)	-
Margarine and similar products (*)	1 500(1 480 - 1 530)	7 060
Margarine and similar products	1 640(1 620 - 1 650)	8 600
Margarine with other ingredients	590(520 - 660)	-
Vegetable fats and oils (* separating walnut oil – see below)	820(740 - 890)	3 700
Vegetable fats and oils refined	530(460 - 600)	-
Vegetable fats and oils unrefined	250(190 - 300)	-
Vegetable fats and oils unspecified refining	910(820 - 990)	4 260
Composite food	6.7(4 - 9.4)	-
Beans and meat meal (to be reconstituted)	5(0 - 10) ^(b)	-
Ready-to-eat soups (to be reconstituted) (*)	6.9(4.4 - 9.4)	-
Fish and other seafood	37(36 - 37)	-
Fish meat (smoked) (*)	37(36 - 37)	-
Food for infants and small children	100(90 - 110)	-
Follow-on formulae, liquid	13 ^(b)	-
Follow-on formulae, powder	1000 ^(b)	-
Infant formulae, liquid	54 ^(b)	-
Infant formulae, powder	300 ^(b)	-
Ready-to-eat meal for infants and young children (*)	17(2.8 - 28)	-
Grains and grain-based products	33(26 - 39)	98(90 - 98)
Bread and rolls (*)	25(24 - 26)	62
Fine bakery wares (*)	41(30 - 51)	100(98 - 100)
Biscuits (cookies)	42(26 - 56)	-
Pastries and cakes	40(34 - 46)	-
Pasta (Raw)	5.5(0 - 11) ^(e)	-
Herbs, spices and condiments	9.2(6 - 12)	19(18 - 20)

Fuente: EFSA, 2013

Entre los tres principales contribuyentes a la exposición al 3-MCPD aparece: (a) la margarina y productos similares en un 73% de grupos de la población, con una contribución a la exposición total en un rango de 13-83%, (b) el pan en un 86% de grupos de población, con una contribución a la exposición total en el rango de 6-26% y (c) las grasas y aceites vegetales en un 53% de grupos de población, con una contribución a la exposición total en el rango de 5-74%.

A consecuencia de estos resultados, la Comisión Europea publicó el 12 de noviembre de 2014 una Recomendación (UE, 2014) en la que insta a los Estados Miembros a evaluar la presencia de cloropropanoles y glicidol en diferentes alimentos, en los que se incluyen:

1. Los aceites y grasas vegetales y sus productos derivados, como la margarina y productos similares.
2. Los productos alimenticios destinados a una alimentación especial y destinados a lactantes y niños de corta edad, incluidos los preparados para lactantes y preparados de continuación, así como los alimentos dietéticos para usos médicos especiales y dirigidos a los lactantes.
3. Los productos de bollería fina, pan y panecillos.
4. Las conservas de carne (ahumada) y de pescado (ahumado).
5. Los productos de aperitivo a base de patatas fritas o de cereales y otros productos a base de patatas fritas.
6. Los aceites vegetales que contengan alimentos y alimentos elaborados o producidos con aceites vegetales.

Por tanto, la determinación de las concentraciones de estos contaminantes en los alimentos es un tema de especial relevancia en la actualidad.

2.6. Métodos de análisis

El análisis de 3-MCPD presenta varios inconvenientes que pueden resumirse en (Hamlet et al., 2002):

- Ausencia de un cromóforo adecuado
- Alto punto de ebullición
- Bajo peso molecular

Debido a la ausencia de un cromóforo, métodos como la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con detección UV o por fluorescencia (Hamlet and Sadd, 2002) no se pueden aplicar. En cuanto al análisis directo por Cromatografía de Gases (GC) sin derivatización, también está restringido debido a la baja volatilidad y alta polaridad del 3-MCPD que da lugar a interacciones desfavorables con los componentes del sistema cromatográfico, traduciéndose en una baja sensibilidad (Kissa, 1992; Boden et al., 1997)).

La electroforesis capilar con detección electroquímica ha sido también propuesta para el análisis de 3-MCPD, pero la sensibilidad es insuficiente para determinar el contenido de 3-MCPD a nivel de trazas en alimentos (Xing y Cao, 2007).

Hasta muy recientemente, el análisis de ésteres del 3-MCPD en aceites y grasas presentaba enormes problemas de reproducibilidad. Esto es debido en parte a que el 3-MCPD se puede formar o perder durante la preparación de la muestra si no se llevan a cabo protocolos estrictos. A fin de solucionar esta situación la *Sociedad Americana de Químicos de Aceites (AOCS)* adoptó en 2013 tres métodos que han sido validados para la determinación de ésteres de 2- y 3-MCPD y de glicidol en aceites y grasas comestibles a través de un estudio colaborativo (AOCS, 2013a, 2013b, 2013c). Los tres métodos tienen en común que utilizan la técnica GC acoplada a Espectrometría de Masas (MS), (GC/MS). En estos métodos es necesario tener en cuenta la capacidad del MCPD y del glicidol de interconvertirse fácilmente, lo que exige un control absoluto de las condiciones de análisis.

En la actualidad, los métodos cromatográficos para la determinación de ésteres de 3-MCPD y glicidol se pueden agrupar en dos grandes grupos, métodos directos y métodos indirectos.

2.6.1. Métodos directos

Los métodos directos se basan en el análisis individual de cada uno de los ésteres del 3-MCPD y del glicidol mediante HPLC-MS previo aislamiento de los analitos generalmente por Extracción en Fase Sólida (SPE). El principal inconveniente de estos métodos es que se necesita un número ingente de patrones de referencia, ya que sólo del 3-MCPD son posibles 63 potenciales ésteres. Además, la determinación individual de cada uno de los ésteres, en lugar de su contenido total, sólo tendría sentido si alguno(s) de ellos fuera(n) más tóxico que los demás.

2.6.2. Métodos indirectos

En estos métodos se mide el contenido total en 3-MCPD y glicidol sin diferenciar entre los diferentes ésteres.

Los tres métodos recomendados por la AOCS, anteriormente comentados, son métodos indirectos en los que se lleva a cabo una hidrólisis de los ésteres (ácida o básica) y luego se mide el 3-MCPD y glicidol libres por GC/MS. Estos métodos son además diferenciales, ya que se llevan a cabo dos ensayos paralelos: (1) ensayo A, en el que se determina el 3-MCPD y el glicidol, y (2) ensayo B, en el que sólo se determina el 3-MCPD debido a la degradación del glicidol. Por diferencia de los resultados obtenidos en ambos ensayos se determina el glicidol.

Las etapas principales de estos métodos indirectos son:

- Adición de patrón interno a la muestra.

Para la determinación de 3-MCPD se utiliza un patrón deuterado (éster del 3-MCPD-d5) a fin de mejorar la reproducibilidad del método y permitir la cuantificación.

- Transesterificación o hidrólisis de los ésteres.

En esta etapa se lleva a cabo la liberación del 3-MCPD y glicidol de sus respectivos ésteres mediante transesterificación, ácida o alcalina, con metanol (Figura 4).

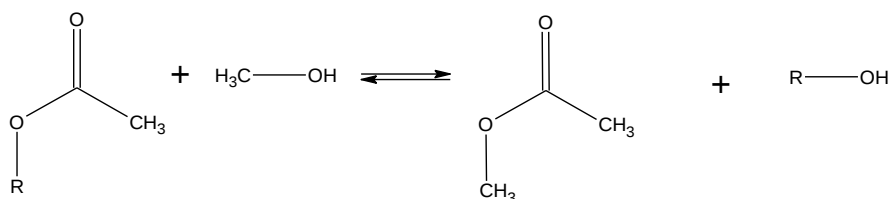


Figura 4: Reacción de transesterificación

La transesterificación alcalina tiene una gran ventaja y es su corta duración, pero el 3-MCPD es inestable en medio alcalino, sufriendo una decoloración muy rápida y convirtiéndose en glicidol (Kuhlmann, 2011; Hrnčířík and Zelinkova, 2011). A este problema se añade que el 2-MCPD actúa de una manera similar.

Las soluciones que se han propuesto para minimizar la conversión del 3-MCPD han sido: (1) minimizar el tiempo de la transesterificación, siempre y cuando esta sea completa; (2) añadir un patrón diésterpentaduterado del 3-MCPD (ya que la mayor parte del 3-MCPD está en forma de diésteres) a fin de eliminar el impacto de las diferentes conversiones y aumentar la reproducibilidad, (3) usar condiciones suaves para la transesterificación. A partir de estas propuestas se desarrolló un método en el que la transesterificación se lleva a cabo con una disolución diluida de hidróxido de sodio a temperatura de -22°C, que permite determinar tanto el 3-MCPD como el 2-MCPD, ya que se reduce la degradación de ambos (Kuhlmann, 2011).

La transesterificación en medio ácido tiene la ventaja de que el 2- y 3-MCPD no se degradan. Sin embargo, en medio ácido las sustituciones nucleofílicas están favorecidas, lo que supone un riesgo debido a que pueden formarse 2- y 3-MCPD si en el medio hay cloruro. Para evitar esto es necesario hacer una previa extracción líquido-líquido a fin de eliminarlos cloruros (Ermacora and Hrnčirik, 2012).

- Neutralización y *salting-out*.

El objetivo de la neutralización es detener la reacción de transesterificación. En el caso de la transesterificación ácida se usa bicarbonato sódico, y cuando aquella se lleva a cabo en medio alcalino se adiciona por ejemplo ácido sulfúrico.

El *salting-out* es un paso crítico en el análisis cuyo objetivo es facilitar la extracción de los compuestos lipófilos (ésteres metílicos, esteroides, alcoholes alifáticos, etc.) de la matriz. Si se emplea para ello una sal clorada, el glicidol reacciona con ésta llevándose a cabo una adición nucleofílica al anillo epóxido, transformándose el glicidol en 3-MCPD y en menor proporción en 2-MCPD debido a la regioselectividad. Esta reacción, cuyo rendimiento depende de forma crítica del pH (Kaze et al., 2011) fue la base del primer método propuesto para la determinación indirecta de glicidol previa conversión en 3-MCPD (DGF, 2009). Si después de la transesterificación alcalina en la etapa de *salting-out* se sustituye la sal clorada por una sal libre de cloro, como bromuro de sodio, se evita la conversión del glicidol en 3-MCPD, determinando así sólo este último. Por diferencia es posible determinar el contenido en glicidol. En el caso de usar

transesterificación ácida no es posible la determinación de este compuesto debido a su inestabilidad en dicho medio.

- Derivatización.

Este paso se debe de llevar a cabo en condiciones estrictamente anhidras y tiene como finalidad convertir el 3-MCPD y el glicidol en un derivado volátil.

Los reactivos que se usan para ello son el ácido fenilborónico (PBA) y el N-heptafluorobutiril imidazol (HFBI). En la Figura 5 se muestra el derivado formado con PBA.

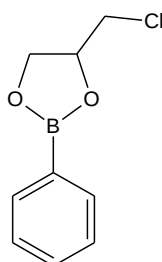


Figura 5: Estructura del derivado volátil del 3-MCPD con PBA (PBA-3-MCPD)

- Separación y cuantificación mediante GC-MS.

2.6.3. Comparación entre métodos directos e indirectos

Los primeros métodos para la determinación de ésteres de 3-MCPD eran todos indirectos y se desarrollaron antes de la detección de su isómero 2-MCPD y de glicidol en los alimentos, lo que complicó mucho los análisis. Los métodos directos se desarrollaron entonces como respuesta a la escasa exactitud y selectividad que tenían inicialmente los métodos indirectos. Posteriormente, mejoró la calidad de los métodos indirectos y, en la actualidad, existen métodos que proporcionan información exacta sobre el contenido en ésteres de 2-MCPD, 3-MCPD y glicidol.

La principal ventaja de los métodos indirectos es que al convertir todos los ésteres del 2-MCPD, 3-MCPD y glicidol a sus formas libres, se alcanzan límites de detección muy bajos y, además, se necesita una cantidad muy reducida de estándares internos.

Por otra parte, los métodos directos presentan la ventaja de que la preparación de la muestra es muy simple al no ser necesario llevar a cabo la

transesterificación o la derivatización que se lleva a cabo en los métodos indirectos, eliminando así posibles fuentes de error en la cuantificación de los analitos. Sin embargo, el límite de detección es en general mayor que el alcanzado en los métodos indirectos y es necesario un gran número de patrones para la cuantificación de cada uno de los ésteres posibles de los analitos.

2.6.4. Requerimientos de los métodos de análisis

La UE recomienda utilizar cualquiera de los tres métodos normalizados de la AOCS (UE, 2014). También se recomienda que para el análisis de 3- MCPD y glicidol ligados en forma de ésteres de ácidos grasos en los aceites y grasas comestibles el límite de cuantificación no sea superior a 100 µg/kg.

3. CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La técnica analítica usada en el desarrollo del presente Trabajo Fin de Grado para el análisis de 3-MCPD y glicidol en alimentos es GC-MS.

La GC es una técnica separativa, que tiene una gran sensibilidad, versatilidad y posibilidades para la automatización. La separación de las mezclas de compuestos en la columna se produce cuando las muestras están en estado gaseoso, por lo tanto las muestras sólidas y líquidas deben ser vaporizadas (Gutiérrez, 2002). Esta es la mayor limitación que tiene esta técnica analítica, debido a que su uso se limita al estudio de los compuestos termoestables y suficientemente volátiles. Gracias a su gran sensibilidad esta técnica es capaz de detectar cantidades del orden de los picogramos de ciertos compuestos.

El cromatógrafo de gases se compone de un inyector, una columna cromatográfica y el detector, todo esto acoplado a un horno con un termostato que permite a la columna alcanzar altas temperaturas (Figura 6). La fase móvil, es un gas inerte conocido como “gas portador”, que transporta a los analitos a través de la columna que contiene una fase estacionaria.

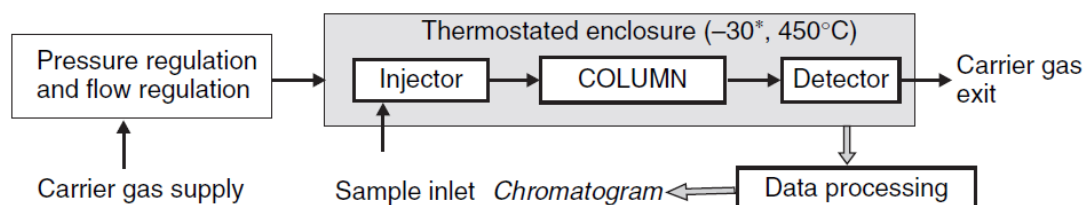


Figura 6: Esquema de un cromatógrafo de gases

Fuente: Rouessac, 2007

El análisis comienza cuando se introduce una pequeña cantidad de muestra en el inyector, el cual tiene como función la vaporización de la muestra y su mezcla con el flujo gaseoso en la cabeza de la columna.

Arrastrados por el gas portador los analitos se separan a lo largo de la columna debido a su diferente afinidad por la fase estacionaria, llegando al final de la columna, donde se encuentra el detector, a diferentes tiempos.

La MS es una técnica analítica que se basa en la fragmentación de los analitos en sus diferentes iones. Cada ión obtenido a partir de un compuesto tiene una relación entre su masa y su carga (m/z) diferente, lo que permite su separación y la identificación del compuesto por el modelo de fragmentación que sufre.

Es una técnica destructiva, pero versátil, muy sensible y muy selectiva, requiriendo además una pequeña cantidad de muestra. En el espectrómetro de masas se llevan a cabo los siguientes procesos: vaporización de la muestra, generación de iones a partir de moléculas neutras en fase gaseosa, separación de los iones en función de su m/z y detección/cuantificación de los iones.

Principalmente este instrumento se compone de cuatro partes básicas (Sparkman, 2011):

1. Sistema de introducción de muestras: El principal factor limitante de la MS, es la capacidad para vaporizar la muestra. La condición para que se pueda obtener el espectro de un compuesto, es que la presión de vapor sea igual o superior a 10^{-6} mm de mercurio. La introducción de la muestra se puede llevar a cabo de manera directa (se introduce directamente en la fuente de iones) o desde otro instrumento al que está acoplado.

2. Fuente de iones: Esta parte del instrumento es la encargada de producir la ionización de la muestra en estado gaseoso. En GC/MS se utiliza ionización por *impacto electrónico* (EI), *ionización química* (CI), *ionización negativa de captura electrónica* (ECNI), *ionización de campo* (FI) y, en mucha menor medida, *ionización química a presión atmosférica* (APCI).

La EI es el tipo de ionización más utilizado, en el que se obtienen iones moleculares M^+ con gran energía. Los iones son generados por impacto con electrones que han sido acelerados en un campo de 70 eV. Una vez formados los iones se extraen de esta parte del instrumento y son acelerados por una serie de lentes para aumentar su energía cinética.

3. Analizador: Esta parte del instrumento es la encargada de la separación de los iones para poder ser posteriormente detectados.

Los cuatro tipos de analizadores m/z utilizados en GC/MS son: *de sector magnético*, *de cuadrupolo*, *tiempo de vuelo* y *trampa de iones*.

El analizador *de sector magnético* utiliza un imán permanente o un electroimán para hacer que los iones que provienen de la fuente de ionización, y que llevan una velocidad que ha sido proporcionada por el campo eléctrico aplicado, sean obligados a describir una trayectoria circular de radio r que será diferente para cada relación m/z , al ser sometidos a un campo magnético perpendicular a su trayectoria.

En este analizador se puede llevar a cabo un barrido de los iones de diferente masa variando la fuerza del campo del imán (barrido magnético) o el potencial de aceleración entre las rendijas de entrada y salida del analizador (barrido eléctrico).

El *analizador de cuadrupolo*, en unas determinadas condiciones de operación, transmite sólo iones de un pequeño intervalo de relaciones m/z . Este analizador está formado por 4 barras de sección circular o hiperbólica, rectas y paralelas dispuestas sobre una circunferencia, de manera que el haz de iones pase por el centro del dispositivo. Los iones de la fuente son acelerados por un potencial de 5 a 15 V e introducidos en el espacio entre las barras. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par a la terminal negativa.

Además, se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia, que están desfasados 180° . Para que un ión atraviese el cuadrupolo debe tener una trayectoria estable en los dos planos formados por cada par de electrodos opuesto.

En el *analizador de tiempo de vuelo* los iones positivos son producidos periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Los iones producidos de esta manera son acelerados por un impulso de campo eléctrico que tiene la misma frecuencia, pero retrasada, que el impulso de ionización. Las partículas aceleradas pasan luego a un tubo analizador sobre el que no actúa ningún campo. Debido a que todos los iones que entran en el tubo tienen idealmente la misma energía cinética, sus velocidades en el tubo deberán variar de modo inverso a sus masas, y por tanto las partículas ligeras llegarán antes al detector que las pesadas. Los tiempos de vuelo típicos están entre 1 y 30 μs .

Un *analizador de trampa de iones* es un dispositivo en el que los iones gaseosos pueden ser formados y confinados durante largos períodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos. Se han desarrollado varios tipos de trampas de iones que en general son cuadrupolos y que permiten hacer MS/MS. El analizador consiste en un electrodo anular y un par de electrodos colectores (Figura 7).

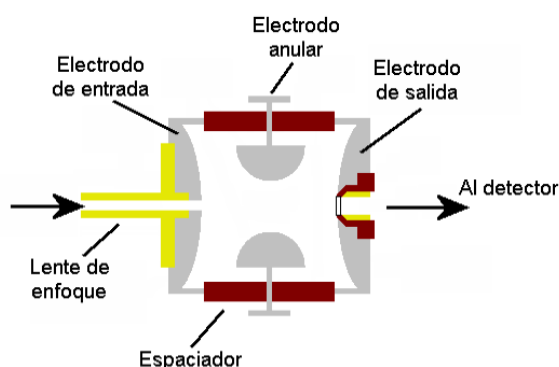


Figura 7: Analizador de trampa de iones

Fuente: CSIC, http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf

Para su funcionamiento se aplica un voltaje de radiofrecuencia entre los electrodos inferior y superior, a la misma vez que sobre el electrodo central o anular se aplica otro potencial diferente. Esto tiene como consecuencia la creación de un campo electromagnético, en el que se encuentran los iones con una trayectoria concreta, donde el movimiento de cada ión depende de los voltajes aplicados y su relación masa-carga

Los iones con un valor apropiado de m/z circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que está rodeada por el anillo. Cuando el potencial de radiofrecuencia se aumenta, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones más ligeros se desestabilizan, lo que causa colisiones con la pared del electrodo anular. Esto permite extraer de la trampa los iones que no interesan y dejar el(los) que interesa(n), haciendo un análisis por MS/MS. Los espectrómetros de trampa de iones son robustos y compactos; sin embargo tienen limitaciones en cuanto al poder de resolución y, debido a que dentro de la trampa hay una concentración alta de iones, se pueden producir reacciones entre éstos. Tienen otras ventajas tales como posibilidad de hacer MS/MS y límites de detección más bajo que el analizador de cuadrupolo.

En el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado se ha utilizado un espectrómetro de masas con analizador de *trampa de iones*.

4. Detector: El acoplamiento de ambas técnicas, GC/MS, permite la separación e identificación de mezclas complejas de analitos y es una de las técnicas más eficaces y sensible que existen en la actualidad para el análisis de compuestos orgánicos. La separación de los compuestos se lleva a cabo en el cromatógrafo de gases, pasando después al espectrómetro de masas donde son identificados y cuantificados.

Por otra parte, la configuración MS/MS permite facilitar la explicación de estructuras químicas, determinar los mecanismos de fragmentación de las moléculas ionizadas y la composición elemental de iones-fragmento y su conectividad con los iones precursores y, sobre todo, de mayor aplicación hoy en día, realizar un análisis extremadamente selectivo (específico) y sensible (a nivel de $\mu\text{g/L}$) de mezclas sumamente complejas, biológicas, ambientales, de alimentos o extractos naturales, entre otros.

En el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado se ha utilizado la configuración MS/MS para la cuantificación de los analitos.

4. OBJETIVOS

El trabajo que se presenta tiene como objetivos: 1) la validación de un método analítico, basado en el uso de la técnica analítica GC-MS, para la determinación de 3-MCPD y glicidol en aceites vegetales y productos derivados, y 2) la estimación de los niveles de estos contaminantes en algunos de estos productos alimenticios. Se pretende con ello contribuir a las recomendaciones de la UE en cuanto a la necesidad de conocer los niveles de exposición de la población a estos compuestos a través de la dieta.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

5.1.1 Reactivos y disolventes.

Los disolventes y reactivos usados para realizar las disoluciones necesarias son:

- Metanol LC-MS Ultra Chromasolv, para UHPLC-MS, 1L (Fluka).
- Tert-butil-metil éter (MTBE), para análisis de residuos (GS), 1L (Fluka).
- Métoxido sódico (25% p/v en metanol), 1L (Sigma).
- Ácido Sulfúrico 98%, 1L (Merck).
- Cloruro sódico, granular, 500g, (Panreac).
- Sulfato Amónico, 100 g (Merck).
- Bromuro sódico Bioultra, 1kg (Sigma).
- Hexano Chromasolv, para HPLC, 97.0% (GS), 1L (Sigma-Aldrich).
- 2-Metilpentano (Isohexano), ≥95.0% (GS), 100 mL (Aldrich Chemistry).
- Éter etílico, estabilizado con etanol, 1L (Panreac).
- Acetato de etilo, TraceSELECT, para análisis de residuos, 2.5 L (Fluka).

- Sulfato sódico anhidro, granular, $\geq 99.0\%$, 500 g (Sigma).
- Ácido fenilborónico (PBA), para HPLC, puro, 10g (Fluka).
- 2,2,4- Trimetilpentano (Isooctano) Chromasolv Plus, para HPLC, $\geq 99,5\%$, 1L (Sigma-Aldrich).

5.1.2 Disoluciones.

- Disolución estándar de 1000 ppm de 3-MCPD: Disolver 100 mg de 3-MCPD (Fluka) en 100 mL de metanol.
- Disolución estándar de 500 ppm de 3-MCPD diéster: Disolver 25 mg de 1,2-bis-palmitoil-3-cloropropanodiol (3-MCPD diéster) (Toronto Research Chemicals) en 50 mL de acetato de etilo.
- Disolución estándar de 2000 ppm de éster de glicidilo: Disolver 100 mg de estearato de glicidilo (TCI Europe N.V) en 50 mL de acetato de etilo.
- Disolución de patrón interno de 50 ppm de 3-MCPD-d5 diéster: Disolver 2,5 mg de 1,2-bis-palmitoil-3-cloropropanodiol-d5 (3-MCPD-d5 diéster) (Toronto Research Chemicals) en 50 mL de acetato de etilo.

A partir de éstas se preparan las diferentes disoluciones de trabajo usadas durante el Trabajo de Fin de Grado.

Además de las disoluciones anteriores, también se usan:

- Disolución de metóxido sódico 25g/L (2,5% p/v) en metanol: Dilución 1:10 del metóxido sódico al 25% (p/v).
- Disolución de cloruro sódico (200g/L) acidificada: Se disuelve 20g de NaCl en 100 mL de agua. Posteriormente se adiciona 0,89 mL de ácido sulfúrico (98%) a la disolución de NaCl (200g/L). 600 μ L de esta disolución deben neutralizar a 200 μ L de la disolución de metóxido sódico (2,5%) y ajustar el pH a rango ácido.
- Disolución de bromuro sódico (600g/L) acidificada: Se disuelve 60g de NaBr en 100 mL de agua. Posteriormente se adiciona 0,89 mL de ácido sulfúrico (98%) a la disolución de NaBr (600g/L). 600 μ L de esta disolución deben neutralizar a 200 μ L de la disolución de metóxido sódico (2,5%) y ajustar el pH a rango ácido.

- Disolución de sulfato amónico (200g/L) acidificada: Se disuelve 20g de sulfato amónico en 100 mL de agua. Posteriormente se adiciona 0,89 mL de ácido sulfúrico (98%) a la disolución de sulfato amónico (200g/L). 600 µL de esta disolución deben neutralizar a 200 µL de una disolución de metóxido sódico (2,5%) y ajustar el pH a rango ácido.
- Mezcla 6:4 (v:v) de éter etílico y acetato de etilo: Para preparar 100 mL de disolución, añadir 60 mL de éter etílico y 40 mL de acetato de etilo.
- Disolución de ácido fenilborónico (PBA) saturada en éter etílico: Añadir en un vial, 5 mL de éter etílico y adicionar PBA hasta saturación con precipitación. Posteriormente centrifugar y filtrar a través de un filtro de 0,45 µm.

5.2 Materiales e instrumentos

- Espectrómetro de masas trampa iónica – cromatógrafo de gases: El instrumento consta de un espectrómetro de masas (Thermo) modelo Polaris Q, unido a un cromatógrafo de gases (Thermo) modelo Focus. El analizador de iones es de trampa de iones y la fuente de iones es del tipo EI (impacto electrónico). El rango de masas del analizador es de 10-1000 uma, con una velocidad máxima de barrido de hasta 5500 uma/s.

Al tratarse de una trampa iónica puede llevar a cabo experimentos MS-MS. El cromatógrafo de gases consta de un puerto de inyección, split/splitless y está servido por un automuestreador con capacidad de automatizar inyecciones simples, en espacio de cabeza y microextracción en fase sólida. La columna usada para GC es una SPB-5 (Sigma-Aldrich), con 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor (Figura 8).

- Centrífuga (Selecta), modelo S-240 (Figura 9)
- Balanza analítica (Sartorius): balanza analítica de 5 decimales modelo CPA2250, capaz de pesar como máximo 220 g (Figura 10)
- Evaporador (Supelco) Mini-Vap: Contiene seis agujas de acero inoxidable, una válvula de control y una tubería de plástico de 0,9 m (Figura 11).



Figura 8: Instrumento GC-MS



Figura 9: Centrífuga



Figura 10: Balanza Analítica

- Baño de Ultrasonidos (BandelinSonorex): Presenta una memoria de datos para guardar el programa de trabajo. Se puede seleccionar el tiempo, la potencia y la temperatura entre otros. Tiene una capacidad de calefacción de 20° a 80°C y la potencia puede ajustarse del 10 al 100% (Figura 12).
- Micropipetas (Sinerlab) con rangos de volumen entre 10 y 100 μL y de 1 a 1000 μL .
- Pipetas Pasteur de vidrio.



Figura 11: Evaporador



Figura 12: Baño de Ultrasonidos

5.3 Método analítico

El método analítico validado está basado en el método ISO/DIS 18363-1, adoptado por la AOCS como método oficial Cd 29c-13 (AOCS, 2013c).

5.3.1 Preparación de la muestra

En el tratamiento de muestra se llevan a cabo dos ensayos, A y B.

5.3.1.1 Ensayo A

Si la muestra es líquida, en un vial de 2 mL se pesa directamente entorno a 100 mg de muestra. Si es sólida se funde previamente a 80°C en un baño de agua o estufa de secado. En caso de ser sólida y contener mucha agua no se funde (lo que daría lugar a una separación de fases), sino que se usa como tal o se separa la fracción grasa por extracción liquido-liquido). Se añade después a la muestra 50 µL de 1,2-bis-palmitoil-3-cloropropanodiol-d5 (patrón interno) y se disuelve en 100 µL de MTBE. Se adicionan después 200 µL de disolución de metóxido sódico al 2,5 % p/v, se agita 10 s en baño de ultrasonidos y se deja reposar durante exactamente 4 min. Una vez transcurrido este tiempo, se adicionan rápidamente 600 µL de disolución de NaCl acidificada y se agita 20 s en baño de ultrasonidos.

Para llevar a cabo la etapa de *clean-up*, se añaden 600 µL de isohexano, se agita 10 s en baño de ultrasonidos y se deja reposar 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se recoge y desecha la fase orgánica (fase superior) con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio. La extracción se realiza dos veces. La extracción del 3-MCPD se realiza adicionando 600 µL de la mezcla éter etílico/acetato de etilo 6:4 (v/v). Se agita en baño de ultrasonidos durante 10 s y se deja reposar 5 min. Por último se extrae la fase orgánica (fase superior) con una pipeta Pasteur de vidrio y se traspasa a otro vial. Esto se hace tres veces y se reúnen los extractos en el mismo vial, añadiendo finalmente sulfato sódico anhidro para eliminar los restos de humedad.

La derivatización del 3-MCPD se realiza después adicionando para ello 30 µL de disolución saturada de PBA. Se agita entonces en baño de ultrasonidos durante 5 min y se evapora hasta sequedad el extracto en corriente de nitrógeno.

Por último, el residuo se redisuelve en 500 µL de iso-octano, se centrifuga y el extracto resultante se encapsula. Para ello se prepara un vial con microinserto, se recoge el extracto obtenido con una jeringa y se vierte sobre el microinserto pasándolo previamente a través de un filtro de 0,45 µm.

5.3.1.2 Ensayo B

El procedimiento seguido en este caso es análogo al del ensayo A, pero en lugar de adicionar disolución acidificada de NaCl para detener la transesterificación, se adicionan 600 µL de una disolución de NaBr acidificada, y se agita 20 s en baño de ultrasonidos.

5.3.2 Medida analítica

Condiciones cromatográficas:

- Volumen de muestra: 1 µL.
- Gas portador: Helio con una pureza del 99,999% y un flujo constante de 1 – 1,2 mL/min.
- Programa de temperaturas del horno: temperatura inicial de 80° C; se mantiene constante 1 min; posteriormente se aumenta 10°C/min hasta alcanzar 170°C. Se vuelve a aumentar hasta los 200°C con una velocidad de 3°C/min y por último se aumenta hasta los 280°C con una velocidad de 15°C/min, manteniendo esta temperatura durante 10 min.
- Inyector en modo splitless. Temperatura, 250 °C. La totalidad de la muestra inyectada es dirigida hacia la columna, manteniéndose una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil, en este caso 270°C. La muestra condensa en la cabeza de la columna, actuando el disolvente condensado como una trampa donde se concentran los componentes a analizar (efecto solvente). Transcurridos 2 min se purga el inyector para barrer el disolvente vaporizado a la atmósfera.

Espectrómetro de Masas: Voltaje, 70 eV; flujo de gas, 0,3 mL/min; rango de masas usado, 50.00 a 500.00.

El análisis cuantitativo se llevó a cabo filtrando los iones característicos m/z 147 (3-MCPD) y m/z 150 (3-MCPD-d5) y a partir de ellos, en modo MS/MS, los iones m/z 91 y m/z 93 (3-MCPD-d5). Los iones m/z 196/198 (3-MCPD) y 201/203 (3-MCPD-d5) fueron usados a efectos de identificación. El contenido en ésteres de 3-MCPD y de glicidol fueron calculados a partir de la ratio área del pico cromatográfico para el 3-MCPD (m/z 91)/área del pico cromatográfico del patrón interno (m/z 93) en todos los casos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Principio del método

Como ya se explicó en la introducción, tanto el 3-MCPD como el glicidol se encuentran fundamentalmente en forma de ésteres en los aceites, aunque podría haber una pequeña cantidad en forma libre. En el método que se ha validado en este Trabajo Fin de Grado se determina el contenido de ambos compuestos expresado como “*contenido total en ésteres de 3-MCPD*” y “*contenido total en ésteres de glicidol*”. El método consta de dos ensayos paralelos, A y B, que se llevan a cabo usando catálisis básica (Figura 13).

En el ensayo A, se determina tanto el 3-MCPD como el glicidol. Una alícuota de la muestra se enriquece con el patrón interno (3-MCPD-d5), que se comporta de forma similar a los ésteres del 3-MCPD y permite obtener una buena reproducibilidad en el análisis. Se lleva a cabo luego una transesterificación de los ésteres del 3-MCPD y del glicidol (y resto de ésteres) con metóxido sódico en metanol, con lo que se consigue liberar ambos compuestos. El tiempo de esta reacción tiene que ser estrictamente controlado ya que si es demasiado corto no se produce la hidrólisis de los ésteres en grado suficiente y, si es demasiado largo, se corre el peligro de que parte del 3-MCPD, que es inestable en medio básico, se convierta en glicidol.

Para detener la reacción se adiciona una disolución ácida de NaCl. Bajo condiciones ácidas el glicidol libre reacciona con el cloro inorgánico para convertirse en 3-MCPD.

El NaCl ejerce además un efecto de *salting-out*, mejorando el proceso de extracción que se lleva a cabo a continuación. Los compuestos no polares, fundamentalmente ésteres metílicos, procedentes de la matriz son eliminados a través de una etapa de *clean up* con isohexano. Tanto el 3-MCPD libre como el patrón interno, que son muy polares, se extraen luego con una mezcla de éter etílico y acetato de etilo. Ambos compuestos son luego derivatizados con PBA, obteniéndose productos muy volátiles. Finalmente, el exceso de PBA se elimina evaporando hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno y redisolviendo el residuo en iso-octano, disolvente en el que es poco soluble (ISO, 2014).

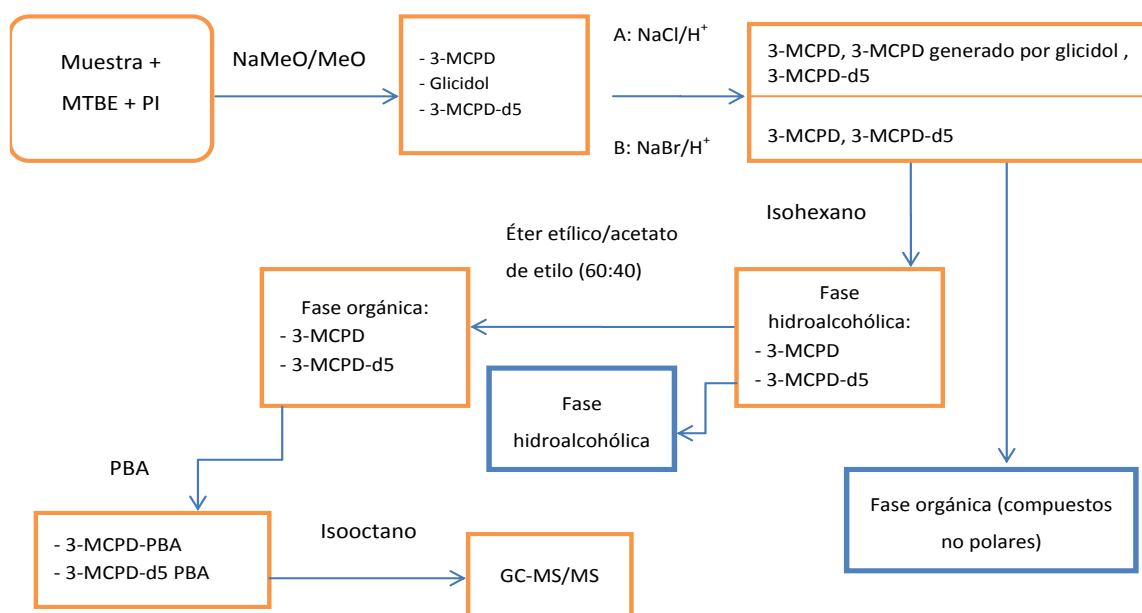


Figura 13: Esquema general del método analítico (ensayos A y B)

PI: patrón interno

En el ensayo B se determina sólo el 3-MCPD. Se lleva a cabo de forma análoga al ensayo A, pero en este caso la reacción de transesterificación se detiene por adición de una disolución ácida de una sal no clorada, NaBr. En estas condiciones el glicidol libre reacciona dando un producto diferente al 3-MCPD, que no interfiere en la determinación de éste.

El contenido total en ésteres del glicidol se determina a partir de la diferencia entre el contenido total en ésteres del 3-MCPD calculado en los ensayos A y B,

multiplicando esta diferencia por un factor estequiométrico que refleja la cantidad de glicidol que se convierte en 3-MCPD.

6.2 Pruebas preliminares

En primer lugar, y a fin de conocer el espectro de masas del derivado con PBA del 3-MCPD, se llevó a cabo la derivatización de 50 μ L de una disolución de 50 ppm de 3-MCPD libre (Figura 14). Como se observa en el cromatograma, el tiempo de retención para el derivado del 3-MCPD es 10,66 min. Del espectro de masas correspondiente se observa que los principales fragmentos obtenidos son m/z 91, 147 (Figura 15), 196 (ión molecular) y 198.

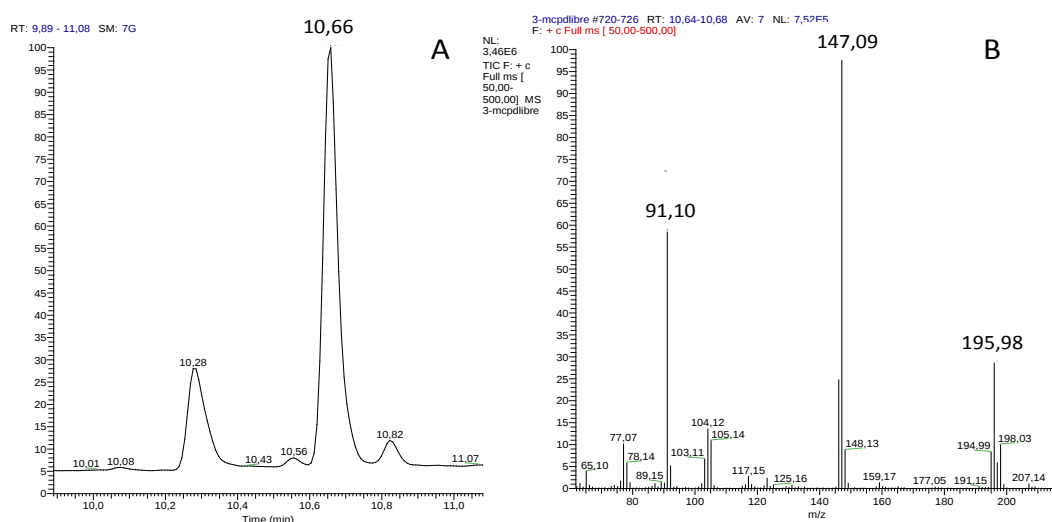


Figura 14: A) Cromatograma GC-MS TIC del 3-MCPD fenilboronato (tiempo de retención, 10,66 min). B) Espectro de masas del 3-MCPD fenilboronato.

Se hizo lo mismo para el patrón interno, aplicando en este caso el ensayo A a 100 mg de aceite de oliva virgen extra fortificado con 50 μ L de una disolución de 50 ppm de 3-MCPD-d5 diéster. El cromatograma y el espectro de masas del derivado con PBA del 3-MCPD-d5 se muestran en la Figura 16.

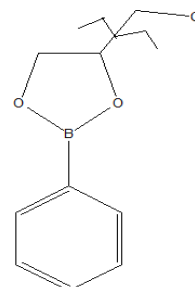


Figura 15: Fragmento 147

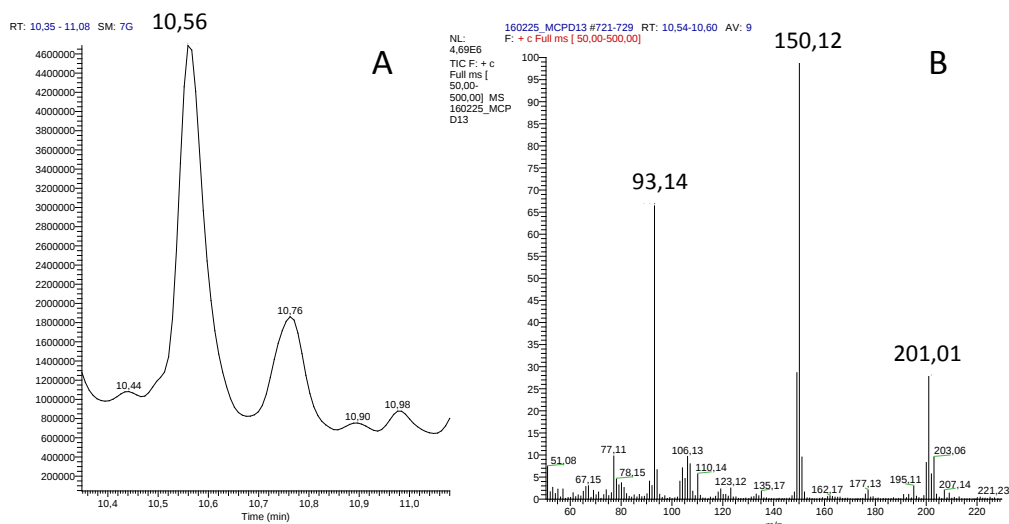


Figura 16: A) Cromatograma GC-MS TIC del 3-MCPD-d5 fenilboronato en matriz de aceite de oliva virgen extra (100 mg) (tiempo de retención, 10,56 min) B) Espectro de masas del 3-MCPD-d5 fenilboronato.

En este caso se aplicó el ensayo A completo ya que el patrón interno del que disponemos es un diéster (no 3-MCPD-d5 libre), por lo que era necesario realizar la transesterificación. Como se observa, el tiempo de retención correspondiente es de 10,56 min y los principales fragmentos son m/z 93, 151, 201 y 203. Puesto que se partió del éster, es evidente que la transesterificación del patrón interno se lleva a cabo correctamente.

En la experiencia anterior se utilizó como matriz una muestra de aceite de oliva virgen extra que en adelante utilizaríamos como blanco. Para ello, se comprobó previamente que no contenía glicidol ni 3-MCPD aplicándole el ensayo A. Como se observa en la Figura 17 no eluye ningún compuesto al tiempo de retención del 3-MCPD fenilboronato. En el cromatograma se observan algunos picos cromatográficos que corresponden, como era de esperar, a ésteres metílicos. Ejemplo de ello es el que se obtiene para un tiempo de retención de 19,11 min, correspondiente al hexadecanoato de metilo.

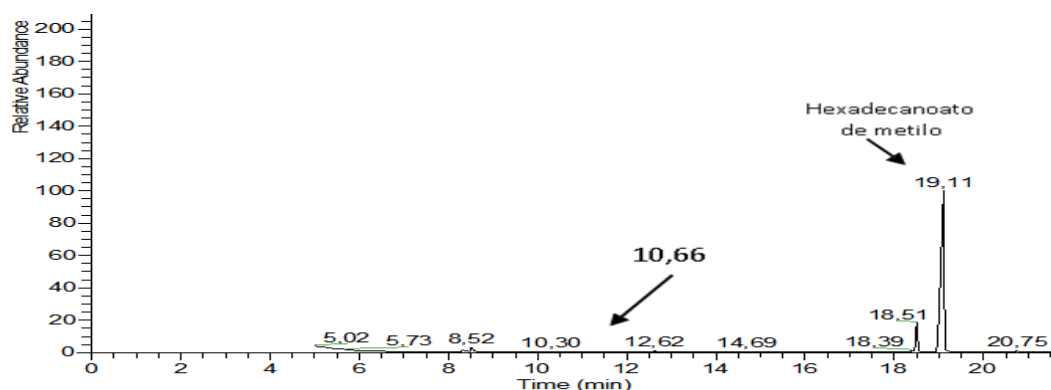


Figura 17: Cromatograma GC-MS TIC de aceite de oliva virgen extra (100 mg)

Para obtener el cromatograma del derivado del 3-MCPD diéster en matriz, se pesaron 100 mg del aceite de oliva virgen extra, se fortificaron con 50 μ L de una disolución de 50 ppm de 3-MCPD diéster, y se llevó a cabo el ensayo A. De la Figura 18, y dado que el compuesto eluye a un tiempo de retención de 10,61 que coincide con el del mismo compuesto en ausencia de matriz y partiendo de 3-MCPD libre, se deduce que la transesterificación se lleva a cabo de forma apropiada. El espectro de masas obtenido es también el correspondiente al 3-MCPD fenilboronato.

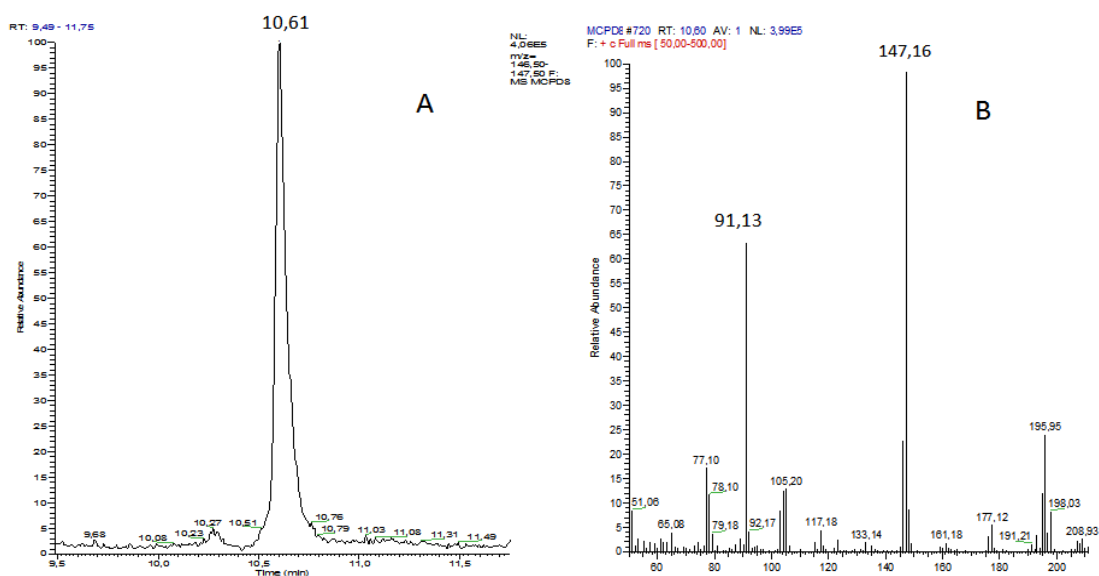


Figura 18: A) Cromatograma GC-MS (ión extraído m/z 147) del 3-MCPD fenilboronato en matriz de aceite de oliva virgen extra (100 mg) (tiempo de retención, 10,61 min). B) Espectro de masas del 3-MCPD fenilboronato. Fortificación con 3-MCPD diéster.

Para comprobar la conversión del glicidol en 3-MCPD se prepararon dos muestras de aceite de oliva virgen extra (100 mg), se fortificaron con 50 μ L de una disolución de 50 ppm de estearato de glicidilo y se analizaron mediante los ensayos A y B. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 19. Se observa que cuando se realiza el ensayo B no aparece el pico cromatográfico del 3-MCPD fenilboronato, lo que demuestra que el glicidol no se convierte en 3-MCPD. Sin embargo, en el ensayo A si se observa el pico cromatográfico, lo que demuestra que el glicidol reacciona con el NaCl y se convierte en 3-MCPD.

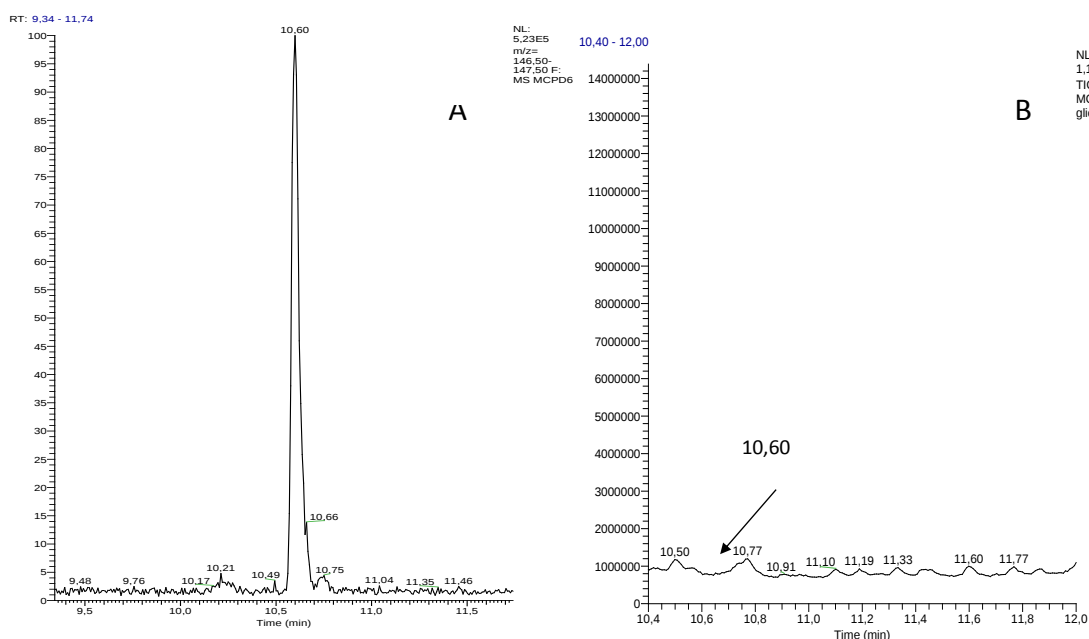


Figura 19: Cromatograma GC-MS (ión extraído m/z 147) obtenido después de fortificar aceite de oliva virgen extra (100 mg) con estearato de glicidilo: A) ensayo A; B) ensayo B

6.3 Optimización de variables

Se estudió la influencia de diferentes factores tales como: cantidad de PBA a añadir para la derivatización, influencia de la aplicación de ultrasonidos, tiempo de hidrólisis, naturaleza del disolvente utilizado para el *clean-up* y naturaleza de la sal no clorada. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

6.3.1 Estudio de la influencia de la cantidad de PBA.

En el método ISO en el que se ha basado este trabajo se recomienda añadir entre 10 y 100 μL de disolución saturada de PBA. La cantidad óptima será aquella que permita obtener la máxima señal y no suponga demasiado exceso que pueda dar lugar a un cromatograma con demasiados picos no específicos así como ensuciar demasiado el sistema cromatográfico y la fuente de iones del espectrómetro de masas. Pudimos comprobar que en los cromatogramas aparecía una serie de picos cromatográficos solapados, con un área enorme, para un tiempo de retención entre 20 y 30 min, correspondientes fundamentalmente a la formación de boroxina y otros productos derivados del PBA.

Se prepararon tres muestras fortificadas con 3-MCPD diéster y 3-MCPD-d5 diéster y se analizaron a través del ensayo A, adicionando en cada caso 10, 30 y 50 μL de disolución saturada de PBA. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados del estudio de la influencia de la cantidad de PBA.

Muestra	Peso de muestra (mg)	μL 3-MCPD-d5 diéster (50 ppm)	μL 3-MCPD diéster (50 ppm)	μL disolución PBA	ratio $A_{3\text{-MCPD}}/A_{3\text{-MCPD-d5}}$
1	102,74	50	50	10	0,99
2	103,00	50	50	30	1,20
3	107,88	50	50	50	1,24

Se observa que a medida que se aumenta el volumen de disolución de PBA aumenta la relación de áreas $A_{3\text{-MCPD}}/A_{3\text{-MCPD-d5}}$. Sin embargo, como se observa en la Figura 20, cuando el volumen de disolución de PBA aumenta de 10 a 30 μL aumenta también apreciablemente el área de la señal correspondiente a los diferentes derivados del PBA. Puesto que a partir de 30 μL la señal ya apenas aumenta, se eligió este volumen para posteriores determinaciones.

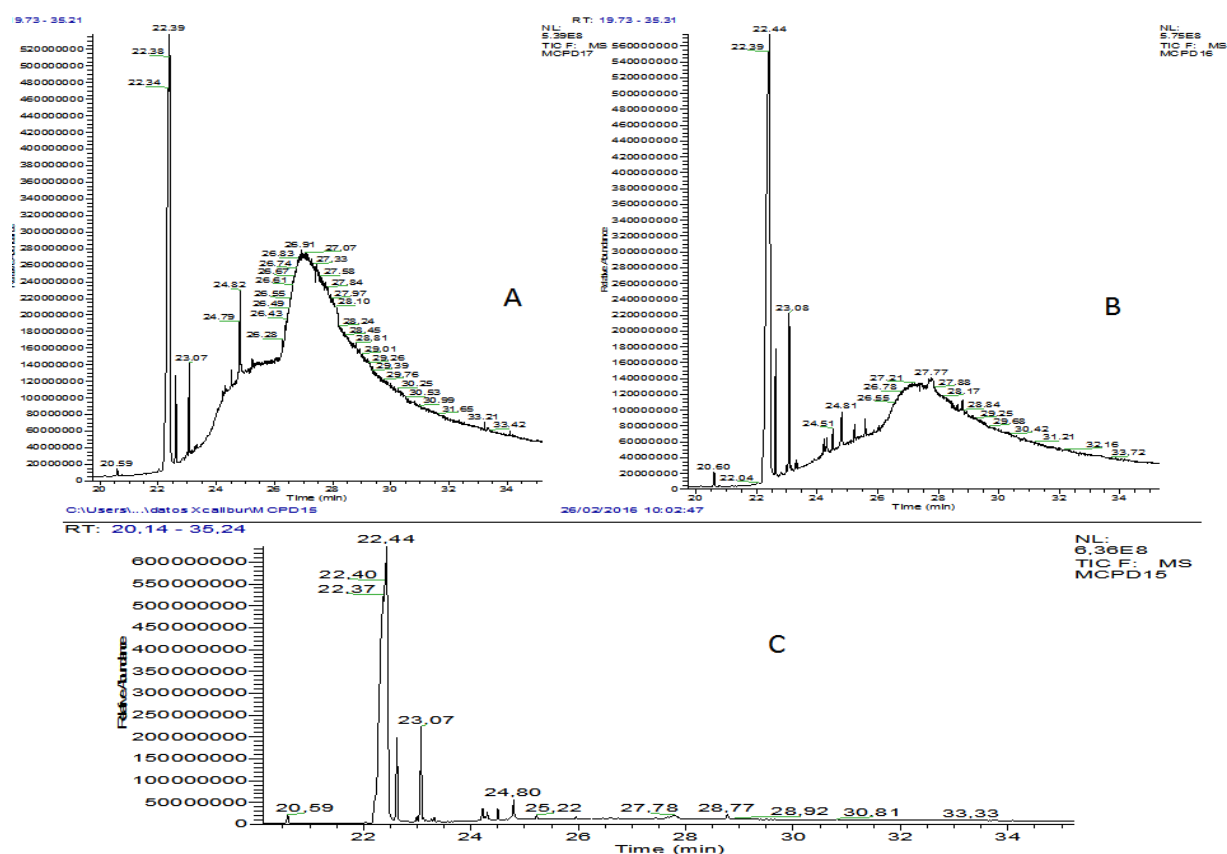


Figura 20: Cromatogramas GC-MS TIC obtenidos tras fortificar aceite de oliva virgen extra con 3-MCPD diéster y 3-MCPD-d5 diéster, para: A) 50 µL, B) 30 µL y C) 10 µL de disolución añadida de PBA.

6.3.2 Estudio de la influencia de la naturaleza de la sal no clorada y del tiempo de sonicación

Aunque en el método ISO en el que se ha basado este trabajo no se indica, decidimos estudiar la influencia de la agitación por ultrasonidos (sonicación) en las etapas de *clean-up* y de extracción del analito. Hasta el momento, ambas se habían realizado mediante sonicación durante 10 s. Por otra parte, aunque la sal que se adiciona en el ensayo B es NaBr, puesto que existen numerosos artículos en bibliografía que utilizan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, decidimos también ensayar la influencia de ésta. Para ello se prepararon tres muestras de aceite de oliva virgen extra (100 mg) fortificado con 50 µL de 3-MCPD-d5 diéster y 50 µL de 3-MCPD diéster. En una de las muestras se adicionó NaBr para la etapa de *salting-out* y se agitó durante 5 min. En las otras dos muestras se adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, agitando durante 5 y 15 min.

Se observó que la sonicación durante 5 min, en lugar de 10 s, no mejoraba la señal obtenida. Por otra parte, cuando se usa NaBr la señal/ruido (S/N) es unas tres veces mayor que cuando se utiliza (NH₄)₂SO₄. Se eligió por tanto NaBr y un tiempo de sonicación de 10 s.

6.3.3 Estudio de la influencia del disolvente utilizado en la etapa de clean-up.

Se estudió la influencia del disolvente utilizado en la eliminación de los componentes no polares de la matriz, isohexano (como recomienda el método ISO) o hexano (utilizado por numerosos autores en bibliografía), se realizaron dos muestras por el ensayo A. Para ello se pesaron 100 mg del aceite de oliva virgen extra y se añadieron 50 µL de 3-MCPD-d5 diéster y 50 µL de 3-MCPD diéster (50 ppm), realizando el *clean-up* con uno u otro disolvente.

Tabla 3: Estudio de la influencia del disolvente utilizado en el clean-up.

Muestra	µL Isohexano	µL Hexano	ratio A _{3-MCPD} /A _{3-MCPD-d5}
1	600	-	1,4
2	-	600	1,1

A raíz de los resultados obtenidos (Tabla 3), se decidió usar para la limpieza de la matriz isohexano por los siguientes motivos:

- La relación A_{3-MCPD}/A_{3-MCPD-d5} es mayor.
- El cromatograma obtenido es más limpio (Figura 21).

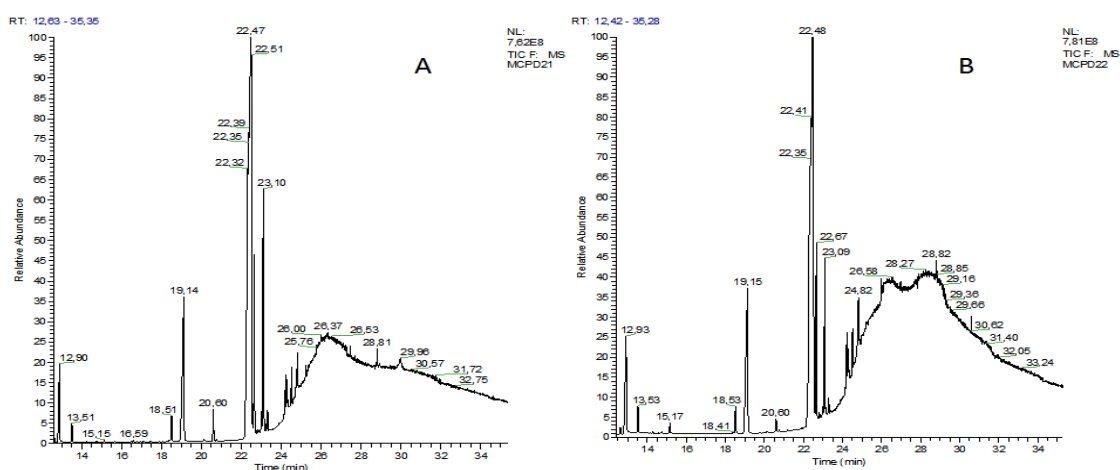


Figura 21: Cromatogramas GC-MS TIC obtenidos tras fortificar aceite de oliva virgen extra con 3-MCPD diéster y 3-MCPD-d5 diéster, para: A) isohexano y B) hexano.

6.4 Parámetros analíticos

Como se ha dicho anteriormente a efectos de cuantificación se ha trabajado en modo MS/MS. De esta forma se reduce en gran medida el ruido de fondo ganando por tanto en sensibilidad. Para ello, se ha seleccionado para el 3-MCPD fenilboronato el ión m/z 91, que proviene del ión m/z 147. En el caso del 3-MCPD-d5 fenilboronato, se ha seleccionado el ión m/z 93, que proviene del ión m/z 150. En la Figura 22 se muestran los cromatogramas obtenidos filtrando ambos iones.

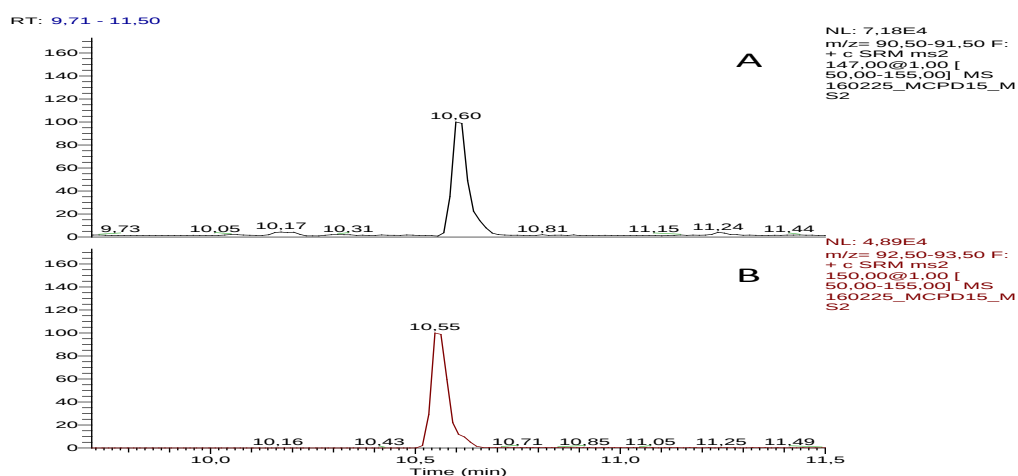


Figura 22: Cromatogramas GC-MS/MS obtenidos tras fortificar aceite de oliva virgen extra con 3-MCPD diéster y 3-MCPD-d5 diéster, en modo MS/MS: A) Ión extraído m/z 147→ 91 y B) ión extraído m/z 150→93.

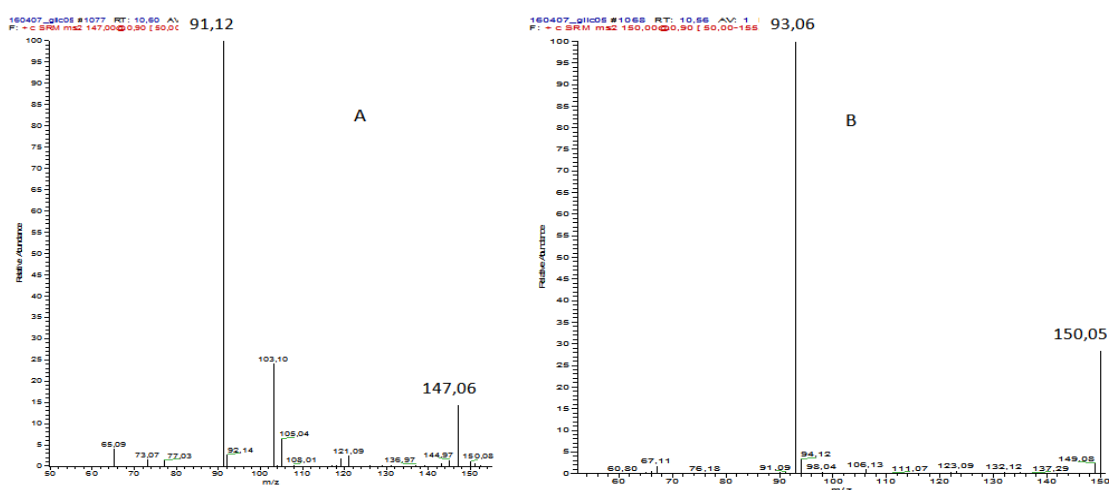


Figura 23: Espectro de masas obtenido tras fortificar aceite de oliva virgen extra con 3-MCPD diéster y 3-MCPD-d5 diéster, en modo MS/MS: A) m/z 147 y B) m/z 150.

En la Figura 23 se muestra los espectros de masas obtenidos a través del modo MS/MS de los iones m/z 147 y m/z 150.

En nuestro conocimiento, este es el primer método basado en la técnica GC-MS para la determinación del contenido en glicidol y 3-MCPD ligados en el que se trabaja en modo MS/MS con IT (trampa iónica).

6.4.1 Calibración

a) Ensayo A

Para realizar la calibración en matriz, se prepararon siete muestras que se fortificaron con 250 μL de disolución de 5 ppm de patrón interno y diferentes volúmenes (15 - 315 μL) de disolución de 3-MCPD diéster de 5 ppm (equivale a 0,94 ppm de 3-MCPD). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24, en la que se representa la ratio de las áreas frente a la masa de 3-MCPD.

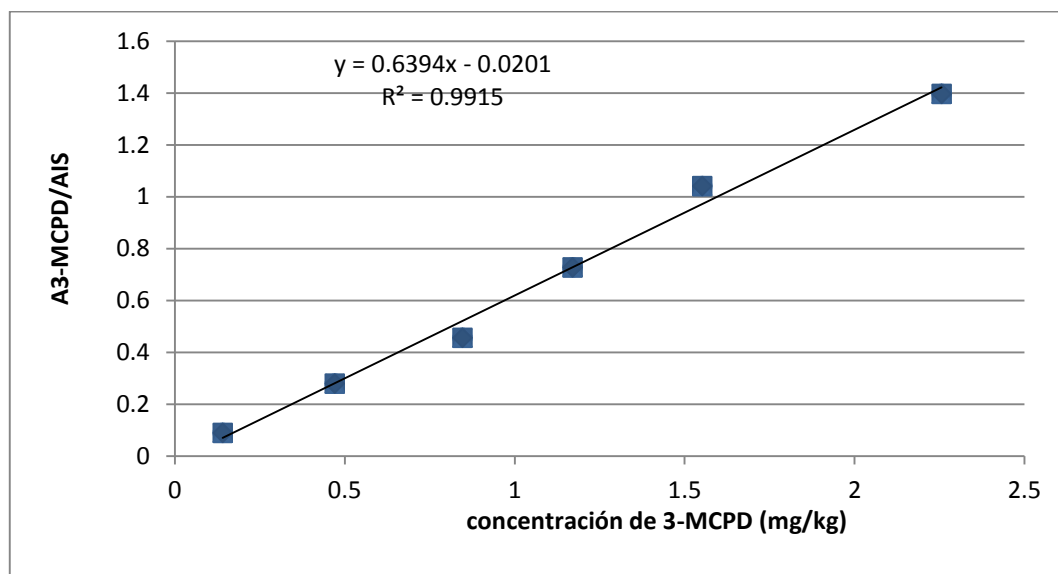


Figura 24: Recta de calibrado, ensayo A.

El último patrón se ha eliminado de la recta de calibrado debido a que a esa concentración ya se pierde la linealidad. El rango lineal para el ensayo A es 0,102 – 2,260 mg/Kg de 3-MCPD.

b) Ensayo B

En este caso la calibración se llevó a cabo de forma análoga al ensayo A añadiendo volúmenes de disolución de 3-MCPD diéster de 5 ppm comprendidos entre 20 y 260 μL .

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25.

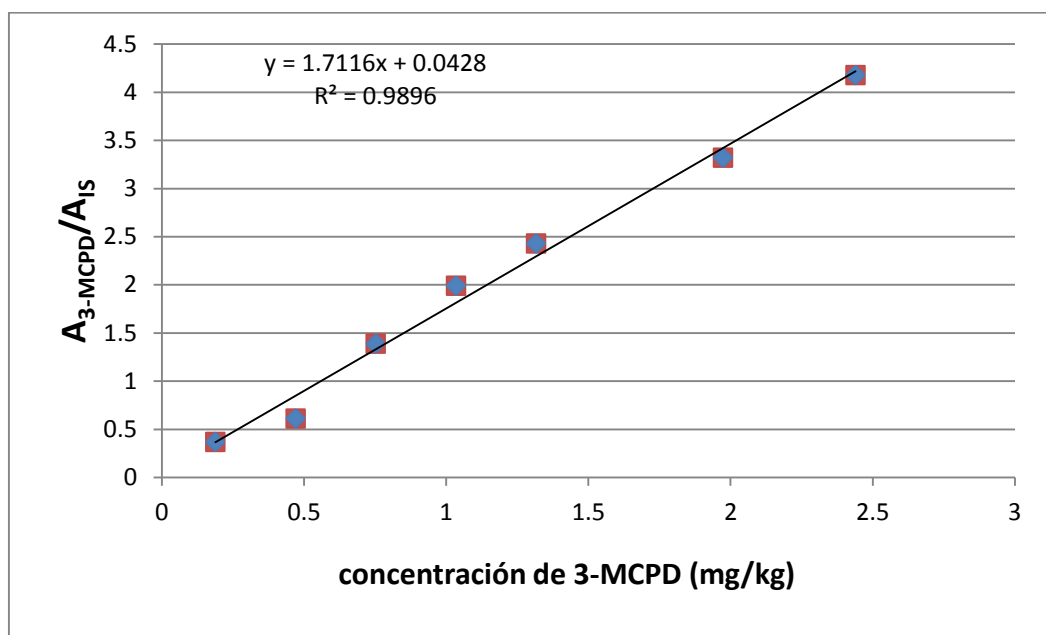


Figura 25: Recta de calibrado, ensayo B.

El rango lineal para el ensayo B es 0,098 – 2,440 mg/Kg de 3-MCPD.

6.4.2 Determinación del factor de conversión (t) del glicidol en 3-MCPD

A efectos de cuantificación es necesario saber la cantidad de 3-MCPD que se obtiene a partir de una determinada cantidad de glicidol en el ensayo A. Para ello, se analizaron cinco muestras a través del ensayo A preparadas fortificando 100 mg de aceite de oliva virgen con diferentes volúmenes (10 - 200 μL) de una disolución de estearato de glicidilo de 5 ppm (equivale a 1,09 ppm de glicidol).

Para cada una de las masas de glicidilo añadidas se obtuvo la masa de 3-MCPD interpolando la correspondiente $A_{3\text{-MCPD}}/A_{3\text{-MCPD-d5}}$ en la recta de calibrado del ensayo A. El último patrón se ha eliminado de la recta debido a que a esa concentración ya se pierde la linealidad.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 26. Como se observa se obtiene una relación lineal para las concentraciones de glicidol comprendidas entre 0,11 y 1,31 mg/kg.

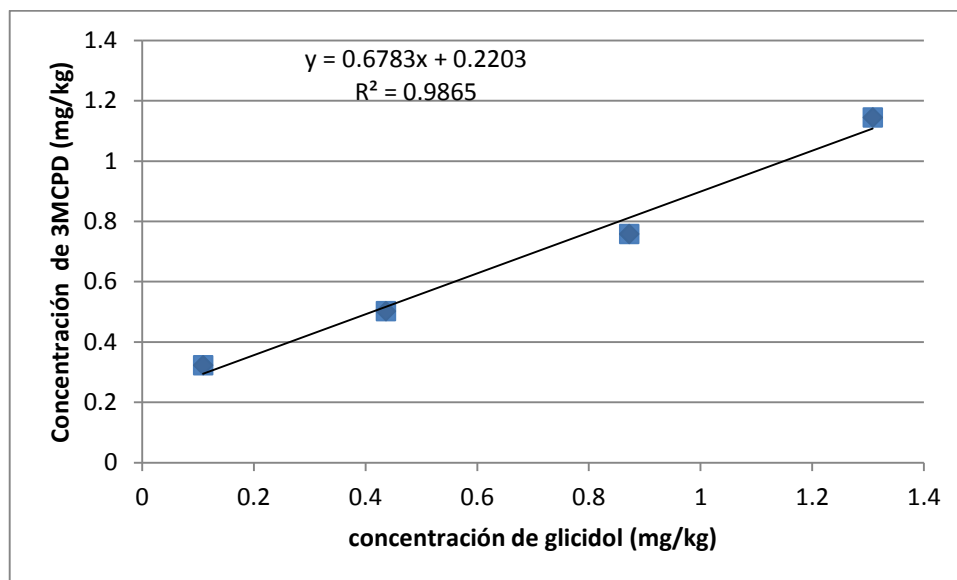


Figura 26: Recta de calibrado para el cálculo del factor de conversión del glicidol.

Por lo tanto la masa de glicidol en una muestra se obtendría a través de la siguiente expresión:

$$\text{mg/kg de glicidol} = [(\text{mg/kg de 3-MCPD}_{(A)} - \text{mg/kg de 3-MCPD}_{(B)}) - 0,22] \times 1,47$$

6.4.3 Límites de detección y cuantificación

El *límite de detección* del método corresponde a la concentración de analito que proporciona una relación señal/ruido de 3, mientras que el *límite de cuantificación* corresponde a la concentración de analito que proporciona una relación señal/ruido de 10. Para determinar ambos parámetros, partiendo de las concentraciones más bajas de la recta de calibrado para los ensayos A y B, se prepararon sucesivas diluciones hasta conseguir un valor de la señal/ruido igual al indicado anteriormente.

El valor de estos parámetros es:

- Ensayo A: LD: 31 µg/kg; LQ: 102 µg/kg
- Ensayo B: LD: 28 µg/kg; LQ: 98 µg/kg

6.4.4 Evaluación de la precisión.

Por último se hizo una evaluación de la repetitividad del método, tanto para el ensayo A como para el B. Se prepararon para ello 5 muestras de aceite de oliva virgen extra fortificadas con 250 μL de una disolución de 5 ppm del patrón interno y 65 μL de una disolución de 5 ppm de 3-MCPD diéster. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. Como se observa, los valores obtenidos para el coeficiente de variación (CV) indican que el método es reproducible.

Tabla 4: Datos para el cálculo de la precisión.

	Muestra	1	2	3	4	5	
Ensayo B	Ratio A ₃ -MCPD/ A ₃ -MCPD-d ₅	1,14	1,19	1,13	1,21	1,16	CV(%): 2,8
	Concentración de 3-MCPD (mg/kg)	0,64	0,67	0,64	0,68	0,65	
Ensayo A	Ratio A ₃ -MCPD/ A ₃ -MCPD-d ₅	0,31	0,30	0,32	0,30	0,31	CV(%): 2,6
	Concentración de 3-MCPD (mg/kg)	0,52	0,50	0,53	0,50	0,52	

6.5 Aplicaciones analíticas

Se aplicó el método validado a diferentes muestras de alimentos, concretamente, aceite de oliva, margarina, aceite de palma refinado y aceite de girasol. En el caso de la margarina, la muestra se calentó previamente a 40 ° C. Las demás muestras se analizaron directamente. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5.

Dado que se comprobó que las concentraciones de los contaminantes en el caso del aceite de palma y de la margarina eran altas y estaban fuera del rango lineal, se diluyó convenientemente el extracto obtenido tras la aplicación del método.

Tabla 5: Resultados para el análisis de las muestras.

Muestra	Contenido en ésteres de 3-MCPD(mg/kg)	Contenido en ésteres de glicidol (mg/kg)
Aceite de oliva	< LQ	< LQ
Margarina	3,62	< LQ
Aceite de palma	2,14	< LQ
Aceite de girasol	0,71	< LQ

A la vista de los resultados de los tres aceites analizados, y como era de esperar, el aceite que tiene una mayor concentración de 3-MCPD es el aceite de palma. En el caso del aceite de oliva, aunque se detecta la presencia de 3-MCPD la concentración es inferior al límite de cuantificación.

A modo de ejemplo, en la Figura 27 se muestran los cromatogramas para los iones m/z 91 (3-MCPD fenilboronato) y m/z 93 (3-MCPD-d5 fenilboronato) obtenidos para la muestra de aceite de palma (ensayo A).

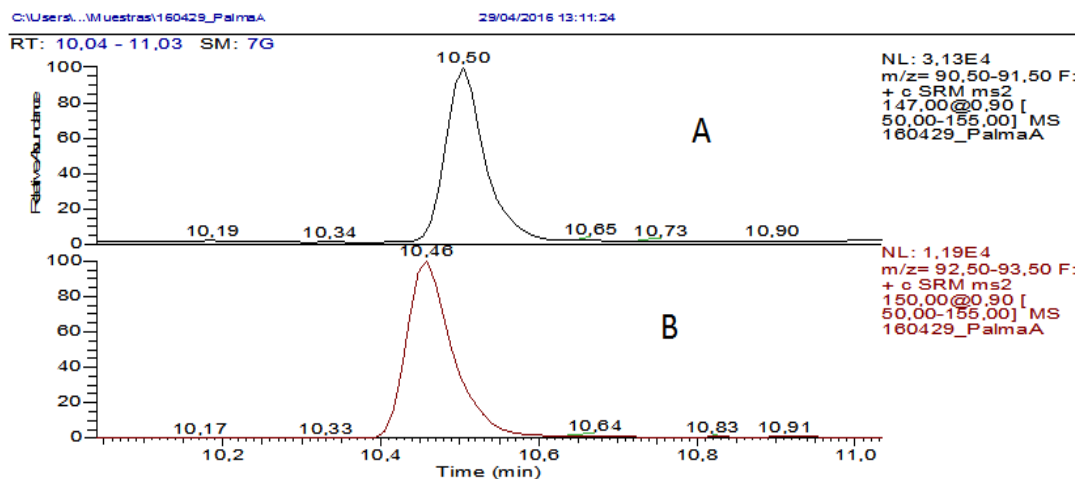


Figura 27: A) Cromatograma 3-MCPD fenilboronato B) Cromatograma 3-MCPD-d5 fenilboronato. La matriz es aceite de palma refinado.

Por último, se confirman los datos encontrados en bibliografía en cuanto a que la margarina es el alimento en el que se encuentra una mayor concentración de 3-MCPD.

7. CONCLUSIONES

- Se ha validado un método analítico muy sensible y selectivo para la determinación de 3-MCPD y glicidol en aceites vegetales y productos derivados. Este método introduce una importante innovación respecto a los publicados en bibliografía al proponer el uso del modo Masas-Masas usando como detector trampa iónica.
- El método establecido cumple el requerimiento establecido por la Unión Europea según el cual el límite de cuantificación de los métodos aplicados en el análisis de 3-MCPD y glicidol ligados no debe ser superior a 100 µg/kg.
- Se ha demostrado la aplicabilidad del método al análisis de muestras reales de aceites vegetales y productos derivados. Las concentraciones de 3-MCPD y glicidol encontradas en los alimentos analizados están de acuerdo con las informadas por la *European Food Safety Authority*.
- Se ha contribuido a la Recomendación realizada por la Unión Europea sobre la necesidad de evaluar los niveles de estos contaminantes en productos alimenticios a fin de conocer los niveles de exposición de la población a estos compuestos a través de la dieta.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] AOCS (Sociedad Americana de los Químicos de Aceites).AOCS Official Method Cd 29a-13.2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glicidol Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats by Acid Transesterification.2013a. Disponible en <http://www.aocs.org/>.
- [2] AOCS (Sociedad Americana de los Químicos de Aceites).AOCS Official Method Cd 29b-13.Determination of Bound Monochloropropanediol-(MCPD-) and Bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol-) by Gas Chromatography/MassSpectrometry (GC/MS). 2013b. Disponible en <http://www.aocs.org/>.

- [3] AOCS (Sociedad Americana de los Químicos de Aceites).AOCS Official Method Cd 29c-13.Fatty-acid-bound 3-chloropropane-1, 2, diol (3-MCPD) and 2,3-epoxi-propane-1-ol (glycidol), Determination in Oils and Fats by GC/MS (Differential Measurement).2013c. Disponible en <http://www.aocs.org/>.
- [4] Boden L., Lundgren M., Stensio K.E., Gorzynski M. Determination of 1,3-dichloro-2-propanol and 3-chloro-1,2-propanediol in papers treated with polyamidoamine-epichlorohydrin wet-strength resins by gas chromatography-mass spectrometry using selective ion monitoring. *Journal Chromatography A*, 1997, 788, 195–203.
- [5] Craft B.D., Nagy, K., Seefelder, W., Dubois, M., Destailats, F. Glycidyl esters in refined palm (*Elaeisguineensis*) oil and related fractions. Part II: practical recommendations for effective mitigation. *Food Chemistry*, 2012, 132, 73-79.
- [6] CSIC (Centro Superior de Investigaciones Científicas). [En línea][Consultado el 8 de marzo de 2015] http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES//investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf
- [7] Destailats, F., Craft, B.D., Dubois, M., Nagy, K. Glycidyl esters in refined palm (*Elaeisguineensis*) oil and related fractions. Part I: formation mechanism. *Food Chemistry*, 2012, 131, 1391-1398.
- [8] DGF (Deutsche Gesellschaft Für Fettwissenschaft). DGF Standard Method C-III 18 (09) A & B: ester-bound 3-Chloropropane-1,2-diol(3-MCPD Estandard glycidol (Glycidyl Esters). Determination in Fats and Oils by GC-MS. Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fett Produkten, Tensiden und verwandten Stoffen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, Germany, 2009.
- [9] EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria). Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009-2011 and preliminary exposure assessment. *EFSA Journal*, 2013, 11, 3381.

- [10] EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria). Risks for human health related to the presence of 3- and 2- monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA Journal*, 2016, 14, 4426
- [11] Ermacora A., Hrnčič K. Evaluation of an Improved Indirect Method for the Analysis of 3-MCPD Esters Based on Acid Transesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2012, 89, 211-217.
- [12] Ermacora A., Hrnčič K. Indirect Detection Techniques for MCPD Esters and Glycidyl Esters, in *Processing Contaminants in Edible Oils MCPD and Glycidyl Esters*. MCPD and Glycidyl Esters, edited by Macmahon S. AOCS Press, 2014.
- [13] FAO-Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Comité del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos, 1ª Reunión. Documento de debate sobre cloropropanoles obtenidas por fabricación de proteínas vegetales hidrolizadas mediante ácido y procesado térmico de los alimentos, Beijing (China), 2007. Disponible en ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCCCF/cccf1/cf01_13s.pdf.
- [14] Gutierrez M.C, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter (U.P.C)*, 2002, 122, 37-41
- [15] Hamlet C.G, Sadd PA, Crews C., Velíšek J. and Baxter D.E. Occurrence of 3-chloro-propane-1,2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: a review. *Food Additives Contaminants*, 2002, 19, 619–631.
- [16] Hamlet C.G., Sadd P.A., Kinetics of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) degradation in high temperature model systems. *European Food Research Technology A*, 2002, 215, 46–50.
- [17] Hamlet C.G., *Chloropropanols and Their Esters*. Bioactive Compounds in Foods, edited by J. Gilbert and H. Senyuva, Wiley-Blackwell, 2008.
- [18] Hrnčič K., Zelinkova Z., Ermacora A. Critical factors of indirect determination of 3-chloropropane-1,2-diol esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011, 113, 361-367.
- [19] IARC (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer), 2000. Glycidol, in: *IARC Monographs Volume 77. Some Industrial Chemicals*. Lyon, France, 469-486.

- [20] IARC (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer), 2012. 3-Monochloro-1, 2-propanediol, in IARC Monographs Volume 101. Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water. Lyon, France, 349-374.
- [21] ILSI (Instituto Internacional de Ciencias de la Salud). 3-MCPD esters in food products. Summary Report of an ILSI Europe workshop held in February 2009. Disponible en:<http://www.ilsi.org/europe/publications/final%20version%203%20mcpd%20esters.pdf>.
- [22] ILSI (Instituto Internacional de Ciencias de la Salud). MCPD and glycidyl esters in food products. ILSI Europe Report Series 2011, 1-24. Disponible en:<http://www.ilsi.org/Europe/Documents/MCPD%20Report%202012.pdf>.
- [23] ISO/DIS 18363-1, Animal and vegetables fats and oils – Determination of fatty-acid-bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 2,3-epoxy-propane-1-ol (glycidol)-Differential method using GC/MS, 2014.
- [24] Jedrkiewicz R., Glowacz A., Gromadzka J., Namiesnik J. Determination of 3-MCPD and 2-MCPD esters in edible oils, fish oils and lipid fractions of margarines available on Polish market. Food Control, 2016, 59, 487-492.
- [25] Kaze N., Sato H., Yamamoto H., Watanabe Y. Bidirectional Conversion between 3-Monochloro-1,2-propanediol and Glycidol in Course of the Procedure of DGF Standard Methods. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2011, 88, 1143-1151.
- [26] Kissa E. Determination of 3-Chloropropanediol and Related Dioxolanes by Gas-Chromatography. Journal of Chromatography A, 1992, 605, 134–138.
- [27] Kuhlmann J. Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. European Journal of Lipid Science and Technology. 2011, 113, 335-344.
- [28] Robjohns S., Marshall R., Fellows M., Kowalczyk G. In vivo genotoxicity studies with 3-monochloropropan – 1,2 – diol. Mutagenesis, 2003, 18, 401-404 .
- [29] Rouessac F., Rouessac A. Chemical Analysis, 2nd Ed, Wiley, 2007.
- [30] Sparkman O.D., Penton Z.E., Kitson F.G. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide, 2nd Edition, Academic Press, 2011.

- [31] Svejková B., Novotný O., Divinová V., Réblová Z., Dolezal M., Velisek J. Esters of Chloropropane-1,2-diol in Foodstuffs. *Czech Journal of Food Sciences*, 2004, 22, 190-196.
- [32] UE (Unión Europea). Reglamento (UE) N° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la UE*, 2006, L364/5.
- [33] UE Reglamento (UE) N° 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. *Diario Oficial de la UE*, 2011, L-2011-82592.
- [34] UE (Unión Europea). Recomendación de la Comisión de 10 de septiembre de 2014 sobre el control de la presencia de 2- y 3-monocloropropano.1, 2-diol (2- y 3-MCPD), de ésteres de ácidos grasos de 2-y 3-MCPD y de ésteres glicídicos de ácidos grasos en los alimentos. *Diario Oficial de la UE*, 2014, L271/93.
- [35] Velíšek J., Dáviděk J., Hajslova J., Kubelka V.J., Janíček G., Mankova B. Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. A*, 1978, 167, 241-244.
- [36] Weibhaar R., Perz R. Fatty Acid esters of glycidol in refined fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2010, 112, 158-165.
- [37] Weibhaar R. Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurrence and exposure estimates. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2011, 113, 304 – 308.
- [38] Willits J. Los 3-MCPD y su importancia en la industria del aceite de palma. *Palmas*, 2013, 34, tomo II, 165-173.
- [39] Xing X., Cao Y. Determination of 3-chloro-1,2- propanediol in soy sauces by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food control*, 2007, 18, 167-172.

