



Capítulo 9

Técnicas de análisis del aceite de oliva

*Rosa Quirantes Piné, Juan Jesús Domínguez Corona,
Antonio Segura Carretero y Alberto Fernández Gutiérrez*

Técnicas de análisis del aceite de oliva

Rosa Quirantes Piné, Juan Jesús Domínguez Corona, Antonio Segura Carretero y Alberto Fernández Gutiérrez

En los últimos años el aceite de oliva ha ganado en popularidad dentro y fuera de nuestras fronteras tanto por su calidad como por los potenciales beneficios para la salud derivados de su consumo. Este auge se ha traducido en un mayor interés en el conocimiento de su composición química ya que resulta de suma importancia para la determinación de su calidad y procedencia, para garantizar el cumplimiento de la normativa vigente, así como para detectar posibles adulteraciones o fraudes. Este tipo de cuestiones pueden tener importantes repercusiones socioeconómicas, sobre todo en una región como la andaluza en la que el olivar constituye un importante pilar de la economía, así como en el ámbito de la salud puesto que determinadas adulteraciones pueden resultar nocivas para el organismo.

El aceite de oliva está constituido por un elevado número de compuestos, tratándose en su conjunto de una matriz de gran complejidad, y puesto que los componentes del aceite de oliva son muy numerosos y variados, los métodos y técnicas analíticas que se emplean para identificarlos y cuantificarlos son también muy diversos. Algunos de estos métodos han sido adoptados y regulados por organismos de carácter oficial como son el Consejo Oleícola Internacional o la Comisión del Codex Alimentarius, y otros simplemente han sido propuestos en la bibliografía empleando técnicas analíticas más sofisticadas y metodologías más novedosas.

1. Análisis de rutina del aceite de oliva

En los laboratorios dedicados específicamente al análisis del aceite de oliva, como es el caso de los laboratorios de las almazaras, se llevan a cabo diversas determinaciones de rutina con el fin de evaluar la calidad del aceite de oliva así como su pureza. Para ello se emplean métodos oficiales que se encuentran validados, generalmente basados en técnicas clásicas como es el caso de las valoraciones volumétricas, la espectrofotometría y la cromatografía tanto de gases como líquida (Tabla 1)⁶.

	Parámetro	Técnica analítica empleada
Calidad	Acidez	Valoración ácido-base
	Índice de peróxidos	Valoración redox
	Absorbancia a 270 y 232 nm	Espectrofotometría
	Humedad y materias volátiles	Calorimetría diferencial
	Impurezas insolubles en éter de petróleo	
Pureza	Triglicéridos	Cromatografía líquida
	Ácidos grasos	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
	Ceras	
	Esteroles	
	Eritrodiol + Uvaol	
	Alcoholes alifáticos	
	Estigmastadienos	
	2-monopalmitato	
Contaminantes	Disolventes halogenados	Cromatografía de gases con captura electrónica
	Plaguicidas	Cromatografía de gases y cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas
	Benzopireno	Cromatografía líquida con detector de fluorescencia

Tabla 1. Determinaciones de rutina que se llevan a cabo para determinar la calidad y pureza del aceite de oliva y las técnicas analíticas que se emplean para tal fin.

1.1 Parámetros de calidad

El aceite de oliva puede clasificarse en distintas categorías: virgen extra, virgen, refinado, etc. Existe una gran diferencia entre los distintos tipos de aceites, tanto en sus cualidades como en su precio. Por tanto, ha sido necesario establecer una serie de criterios objetivos para poder diferenciar entre ellos, basados en las características organolépticas y en la medida de determinados parámetros físico-químicos como la acidez, el índice de peróxidos y el coeficiente de extinción molar a 270 y 232 nm.

La acidez es una medida del contenido en ácidos grasos libres expresado en porcentaje de ácido oleico. El método habitualmente empleado para determinarla consiste en una valoración ácido-base utilizando como agente valorante una disolución etanólica de hidróxido potásico y como indicador, fenolftaleína (Fig. 1).



Figura 1. Montaje para llevar a cabo la valoración ácido-base que permite determinar la acidez

Por otro lado, el índice de peróxidos estima el grado de oxidación de un aceite y se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa. El método oficial para determinar este parámetro consiste en una volumetría en la que se trata el aceite con yoduro potásico y el yodo formado por oxidación del yoduro es valorado con una disolución de tiosulfato sódico de concentración conocida.

El coeficiente de extinción molar a 270 y 232 nm se usa con frecuencia para detectar la presencia de compuestos oxidados anormales. Para determinarlo se mide la absorbancia de la muestra de aceite a una longitud de onda de 270 y 232 nm y se calculan los coeficientes de extinción molar correspondientes (ϵ_{270} y ϵ_{232}) a partir de la ley de Lambert-Beer:

$$\varepsilon = \frac{A}{C \cdot b}$$

Siendo, A = absorbancia medida a 270 y 232 nm respectivamente

C = concentración de aceite (g/100 ml)

b = espesor de la cubeta de medida (cm)

El contenido en humedad e impurezas del aceite de oliva influyen de forma importante en los procesos de filtrado y comercialización de estos aceites. La humedad y materias volátiles se determinan por calorimetría diferencial a 103 °C en estufa de aire forzado hasta pesada constante. La cuantificación de las impurezas insolubles en éter de petróleo se realiza disolviendo el aceite en exceso de éter, pasando la disolución por un sistema de filtrado que posteriormente se lleva a 103 °C hasta pesada constante.

1.2 Parámetros de pureza

El aceite de oliva no sólo es apreciado por sus cualidades organolépticas, sino también por sus propiedades nutritivas y los efectos beneficiosos para la salud que ha demostrado en numerosos estudios ^{7,8}. Debido a estas cualidades, el aceite de oliva presenta un precio de mercado superior al de otros aceites vegetales ⁹. Por ello, en numerosas ocasiones se ha tratado de adulterar mezclándolo con otro tipo de aceites de inferior calidad y precio cometiendo un fraude y poniendo en peligro en algunos casos la salud pública. Esto ha conducido a que diversos organismos como la FDA (Food and Drug Administration), la Comisión del Codex Alimentarius o el Consejo Oleícola Internacional establezcan una serie de métodos oficiales para el control de la pureza de los aceites de oliva que se comercialicen. Estos métodos, en muchos casos se han incorporado a la legislación de la Unión Europea.

Las determinaciones que normalmente se llevan a cabo para detectar posibles adulteraciones son la composición de triglicéridos, el perfil de ácidos grasos y esteroides, así como la cuantificación del contenido en ceras, alcoholes alifáticos, eritrodioleol y uvaol, estigmastadienos, 2-monopalmitato y disolventes halogenados. Este tipo de determinaciones son algo más complejas que las relacionadas con los parámetros de calidad y por tanto, requieren de técnicas analíticas más sofisticadas, como es el caso de la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución, que son las técnicas seleccionadas por los métodos oficiales para realizar estos análisis. La metodología que se emplea para la determinación de estos parámetros se recoge en el apartado siguiente en el que se repasan por separado cada una de las técnicas instrumentales que se aplican al análisis del aceite de oliva.

2. Técnicas analíticas aplicadas en determinaciones en aceite

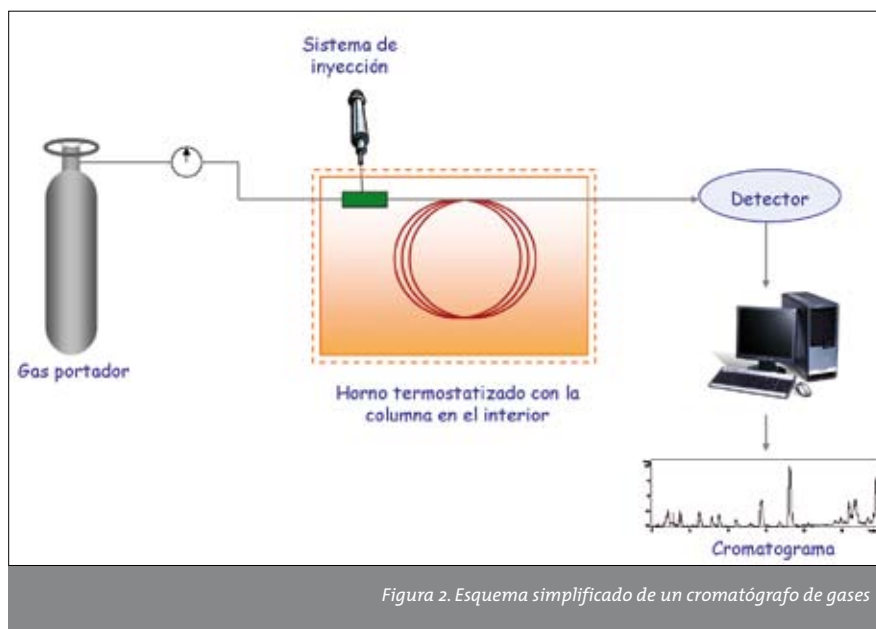
En las últimas décadas el aceite de oliva ha despertado un creciente interés en el ámbito de la investigación. De esta forma, aunque existen métodos oficiales para el análisis de los diversos componentes del aceite, en su mayoría basados en técnicas clásicas, distintos investigadores han propuesto metodologías más actuales. Estas metodologías aportan ciertas ventajas derivadas del uso de técnicas instrumentales más sofisticadas como una mayor sensibilidad, rapidez de análisis y posibilidad de automatización entre otras. En muchos casos, al tratarse de una muestra compleja, el análisis de algún componente concreto del aceite requiere el uso de una técnica separativa, como es el caso de la cromatografía de gases, la cromatografía líquida de alta resolución o la electroforesis capilar. Estas técnicas precisan de un sistema de detección adecuado, que en muchos casos puede ser otra técnica analítica como la espectrometría de masas o la espectroscopía infrarroja. En este caso se trata de técnicas acopladas en las que se unen las ventajas de ambas técnicas.

En este apartado se describen de forma simplificada los fundamentos de las principales técnicas analíticas que se usan en la actualidad para llevar a cabo el análisis de aceite de oliva. Asimismo se recogen sus aplicaciones en este campo, desde las más usuales y de rutina en los laboratorios de control de calidad de aceite como es el caso de la cromatografía de gases, hasta aquellas aplicaciones más novedosas y que pueden suponer una buena alternativa a los métodos oficiales.

2.1 Cromatografía de gases (GC)

FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA:

La cromatografía de gases es una técnica separativa en la cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases. Una de ellas es una fase estacionaria, mientras que la otra es una fase móvil gaseosa, esencialmente inerte, que se mueve a través del lecho de fase estacionaria que se encuentra en el interior de la columna. Si la fase estacionaria es un líquido, la técnica recibe el nombre de cromatografía gas-líquido (GLC) y los analitos se van a separar según las diferencias de solubilidad en la fase estacionaria así como por su distinta volatilidad. Sin embargo, si es un sólido se denomina cromatografía gas-sólido (GSC) y se basa en un fenómeno de adsorción por lo que los analitos se separan según su capacidad para ser adsorbidos por la fase estacionaria y sus diferencias de volatilidad. La GSC tiene un uso más limitado debido a que muchos analitos son retenidos en exceso por el sólido, de forma que el gas portador no puede arrastrarlos dando lugar a tiempos de retención muy largos y a la aparición de colas en los picos.



En GC, los compuestos a analizar deben ser volátiles y térmicamente estables. La muestra es introducida en la fase móvil a través de un sistema de inyección (Fig. 2) y puesto que el analito tiene que introducirse en fase gaseosa, la temperatura en el sistema de introducción de muestra debe controlarse de forma precisa. Actualmente se pueden analizar mediante esta técnica muestras que no sean volátiles o que no tengan estabilidad térmica suficiente mediante el empleo de reacciones de derivación previas.

Una vez que la muestra se introduce en el sistema de inyección, es arrastrada por la fase móvil o gas portador hacia la columna. Al entrar la muestra en la columna, sus componentes interaccionan en extensión variable con la fase estacionaria y se reparten de manera distinta entre ambas fases. Cada proceso de sorción-desorción ocurre repetidamente hasta que cada analito forma una banda separada y eluye de la columna.

Cuando el analito emerge del final de la columna, entra en el detector y produce de alguna forma una señal medible. La intensidad y duración de la señal estará relacionada con la cantidad o naturaleza del analito. Generalmente, la señal es amplificada y registrada por un integrador electrónico, un ordenador o por otros medios mediante los cuales se obtiene el cromatograma que permite identificar y cuantificar el analito. Aunque hay un gran número de detectores disponibles para cromatografía de gases, aquellos basados en la conductividad térmica, ionización de llama, captura electrónica, emisión de llama y conductividad iónica son los más ampliamente usados. También es posible acoplar a GC las técnicas de espectroscopía de infrarrojo o espectrometría de masas, sin duda el detector con mayor potencial analítico.

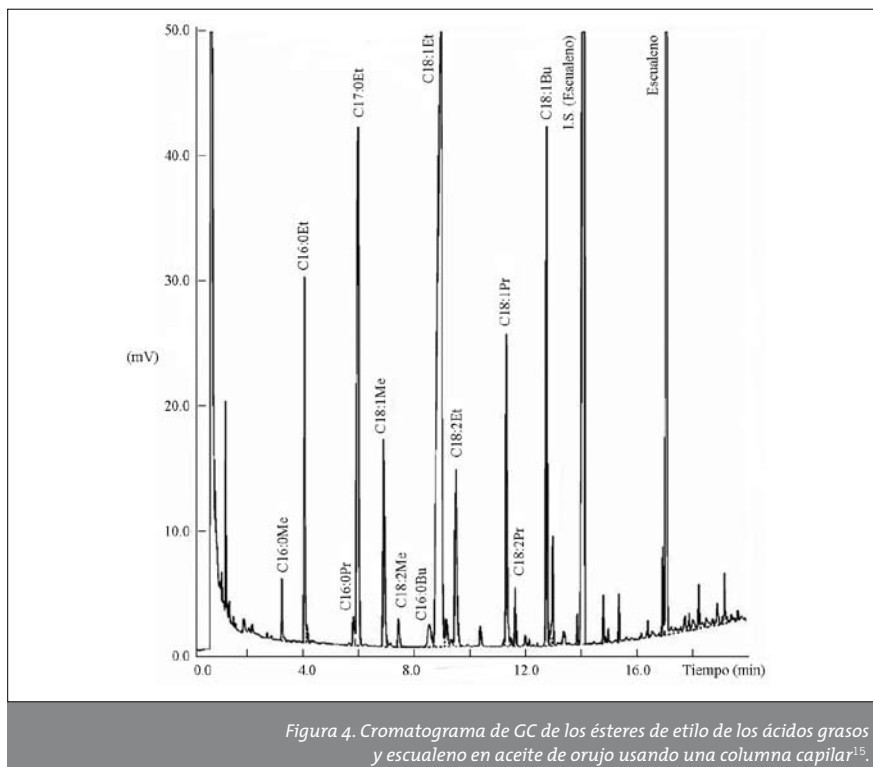


Figura 3. Cromatógrafo de gases comercial (a) y detalle de una columna para GC (b)

APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES AL ANÁLISIS DEL ACEITE DE OLIVA:

Las principales aplicaciones de la cromatografía de gases en el campo del aceite de oliva se centran en la determinación de la fracción de ácidos grasos y sus derivados, así como de la fracción insaponificable.

Los ácidos grasos libres suelen analizarse por GC con columnas capilares en forma de ésteres volátiles, por lo general, ésteres metílicos. Empleando columnas capilares de gran longitud se pueden resolver de forma adecuada los ácidos grasos en función del número de átomos de carbono y de insaturaciones, e incluso se pueden llegar a separar isómeros geométricos y de posición de dobles enlaces, es decir, se pueden determinar los ácidos grasos trans (Fig. 4).



Mediante GC además puede establecerse el contenido de ácidos grasos totales, así como determinar cuáles esterifican las diferentes posiciones del glicerol en los triglicéridos. Estas determinaciones resultan de utilidad ya que la composición de ácidos grasos y triglicéridos es característica de los distintos tipos o variedades de aceites y por otra parte, cualquier alteración de un aceite, ya sea con fines fraudulentos o bien a causa de la propia manipulación industrial, afecta a su composición. Este tipo de análisis requiere tres etapas previas a la separación cromatográfica:

1. hidrólisis química para determinar el porcentaje de cada ácido graso, referido al total de los ácidos grasos;
2. hidrólisis enzimática con lipasa pancreática para conocer el porcentaje de ácidos grasos en posición beta del glicerol, y por diferencia los de la posición alfa;
3. hidrólisis enzimática con fosfolipasa que permite conocer los ácidos grasos en las posiciones 1 y 3 del triglicérido.

Los ácidos grasos aislados se determinan, al igual que los libres, previa esterificación por cromatografía de gases¹⁰.

También se han descrito algunos métodos para la determinación de triglicéridos sin hidrolizar aunque comúnmente se utilizan métodos de HPLC que se describirán en el siguiente apartado. Los triglicéridos intactos se separan en columnas rellenas,

según la longitud de la cadena de carbono, o en columnas capilares según la longitud de la cadena y la insaturación¹¹. Los monoacilgliceroles y los diacilgliceroles se separan igualmente en columnas capilares preferiblemente como trimetilsilil derivados¹².

El contenido en ceras del aceite de oliva puede determinarse mediante GC utilizando una metodología en la que la muestra, a la que se ha adicionado un patrón interno apropiado como el araquidato láurico, se fracciona en una columna de vidrio rellena de gel de sílice y la fracción eluida correspondiente a las ceras puede ser analizada por cromatografía de gases capilar¹³.

El análisis de los componentes minoritarios del aceite de oliva en sus formas libres o esterificadas requiere una preparación larga y tediosa de la muestra, bajo condiciones experimentales desfavorables. Para llevar a cabo el análisis de la fracción insaponificable del aceite de oliva es necesario, en primer lugar, realizar una saponificación y extraer con disolventes adecuados esta fracción. Posteriormente, el insaponificable se separa en distintas fracciones mediante cromatografía en columna o en capa fina.

En el aceite de oliva existen pequeñas cantidades de hidrocarburos saturados lineales, ramificados, terpénicos y aromáticos. Entre los hidrocarburos insaturados, el más importante es el escualeno que está presente en todos los aceites y grasas vegetales, especialmente en el aceite de oliva. Para la determinación de estos compuestos se utiliza la cromatografía de gases de la fracción de hidrocarburos aislada del insaponificable, realizándose la cuantificación mediante el uso de patrones internos^{14,15}. La naturaleza química de los hidrocarburos separados por GC puede establecerse mediante el acoplamiento de la espectrometría de masas como sistema de detección.

La composición de esteroides es muy característica de cada tipo de aceite por lo que en el caso del aceite de oliva se utiliza con frecuencia para detectar mezclas fraudulentas con otros aceites¹⁶. El análisis por GC de los esteroides está bien establecido. Tras el aislamiento de la fracción de esteroles por los métodos indicados, se procede a su inyección directamente o previa derivación con un reactivo silanizante¹⁷. El análisis de estos esteroides requiere columnas capilares largas rellenas con fases estacionarias polares o polarizables. Los diálcoholes triterpénicos presentes en el aceite de oliva como el eritrodíol y el uvaol se determinan junto con la fracción de esteroides¹⁸. En algunos estudios se utiliza HPLC acoplada al cromatógrafo de gases para llevar a cabo el fraccionamiento del insaponificable en sustitución de la cromatografía en capa fina debido a los tiempos de elución tan elevados que presentan los esteroides (Fig. 5)¹⁹.

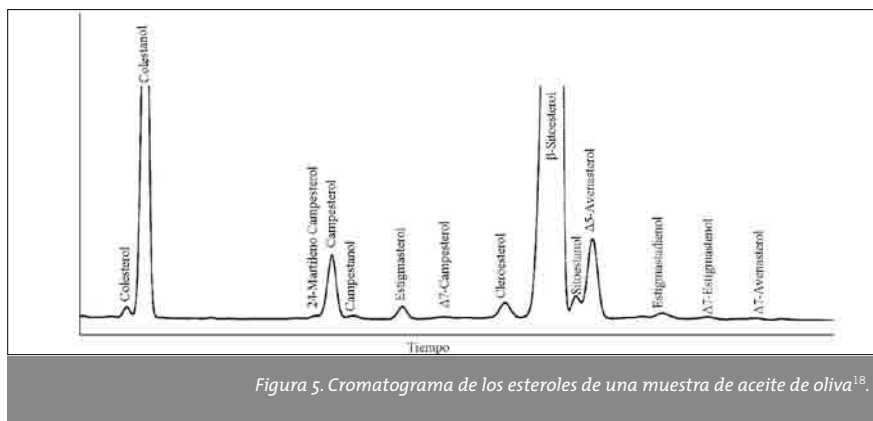


Figura 5. Cromatograma de los esteroides de una muestra de aceite de oliva¹⁸.

El contenido en alcoholes alifáticos también se establece por cromatografía de gases capilar. Tras la separación de la fracción alcohólica del insaponificable, los alcoholes pueden analizarse directamente o previa silanización empleando columnas apolares, o bien se pueden acetilar y utilizarse columnas polares.

Otros componentes importantes en el aceite de oliva que pueden analizarse mediante GC son los tocoferoles. Después de la extracción del insaponificable y separación de la fracción de tocoferoles mediante cromatografía en capa fina, estos compuestos se silanizan y se analizan mediante GC con el uso de un patrón interno²⁰.

El análisis por dilución de los extractos de aromas (AEDA) se emplea para caracterizar los componentes volátiles destilados bajo condiciones suaves. Los volátiles se separan en varias columnas de GC y se caracterizan por espectrometría de masas. La cuantificación se realiza mediante un ensayo de dilución de isótopo estable utilizando odorantes marcados con deuterio como estándares internos.

La determinación cualitativa y cuantitativa de los compuestos fenólicos del aceite de oliva puede realizarse mediante cromatografía de gases capilar de estos compuestos o de sus derivados²¹. En los métodos analíticos estandarizados, el sistema de detección más ampliamente usado es la ionización de llama (FID) pero el uso de la espectrometría de masas como sistema de detección permite obtener datos de masa molecular e información estructural, facilitando la identificación de este tipo de compuestos²². La metodología incluye extracción líquido-líquido de los compuestos fenólicos, limpieza del extracto metanólico seguida de una destilación azeotrópica para eliminar los disolventes, cromatografía en columna a baja presión para limpiar los extractos y finalmente análisis mediante GC capilar de los trimetilsilil derivados.

2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA:

En la cromatografía líquida de alta resolución los componentes de la muestra se distribuyen entre una fase móvil (el disolvente) y una fase estacionaria (el relleno de la columna).



Figura 6. Esquema simplificado de un equipo de HPLC junto a uno comercial

La HPLC tiene su origen en la cromatografía en columna clásica aunque tanto sus fundamentos como su desarrollo son similares a la cromatografía de gases. En este caso es la habilidad con que los constituyentes de la muestra se reparten entre las dos fases lo que condicionará la separación. La HPLC es comparable a la GC en velocidad, eficiencia y resolución y es inherentemente más versátil. No está limitada a muestras volátiles y térmicamente estables, y la elección de la fase estacionaria incluye sólidos adsorbentes, adsorbentes modificados químicamente, cambiadores iónicos y materiales porosos, dando lugar a distintas modalidades. Además, una elección mucho más amplia de fases móviles que en GC facilita una variación muy considerable en la selectividad del proceso. Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria, se pueden distinguir cuatro modos diferentes:

- a. **Cromatografía de adsorción**, donde la separación se basa en repetidos pasos de adsorción-desorción.
- b. **Cromatografía de partición**, basada en la partición entre la fase móvil y la estacionaria.
- c. **Cromatografía de cambio iónico**, en la que la fase estacionaria está compuesta por una superficie iónica de carga opuesta a la de la muestra.
- d. **Cromatografía de exclusión por tamaños**, donde la muestra se separa de acuerdo a su peso molecular a través de la columna rellena de un material con un tamaño de poro controlado.

La cromatografía de partición es la más ampliamente utilizada y en la práctica, pueden diferenciarse dos modalidades, dependiendo de la polaridad de las dos fases:

- **Cromatografía en fase normal**, donde la fase estacionaria es de naturaleza polar y la fase móvil es apolar. En este caso, las muestras polares son rete-

nidas más fuertemente por la columna permitiendo, por tanto, la elución de componentes apolares en primer lugar.

- ▮ Cromatografía en fase inversa, donde la fase estacionaria es de naturaleza apolar y el disolvente de elución o fase móvil es polar. En este caso ocurre lo contrario que en fase normal, los compuestos apolares serán retenidos durante más tiempo en la columna.

En cromatografía líquida suelen usarse como fase móvil mezclas de disolventes. Cuando la composición de la fase móvil se mantiene constante a lo largo del desarrollo cromatográfico, se denomina elución en modo isocrático. Por otro lado, cuando la composición de la fase móvil varía, se conoce como modo de elución en gradiente.

Los detectores más ampliamente utilizados son aquellos basados en la absorción de radiación UV/visible por los solutos y los que monitorizan las diferencias en el índice de refracción entre los solutos disueltos en la fase móvil y la fase móvil pura. Otros detectores que son más selectivos en su respuesta dependen de propiedades específicas de cada soluto como fluorescencia, conductividad eléctrica, corrientes de difusión y radiactividad y especialmente espectrometría de masas.

APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA AL ANÁLISIS DEL ACEITE DE OLIVA:

La estructura de los triglicéridos del aceite de oliva puede determinarse por HPLC en fase inversa, separándose según el número de átomos de carbono y según su insaturación mediante el uso de columnas rellenas con fases ligadas y mezclas acetonitrilo:acetona como fases móviles.

Puede usarse una combinación de cromatografía líquida de alta resolución con ión plata (SI-HPLC)²³ y la separación cromatográfica de derivados diacilglicérols como parte de un procedimiento de análisis estereoespecífico para obtener la distribución de los ácidos grasos en las tres posiciones de los triglicéridos del aceite de oliva virgen extra. El análisis de estas especies se ha usado para describir e identificar el origen de aceites así como para detectar ciertas adulteraciones. Puede usarse también HPLC de exclusión por tamaños para la determinación de la cantidad de oligopolímeros formados durante la oxidación de los triacilglicérols. La ausencia de oligopolímeros en aceite de oliva virgen es un indicador de calidad.

La determinación de pigmentos como clorofilas y carotenos se puede efectuar por HPLC con detección UV previa extracción de la fracción de pigmentos mediante extracción líquido-líquido o bien mediante extracción en fase sólida (SPE)²⁴.

Se han puesto a punto métodos de HPLC para el análisis de los tocoferoles como alternativa a la cromatografía de gases que suele emplearse ya que estos compuestos pueden deteriorarse por la alta temperatura usada en GC²⁵. En estos métodos se inyecta directamente el aceite disuelto en hexano y pueden resolverse las ocho formas de tocoferoles en modo isocrático, utilizando como fase móvil n-hexano con pequeñas cantidades de un disolvente polar como isopropanol o dioxano. El aceite de oliva virgen contiene casi exclusivamente α -tocoferol mientras que sus adulteraciones más comunes tienen un patrón más complicado, sin embargo, a causa de la

variabilidad natural y diversos problemas analíticos, la detección de adulteraciones utilizando este método presenta importantes limitaciones.

Aunque algunos componentes minoritarios como los esteroides, los productos de deshidratación del esteroide, los alcoholes grasos, etc. son estudiados principalmente por GC, la técnica HPLC se puede considerar un procedimiento alternativo o complementario. Por ejemplo, se pueden determinar esteroides mediante inyección directa o previa derivación con un reactivo silanizante (Fig. 7)^{26,27}. Igualmente, el escualeno se ha determinado en varios estudios mediante HPLC por inyección directa del aceite diluido o tras su fraccionamiento con cartuchos de extracción en fase sólida²⁸.

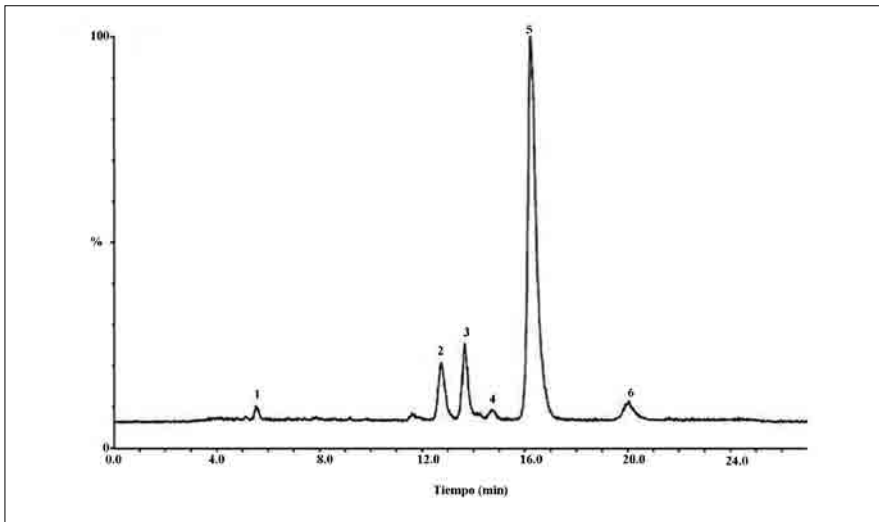


Figura 7. Cromatograma obtenido mediante HPLC-APCI-MS de la fracción de esteroides del aceite de oliva virgen extra. Asignación de los picos: 1 = uvaol + eritrodiool, 2 = colesterol, 3 = Δ^5 -avenasterol, 4 = estigmasterol, 5 = β -sitoestero, 6 = sitoestanol²⁷.

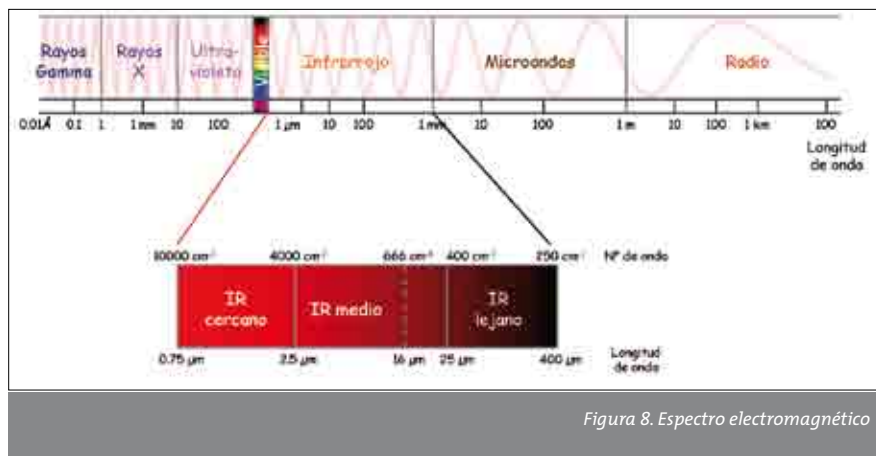
Los compuestos fenólicos son principalmente analizados por técnicas de HPLC después de extraerlos del aceite mediante extracción en fase sólida usando disolventes orgánicos apropiados²⁹. La correcta separación de los compuestos fenólicos del aceite de oliva por HPLC en fase inversa requiere la utilización de un gradiente consistente en al menos dos disolventes: un ácido diluido y un disolvente orgánico, usando tirosol, ácido vanílico, ácido siríngico o ácido o-cumárico como patrones internos.

Además puede utilizarse la HPLC como una etapa previa de limpieza o de separación de las distintas fracciones del aceite.

2.2 Espectroscopía infrarroja (IR)

FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA:

La absorción de radiación en la región infrarroja del espectro electromagnético produce cambios en la energía vibracional de las moléculas. Los cambios de energía son normalmente de entre $6 \cdot 10^3 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $42 \cdot 10^3 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$, que corresponde a $250\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$, aunque algunas ocurren entre 4000 cm^{-1} y el comienzo de la región visible sobre 12500 cm^{-1} , en la región conocida como infrarrojo cercano (Fig. 8).



Para absorber radiación infrarroja, una molécula debe experimentar un cambio neto en su momento dipolar. El momento dipolar está determinado por la magnitud de la diferencia de carga de los átomos que forman la molécula y por la distancia entre ellos. Dado que las moléculas vibran, se producirá una fluctuación regular del momento dipolar lo que origina un campo que puede interactuar con el campo eléctrico asociado a la radiación IR. Si la frecuencia de la radiación iguala exactamente a la frecuencia de vibración natural de la molécula, ocurre una transferencia neta de energía que da lugar a un cambio en la amplitud de la vibración molecular; como consecuencia se absorbe la radiación. De manera análoga, la rotación de moléculas asimétricas alrededor de sus centros de masa produce una fluctuación dipolar periódica que puede interactuar con la radiación.

Cuando se trata de especies homonucleares como el O_2 , N_2 o Cl_2 , el momento dipolar no se altera durante la vibración o la rotación y, en consecuencia, este tipo de compuestos no absorben en el infrarrojo.

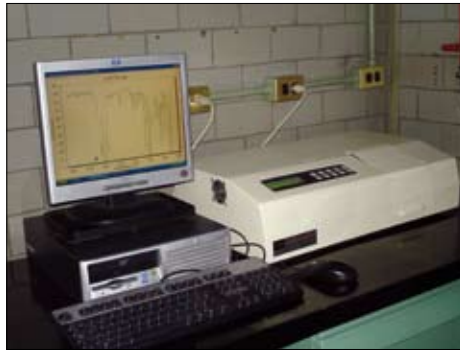


Figura 9.
Espectrofotómetro
de infrarrojo
comercial

La espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se basa en interferometría y hace uso del espectro completo de la fuente en lugar de las longitudes de onda individuales que se usan en la espectroscopía IR convencional. La espectroscopía FTIR tiene grandes ventajas respecto a la espectroscopía IR convencional como son una sustancial mejora de la relación señal-ruido y la posibilidad de detección de todas las frecuencias simultáneamente, reduciéndose así el tiempo de análisis sin pérdida de resolución³⁰.

ANÁLISIS CUALITATIVO:

El rango de frecuencias de un espectro de IR comprendido entre 700-1200 cm^{-1} es conocido como “región de la huella dactilar”. Pequeños cambios en la estructura molecular ocasionan con frecuencia cambios significativos en los picos de absorción de la región de la huella dactilar por lo que esta zona es altamente característica para un compuesto individual. De esta forma, los espectros de muestras desconocidas pueden compararse con los de compuestos conocidos, por lo que muchos espectrómetros IR modernos incorporan librerías de espectros informatizadas que simplifican la comparación de los espectros.

ANÁLISIS CUANTITATIVO:

Como la espectroscopía IR es una técnica de análisis secundaria, el desarrollo de métodos de análisis cuantitativos requiere una calibración previa con un grupo de patrones de composición conocida. De esta forma, se establece la relación entre la intensidad de las bandas de IR y la concentración. Una vez que se ha llevado a cabo la calibración, puede entonces usarse la espectroscopía IR con fines cuantitativos. Pero para ello, deben cumplirse dos condiciones generales, la primera de ellas es que el espectro de las muestras se registre bajo las mismas condiciones empleadas para la calibración incluyendo mismos parámetros instrumentales, idéntica forma de manipulación de la muestra, etc. Otra condición que debe cumplirse es que la composición de los patrones de calibración sea representativa de la de las muestras a analizar.

Para la calibración pueden emplearse diversos métodos, desde la ley de Lambert-Beer que es adecuada para sistemas simples, a las sofisticadas técnicas de análisis multivariante que se requieren para sistemas más complejos. La elevada capacidad de manipulación de datos de los sistemas con transformada de Fourier ha permitido que

estas últimas técnicas sean implementadas en el software de los instrumentos y se puedan aplicar directamente a los datos espectrales. Esto ha sido clave para el resurgimiento de la espectroscopía de infrarrojo cuantitativa durante las últimas décadas.

APLICACIONES DE LA ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO AL ANÁLISIS DEL ACEITE DE OLIVA:

La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) así como la de infrarrojo medio (MIR) se han utilizado en diversos estudios para llevar a cabo una cuantificación rápida y evaluar la calidad del aceite de oliva. Estas técnicas se han encontrado con algunos problemas relativos a ciertas características de las muestras como su opacidad, nivel de humedad, etc. Sin embargo, se han ampliado sus posibilidades de aplicación gracias a la incorporación de la transformada de Fourier (FT), las nuevas técnicas de muestreo y la evaluación de los datos estadísticos multivariantes. Las bases de datos obtenidas con espectros de muestras reales son muy útiles para evitar errores en la clasificación de los aceites y también para conseguir una automatización completa³¹.

Los estudios que se han realizado con espectroscopía de IR cercano muestran que los espectros del aceite de oliva contienen información sobre el grado de insaturación, la insaturación total, el número de carbonos y la composición de la fracción insaturada.

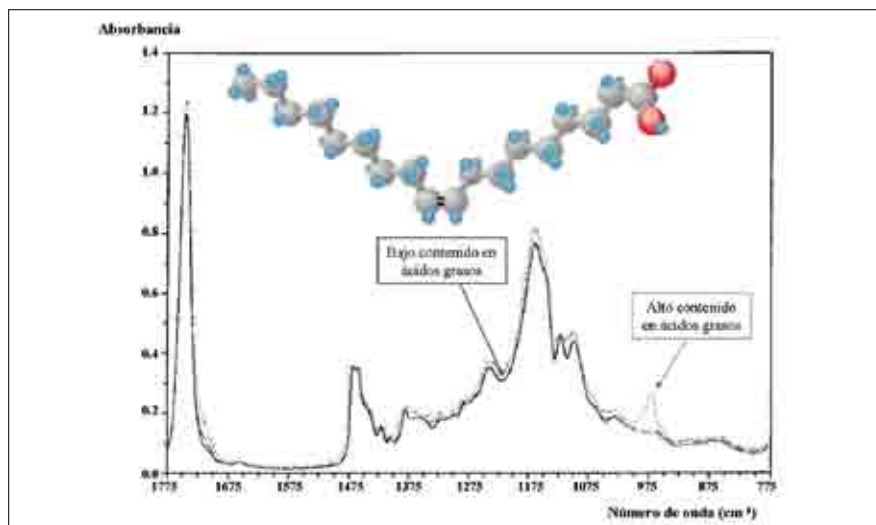


Figura 10. Espectro ATR-FTIR de dos aceites de oliva virgen extra con diferentes contenidos en ácidos grasos: bajo (línea continua) y alto (línea discontinua)³³.

Se han desarrollado una serie de métodos basados en la información contenida en el espectro de IR medio para cuantificar el contenido trans/cis de aldehídos en aceites sometidos a estrés térmico y el contenido en ácidos grasos libres. La espectroscopía MIR también se ha aplicado a la determinación de distintos índices

químicos como son el índice de yodo, el índice de saponificación, el índice de grasa sólida y el valor de anisidina.

La determinación del contenido de ácidos grasos libres en el aceite de oliva puede ser importante ya que éstos presentan mayor tendencia a oxidarse que los triglicéridos por lo que su presencia en el aceite de oliva incrementa la posibilidad de enranciamiento. Se han desarrollado metodologías de FTIR para la determinación cuantitativa rápida de los ácidos grasos libres utilizando como dispositivo de muestreo tanto celdas de transmisión como reflectancia total atenuada (ATR)^{32,33}. Estos métodos son rápidos, poco contaminantes y pueden aplicarse a muestras de diferentes categorías (aceite virgen extra, virgen, puro y de orujo). (Fig. 10).

El índice de yodo expresa el nivel de insaturación de una muestra. Este valor se deriva de la técnica de adición de yoduro a un compuesto insaturado o mezcla de compuestos que reaccionan cuantitativamente con los dobles enlaces³⁴. La espectroscopía IR puede usarse en la determinación del grado de insaturación de mezclas de ácidos grasos mediante cocientes entre parámetros obtenidos directamente de los espectros IR o bien transformando estos parámetros en el índice de yodo tradicional, estableciendo previamente la relación entre ambos valores mediante una calibración^{35,36}.

El índice de saponificación está relacionado con el promedio del peso molecular de los triglicéridos en la mezcla y se determina mediante la cantidad de hidróxido potásico necesario para saponificar una cierta cantidad de aceite. Un índice de saponificación alto indica un peso molecular promedio bajo y viceversa.

El índice de grasa sólida mide el cambio de volumen específico de una grasa en función de la temperatura. Otro parámetro íntimamente relacionado con el anterior es el contenido en grasa sólida. Estos parámetros proporcionan información de las características funcionales de los aceites y grasas en general y pueden determinarse mediante espectroscopía FTIR, que es capaz de proporcionar el perfil de índice de grasa sólida de una muestra en pocos minutos. Este método requiere calibraciones mediante mínimos cuadrados parciales³⁷.

También puede llevarse a cabo la determinación del grado de oxidación de aceites mediante FTIR usando el índice de peróxidos como parámetro indicativo de la estabilidad oxidativa del aceite³⁸. Esta técnica proporciona una forma rápida de evaluar el estado oxidativo del aceite o de monitorizar los cambios en aceites bajo condiciones de estrés térmico. Sin embargo, es necesario caracterizar los cambios espectrales que ocurren procedentes de la oxidación del aceite, asignando longitudes de onda a las especies moleculares más comunes producidas y conocer las interferencias espectrales potenciales.

Otra posible aplicación de la FTIR es la detección e incluso cuantificación de adulteraciones del aceite de oliva virgen extra tanto con otro tipo de aceites vegetales³⁹ como con aceite de oliva refinado⁴⁰ o con aceite de orujo⁴¹. Para ello, pueden usarse métodos de clasificación multivariantes como el análisis discriminante (Fig. 11).

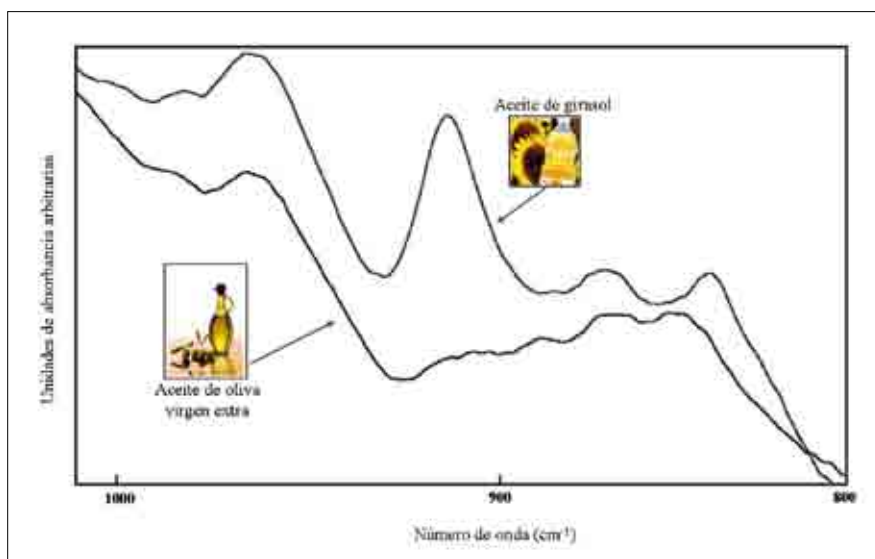


Figura 11. Región de la huella dactilar de un espectro IR de aceite de oliva virgen extra y de aceite de girasol³⁹.

La espectroscopía infrarroja está adquiriendo una enorme importancia desde el punto de vista de implementación en los laboratorios de rutina para identificaciones discriminantes de lotes basadas en el análisis de esteroides, ceras, alcoholes alifáticos, acidez, etc.

2.4 Espectroscopía Raman

FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA:

El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el examen de la radiación dispersada inelásticamente que experimenta ligeros cambios de frecuencia característicos del material analizado e independientes de la frecuencia de la radiación incidente. Consiste, por tanto, en hacer incidir un haz de luz visible de alta intensidad de frecuencia ν_0 , normalmente procedente de un láser, sobre una muestra y examinar la radiación dispersada por ésta.

Cuando los fotones de luz visible inciden sobre la molécula, la mayor parte la atraviesan pero una pequeña fracción son dispersados. En este proceso el fotón incidente excita la molécula transitoriamente a un nivel de energía vibracional (o rotacional) superior no permitido, el cual abandona rápidamente para pasar a uno de los niveles de energía permitidos emitiendo un fotón cuya energía dependerá del salto realizado por la molécula de forma que pueden distinguirse varios casos (Fig. 12):

- Si el fotón dispersado tiene la misma frecuencia ν_0 que el incidente, se ha producido un choque elástico ya que ni el fotón ni la molécula sufren variaciones en su estado energético y por tanto, la molécula vuelve al mismo

nivel de energía que tenía antes del choque, dando lugar a la **dispersión Rayleigh**.

- Si el fotón es dispersado a una frecuencia distinta de la incidente, se dice que se ha producido un choque inelástico ya que existe transferencia de energía entre la molécula y el fotón. En este caso pueden darse dos fenómenos:
 - ▮ Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor que el incidente, la molécula después de saltar al estado de energía no permitido vuelve a uno permitido de mayor energía que el que tenía inicialmente. El fotón dispersado tiene una frecuencia $\nu_0 - \nu_r$ y se denomina **dispersión Raman Stokes**.
 - ▮ Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor que el incidente, la molécula antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a su estado fundamental. El fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 + \nu_r$ y se produce la denominada **dispersión Raman anti-Stokes**.

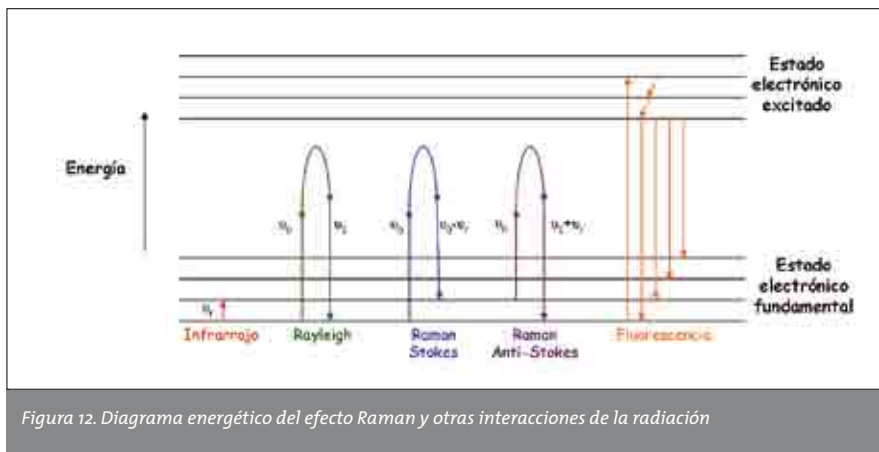


Figura 12. Diagrama energético del efecto Raman y otras interacciones de la radiación

Cada material tendrá un conjunto de valores ν_r característicos de su estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman.

El espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica dispersada en función del número de onda. Está formado por una banda principal o Rayleigh y dos series de bandas secundarias correspondientes a las bandas Raman Stokes y anti-Stokes, situadas simétricamente a ambos lados de la banda Rayleigh (Fig. 13). El desplazamiento de las frecuencias Raman respecto a la frecuencia incidente ν_0 es independiente de esta última, y por ello suele tomarse como abscisa de estos espectros Raman, situando el centro de la banda Rayleigh como origen del eje. Así, en el eje de abscisas en realidad aparecerá la diferencia entre la frecuencia Raman y la de la radiación incidente.

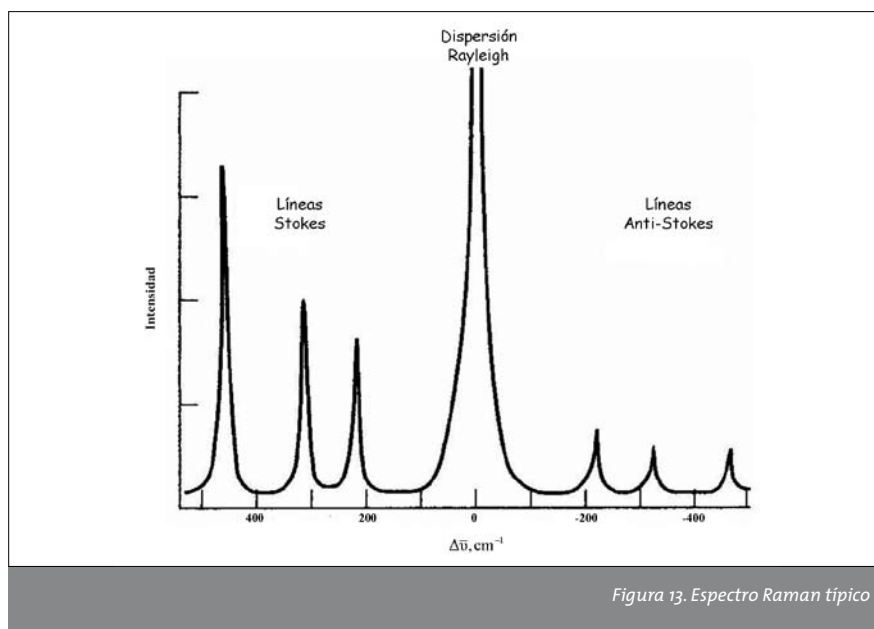


Figura 13. Espectro Raman típico

A temperatura ambiente, según la ley de distribución de energías de Maxwell-Boltzman, el 99% de las moléculas se encuentran en el estado vibracional de menor energía, y por tanto, la probabilidad de que ocurran transferencias de energía que den lugar a la dispersión Raman Stokes es mucho mayor que la de la dispersión Raman anti-Stokes. Esto se traduce en que la intensidad de la dispersión Raman Stokes es del orden de 100 veces superior a la de la dispersión Raman anti-Stokes. La diferencia entre la intensidad del efecto Stokes y el anti-Stokes hace que habitualmente se trabaje midiendo sólo el efecto Stokes y por comodidad se sitúa el resultado en la parte positiva del eje.

El efecto Raman se observa si la molécula es polarizable, es decir, si la forma de la molécula puede ser alterada sin generar un momento dipolar. La absorción de radiación IR como ya se ha comentado requiere la generación de un momento dipolar, de esto se desprende que las moléculas que muestran absorción en la región IR del espectro electromagnético no presentarán efecto Raman y viceversa, por lo que pueden considerarse dos técnicas complementarias.

La espectroscopía Raman siempre se lleva a cabo en la región visible del espectro electromagnético. La frecuencia de la radiación incidente no afecta a la variación Raman observada y por tanto, puede usarse cualquier frecuencia que no ocasione efectos de absorción o fluorescencia que pudieran complicar la medida.

APLICACIONES DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN AL ANÁLISIS DEL ACEITE DE OLIVA:

Los grupos no polares como los dobles enlaces C=C muestran bandas de dispersión Raman intensas. Debido a que la propiedad principal de los ácidos grasos insaturados es su contenido en dobles enlaces y su configuración (cis o trans), los espectros FT-Raman son de gran valor en el estudio de los lípidos.

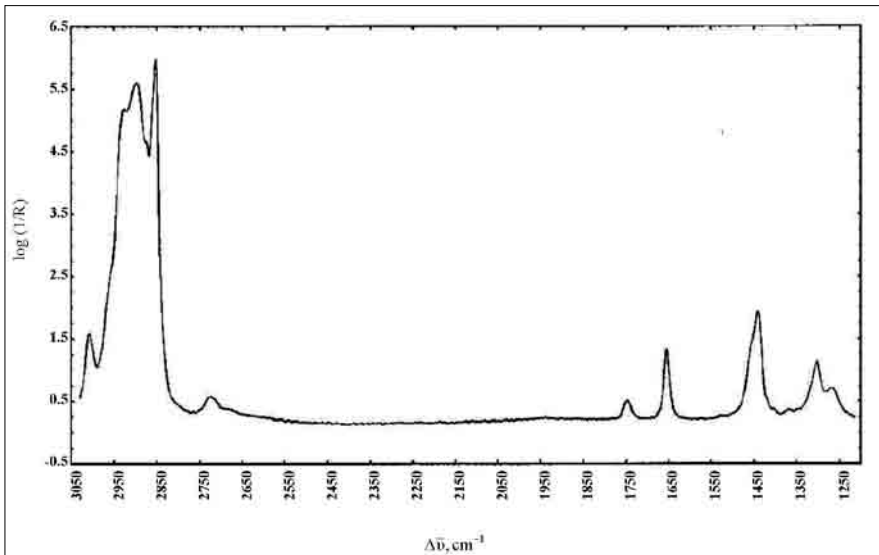


Figura 14. Espectro FT-Raman de aceite de oliva virgen extra [44].

Se han propuesto diversos métodos de espectroscopía Raman con transformada de Fourier que son una valiosa herramienta para superar los problemas de fluorescencia que se daban con frecuencia en la espectroscopía Raman convencional de aceites, haciendo posible el análisis cuantitativo de estas muestras. Esta técnica puede proporcionar información similar a la que se obtiene normalmente por GC pero con mucha menor preparación de muestra⁴². En general, los espectros FT-Raman se registran de forma rápida y a diferencia de la GC, esta técnica es sencilla y no destructiva. La técnica FT-Raman también tiene la ventaja de que es fácilmente adaptable a un proceso de control industrial ya que la longitud de onda de excitación de 1 μm es ideal para la transmisión mediante fibra óptica. De esta forma, el instrumento puede ser fácilmente acoplado de forma remota a dispositivos sensores on-line y podría usarse para monitorizar y controlar diversos procesos industriales⁴³.

Los progresos logrados en los nuevos espectrómetros Raman han fomentado por tanto, su utilización en el análisis de aceites. Los espectros Raman contienen principalmente información sobre los isómeros cis y trans de los ácidos grasos lo que permite detectar adulteraciones del aceite de oliva virgen extra con otro tipo de aceites de inferior calidad y precio⁴⁴.

La espectroscopía FT-Raman también se ha usado con la ayuda de la regresión por mínimos cuadrados parciales para determinar el contenido en ácidos grasos libres del aceite de oliva permitiendo clasificarlo en diferentes categorías de acuerdo con las regulaciones de la Unión Europea⁴⁵.

2.5 Resonancia magnética nuclear (RMN)

FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA:

El fenómeno de la resonancia magnética nuclear es el resultado de la interacción entre el momento magnético de un núcleo atómico y un campo magnético externo. Se produce debido a que algunos núcleos atómicos se comportan como imanes microscópicos. Para que un núcleo se comporte de esta forma es necesario que tenga un número impar de protones y/o neutrones, es decir, tener el número cuántico de espín (I) distinto de cero. Los núcleos activos en RMN más comunes tienen el número de espín igual a $\frac{1}{2}$ (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F). A pesar de que no todos los núcleos de la tabla periódica sean activos en RMN, casi todos los elementos tienen uno o más isótopos que sí lo son, aunque surgen algunas dificultades cuando la abundancia natural de estos isótopos es muy baja. Sin embargo, con la instrumentación actual se pueden registrar los espectros de prácticamente cualquier núcleo activo.

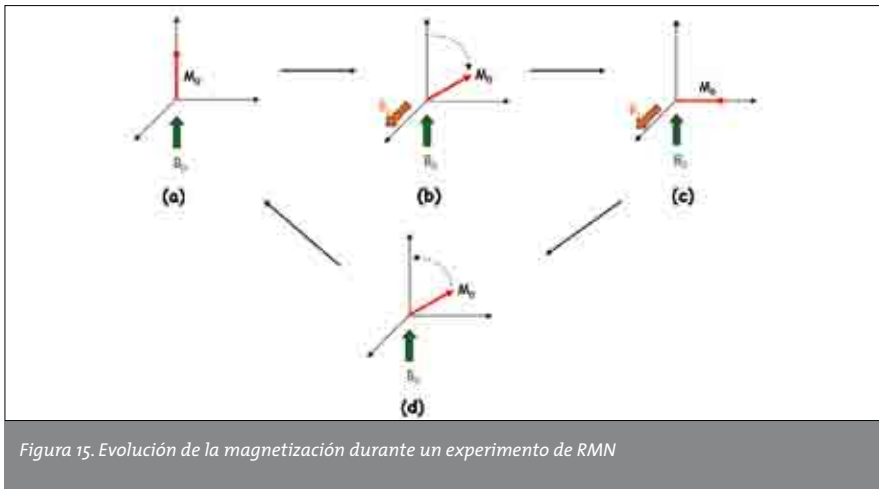
Los núcleos de un átomo, al estar eléctricamente cargados y girando, generan un campo magnético por lo que se comportan como imanes y son capaces de interactuar con otros campos magnéticos. En ausencia de un campo magnético externo, los momentos magnéticos (μ) de los átomos están orientados al azar y se reorientan continuamente debido al movimiento browniano. Por tanto, los momentos magnéticos de los distintos núcleos se anulan y el resultado es que la muestra macroscópica no tiene magnetización.

Si se aplica un campo magnético externo (B_0) a la muestra, los momentos magnéticos sólo podrán adoptar algunas orientaciones permitidas respecto a este campo. Para un núcleo de espín $\frac{1}{2}$, sólo están permitidas dos orientaciones: paralela y antiparalela al campo magnético externo. Las dos orientaciones permitidas tienen distinta energía, por lo que el número de núcleos que adopta cada orientación no es igual, de forma que el estado de menor energía es el más poblado. El resultado macroscópico de este estado es que los momentos magnéticos individuales no se cancelan así que se produce una magnetización neta (M_0) en la dirección del campo magnético externo.

Para inducir el fenómeno de RMN se irradia la muestra con una frecuencia (ν_0) correspondiente a la diferencia de energía entre los dos niveles energéticos permitidos (paralelo y antiparalelo). La energía requerida se encuentra en el rango de las radiofrecuencias. Esta absorción de energía que estimula transiciones entre los dos niveles energéticos en un campo magnético se denomina resonancia magnética.

En un experimento de RMN, los núcleos se encuentran en el seno del campo magnético B_0 , por lo que habrá una magnetización neta (M_0) en la misma dirección del campo (Fig. 15, a). A continuación, se irradia con una radiofrecuencia que tiene un campo magnético asociado (B_1) en la dirección perpendicular al campo externo B_0 , invirtiéndose así la población de los dos estados energéticos. El efecto, por tanto, del campo orientado perpendicularmente B_1 es la rotación del vector de magnetización (Fig. 15, b, c).

Una vez que el campo magnético temporal B_1 cesa, el sistema que estaba perturbado vuelve a su estado normal (Fig. 15, d). Este proceso de retorno al estado de equilibrio se denomina relajación.



Se registra la evolución de la magnetización después del pulso de radiofrecuencia que se conoce como atenuación libre de la inducción (free induction decay, FID) que posteriormente, haciendo uso de la transformada de Fourier, se transforma en un espectro de RMN (Fig.16).



APLICACIONES DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR AL ANÁLISIS DEL ACEITE DE OLIVA:

La resonancia magnética nuclear de alta resolución mono o bidimensional ha sido reconocida como una técnica viable para analizar la composición en ácidos grasos de aceites, adulteraciones y el grado de insaturación. La ^1H -RMN proporciona información acerca de la composición en ácidos grasos, nivel de insaturación, porcentaje aproximado de moléculas de mono, di y triglicéridos, así como sobre varios componentes minoritarios (esteroles, escualeno, terpenos, compuestos volátiles y otros)⁴⁶. Por otro lado, la ^{13}C -RMN, debido a su alto poder de resolución, permite caracterizar las mezclas de triglicéridos y la determinación del grado de esterificación de la molécula de glicerol en muestras de aceite dando información única sobre la distribución posicional de los ácidos grasos en las moléculas de glicerol y la esteoquímica de insaturación.

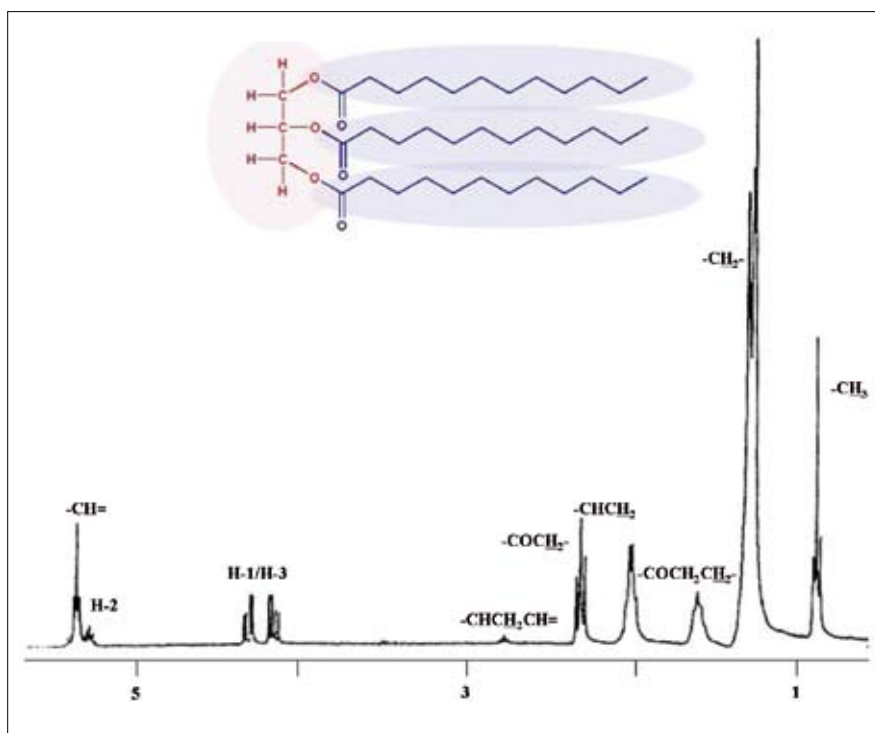


Figura 17. Espectro ^1H -RMN de 300 MHz de una muestra de aceite de oliva. H-1, H-2 y H-3 indican las resonancias del protón del glicerol, mientras que las resonancias de protón de las cadenas acilo de triglicéridos están subrayadas con los fragmentos moleculares a los que están unidos los protones ⁴⁷.

El análisis de los espectros de ^{13}C -RMN además permite distinguir entre aceite de oliva virgen, aceite con alto contenido en ácido oleico y aceite con alto contenido en ácido linoleico aplicando técnicas de análisis discriminante⁴⁷.

También se han utilizado estudios de RMN junto con métodos estadísticos para llevar a cabo la caracterización geográfica de aceites de oliva de diferentes áreas. Aplicando análisis discriminante lineal a parámetros de RMN seleccionados de aceites de oliva producidos en el mismo año se consiguió agrupar muestras según su origen geográfico e incluso se logró un agrupamiento satisfactorio combinando datos de RMN de aceites de oliva de dos años diferentes⁴⁸.

Recientemente, también se ha empleado ^{31}P -RMN en el análisis del aceite de oliva complementando a la ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, especialmente en casos donde hay un fuerte solapamiento de la señal y problemas de rango dinámico en el espectro de protones o bien el tiempo de relajación del ^{13}C es excesivo. Esta metodología se basa en la derivación de los átomos de hidrógeno lábiles de los constituyentes del aceite de oliva que llevan los grupos hidroxilo y carboxilo con un reactivo fosforilante y posteriormente se usa el desplazamiento químico del ^{31}P para identificar los centros lábiles. Este enfoque analítico se ha usado en el pasado para detectar y cuantificar los constituyentes minoritarios del aceite de oliva, como los mono y diacilgliceroles⁴⁹, los compuestos fenólicos⁵⁰, los esteroides totales libres y los ácidos grasos libres.

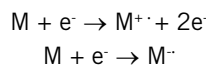
Los métodos de resonancia magnética nuclear, a pesar de su baja sensibilidad, presentan ciertas ventajas respecto a los métodos de análisis oficiales o ampliamente reconocidos ya que en la mayoría de los casos no se requiere un pretratamiento de la muestra, por lo que se convierte en un análisis más simple y rápido que los métodos convencionales. Además pueden determinarse varios constituyentes en un sólo análisis (monoacilglicérols, diacilglicérols, esterols totales libres y acidez libre) y evita varios problemas como la oxidación lipídica que conlleva el análisis por GC tradicional. Finalmente, la determinación de los compuestos fenólicos puede considerarse una alternativa válida a los clásicos métodos de HPLC ya que no requiere calibración con patrones que pueden no estar disponibles comercialmente.

2.6 Espectrometría de masas (MS)

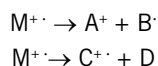
FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA:

La espectrometría de masas no es estrictamente una técnica espectrométrica ya que no se absorbe ni se emite radiación electromagnética. Sin embargo, los datos se obtienen en forma espectral ya que la abundancia relativa de los fragmentos de masas de una muestra se registran como una serie de líneas o picos.

La espectrometría de masas se basa en la separación a vacío de iones en fase gaseosa de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). En esta técnica, un haz de electrones, iones, fotones o moléculas (dependiendo del sistema de ionización que se utilice) es dirigido hacia la sustancia de interés, M . Este haz es suficientemente energético para provocar la eliminación de un electrón externo de M o bien la incorporación de un electrón a M , produciéndose así un ión-radical $M^{+\cdot}$ o $M^{\cdot-}$ respectivamente, que suele denominarse “ión molecular”. El proceso de ionización es el siguiente:



Este proceso puede transmitir un nivel relativamente alto de energía al ión-radical resultante, de forma que si esa energía es excesiva puede causar la fragmentación del ión-radical mediante procesos de disociación unimolecular. Las dos principales vías de fragmentación se reflejan en las siguientes ecuaciones:



La primera vía es un proceso disociativo que produce un ión, A^+ , y un radical, B^{\cdot} , mientras que la segunda produce otro ión-radical, $C^{+\cdot}$, liberando una molécula neutra, D .

Existen diversos tipos de espectrómetros de masas, pero todos incluyen los siguientes elementos: un sistema de introducción de muestra, un medio por el que las muestras son ionizadas, un acelerador de iones mediante un campo eléctrico, un

sistema de dispersión de iones de acuerdo a su relación masa/carga y un detector de los iones junto con un procesador adecuado de la señal (Fig. 18). El acelerador de iones, la cámara de dispersión de los iones y el detector deben estar a una presión inferior a 10^{-4} - 10^{-8} Torr para evitar colisiones entre los iones de interés y otras sustancias como radicales o moléculas neutras.

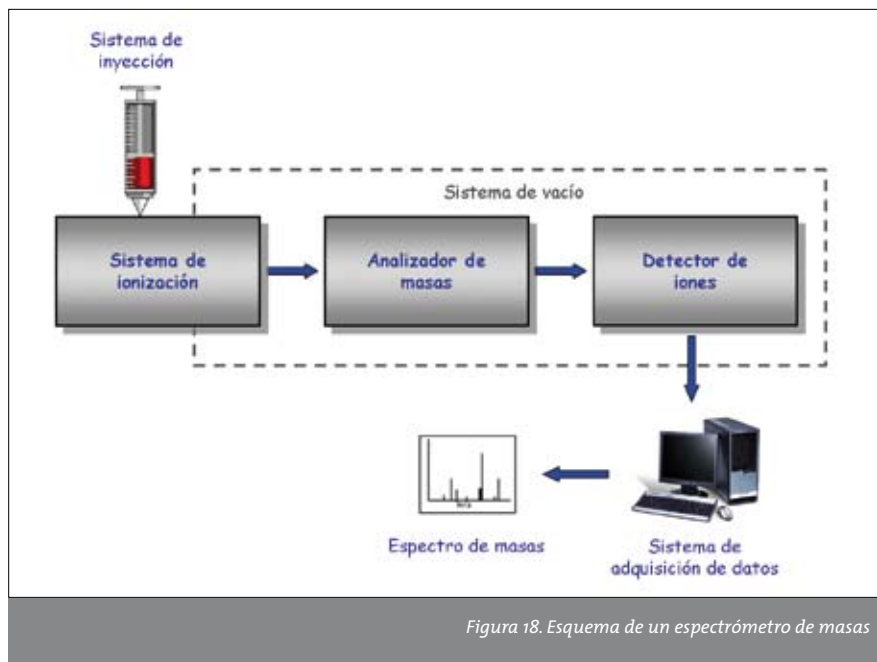


Figura 18. Esquema de un espectrómetro de masas

En primer lugar se introduce una pequeña cantidad de muestra mediante el sistema de introducción de la muestra. Normalmente, éste contiene un nebulizador o atomizador junto con un sistema de calefacción para vaporizar la muestra antes de la ionización. A continuación, las muestras son ionizadas mediante bombardeo con electrones, fotones, moléculas o iones. De esta forma se obtiene una corriente de iones cargados positiva o negativamente. Los iones, al estar cargados, pueden ser acelerados y focalizados en un haz mediante un campo eléctrico y entonces son conducidos al analizador de masas. Cada uno de los iones posee un momento característico y una carga. El momento de un ión viene determinado tanto por su masa como por la forma en que ese ión es acelerado por el campo eléctrico, lo cual depende de la carga que tenga. De esta forma, los iones pueden ser dispersados en el analizador de masas de acuerdo con su relación masa/carga. Los iones son finalmente detectados y caracterizados según esta relación y la información se registra en forma de un espectro de masas (Fig. 19).

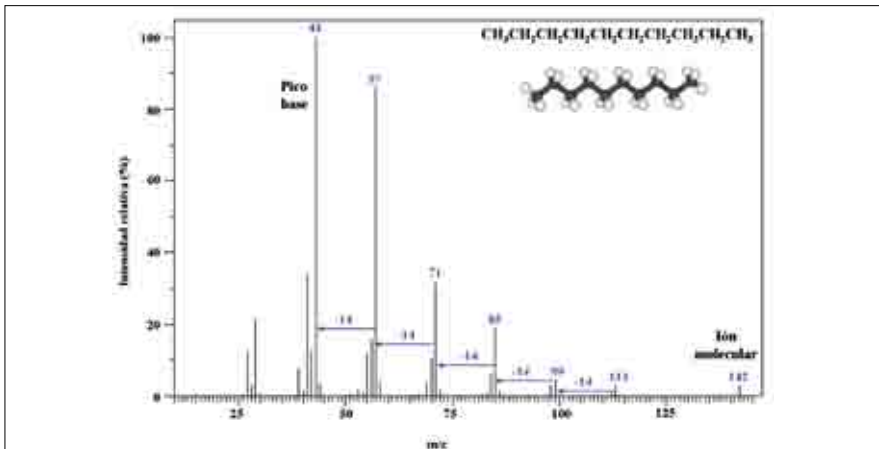


Figura 19. Espectro de masas del n-decano

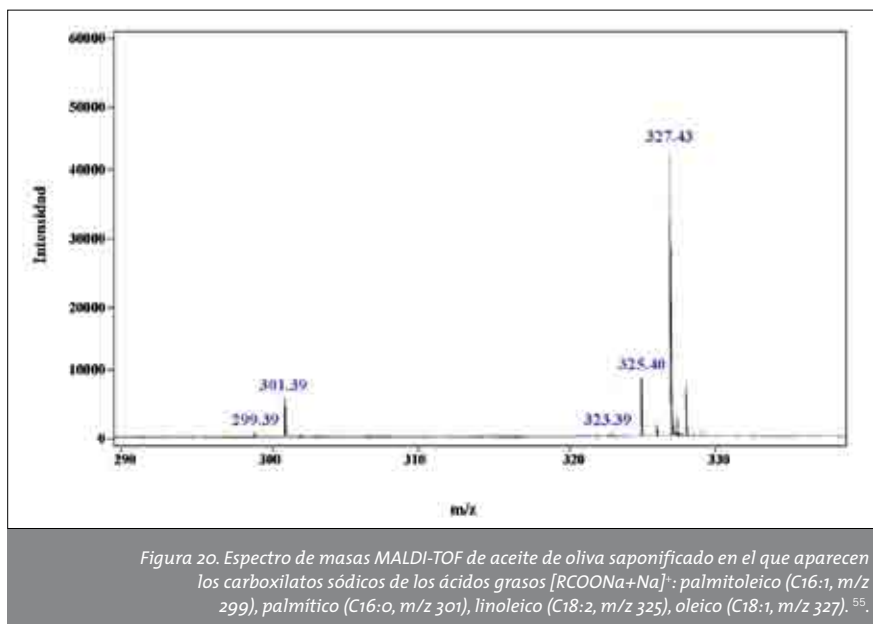
APLICACIONES DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS AL ANÁLISIS DEL ACEITE DE OLIVA:

La espectrometría de masas se ha aplicado al análisis de diversos componentes del aceite de oliva principalmente como sistema de detección después de la separación mediante otras técnicas como cromatografía de gases, cromatografía líquida o electroforesis capilar.

Se ha usado ampliamente la pirólisis-espectrometría de masas, en la que a través de la pirólisis del punto de Curie, se degrada térmicamente una muestra orgánica en una atmósfera inerte, o en el vacío, a una temperatura conocida. El proceso produce la ruptura de las moléculas por sus enlaces más débiles para producir fragmentos volátiles más pequeños que se analizan en el espectrómetro de masas acoplado en línea.

Se ha probado la aplicabilidad de la espectrometría de masas con ionización mediante electrospray (ESI-MS) para la clasificación de muestras de aceites vegetales basándose en la detección principalmente de ácidos grasos y utilizando técnicas quimiométricas como una alternativa a las técnicas utilizadas tradicionalmente para reducir el tiempo de análisis⁵². Se ha demostrado que mediante infusión directa de un extracto de aceite en metanol/agua (1:1) pueden diferenciarse, en modo positivo diversos aceites vegetales y mezclas de ellos incluyendo aceite de oliva, y en modo negativo, aceite de oliva de otros aceites refinados⁵³. Asimismo, se ha utilizado ESI-MS para caracterizar aceites de distintas calidades, así como mezclas de aceite de oliva virgen extra y virgen, y mezclas binarias de éstos con aceites de oliva de inferior calidad⁵⁴.

También se ha determinado la composición en ácidos grasos de diversos aceites vegetales utilizando como técnica de ionización la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI) (Fig. 20) y un analizador de tiempo de vuelo (TOF)⁵⁵. Los triglicéridos pueden determinarse utilizando como técnica de ionización la desorción/ionización laser (LDI) en lugar de MALDI que requiere una preparación de muestra más compleja y presenta problemas de interferencia de los picos de la matriz y falta de reproducibilidad⁵⁶.



Recientemente se ha aplicado la espectrometría de masas con infusión directa para el análisis de la fracción de esteroides del aceite utilizando como sistema de ionización tanto electrospray como fotoionización a presión atmosférica (APPI)⁵⁷. Mediante este método se consiguieron clasificar muestras de aceites de orígenes botánicos diferentes.

La espectrometría de masas también se utiliza en los laboratorios de rutina para el análisis de plaguicidas polares y no polares mediante su acoplamiento a HPLC y GC. Estos acoplamientos han hecho posible el desarrollo de métodos de barrido que permiten detectar hasta cien especies distintas en un sólo análisis.

2.7 Electroforesis capilar (CE)

FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA:

La electroforesis constituye una técnica separativa basada en la diferencia en la velocidad de migración de distintos solutos al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico.

En electroforesis capilar, los componentes de una mezcla se transportan a través de un tubo capilar, normalmente de sílice fundida, por efecto de un elevado potencial de corriente continua que se aplica a lo largo de la longitud del tubo. Los extremos del capilar se colocan en dos viales rellenos de disolución de separación que contienen cada uno de ellos un electrodo, ambos conectados a una fuente de alto voltaje (Fig. 21). La muestra se inyecta dentro del capilar sustituyendo temporalmente el vial inicial con disolución de separación (normalmente el del ánodo) por un vial que contiene la muestra a separar, aplicando un potencial eléctrico (inyección electro-

cinética) o una presión externa (inyección hidrodinámica) durante unos segundos. Después se vuelve a reemplazar el vial de muestra por el inicial conteniendo la disolución de separación y se aplica un potencial eléctrico a lo largo del capilar que produce la separación. Los analitos pueden ser detectados directamente con detección óptica a través de la ventana en el capilar o al final del capilar mediante el uso de otras técnicas de detección como la espectrometría de masas o las eléctricas.

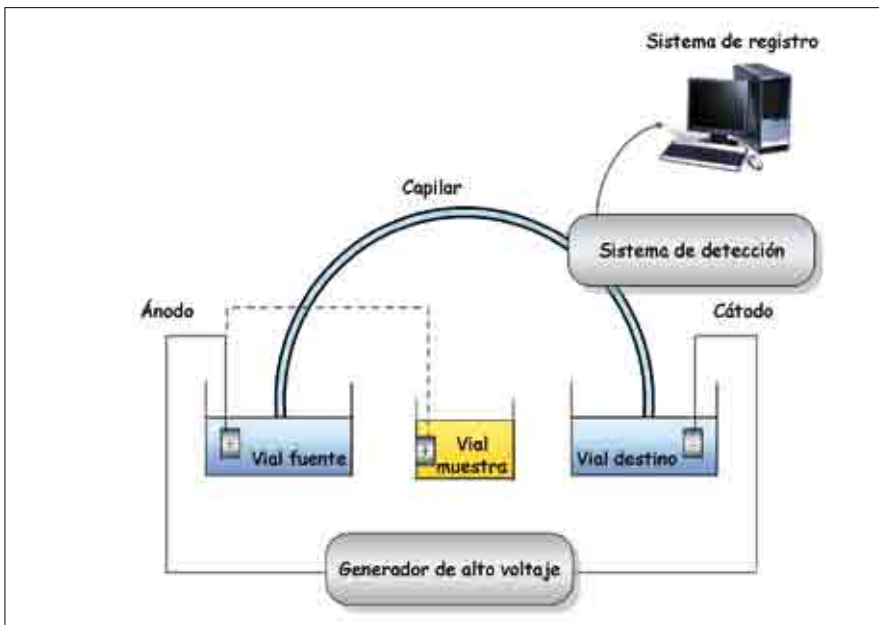


Figura 21. Esquema de un instrumento de electroforesis capilar

La fuerza motora de la separación en CE es el voltaje aplicado. Los iones disueltos o suspendidos en un electrolito y sujetos a un voltaje son obligados a migrar al electrodo con carga opuesta. Las separaciones ocurren cuando los cationes se mueven en una dirección y los aniones en otra, o cuando las velocidades de migración de iones del mismo signo son diferentes. Por tanto, la separación ocurre gracias a las diferencias en las velocidades de los iones, y esta velocidad de migración (v_{ef}) depende tanto del campo eléctrico aplicado como de la movilidad electroforética de cada ión. La movilidad electroforética (μ_e) viene dada por la siguiente expresión:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

donde q es la carga del ión, r su radio, y η es la viscosidad de la disolución. Esto significa que los iones con carga del mismo signo en un sistema electroforético concreto se separarán entre sí según su relación q/r .

En las separaciones electroforéticas hay que tener en cuenta además otro fenómeno que se produce denominado electroósmosis. El uso de capilares de sílice provoca un flujo electroosmótico (FEO) que hace que los iones y moléculas presentes en el medio electroforético se muevan hacia el cátodo. A pH superiores a 6, en la superficie interna de los capilares de sílice, que contiene grupos hidroxilo, se formará una capa de protones cerca de la pared cargada negativamente. Estas cargas positivas incluyendo las moléculas de solvatación de agua son atraídas hacia el cátodo provocando este flujo electroosmótico, que mueve igualmente a las especies neutras que se encuentran en el medio electroforético. Su componente de velocidad es mayor, en general, que las componentes de migración electroforéticas de los solutos a separar de forma que esta doble capa mueve todos los iones en conjunto, tanto cationes como aniones, hacia el cátodo produciendo un movimiento electroosmótico. Los cationes se moverán a lo largo del capilar con una velocidad mayor que la del flujo electroosmótico, puesto que su movimiento se ve acelerado por la atracción electroforética al electrodo negativo. Los aniones, por el contrario, se moverán más lentamente que el FEO debido a que son repelidos por el cátodo, de hecho, en algunos casos las especies negativas pueden moverse en la dirección opuesta al flujo de disolvente. Los solutos neutros se mueven a través del capilar con el flujo electroosmótico y no se separarán entre sí, salvo que se usen agentes micelares como aditivos del medio electroforético dando lugar a un modo de CE conocido como cromatografía capilar electrocinética micelar. (Fig. 22).

- Cationes: $v = v_{ef} + v_{FEO}$
- Neutros: $v = v_{FEO}$
- Aniones: $v = v_{FEO} - v_{ef}$

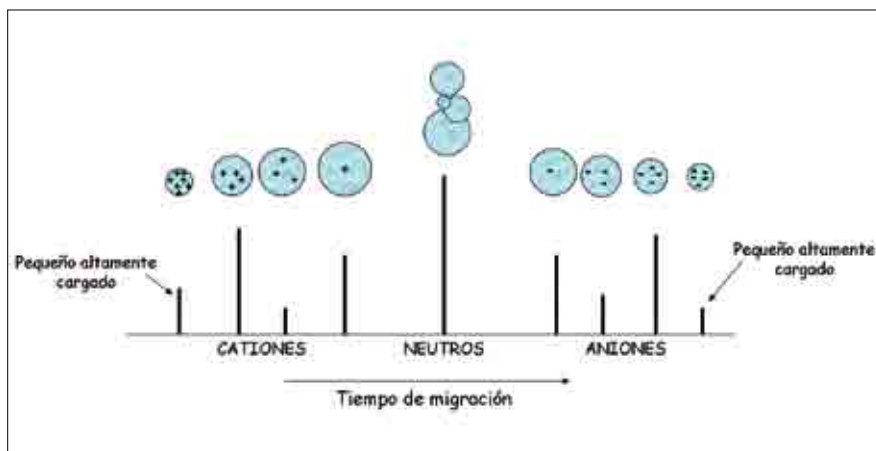


Figura 22. Orden de elución en un electroferograma

La electroforesis capilar es una técnica muy versátil debido en parte, a los distintos modos de separación disponibles. Los modos de CE más comunes se resumen en la tabla 2 junto con el principio de separación de cada uno y sus principales aplicaciones. Los diferentes mecanismos de separación empleados hacen que estos modos sean complementarios entre sí, e incluso en algunos casos, una separación puede llevarse a cabo de forma adecuada por más de un modo electroforético. Además, una de las grandes ventajas de esta técnica es que para cambiar de modo puede bastar simplemente con variar la composición de la disolución reguladora empleada.

Modo de CE	Principio de Separación	Análitos
Electroforesis capilar en zona (ECZ)	Relación carga/masa	Iones pequeños, pequeñas moléculas, péptidos, proteínas, ADN (limitado)
Cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM)	Interacción hidrofóbica/iónica con micelas del surfactante	Pequeñas moléculas, péptidos, ADN
Isoelectroenfoque capilar (IEEC)	Punto isoeléctrico	Péptidos, proteínas
Isotacoforesis capilar (ITFC)	Capacidad de migración entre tampones de distinta naturaleza	Pequeñas moléculas, péptidos, proteínas
Electroforesis capilar en gel (ECG)	Tamaño molecular	Péptidos, proteínas, ADN

Tabla 2. Modos de separación en electroforesis capilar

APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR AL ANÁLISIS DEL ACEITE DE OLIVA:

La electroforesis capilar se ha usado en el ámbito del aceite de oliva básicamente para el análisis de los compuestos fenólicos previa extracción líquido-líquido o en fase sólida. Para ello se ha usado principalmente la modalidad de electroforesis capilar en zona con detección ultravioleta⁵⁸⁻⁶¹ o acoplada a espectrometría de masas⁶².

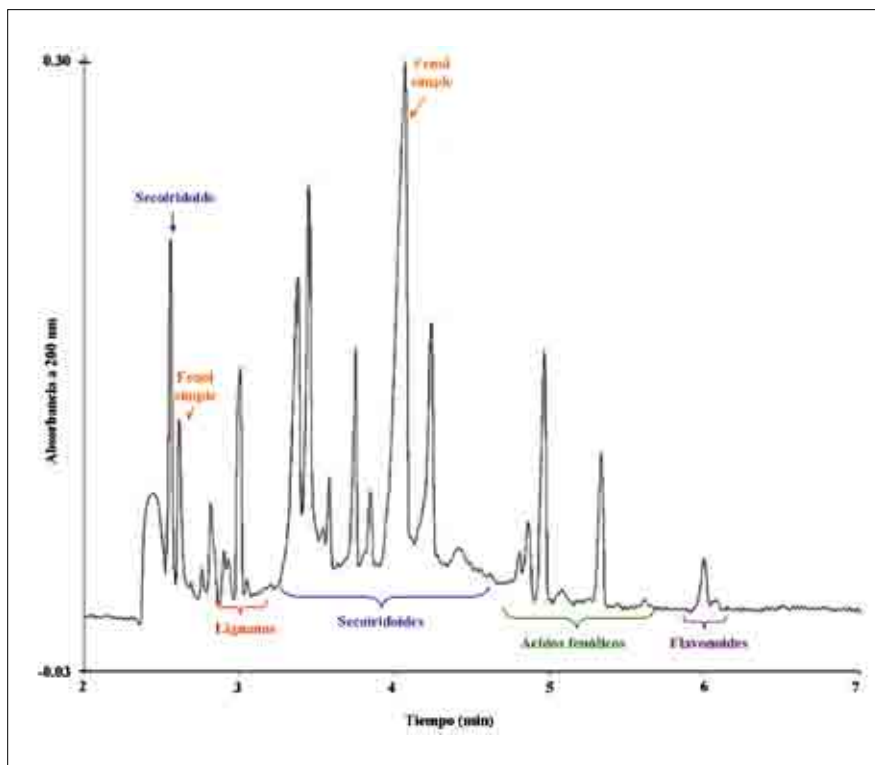


Figura 23. Electroferograma de una muestra de aceite de oliva virgen extra de la variedad picual, con detección a 200 nm.⁶⁰

Los ácidos grasos normalmente se determinan mediante cromatografía líquida o de gases, pero estas técnicas tienen el inconveniente de requerir pasos previos de derivación para incrementar la volatilidad en el caso de GC y para hacerlos detectables en HPLC. Esta derivación consume tiempo y aumenta las posibilidades de pérdida de muestra, dilución y/o contaminación de estos analitos⁶³. Para evitar estos inconvenientes se ha propuesto la electroforesis capilar en zona no acuosa con detección mediante fluorescencia indirecta para el análisis de los ácidos grasos libres. La ECZ no acuosa usa disolventes orgánicos como electrolitos y ofrece la ventaja de incrementar la solubilidad y selectividad para los ácidos grasos libres⁶⁴. También se han propuesto otros métodos de ECZ con el uso de distintos sistemas de detección como la detección UV indirecta^{65,66} o acoplado a espectrometría de masas⁶⁷.

Bibliografía

1. D. Boskou (ed.); "Química y tecnología del aceite de oliva"; AOLS Press, 1ª ed (1998).
2. J. R. J. Paré, J. M. R. Bélanger (eds.); "Instrumental methods in food analysis"; Elsevier, 1ª ed (1997).
3. D. A. Skoog, J. J. Leary; "Análisis instrumental"; McGraw-Hill, 4ª ed (1994).
4. S. P. J. Higson; "Analytical chemistry"; Oxford University Press, 1ª ed (2003).
5. F. W. Fifield, D. Kealey; "Principles and practice of analytical chemistry"; Blackie Academic and Professional, 4ª ed (1995).
6. L. Frías Ruiz, A. García-Ortiz Rodríguez, M. Hermoso Fernández, A. Jiménez Márquez, M. P. Llaveró del Pozo, J. Morales Bernardino, M. T. Ruano Ayuso, M. Uceda Ojeda; "Analistas del laboratorio de almazara"; Publicación de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía., 1ª ed (1991).
7. A. H. Stark, Z. Madar; "Olive oil as a functional food: Epidemiology and nutritional approaches"; *Nutrition Reviews*, 60 (6), 170-176 (2002).
8. J. A. Menéndez, A. Vázquez-Martín, R. Colomer, J. Brunet, A. Carrasco-Pancorbo, R. Garcia-Villalba, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero; "Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin (TM)) in HER2-overexpressing breast cancer cells"; *Bmc Cancer*, 7, 80-98 (2007).
9. A. K. Kiritsakis; "El aceite de oliva"; A. Madrid Vicente, 1ª ed (1992).
10. E. Vioque, M. P. Maza, M. Calderon; "Olive oil triglycerides"; *Grasas y Aceites*, 15, 173-180 (1964).
11. E. Geeraert, P. Sandra; "Capillary GC of triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone stationary phase. Part II. The analysis of chocolate fats"; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64, 100-105 (1987).
12. Y. Itabashi, T. Takagi; "Gas chromatographic separations of di- and monoacylglycerols based on the degree of unsaturation and positional placement of acyl groups"; *Lipids*, 15, 205-215 (1980).
13. Commission Regulation (EEC) No 183/93 of 29 January 1993 (characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis).
14. A. Lanzón, A. Guinda, T. Albi, C. de la Osa; "Método rápido para la determinación de escualeno en aceites vegetales"; *Grasas y aceites*, 46, 276-278 (1995).
15. M. C. Pérez-Camino, W. Moreda, R. Mateos, A. Cert; "Determination of esters of fatty acids with low molecular weight alcohols in olive oils"; *J. Agric. Food Chem.* 50, 4721-4725 (2002).
16. L. Cercaci, M. T. Rodríguez-Estrada, G. Lercker; "Solid-phase extraction–thin-layer chromatography–gas chromatography method for the detection

- of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols"; *J. of Chromatography A*, 985, 211–220 (2003).
17. S. S. Cunha, J. O. Fernandes, M. B. P.P. Oliveira; "Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry"; *J. Chromatography A*, 1128, 220–227 (2006).
 18. J. Sánchez Casas, E. Osorio Bueno, A. M. Montaña García, M. Martínez Cano; "Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain)"; *Food Chem.* 87, 225–230 (2004).
 19. J. M. Cortés, R. Sánchez, J. Villén, A. Vázquez; "Analysis of unsaponifiable compounds of edible oils by automated on-line coupling reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface"; *J. Agric. Food Chem.* 54, 6963–6968 (2006).
 20. H.T. Slover, R.H. Thompson, G.V. Merola; "Determination of tocopherols and sterols by capillary gas chromatography"; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 1524–1528 (1983).
 21. L. Liberatore, G. Procida, N. d'Alessandro, A. Cichelli; "Solid-phase extraction and gas chromatographic analysis of phenolic compounds in virgin olive oil"; *Food Chem.* 73, 119–124 (2001).
 22. A. Carrasco-Pancorbo, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, T. Gallina-Toschi, A. Fernández-Gutiérrez; "Analytical determination of polyphenols in olive oils"; *J. Sep. Sci.* 28, 837–858 (2005).
 23. W. E. Neff, R. O. Adlof, G. R. List, M. Elagaimy; "Analyses of vegetable oil triacylglycerols by silver ion high-performance liquid-chromatography with flame ionization detection"; *J. Liquid Chrom.* 17, 3951–3968 (1994).
 24. M. I. Mínguez-Mosquera, B. Gandul-Rojas, M. L. Gallardo-Guerrero; "Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography"; *J. Agric. Food Chem.* 40, 60–63 (1992).
 25. S. C. Cunha, J. S. Amaral, J. O. Fernandes, M. B. P. P. Oliveira; "Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems"; *J. Agric. Food Chem.* 54, 3351–3356 (2006).
 26. B. Cañabate-Díaz, A. Segura Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, J. Duran Martos; "Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS"; *Food Chem.* 102, 593–598 (2007).
 27. J. L. Martínez-Vidal, A. Garrido-Frenich, M. A. Escobar-García, R. Romero-González; "LC–MS determination of sterols in olive oil"; *Chromatographia* 65, 695–699 (2007).
 28. D. Grigoriadou, A. Androulaki, E. Psomiadou, M.Z. Tsimidou; "Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil"; *Food Chem.* 105, 675–680 (2007).

29. A. Carrasco-Pancorbo, C. Neusüß, M. Pelzing, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez; "CE- and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil"; *Electrophoresis*, 28, 806–821 (2007).
30. F. R. van de Voort; "Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis"; *Food Research Int.* 25, 397-403 (1992).
31. R. Aparicio, J. Harwood; "Manual del aceite de oliva"; AMV Ediciones, 1ª ed (2003).
32. A. Kiritsakis, A. Kanavouras, K. Kiritsakis; "Chemical analysis, quality control and packaging issues of olive oil"; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 628-638 (2002).
33. E. Bertran, M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspocho, I. Montoliu; "Determination of olive oil free fatty acid by fourier transform infrared spectroscopy"; *J. Am. Oil Chem Soc.* 76, 611-616 (1999).
34. M. D. Guillén, N. Cabo; "Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats"; *J. Sci. Food Agric.* 75, 1-11 (1997).
35. R. G. Arnold, T. E. Hartung "Infrared spectroscopic determination of degree of unsaturation of fats and oils"; *J. Food Sci.* 36, 166-168 (1971).
36. F. R. van de Voort, J. Sedman, G. Emo, A. A. Ismail; "Rapid and direct iodine value and saponification number determination of fats and oils by attenuated total reflectance/fourier transform infrared spectroscopy"; *J. Am. Oil Chem Soc.* 69, 1118-1123 (1992).
37. F. R. van de Voort, K. P. Memon, J. Sedman, A. A. Ismail; "Determination of solid fat index by fourier transform infrared spectroscopy"; *J. Am. Oil Chem Soc.* 73, 411-416 (1996).
38. F. R. van de Voort, A. A. Ismail, J. Sedman, J. Dubois, T. Nicodemo; "The determination of peroxide value by fourier transform infrared spectroscopy"; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 921-926 (1994).
39. A. Tay, R. K. Singh; S. S. Krishnan, J. P. Gore; "Authentication of olive oil adulterated with vegetable oils using fourier transform infrared spectroscopy"; *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 35, 99–103 (2002).
40. Y. W. Lai, E. K. Kemsley, R. H. Wilson; "Quantitative analysis of potential adulterants of extra virgin olive oil using infrared spectroscopy"; *Food Chemistry*, 53, 95-98 (1995).
41. H. Yang, J. Irudayaraj; "Comparison of Near-Infrared, Fourier Transform-Infrared, and Fourier Transform-Raman Methods for Determining Olive Pomace Oil Adulteration in Extra Virgin Olive Oil"; *J. Am. Oil Chem Soc.* 78, 889-895 (2001).
42. E. C. Y. Li-Chan; "The applications of Raman spectroscopy in food science"; *Trends in Food Sci. Technol.* 7, 361-370 (1996).
43. H. Sadeghi-Jorabchi, R. H. Wilson, P. S. Belton, J. D. Edwards-Webb, D. T. Coxon; "Quantitative analysis of oils and fats by Fourier transform Raman spectroscopy"; *Spectrochim. Acta*, 47A, 1449-1458 (1991).
44. V. Baeten, M. Meurens, M. T. Morales, R. Aparicio; "Detection of virgin olive oil adulteration by Fourier transform Raman spectroscopy"; *J. Agric. Food Chem.* 44, 2225-2230 (1996).

45. B. Muik, B. Lendl, A. Molina-Díaz, M. J. Ayora-Cañada; "Direct, reagent-free determination of free fatty acid content in olive oil and olives by Fourier transform Raman spectrometry"; *Anal. Chim. Acta*, 487, 211-220 (2003).
46. P. Dais, A. Spyros, S. Christophoridou, E. Hatzakis, G. Fragaki, A. Agiomirgiani, E. Salivaras, G. Siragakis, D. Daskalaki, M. Tasioula-Margari, M. Brenes; "Comparison of analytical methodologies based on ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy with conventional methods of analysis for the determination of some olive oil constituents"; *J. Agric. Food Chem.* 55, 577-584 (2007).
47. G. Vlahov "Application of NMR to the study of olive oils"; *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 35, 341-357(1999).
48. R. Zamora, V. Alba, F. J. Hidalgo; "Use of high-resolution ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of virgin olive oils"; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 89-94 (2001).
49. L. Mannina, M. Patumi, N. Proietti, D. Bassi, A. L. Segre; "Geographical characterization of italian extra virgin olive oils using high-field ^1H NMR spectroscopy"; *J. Agric. Food Chem.* 49, 2687-2696 (2001).
50. A. Spyros, P. Dais; "Application of ^{31}P NMR spectroscopy in food analysis. 1. Quantitative determination of the mono- and diglyceride composition of olive oils"; *J. Agric. Food Chem.* 48, 802-805 (2000).
51. S. Christophoridou, P. Dais; "Novel approach to the detection and quantification of phenolic compounds in olive oil based on ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy"; *J. Agric. Food Chem.* 54, 656-664 (2006).
52. R. Goodacre, S. Vaidyanathan, G. Bianchi, D. B. Kella; "Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterisation of olive oils"; *Analyst*, 127, 1457-1462 (2002).
53. R. Ramos Catharino, R. Haddad, L. Giroto Cabrini, I. B. S. Cunha, A. C. H. F. Sawaya, M. N. Eberlin; "Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: classification, quality, adulteration, and aging"; *Anal. Chem.* 77, 7429-7433 (2005).
54. M.J. Lerma-García, J.M. Herrero-Martínez, G. Ramis-Ramos, E.F. Simó-Alfonso; "Evaluation of the quality of olive oil using fatty acid profiles by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry"; *Food Chem.* 107, 1307-1313 (2008).
55. F. O. Ayorinde, K. Garvin, K. Saeed; "Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry"; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 608-615 (2000).
56. C. D. Calvano, F. Palmisano, C. G. Zambonin; "Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of triacylglycerols in oils"; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 1315-1320 (2005).
57. M. J. Lerma-García, G. Ramis-Ramos, J. M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso; "Classification of vegetable oils according to their botanical origin

- using sterol profiles established by direct infusion mass spectrometry”; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 973–978 (2008).
58. A. Carrasco-Pancorbo, C. Cruces-Blanco, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez; “Sensitive Determination of Phenolic Acids in Extra-Virgin Olive Oil by Capillary Zone Electrophoresis”; *J. Agric. Food Chem.* 52, 6687-6693 (2004).
59. A. M. Gómez-Caravaca, A. Carrasco-Pancorbo, B. Cañabate-Díaz, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez; “Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil”; *Electrophoresis* 26, 3538–3551 (2005).
60. A. Carrasco-Pancorbo, A. M. Gómez-Caravaca, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez; “Rapid quantification of the phenolic fraction of spanish virgin olive oils by capillary electrophoresis with UV detection”; *J. Agric. Food Chem.* 54, 7984-7991 (2006).
61. A. Carrasco-Pancorbo, A. M. Gómez-Caravaca, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez; “A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extravirgin olive oil”; *J. Sep. Sci.* 29, 2221 – 2233 (2006).
62. A. Carrasco-Pancorbo, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez; “Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry method to determine the phenolic fraction of extra-virgin olive oil”; *Electrophoresis*, 27, 2182–2196 (2006).
63. R. A. Frazier, J. M. Ames, H. E. Nursten; “The development and application of capillary electrophoresis methods for food analysis”; *Electrophoresis*, 20, 3156-3180 (1999).
64. E. Drange, E. Lundanes; “Determination of long-chained fatty acids using non-aqueous capillary electrophoresis and indirect UV detection”; *J. Chromatography A*, 771, 301-309 (1997).
65. W. Buchberger, K. Winna; “Determination of free fatty acids by capillary zone electrophoresis”; *Mikrochim. Acta*, 122, 45-52 (1996).
66. M. R. Balesteros, M. F. M. Tavares, S. J. L. Ribeiro, F. C. Polachini, Y. Messaddeq, M. A. L. de Oliveira; “Determination of olive oil acidity by CE”; *Electrophoresis*, 28, 3731–3736 (2007).
67. M. A. Petersson, G. Hulthe, E. Fogelqvist; “New sheathless interface for coupling capillary electrophoresis to electrospray mass spectrometry evaluated by the analysis of fatty acids and prostaglandins”; *J. Chromatography A*, 854, 141–154 (1999).

