

**Autenticación de aceites vegetales
mediante el empleo de cromatografía de
gases y espectrometría de masas.
Cuantificación de aceite de oliva**

Tesis Doctoral

Cristina Ruiz Samblás

Directores:

Dr. Luis Cuadros Rodríguez

Dr. Antonio González Casado

para optar al grado de:

Doctora en Química

Granada, 15 de mayo de 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Cristina Ruiz Samblás
D.L.: GR 2315-2012
ISBN: 978-84-9028-194-9

AGRADECIMIENTOS

"Es muy común recordar que alguien nos debe agradecimiento, pero es más común no pensar en quienes le debemos nuestra propia gratitud"

J.W. Goethe

La escritura de esta Tesis pone fin a años de mucho trabajo, esfuerzo y dedicación. Años en los cuales también han sucedido muchas cosas en mi vida personal, gracias a todo ello en conjunto soy lo que soy en este momento y he podido llegar hasta aquí. Por eso, no me gustaría terminar esta etapa sin agradecer de todo corazón a aquellos que me han acompañado a lo largo de este tiempo.

En primer lugar, muchas gracias a mis directores, a Antonio por su dedicación e interés; y a ti Luis, por el tiempo que le has dedicado, por tu empeño, por las veces que me has hecho enfadar y por las que te has preocupado por mí, y porque... espero que por fin, "este sea el comienzo de una gran amistad".

Muchas Gracias, al departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, han sido muchas las horas en él y me gustaría agradecer a todos sus miembros (Alberto, Ignacio, Fermín, Juan Manuel, Oscar, Monsa, Natalia, Alegría, Laura, Francisca,..., todos ellos), por permitirme la realización de la Tesis y por estar siempre disponibles para cualquier cosa y ofrecer su ayuda en cualquier momento, muchas gracias.

En especial a los miembros del grupo FQM-232, a Mercedes, Domingo... y a Brigui por sus ideas, por no tener pelos en la lengua y estar siempre dispuesta para cualquier cosa, gracias y por supuesto a tu sobri Pepe, por echarme una mano con las muestras ¡muchas gracias Pepe!

Gracias también a Belén y a Carmen, por ponerle unas risas, con sus historias, a los jueves por la mañana.

A mis compañeras del labo, Estefanía, Carmen, Paulina...y a "las de enfrente" Isa, María...y al "gallico del corral" David, por todas las horas que hemos compartido, buenos y malos momentos, han sido muchas risas, veneno y algún que otro llanto,

gracias por acompañarme cada día, hacerme reír y crecer juntos. No sé que nos deparara el futuro a cada uno de nosotros, pero os deseo todo lo mejor y os llevo en el corazón, ¡gracias por todo chicos!.

Thanks Saskia, I am very grateful for giving me the opportunity of learning and working with you. It has been for me a pleasure to be in The Netherlands, and I have learnt a lot. Thanks to all the colleagues at Rikilt, Martin, Erwin, Alex, Grishja... for your help and for all the funny moments.

Muchas gracias también a la "Spanish community" de Wageningen, por tan buenos ratos pasados y porque es muy agradable tener gente tan "apañá" cerca cuando estas lejos de los tuyos. Especialmente, gracias a ti Alba, por tu ayuda para adaptarme, por todo el tiempo que me has dedicado durante la estancia y las cosas que me has enseñado, ¡t'aprecio molt!.

A Fede, grazie mille per il meraviglioso tempo passato a Roma, è stato breve ma intenso. Ti ammiro profondamente, per le tue conoscenze infinite e perché sei un ragazzo "grande" ed umile; grazie per avermi aiutato professionalmente, ma anche personalmente, grazie amico mio. Grazie mille anche ad Ale, Ric, Marta, Sara, Raffaele, per il vostro aiuto, vi porto tutti nel cuore.

Gracias a mi FAMILIA por supuesto, a mis padres, porque, aunque ya no estén conmigo, sigo aprendiendo de ellos y sé que estarían muy orgullosos de ver donde ha llegado "su chica", gracias a ellos soy y estoy aquí hoy.

Gracias a mis hermanas, por su apoyo y ejemplo y a mis sobris, a Marta y a Pablo por preguntarme casi cada día cuantas páginas había escrito ya y si me faltaba mucho, por ser como sois y por compartir vuestras cosas conmigo y a Héctor y Hugo por hacerme reír tanto y enseñarme tantas cosas.

A mis AMIGOS del taller, a Rosa, a Toñi, a Iván, a Tere, Chari, Anta, Obdulia,..., por todo lo que compartimos en ese tiempo, porque encontrar gente autentica, no es fácil, y porque fuisteis un gran apoyo en los peores momentos de mi vida, sin vosotros no hubiera podido llegar hasta aquí.

También gracias a aquellos amigos, que por la distancia no podemos vernos a menudo, pero sé que siempre están ahí y que comparten conmigo la felicidad de haber terminado esta etapa, Maribel, M^a del Mar, Ana, María, Dani...

Muchas gracias AMOR, por acompañarme cada día incondicionalmente, desde que nos conocemos, y por ofrecer tu mano, cuando la necesito. Gracias por caminar a mi lado siempre y nunca delante, por sonreír cada día y por enseñarme el valor de las pequeñas cosas... por apoyarme en cada decisión que tomo y por enseñarme la virtud de la paciencia... Y por supuesto muchas gracias por esta portada tan maravillosa, por las horas que le has dedicado, gracias Fran.

Una tesis doctoral no es solo esta memoria y lo que hay escrita en ella, sino todo el tiempo dedicado, las ilusiones y los desencantos, la gente que se ha cruzado en el camino y la que ha contribuido a ella, la madurez adquirida a lo largo de los años, las experiencias personales vividas...

Ha sido un viaje intenso, difícil y bonito a la vez, con muchos tropiezos en el camino, pero ha llegado a su fin, me llevo el aprendizaje de todos los momentos vividos, a las buenas personas encontradas en el camino y el haber disfrutado de este viaje.

**Gracias a todos de corazón,
Cristina**



*A mis padres,
Pedro y Ana*

Índice General

Capítulo α : <i>Presentación y Justificación</i>	11
Capítulo I: <i>Extracción y cuantificación del contenido de grasa total en productos alimenticios</i>	29
1. Presentación.....	33
2. Introducción	34
3. Análisis DAFO	51
4. Artículo N° 1.....	53
5. Discusión	75
<i>Comunicaciones a Congresos derivadas de este capítulo</i>	76
Anexo: Procedimiento para la Verificación, Validación y mantenimiento de Extractores con Disolventes Presurizados.....	78
Capítulo II: <i>Cromatografía de gases a alta temperatura en el análisis de triglicéridos</i>	105
1. Presentación.....	109
2. Introducción	110
3. Análisis DAFO	121
4. Artículo N° 2.....	123
5. Artículo N° 3.....	159
6. Artículo N° 4.....	179
7. Apéndice N° 1.....	199
8. Discusión	207
<i>Comunicaciones a Congresos derivadas de este capítulo</i>	208
Anexo: Procedimiento para la Verificación y Mantenimiento del equipo de Cromatografía de Gases con Detector de Espectrometría de Masas (GC-MS)	209

Capítulo III: <i>Autenticación de Aceite de Oliva</i>	235
1. Presentación.....	239
2. Introducción.....	240
3. Análisis DAFO.....	273
4. Artículo N° 5.....	275
5. Artículo N° 6.....	297
6. Discusión.....	317
<i>Comunicaciones a Congresos derivadas de este capítulo</i>	318
Capítulo IV: <i>Cuantificación de Aceite de Oliva</i>	319
1. Presentación.....	323
2. Introducción.....	325
3. Análisis DAFO.....	341
4. Artículo N° 7.....	343
5. Artículo N° 8.....	379
6. Discusión.....	401
<i>Comunicaciones a Congresos derivadas de este capítulo</i>	402
Capítulo ω: <i>Conclusiones y Perspectivas</i>	403

Capítulo α

Contextualización

El marco legal en que se encuadran en la actualidad las enseñanzas oficiales de doctorado queda regulado en el Real Decreto 99/2011. Este Real Decreto, ha sustituido recientemente al Real Decreto 861/2010, donde se establecían las enseñanzas universitarias oficiales, entre ellas las enseñanzas de doctorado, y el cual a su vez había modificado algunos aspectos del anterior Real Decreto 1393/2007, por el que se regulan los programas de Doctorado. En dicho Real Decreto 99/2011, consta explícitamente que el Doctorado tiene como finalidad la adquisición de las competencias y habilidades relacionadas con la investigación científica de calidad.

El artículo 5 de dicho Real Decreto establece cuales deben ser las competencias básicas que, como mínimo, deben adquirirse en los estudios de doctorado. Dichas competencias quedan redactadas en seis items:

- a) Comprensión sistemática de un campo de estudio y dominio de las habilidades y métodos de investigación relacionados con dicho campo.
- b) Capacidad de concebir, diseñar o crear, poner en práctica y adoptar un proceso sustancial de investigación o creación.
- c) Capacidad para contribuir a la ampliación de las fronteras del conocimiento a través de una investigación original.
- d) Capacidad de realizar un análisis crítico y de evaluación y síntesis de ideas nuevas y complejas.
- e) Capacidad de comunicación con la comunidad académica y científica y con la sociedad en general acerca de sus ámbitos de conocimiento en los modos e idiomas de uso habitual en su comunidad científica internacional.
- f) Capacidad de fomentar, en contextos académicos y profesionales, el avance científico, tecnológico, social, artístico o cultural dentro de una sociedad basada en el conocimiento.

Seguidamente, el artículo 6, establece que la obtención del título de doctor debe proporcionar una alta capacitación profesional en ámbitos diversos.

Para ello, los doctores habrán adquirido, al menos, las capacidades y destrezas personales necesarias para:

- a) Desenvolverse en contextos en los que hay poca información específica.
- b) Encontrar las preguntas claves que hay que responder para resolver un problema complejo.
- c) Diseñar, crear, desarrollar y emprender proyectos novedosos e innovadores en su ámbito de conocimiento.
- d) Trabajar tanto en equipo como de manera autónoma en un contexto internacional o multidisciplinar
- e) Integrar conocimientos, enfrentarse a la complejidad y formular juicios con información limitada.
- f) La crítica y defensa intelectual de soluciones.

Los estudios de doctorado finalizarán, en todo caso, con la elaboración y defensa de una tesis doctoral que incorpore resultados originales de investigación. La tesis doctoral consistirá en un trabajo original de investigación elaborado por el candidato en cualquier campo del conocimiento y debe realizarse de modo que capacite al doctorando para el trabajo autónomo en el ámbito de la I+D+I.

El proyecto científico que constituye esta Tesis Doctoral ha sido llevado a cabo en el seno de la Unidad de Cualimetría y Metrología Química (CMQ) y del grupo de investigación Análisis en Alimentación y Medio Ambiente (AnAMA, FQM-232), y ha sido realizada en el Departamento de Química Analítica, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, bajo la tutela y dirección de los profesores Luis Cuadros Rodríguez y Antonio González Casado.

Esta tesis se enmarca dentro de una de las líneas de investigación de nuestro grupo, sobre autenticación de alimentos, en especial de aquellos relacionados con el aceite de oliva, y está incluida dentro de las actividades y

CAPÍTULO α

tareas del proyecto QuOLEO, que ha sido financiado con fondos públicos para las siguientes acciones:

- ⇒ *Cuantificación y control analítico de aceite de oliva en alimentos*. Proyecto de Investigación de Excelencia, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (Ref.: P07-FQM-02667).
- ⇒ *Cuantificación de aceite de oliva en alimentos*. Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2004-2007, Ministerio de Educación y Ciencia, Gobierno de España (MEC, Ref.: CTQ2006-15066-C02-02/BQU).
- ⇒ *Estudio de viabilidad de metodologías analíticas para la cuantificación de aceite de oliva en alimentos que contengan materias grasas*. Convenio especial de colaboración, Consejería de Agricultura y Pesca (CAP), Junta de Andalucía. (Ref.: 9728-2007).

A continuación se exponen, el problema general, hipótesis y objetivos de esta Tesis Doctoral con el fin de justificar su realización.

Problema general

En la actualidad, en la Unión Europea (UE), el aceite de oliva se consume directamente sólo, mezclado con otros aceites o como ingrediente en numerosos alimentos (conservas, salsas y aliños, galletas, productos de panadería, embutidos, patatas fritas, etc.). En estos casos, y dado el valor añadido que el aceite de oliva aporta al alimento en cuestión, existe una clara necesidad de evitar que los fabricantes de aquellos productos alimenticios que contienen aceite de oliva, engañen o confundan al consumidor, por ello la etiqueta debe señalar la composición real del producto.

Los requerimientos de la UE en relación a la comercialización y etiquetado de productos que contienen aceite de oliva y mezclas con otros aceites vegetales están recogidos en el reciente Reglamento de Ejecución (UE) N° 29/2012 sobre las normas de comercialización del aceite de oliva (que ha sustituido al Reglamento (CE) N°1019/2002 y posteriores modificaciones).

Dicho Reglamento establece, entre otras cosas, las normas para la comercialización de alimentos que contienen aceite de oliva. Así, los artículos 6 y 7 establecen (extracto no literal):

En caso de que, en una mezcla de aceite de oliva y de otros aceites vegetales, la presencia de aceites se mencione en el etiquetado, fuera de la lista de ingredientes, mediante palabras, imágenes o representaciones gráficas, la denominación de venta de la mezcla en cuestión será la siguiente: «Mezcla de aceites vegetales (o nombres específicos de esos aceites vegetales) y de aceite de oliva», seguida directamente de la indicación del porcentaje de aceite de oliva en la mezcla.

Solo podrá mencionarse la presencia de aceite de oliva en el etiquetado de las mezclas, mediante imágenes o representaciones gráficas, en el caso de que su porcentaje sea superior al 50 %.

Los Estados miembros podrán prohibir la producción en su territorio, para consumo interno, de las mezclas de aceite de oliva y otros aceites vegetales. Sin embargo, no podrán prohibir la comercialización en su territorio de tales

mezclas procedentes de otros países y no podrán prohibir la producción en su territorio de tales mezclas con vistas a su comercialización en otro Estado miembro o a su exportación.

Con exclusión del atún en aceite de oliva y de las sardinas en aceite de oliva, si la presencia de aceite de oliva en un producto alimenticio, en cualquiera de sus categorías, se menciona en el etiquetado, fuera de la lista de ingredientes, mediante palabras, imágenes o representaciones gráficas, la denominación de venta del producto alimenticio irá seguida directamente de la indicación del porcentaje de aceites de oliva con relación al peso neto total del producto alimenticio.

El porcentaje de aceite de oliva añadido con relación al peso neto total del producto alimenticio podrá sustituirse por el porcentaje de aceite de oliva añadido con relación al peso total de materias grasas, añadiendo la indicación: «porcentaje de materias grasas».

En estos casos, de acuerdo al Reglamento anteriormente citado, se estipula que el contenido de aceite de oliva debe declararse explícitamente en el etiquetado.

En España está prohibida la comercialización de mezclas de aceite de oliva con aceite de semillas, de acuerdo con lo que establece la Reglamentación Técnico Sanitaria de los aceites vegetales comestibles (Real Decreto 308/1983); igualmente está prohibida en Bélgica, Italia, Grecia y Portugal, pero no en el resto de los países de la U.E, como por ejemplo en Francia.

Y recordemos, que de acuerdo con el Reglamento de Ejecución (UE) N° 29/2012, dichos productos fabricados en esos países pueden comercializarse en el territorio español.

Por otro lado, hasta noviembre del pasado año 2011, en que se publicó el Reglamento (UE) N° 1169/2011 sobre la información alimentaria al consumidor (especialmente en el etiquetado), no era preceptivo en la lista de ingredientes indicar los tipos de aceites vegetales que se incluían como ingredientes con excepción del aceite de oliva. Esta situación ha quedado corregida con la entrada en vigor de este nuevo Reglamento.

CAPÍTULO α

En la actualidad existe un creciente interés, por parte de las industrias alimentarias, así como por parte de las empresas oleícolas, en comercializar mezclas de aceites con objeto de ofrecer productos con una composición lipídica nutricionalmente óptima, o de utilizar el aceite de oliva como un ingrediente alimenticio con objeto de dotar al alimento que lo contiene de un valor añadido.

Paralelamente, han existido otro tipo de empresas que, buscando beneficios económicos ilícitos, han estado vendiendo mezclas de aceites de oliva con otros aceites vegetales, al mismo precio que aceite de oliva puro. En este tipo de fraude alimentario, los adulterantes normalmente utilizados son aquellos que tienen unas propiedades físicas y químicas parecidas al aceite de oliva, y normalmente más baratos de obtener.

La verificación de los requisitos especificados en el citado Reglamento, así como la detección de los problemas anteriormente comentados, requieren la existencia de métodos analíticos que permitan:

- (I) detectar la presencia fraudulenta de aceites extraños (generalmente de semillas) en aquellos alimentos que se comercializan con el indicativo de que contienen 100 % de aceite de oliva (métodos tipo I); y
- (II) cuantificar la proporción de aceite de oliva en alimentos que expresamente declaran un contenido parcial de éste (métodos tipo II)

En los últimos años se ha abordado de forma extensa el desarrollo de métodos de tipo I para la detección de diferentes tipos de aceites. De hecho, con este objetivo, la Unión Europea ha incorporado a su legislación (Reglamento (CEE) N° 2568/91 y posteriores modificaciones) muchos métodos analíticos desarrollados en el seno del Consejo Oleícola Internacional (COI), así como en la Comisión del Codex Alimentarius, para el control de la calidad y autenticidad del aceite de oliva.

Sin embargo, ninguno de ellos hace referencia a las necesidades anteriormente planteadas con relación a los métodos de tipo II. Conjuntamente, como ya se constataba en el Informe de la Comisión COM (2000) 855 (p. 15):

... no existe ningún método analítico que permita dosificar el contenido de aceite de oliva en mezclas de éste con aceite de semilla.

Ciertamente, nosotros no conocemos que existan otros estudios sistemáticos publicados, además del que aquí se presenta, encaminados específicamente al desarrollo de tal tipo de métodos.

Por otro lado, tampoco se han abordado algunos problemas específicos como ocurre con los medios de cobertura de las conservas de pescado que necesariamente contienen grasas derivadas de la transferencia lipídica del medio al pescado y que es necesario diferenciar de la presencia de otro aceite o grasa fraudulentamente añadidos.

Hipótesis

Sobre la base del problema general descrito en el apartado anterior, y para controlar el cumplimiento de los requisitos especificados en el Reglamento de Ejecución (UE) N° 29/2012, surge la necesidad de diseñar y desarrollar soluciones analíticas para verificar la autenticidad de productos alimenticios relacionados con el aceite de oliva.

Para la resolución de este problema analítico, se establece la siguiente hipótesis de trabajo:

"La utilización de huellas dactilares cromatográficas como fuente de datos experimentales en conjunción con la aplicación sinérgica de herramientas quimiométricas de reconocimiento de pautas permitirán el desarrollo de modelos multivariantes aptos para la detección y discriminación de aceite de oliva, y para la cuantificación de la proporción de dicho aceite cuando se encuentra formando parte de una mezcla de aceites comestibles o como ingrediente en un alimento."

Objetivos

En este contexto se plantea la realización de esta tesis doctoral con la apuesta por nuevos métodos analíticos de uso rutinario, precisos, robustos y fácilmente transferibles a laboratorios de control de la calidad del aceite de oliva que, junto con ayuda de herramientas quimiométricas, permitan controlar la autenticidad del aceite de oliva así como cuantificar el aceite de oliva presente en mezclas con otros aceites vegetales.

Dichos métodos se basarán en caracterizar y medir atributos intrínsecos del aceite de oliva relacionados con el contenido de compuestos característicos como son los triacilgliceroles (TAG) (o triglicéridos) y los compuestos orgánicos volátiles (VOC) cuyo perfil composicional es bastante característico de la especie y variedad vegetal de la que procede el aceite.

En los estudios experimentales, se aplicarán técnicas de extracción con líquidos presurizados (PLE), cromatografía de gases a alta temperatura acoplada a espectrometría masas (HTCG-MS) y espectrometría de masas de infusión directa sobre especies ionizadas por reacción acoplada de transferencia de protones (PTR-MS).

Los objetivos concretos planteados inicialmente para llevar a cabo la hipótesis expuesta, y resolver así el problema analítico, fueron los siguientes:

- 1) Desarrollar un método analítico alternativo fácil de aplicar, para separar y, en su caso, evaluar el contenido de grasa total en alimentos en los que se declara la presencia de aceite de oliva en su elaboración mediante el uso de extracción con líquidos presurizados.
- 2) Demostrar la vigencia de la cromatografía de gases a alta temperatura, acoplada a espectrometría de masas, como una técnica analítica válida para identificar y caracterizar el perfil de triglicéridos en aceites de oliva y aceites vegetales.
- 3) Aplicar las huellas dactilares cromatográficas de triglicéridos para establecer un método de autenticación de categorías y variedades de

CAPÍTULO α

aceites de oliva con ayuda de herramientas quimiométricas de reconocimiento de pautas.

- 4) Desarrollar un método de cuantificación del porcentaje de aceite de oliva en mezclas con otros aceites vegetales (girasol, maíz, semillas, sésamo, etc.) mediante cromatografía de gases a alta temperatura acoplada a espectrometría de masas y herramientas quimiométricas de reconocimiento de pautas.

Además, como consecuencia de la estancia predoctoral realizada en el *Rikilt-Institute of Food Safety*, surge un nuevo objetivo que se añade a los ya inicialmente descritos:

- 5) Desarrollar un método para identificar y autentificar aceites de oliva virgen extra mediante su perfil volátil, analizado mediante espectrometría de masas de infusión directa sobre especies ionizadas por reacción acoplada de transferencia de protones y herramientas quimiométricas de reconocimiento de pautas.

Todos los estudios experimentales se llevarán a cabo bajo un sistema de gestión de la calidad en la investigación y en los análisis realizados, para facilitar la transferencia de dichas metodologías a laboratorios y sectores sociales relacionados con el control alimentario del aceite de oliva, lo que comporta un mayor valor de los resultados obtenidos.

Como leer esta tesis...

Cada capítulo se comenzará con una breve presentación del mismo, y de los estudios que se han llevado a cabo en él.

A continuación se hará una introducción propia a cada uno de los capítulos, abordando los temas oportunos que proporcionen la visión necesaria del contexto donde se enmarca el trabajo presentado.

Posteriormente se realizará un análisis DAFO (Debilidades, Amenazas, Fortalezas y Oportunidades). Este análisis, normalmente utilizado para planificación estratégica en el ámbito empresarial, nos proporciona la información necesaria para la implantación de acciones y medidas correctivas y la generación de nuevos o mejores proyectos de mejora.

Normalmente, las fortalezas y debilidades corresponden al ámbito interno, por lo que es posible actuar directamente sobre ellas, fortalezas con las que cuenta y cuáles son las debilidades que obstaculizan el cumplimiento de los objetivos.

En este contexto de Tesis Doctoral, y una vez concluido el trabajo, el análisis DAFO pretende ser una valoración de la doctoranda, de las potencialidades de cada uno de los estudios llevado a cabo, así como de las debilidades encontradas en ellos, una vez realizado el trabajo y con perspectiva.

Consecutivamente, se colocarán las publicaciones científicas derivadas de los estudios y finalmente una discusión específica de ese capítulo con las relevancias principalmente encontradas.

Por último se incluirá un apartado con las comunicaciones a Congresos derivadas de los estudios de cada capítulo correspondiente.

CAPÍTULO α

La disposición de los capítulos es la que sigue:

Capítulo I: Desarrollo, optimización y validación de un método de extracción con disolventes presurizados y cuantificación del contenido de grasa en alimentos que contienen aceite de oliva. Así como la realización de un procedimiento de verificación, validación y mantenimiento de un extractor presurizado. Este trabajo corresponde al Trabajo fin de Máster.

Capítulo II: Análisis del perfil de triglicéridos por cromatografía de gases a alta temperatura. Desarrollo de métodos de identificación y cuantificación cromatográficos. Además se incluye una revisión bibliográfica del uso de la cromatografía de gases a alta temperatura en el análisis de aceites vegetales y alimentos. Para terminar este capítulo se anexa el procedimiento de verificación y mantenimiento del cromatógrafo utilizado.

Capítulo III: Se proponen dos métodos de clasificación de variedades de de aceite de oliva dependiendo del fruto, y mediante el perfil de triglicéridos o volátiles. La parte correspondiente al análisis de volátiles, llevada a cabo mediante PTR-MS, fue realizada en el "RIKILT" Instituto de Seguridad Alimentaria en Wageningen (Holanda), bajo la supervisión de la doctora Saskia van Ruth.

Capítulo IV: Se presenta la cuantificación de aceite de oliva, cuando se encuentra mezclado con otros aceites vegetales, mediante técnicas de reconocimientos de pautas. La parte correspondiente al tratamiento de datos de este trabajo se realizó en la Universidad de Roma "La Sapienza", bajo la supervisión del profesor Federico Marini. Además se incluye una revisión bibliográfica del uso conjunto de cromatografía y quimiometría de triglicéridos.

Finalmente, en el último capítulo, de las conclusiones finales, se resaltarán los principales hallazgos encontrados en este trabajo, así como se mostrará lo que podría ser considerado como perspectivas futuras.

Artículos científicos (por fecha de publicación, aceptación o envío)

- ◆ C. Ruiz Samblás, A. González Casado, L. Cuadros Rodríguez, F.P. Rodríguez García, (2010), *Application of selected ion monitoring to the analysis of triacylglycerols in olive oil by high-temperature gas chromatography / mass spectrometry*, *Talanta*, 82, 255-260 (DOI: 10.1016/j.talanta.2010.04.030).
- ◆ C. Ruiz Samblás, L. Cuadros Rodríguez, A. González Casado (2010), *Pressurized liquid extraction and quantification of total fat-oil content in bread and derivative products*, *Talanta*, 83, 25-30 (DOI: 10.1016/j.talanta.2010.08.026).
- ◆ C. Ruiz Samblás, L. Cuadros Rodríguez, A. González Casado, F.P. Rodríguez García, P. de la Mata Espinosa, J.M. Bosque Sendra (2011), *Multivariate analysis of HT/GC-(IT)MS chromatographic profiles of triacylglycerol for classification of olive oil varieties*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 2093-2103 (DOI: 10.1007/s00216-010-4423-z).
- ◆ C. Ruiz Samblás, L. Cuadros Rodríguez, A. Gonzalez Casado and F. P. Rodríguez García (2012). *A straightforward quantification of triacylglycerols (and fatty acids) in monovarietal extra virgin olive oils by high temperature GC*, *Analytical Methods* 4, 753-758 (DOI: 10.1039/c2ay05574k).
- ◆ C. Ruiz Samblás, F. Marini, L. Cuadros Rodríguez, A. González Casado (2012). *Quantification of blending of olive oils and edible vegetable oils by triacylglycerol fingerprint gas chromatography and chemometric tools*, *Journal of Chromatography B*, In press, (DOI:

10.1016/j.jchromb.2012.01.026).

- ◆ C. Ruiz Samblás, A. Tres, A. Koot, S.M. van Ruth, A. González Casado, L. Cuadros Rodríguez (2012), *Proton transfer reaction- mass spectrometry volatile organic compound fingerprinting for monovarietal extra virgin olive oil identification*, Food Chemistry, In press, (DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.135).
- ◆ J.M. Bosque Sendra, L. Cuadros Rodríguez, C. Ruiz Samblás, A.P. de la Mata (2012), *Combining chromatography and chemometrics for the characterization and authentication of fats and oils from triacylglycerol compositional data - A review*, Analytica Chimica Acta, In press, (DOI: 10.1016/j.aca.2012.02.041).
- ◆ C. Ruiz Samblás, A. González Casado, L. Cuadros-Rodríguez (2012), *Triacylglycerols determination by high temperature gas chromatography in the analysis of vegetable oils and foods*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, en revisión.

Capítulo I

Índice

1. Presentación	33
2. Introducción.....	34
3. Análisis DAFO.....	51
4. Artículo N°1	53
Abstract	54
1. Introduction.....	55
2. Materials and methods	58
2.1. Solvents and reagents	58
2.2. Equipment and software	58
2.3. Sample extraction	58
2.4. Production of an in-house reference material	59
3. Results and discussion	60
3.1. Optimisation of the extraction process.....	60
3.2. Method validation.....	65
3.3 Uncertainty estimation	66
3.4. Application to real samples	69
4. Conclusions	70
References	71
5. Discusión	75
<i>Comunicaciones a Congresos derivadas de este capítulo</i>	<i>76</i>
Procedimiento para la Verificación, Validación y Mantenimiento de Extractores con Disolventes Presurizados	78

1. Presentación

Este capítulo recoge los resultados correspondientes al periodo de investigación inicial y que se presentaron como Trabajo de Fin de Máster, en el Máster Oficial de Postgrado de "QUIMICA" de la Universidad de Granada, en el curso 2007-2008. Los objetivos generales y específicos de la investigación, cuyos resultados se recogen aquí, fueron:

- ✓ Desarrollar y validar un método analítico para la extracción y cuantificación del contenido total de grasa bruta en productos alimenticios de panadería y que fuera fácilmente transferible a laboratorios de análisis.
- ✓ Optimizar las variables implicadas en el proceso de extracción de grasa en productos alimenticios de panadería, aplicando una metodología multivariante de diseño estadístico de experimentos para encontrar los valores más apropiados.
- ✓ Desarrollar un procedimiento para la verificación, validación y mantenimiento de un equipo de extracción con líquidos presurizados.

2. Introducción

La extracción de compuestos orgánicos, incluyendo pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y fenoles, de matrices analíticas sólidas de diverso tipo (suelos, sedimentos, plantas, alimentos, etc.) ha sido históricamente llevada a cabo mediante la extracción *Soxhlet*. Alternativas a la extracción *Soxhlet* existen y se utilizan hoy en día con frecuencia.

El modo de operación para todos los sistemas de extracción consiste en un disolvente orgánico bajo la influencia de calor (y/o presión), que disuelve y difunde los compuestos orgánicos desde la matriz hasta el disolvente (orgánico) [1].

Se considera extracción al proceso fundamental por el cual un compuesto químico en una matriz, por ejemplo de un alimento, se transfiere a un agente extractante. Las constantes de partición cuantifican la eficacia de la extracción. Cuando dos compuestos son solubles en dos disolventes inmiscibles en diferentes grados, por mezclado de los dos disolventes, una vez que estos contengan los compuestos, se crea un equilibrio dinámico y los compuestos se distribuirán entre los disolventes de acuerdo a sus constantes de partición o distribución. El tiempo empleado para establecer el equilibrio entre los dos estados varía considerablemente según la composición de los estados de la materia que participen en la distribución.

Dentro de los métodos generales de separación de analitos de matrices de alimentos, se conocen cuatro procesos físicos fundamentales [2]:

- Extracción Sólido/Líquido
- Destilación
- Adsorción
- Difusión

1 J.R. Dean, in: D.J. Ando, *Extraction Techniques in Analytical Science*, John Wiley & Sons Ltd, 2009, pp 127-139.

2 R. Self, in: P.S. Belton, *Extraction of Organic Analytes from Foods*, Norwich: RSC, 2005, pp. 17-23.

Todos los demás procesos asociados a estos cuatro fundamentales como percolación, filtración, precipitación, hidrólisis enzimática etc., ayudarán en la liberación de compuestos y son considerados agentes de ayuda en el proceso de separación.

A continuación se procederá a explicar brevemente cada uno de los procesos físicos mencionados anteriormente

A) *Extracción Sólido/Líquido*

Cuando un disolvente inmisible se añade a una muestra de alimento y se agita, primeramente las partículas se hinchan por absorción y capilaridad y entonces ocurre la difusión del sólido hacia el disolvente, y en equilibrio estarán presentes en el disolvente en concentraciones proporcionales a sus constantes de partición. En los casos favorables, la mayoría de los componentes pueden ser extraídos en el disolvente. En casos especiales, la hidrólisis ayudará a favorecer la extracción. Dentro de este tipo de extracción podemos encontrar:

- *Dispersión de la matriz en fase sólida (matrix solid-phase dispersion, MSPD)*: la matriz, una vez dispersa, se coloca en una columna y es mezclada con un adsorbente en fase sólida como Florisil, y los compuestos buscados eluyen selectivamente desde la matriz mediante un disolvente orgánico.

- *Extracción con fluidos subcríticos (sub-critical fluid extraction)*: los disolventes se elevan a temperaturas y/o presiones cercanas a la región crítica, así se consiguen a extracciones más efectivas de los solutos. Para análisis de alimentos podemos encontrar:

1. *Extracción con líquidos presurizados (pressurized liquid extraction, PLE)*: la eficiencia de la extracción incrementa cuando la temperatura y/o presión del líquido extractante se aproxima a la región supercrítica.
2. *Extracción con agua subcrítica (subcritical wáter extraction, SWE)*: Analitos extraídos con mezcla de agua caliente y disolvente orgánico bajo presión. La mezcla es entonces enfriada rápidamente y el agua en estado subcrítico junto con el disolvente orgánico extrae los analitos.

CAPÍTULO I

- Extracción con fluidos supercríticos (*supercritical fluid extraction, SFE*): Un fluido supercrítico es similar en propiedades como un gas denso. El uso de CO₂ no tóxico como extractante se ha usado durante muchos años a escalas tanto comercial como analítica.

B) Destilación

Si los constituyentes de un alimento pueden ser volatilizados sin que estos se descompongan, entonces pueden ser concentrados en un destilado.

- Destilación a vapor (*steam distillation, StD*): debido a que muchos alimentos contienen agua y muchos de ellos son preparados para ser cocinados en agua, este proceso es muy importante en análisis de alimentos. Se utiliza para extraer volátiles a un colector externo para un análisis posterior.

- Destilación-extracción con disolventes orgánicos (*organic solvent distillation-extraction*): principalmente usados para la extracción de agua en alimentos. Un disolvente con alto punto de ebullición evapora a uno de bajo punto de ebullición transportándolo durante la destilación. Si el disolvente polar es el más denso, puede ser recogido bajo el no polar y retirado en una bureta para análisis cuantitativo.

- Distribución en contracorriente (*counter current distribution*): agitación continua de un sistema de fases binario (dos disolventes inmiscibles), de tal manera que un disolvente se mueve en una dirección opuesta al flujo de la otra, esto permitirá que el equilibrio se establezca, permitiendo así que los solutos se distribuyan efectivamente en concentraciones proporcionales a sus constantes de partición.

C) Adsorción

Adsorción de moléculas a partículas inmovilizadas sólidas (o líquidas). La reversibilidad de la adsorción define el tipo de extracción o separación que puede ser efectuada. Dentro de esto podemos encontrar la extracción en fase

sólida (*solid-phase extraction, SPE*), y la microextracción en fase sólida (*solid-phase microextraction, SPME*), etc. [3].

D) Difusión

Está basado en el desplazamiento de moléculas o iones desde un punto de alta concentración a uno de baja concentración. Esta es la base de procesos como la diálisis, ósmosis, filtración, uso de membranas, etc.

Métodos analíticos de extracción para la determinación del contenido de grasa en alimentos

Para el análisis del contenido en grasa en alimentos por métodos cromatográficos y métodos espectrométricos es necesario una etapa cualitativa o cuantitativa previo de extracción como los mencionados anteriormente.

Están disponibles un gran número de procedimientos y métodos estandarizados y el analista es el encargado de escoger el más adecuado según el lípido que necesite ser identificado y determinado. Los diferentes componentes grasos obtenidos en un extracto analítico dependen del procedimiento de extracción, especialmente, del disolvente usado, su polaridad, punto de ebullición, miscibilidad con agua u otros disolventes, sus propiedades solubles y volatilidad [4].

-
- 3 D. Firestone, M.M. Mossoba, in: R.E. McDonald, M.M. Mossoba, *New Techniques and Applications in Lipid Analysis*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1997, pp 1-30.
 - 4 F.W. Hemming, J.N. Hawthorne, *Lipid Analysis*, Bios Scientific Publishers Ltd., 2001, pp 5-7.

CAPÍTULO I

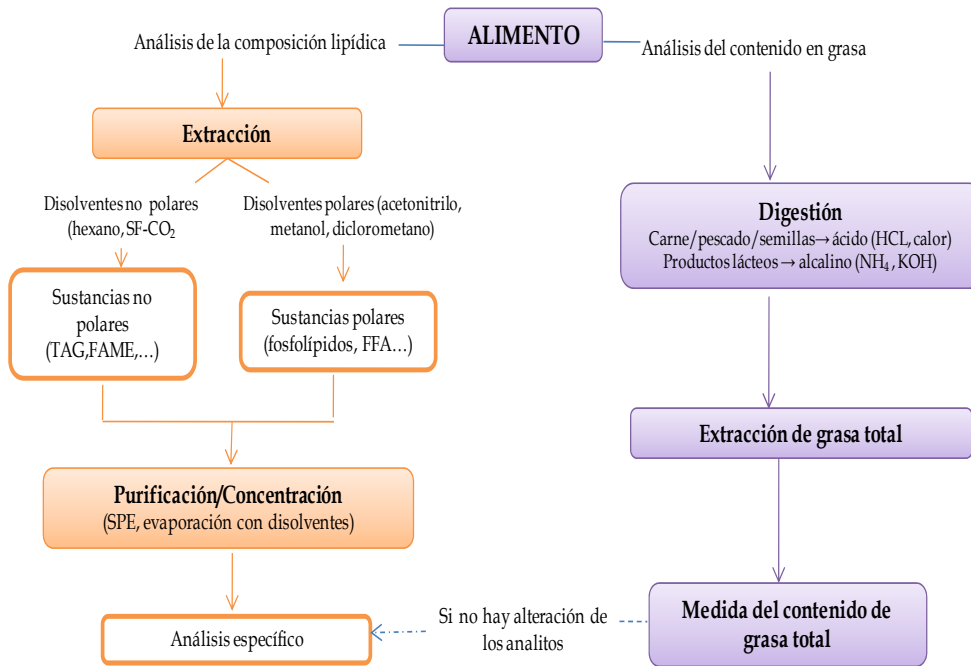


Figura 1. Diagrama del análisis de lípidos [5].

Para la extracción de alimentos, así como de matrices biológicas, la digestión de la muestra es necesaria, especialmente si se requiere una cuantificación posterior. Hay diferentes métodos de digestiones "clásicas" que se han usado durante muchos años. El escoger una u otra ha dependido de la matriz que contiene la grasa. Aunque estos métodos han demostrado proveer resultados exactos del contenido en grasa, las condiciones extremas (alta temperatura, alto o bajo valor del pH, etc.), a menudo han conducido a modificaciones en la estructura molecular de los analitos. Además, si se requieren análisis posteriores de los lípidos, debe usarse un método de extracción que no altere la estructura de los analitos (ver figura 1).

5 N. Hinrichsen, H. Steinhart, in: M. Mossoba, J. Kramer, J. Brenna, R. McDonald, Lipid Analysis and Lipidomics. New Techniques and Applications, AOCS Press, Champaign, Illinois, 2006, pp 3-26.

Están disponibles un gran número de procedimientos y métodos estandarizados, el analista es el encargado de escoger el procedimiento de extracción más apropiado para el lípido que necesita ser identificado y determinado.

Los disolventes orgánicos no polares, como hexano, o dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂), son válidos para lípidos neutros o simples, los cuales incluyen ésteres de ácidos grasos, acilgliceroles y materia insaponificable. Los lípidos polares o complejos (como fosfolípidos, glicolípidos, lipoproteínas, acilgliceroles oxidados y ácidos grasos libres) son extraídos preferentemente con disolventes polares como metanol. Tales extracciones requieren roturas iónicas y enlaces de hidrógeno con las proteínas y carbohidratos de la matriz de la muestra alimentaria. La extracción en fase sólida es particularmente útil para lípidos polares complejos.

La determinación cuantitativa de grasa total tradicional, inicialmente requiere de una digestión ácida o básica de la muestra para la romper los enlaces de los lípidos complejos. El procedimiento de extracción requiere una secuencia de etapas. Primeramente la muestra es mezclada, molida, o calentada en un disolvente orgánico para maximizar la superficie de contacto entre la muestra alimentaria y el disolvente. Seguidamente, el material que no es extraído se separa por decantación, centrifugación o filtración de la fase orgánica. A continuación, es purificado mediante un lavado, re-extracción, secado, filtración o adsorción. Por último, el disolvente es eliminado por destilación o evaporación bajo una corriente de un gas inerte [3].

Los métodos analíticos clásicos de extracción del contenido de grasa, utilizados en análisis de rutina son:

- **Método ISO 1443 (1973):** Este método se basa en la digestión de la muestra con ácido clorhídrico y la posterior extracción de la grasa en un Soxhlet con éter de petróleo o hexano, previa desecación del residuo de grasa obtenido durante la acción del ácido. Con este

extracto sería posible analizar los ácidos grasos liberados en la digestión [6].

- **Método de Folch et al. (1957):** La muestra se extrae con una solución de cloroformo/metanol 2/1 (v/v). Se ha usado principalmente en el caso de carne o productos cárnicos. Se emplea sobre todo cuando las muestras presentan problemas de extracción debido a su humedad y presencia de polifenoles. Se debe tratar para eliminar el agua extraída en un embudo de decantación para separar la fase orgánica que se recoge, se lava con una solución salina y a continuación se evapora para proceder a calcular el contenido total de grasa y con una alícuota determinar los ácidos grasos [7].
- **Método de Bligh and Dyer (1959):** Es una variante del método de Folch et al. en la que la proporción de cloroformo/metanol se modifica a 1/1 (v/v) y en algunos casos a 1/2. El tratamiento posterior consiste en aislar la fase orgánica exenta de agua y tratar el residuo como en el método de Folch [8].
- **Extracción con una solución de hexano/2-propanol 2/1:** Esta técnica se aplicó como un sustituto de la de Folch et al. y la de Bligh and Dyer para evitar el uso de cloroformo. Sin embargo, su utilización es muy limitada.

Los métodos de extracción más utilizados son las mezclas de cloroformo: metanol en sus distintas proporciones, aunque también existen aplicaciones que utilizan una mezcla de acetato de etilo:ciclohexano (54/46, v/v) [9].

-
- 6 ISO 1443:1973, Meat and meat products - Determination of total fat content., ISO, Genève.
 - 7 J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane-Stanley, 1957, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
 - 8 E.G. Bligh, W.J. Dyer, 1959, A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911-917.
 - 9 S. Thurnofer, W. Vetter, 2005, A gas chromatography/electrón ionization-mass spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid

Los resultados cuantitativos de estos métodos respecto del método ISO 1443 no suelen diferir de modo importante por lo que se puede concluir que se extraen cantidades similares de lípidos. La digestión en caliente y medio ácido puede provocar la formación de interferentes, la degradación de algunos ácidos grasos y la isomerización de enlaces *cis*; estos resultados no son críticos para determinar la cantidad total de grasa de un alimento, pero si pueden afectar a la composición de los ácidos grasos. Si en el disolvente o mezcla de extracción no hay un disolvente polar como el metanol resulta difícil extraer los lípidos más polares, algunos de los cuales incluso en presencia de metanol pueden presentar recuperaciones bajas.

La tendencia de los últimos años de modificar la composición lipídica a través de la dieta ha llevado a la necesidad de métodos de análisis más precisos y más exactos para poder determinar la concentración de lípidos en alimentos [10,11].

A continuación se explica en detalle la técnica de extracción con líquidos presurizados, (PLE), por haber sido la utilizada en esta tesis. Bibliografía actualizada sobre este tema puede encontrarse en la introducción del artículo publicado, que se reproduce al final de este capítulo.

Extracción con líquidos presurizados

Las preocupaciones de los últimos años en relación a los volúmenes de compuestos orgánicos usados han aumentado la necesidad de métodos de extracción más eficientes. En respuesta a estas inquietudes, la extracción con líquidos presurizados (*pressurized liquid extraction, PLE*) fue introducida en 1995. Curiosamente, esta técnica recibe otras dos denominaciones que

-
- pattern in food after the formation of fatty acid methyl esters. J. Agric. Food Chem., 53: 8896- 8903.
- 10 J.A. García Regueiro, I. Díaz., Nuevas tendencias en el análisis de ácidos grasos, Centro de Tecnología de la carne, Moneéis, 2006.
 - 11 W.C. Byrdwell, Modern Methods for Lipid Analysis by LC/MS and Related Techniques, AOCS Press, Urbana, Illinois, 2005.

constituyen términos registrados por diferentes casas comerciales, como son: (i) extracción acelerada con disolventes (*Accelerated Solvent Extraction, ASE*®, *Dionex Corporation*) y (ii) extracción con disolventes presurizados (*Pressurized Solvent Extraction, PSE*®, *Applied Separation*). Desde entonces, ha crecido rápidamente su uso y aceptación como alternativa a métodos tradicionales de extracción.

Los analitos son extraídos de la matrices sólidas empleando altas temperaturas (40-200°C) y presiones elevadas (1000-3000 psi). La mayor eficiencia en la extracción es debida a dos fenómenos [12]:

- ✓ Solubilidad y transferencia de masa: la temperatura elevada provocan un aumento en la solubilidad del analito en el disolvente ya que disminuye su viscosidad, una rápida difusión y una mejor transferencia de masa. El empleo de presiones elevadas permite el uso de disolventes a temperaturas superiores a su ebullición
- ✓ Interrupción del equilibrio en superficie: las temperaturas elevadas anulan las interacciones soluto-matriz causadas por fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno y atracción bipolar, además disminuyen la viscosidad y la tensión superficial provocando una mayor penetración del disolvente en la matriz.

Como es bien conocido, calentar un disolvente aumenta su poder disolvente y en consecuencia, la eficacia de la extracción aumenta. Sin embargo, bajo condiciones isobáricas hay un límite. Si el disolvente alcanza su punto de ebullición y pasa a estado gaseoso, no será capaz de disolver los compuestos, produciéndose así una caída de la eficacia a cero.

12 D. Luthria, D. Vinjamoori, K. Noel, J. Ezzell, Accelerated Solvent Extraction in: D.L. Luthria, Oil Extraction and Analysis, AOCS Press Champaign, Illinois, 2004, pp 25-38.

Instrumentación

Un extractor de fluidos presurizados está formado, como muestra la figura 2, por un depósito de disolvente, una fuente de nitrógeno, una bomba, una celda de extracción, un horno y un sistema de colección de extractos. Las celdas de extracción son de acero y pueden tener varios tamaños (1-100mL). En el extremo inferior del reactor se coloca un papel de filtro para evitar el paso de sólidos por las líneas de conducción del extracto y evitar posibles obturaciones.

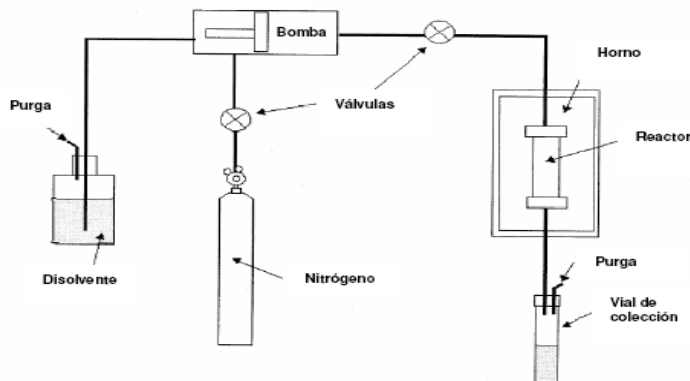


Figura 2. Esquema de un sistema típico de extracción con fluidos presurizados.

El sistema funciona de la siguiente forma: la muestra se introduce en el reactor y éste se coloca automáticamente en el interior del horno, a la temperatura de extracción, en posición vertical. Se introduce el disolvente en el reactor, empleando una bomba, por el extremo superior, y se aplica una presión determinada. La muestra se mantiene en estas condiciones un determinado tiempo de extracción, generalmente 5 ó 10 minutos. Este ciclo se suele repetir una o dos veces más, empleando disolvente nuevo, que arrastra el extracto a los viales de colección. Finalmente, se produce el vaciado del reactor y de las líneas de transferencia, empleando una corriente de nitrógeno.

Preparación de la muestra

La preparación de la muestra es esencial para obtener extracciones eficientes y reproducibles. La muestra ideal para extracción debe estar seca, sólida finamente dividida, a través de la cual pueda penetrar fácilmente el disolvente. Las muestras con partículas de tamaño grande (>1 mm) debe ser molidas para aumentar la interacción matriz-disolvente. Muestras húmedas deben ser mezcladas con agentes desecantes por lo que es común añadir arena de sílice o un agente higroscópico dispersante (tierra de diatomeas, sulfato anhidro, etc.). Las cantidades de muestra utilizada suele ser entre 1-50g.

Parámetros de extracción

Disolvente extractor. Debe ser escogido un disolvente que solubilice los analitos buscados pero deje la mayoría de la muestra intacta. Esto se consigue normalmente escogiendo un disolvente de polaridad parecida al analito. Disolventes como metanol y acetonitrilo son apropiados para análisis directo por HPLC, mientras que disolventes como hexano, metanol o acetona, son más apropiados para evaporación completa o concentración y análisis en GC. La selección de un disolvente apropiado debe hacerse en base a la selectividad de extracción, coste del disolvente y seguridad, así como compatibilidad con los pasos siguientes a la extracción. Mezclas de disolventes también pueden ser consideradas en los casos en los que se requiera un menor ajuste de polaridad.

Las siguientes variables más importantes que influyen en el proceso de extracción con líquidos presurizados y que se podrían modificar para la optimización de la extracción están recogidas en la Tabla 1 [13].

13 ASE[®] Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual, Dionex Corporation, 2002.

Parámetros	Función	Rango de Valores
Temperatura	Temperatura a la cual se calienta la celda de extracción	40-200°C (defecto: 100 °C)
Tiempo estático	Tiempo estático de extracción del disolvente	0-99 min (defecto: 5 min)
Volumen de disolvente	Porcentaje de volumen de celda que se va a llenar de disolvente para realizar la extracción. Por ejemplo si el flujo de volumen se fijara en el panel de control al 50 %, 5 mL de disolvente pasarían a través de la celda de 10 mL, 17 mL a través de la celda de 34 mL y así sucesivamente para otros volúmenes de celda	0-150% en incrementos de 5% (defecto: 60%)
Tiempo de purgado	Cantidad de tiempo que la celda es purgada con nitrógeno	20-900 s (defecto: 100seg)
Ciclos estáticos	Número de veces que el calentamiento y paso de disolvente a través de la celda se llevan a cabo. Cuando hay más de un ciclo el volumen de disolvente se divide entre los ciclos	1-5 (defecto: 1)

Cuando se desarrolla un nuevo método de extracción, es necesaria la optimización de las variables que influyen en el proceso. Los métodos de optimización encontrados en bibliografía, para esta técnica de extracción, recomiendan elegir un disolvente según las circunstancias citadas anteriormente y unas condiciones estándar de presión temperatura, etc. Y a partir de aquí extraer la muestra varias veces para comprobar la eficiencia del método y si hay una cantidad de analito considerable en la segunda y tercera extracción, ir modificando los parámetros uno cada vez, realizando así el "proceso de optimización" [9].

Sin embargo, el desarrollo del método de extracción utilizado en este capítulo, se ha realizado mediante una metodología de diseño de experimentos.

Optimización del proceso de extracción. Diseño de experimentos

La optimización de las condiciones de extracción (temperatura, n° de ciclos, tiempo de purgado, etc.) en extractores presurizados, ha sido normalmente llevada a cabo usando el clásico método de una variable cada vez, en la cual la optimización es calculada por alteración sistemática de una variable mientras que las otras permanecen constantes.

Sin embargo, en este estudio se ha llevado a cabo mediante diseño de experimentos. El cual permite la identificación de interacciones entre variables y proporciona una exploración completa del dominio experimental, con un número optimizado de experimentos. En las estrategias de diseño de experimentos, el valor de todos los factores bajo estudio varía en cada experimento de forma programada y racional. Es, además, posible detectar los factores influyentes, mientras que el número de experiencias permanece al mínimo [14].

El procedimiento adecuado para realizar un buen diseño experimental sería el siguiente:

- Comprensión y planteamiento del problema
- Elección de los factores o niveles: factores que variarían el experimento, los intervalos de dicha variación y los niveles específicos a los cuales se hará el experimento. El efecto de un factor se define como el cambio en la respuesta producido por un cambio de nivel del factor.
- Selección de la variable de respuesta
- Elección del diseño experimental.

14 D.C. Montgomery, *Diseño y Análisis de Experimentos*, Grupo Editorial Iberoamérica, México D.F., 1991, pp 241-299.

- Realización del conjunto de experiencias y análisis de datos

Es necesario invertir inicialmente un tiempo, planificando el diseño que se va a llevar a cabo. El tiempo gastado en planificar un proyecto al principio siempre se verá recompensado al final.

Es razonable admitir que el resultado de un experimento es dependiente de las condiciones experimentales. Esto quiere decir que un resultado puede ser descrito como una función basada en las variables experimentales. El modelo polinomial más simple contiene sólo términos lineales y describe sólo las relaciones lineales entre las variables experimentales y la respuesta. En estudios preliminares, se suelen estudiar interacciones de primer orden, o las que tienen mayor influencia en el proceso pueden identificarse, con diseños factoriales o factoriales fraccionados. En estudios posteriores se suelen evaluar las interacciones de segundo y tercer orden [15].

Diseño factorial

En un diseño factorial, la influencia de todas las variables experimentales, factores y efecto de las interacciones en la respuesta son investigados. Si la combinación de k factores son investigados a 2 niveles, el diseño factorial consistirá en 2^k experimentos. Un nivel cero es incluido también en ocasiones, un centro, en el cual todas las variables son fijadas en su valor medio. Tres o cuatro experimentos centrales se deben incluir siempre en diseños factoriales para minimizar el riesgo de perder relaciones no lineales en el medio de los intervalos. Si el valor para la respuesta del punto central es muy diferente del valor medio, entonces es necesario incluir términos cuadráticos en el modelo [16].

Estos diseños son los más útiles cuando el número de factores es relativamente limitado.

-
- 15 R.E. Bruns, I.S. Scarminio, B.B. Neto, in S. Rutan, B. Walczak, *Statistical Design-Chemometrics*, Elsevier B.V., 2006, pp 83-194.
 - 16 T. Lundstedt , E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, 1998, *Experimental design and optimization*, *Chemom. Intell. Lab. Systems* 42, 3-40.

Diseño factorial fraccionado

Cuando se quieren estudiar un gran número de factores, se emplean diseños factoriales reducidos. Con este tipo de diseños, los factores son evaluados eficientemente usando un número pequeño de experimentos, comparado con el diseño factorial completo. En general se asume que la influencia de las interacciones de tercer orden o mayores son despreciables y pueden ser excluidas del modelo.

La descripción de un diseño factorial fraccionado con k niveles y N factores es dado por k^{N-p} experimentos donde p es siempre menor que N [17].

Se tienen que tener en cuenta las siguientes reglas para estos tipos de diseño:

- Se debe aplicar usualmente a 2 niveles ($k=2$)
- El número de experimentos (2^{N-p}) debe ser mayor que N (número de factores), donde p representa el número de columnas generadas con un diseño factorial completo 2^β ($\beta = N-p$).

Una de las propiedades importantes de estos diseños es que los experimentos, aunque reducidos, cubren la mayoría del dominio experimental. Un diseño factorial fraccionado, "selecciona" aquellos experimentos que cubren un máximo volumen del dominio. Una de las limitaciones principales relacionadas con este tipo de diseños, es que los efectos principales pueden ser confundidos con las interacciones.

En la mayoría de los casos, no es necesario investigar las interacciones entre todas las variables incluidas desde el principio. En el primer "rastreo" es recomendable evaluar el resultado y estimar los principales efectos de acuerdo a un modelo lineal (por supuesto si pudiera ser posible calcular efectos adicionales, deberían ser estimados). Después de esta evaluación las

17 R.G. Brereton, *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant.*, John Wiley & Sons, Ltd., 2003, pp 60- 66.

variables que tengan influencia en el estudio serán seleccionadas para nuevos estudios [18,19,20].

Diseño factorial fraccionado 2⁷⁻⁴

Para la primera etapa de optimización de las variables se ha utilizado un diseño factorial fraccionado saturado para 7 variables, 2⁷⁻⁴, (ver artículo) para el diagnóstico de las variables significativas. La matriz del modelo viene definida por un diseño factorial 2³. Un diseño factorial con 7 variables daría 128 experimentos. Geométricamente los puntos del diseño se acoplan a los vértices de un hipercubo de 7 dimensiones, de los que se selecciona 1 de cada 16 vértices para definir la matriz experimental del diseño, es 1/16 del diseño factorial y se seleccionan 8 experimentos

La última fila de este tipo de matrices tiene que contener únicamente uno de los niveles (+1 ó -1), eso equilibra cada columna para asegurar que hay el mismo número de niveles estudiados por cada factor.

Este diseño es empleado para ajustar los datos experimentales a un modelo lineal, sólo se consideran las interacciones de primer orden:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \varepsilon$$

En estos diseños muchas variables pueden investigarse sin un excesivo número de experimentos. En efecto, mucha menos información se consigue comparada con diseños factoriales completos y el precio que hay que pagar es la contaminación de los efectos principales por los efectos de interacciones.

Como el número de columnas (7) no correspondía al número de factores iniciales (5 variables), fue necesario la introducción de 2 variables "fantasma" que se añaden artificialmente al plan de experiencias para no romper la

18 P.W. Araujo, R.G. Brereton, 1996, Experimental design I. Screening, Trends Anal. Chem., 15, 26-31.

19 P.W. Araujo, R.G. Brereton, 1996, Experimental design II. Optimization, Trends Anal. Chem., 15, 63-70.

20 K. Hinkelmann, O. Kempthorne in W.A. Shewhart, S. Wilks, Design and Analysis of Experiments, John Wiley & Sons, Inc., 2005, pp 241-279.

CAPÍTULO I

estructura matemática de la matriz del diseño, pero que no tienen ningún significado físico-químico y, por tanto, no generan ningún efecto en la respuesta experimental. Estas variables se utilizaron además para tener en cuenta efectos de las interacciones más probables que podían ocurrir, según nuestro conocimiento del sistema, entre algunas variables (ciclos estáticos con tiempo estático, o ciclos estáticos con volumen de disolvente), que son confundidos con los efectos ficticios de las "variables fantasma"

Este modelo se usa principalmente para investigar el sistema experimental con una visión general. Para determinar el óptimo (en este caso el máximo de grasa extraída), habría que introducir términos cuadráticos en el modelo. De esta manera se podrían determinar relaciones no lineales entre las variables experimentales y las respuestas.

A continuación se llevó a cabo la optimización de las variables significativas aplicando un barrido en torno a estas.

3. Análisis DAFO

<i>DEBILIDADES</i>	<i>AMENAZAS</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Inexperiencia de la doctoranda✓ Desconocimiento de las técnicas de extracción✓ Desconocimiento del diseño experimental	<ul style="list-style-type: none">✓ Bibliografía insuficiente✓ Resultados previos no disponibles✓ Fiabilidad de las muestras disponibles en el mercado
<i>FORTALEZAS</i>	<i>OPORTUNIDADES</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Nuevos retos e inquietudes✓ Rodeada de conocedores en la materia.✓ Comienzo de una nueva etapa	<ul style="list-style-type: none">✓ Adquisición de nuevas competencias para trabajar en un laboratorio✓ De gran interés para la comunidad científica✓ Fácil para uso rutinario

4. Artículo N°1

"Extracción con líquidos presurizados y cuantificación del contenido de grasa-aceite en pan y productos derivados".

Publicado en: Talanta, 83 (2010) 25-30.



Abstract

A pressurised liquid extraction (PLE) method for extraction and quantification of total fat and oil in bread and derivatives products has been proposed. Parameters implied in the extraction process; such as temperature, static time, number of extraction cycles, purge time and flush volume; have been optimised using a formal methodology based on statistical experimental design in order to obtain the best results. Moreover, this method has been validated by using homemade bread elaborated in the laboratory which contained 9.64 g of olive oil in 100 g dry weight. The production and use of an "ad-hoc" in-house reference material is just one of the most relevant aspects of this study. The uncertainty estimation has been carried out taking into account all the uncertainty components of the process and it was stated as 4.2%. Finally, the proposed method has been applied to six different Spanish bread derivatives products with different olive oil contents (5-20%) to determine the fat content.

Keywords

Pressurised liquid extraction, fat content, olive oil, in-house reference material, method validation, uncertainty.

1. Introduction

Nowadays the total lipid content of food products is an important issue in several studies. Lipids are a diverse group of biological substances made up primarily of non-polar compounds (acylglycerols, waxes and sterols) and more polar compounds (free fatty acids, phospholipids and sphingolipids). The complex nature of the total lipid composition of foods, from non-polar glycerides to polar phospholipids, means that the extraction with solvents has to be effective across a range of polarities. This is made more difficult because lipids bind to proteins (lipoproteins) and sugars (glycolipids) on cell membranes require a particular polar solvent to remove them [1]. Non-polar organic solvents, like hexane, are valid for neutral or simple lipids, which include fatty acid methyl esters, mono, di and triacylglycerols and unsaponifiable matter. Polar or complex lipids (such as phospholipids, glycolipids, lipoproteins, oxidised acylglycerols and free fatty acids) are extracted preferentially by polar solvents like methanol.

This ability of different solvent mixtures to dissolve different lipid classes has led to the concept of "total fat extraction". There are different ways to explain the total fat content in a sample: (i) substances extracted under the method conditions; (ii) total lipids including phospholipids; (iii) all the unchanged fatty acids from food; and iv) the food lipids converted to triacylglycerols (net fat) and the sum of all lipids expressed as triacylglycerols [2].

The "ideal" extraction method should be quantitative, nondestructive, and low time- and solvent-consuming. Such a procedure is hard to imagine, considering the complexity of the lipids. Several methods have been developed for total lipid extraction which are based on the use of solvents or solvents combination, but the most common are a mixture of chloroform and methanol (Folch method, modified later by Bligh and Dyer), a mixture of diethyl ether and petroleum ether (Roese- Gottlieb or Mojonnier method), and n-hexane/2-propanol (3/2, v/v) (Hara and Radin method). Other solvent mixtures have been tested with different results. Detailed information on these topics can be found in any lipid or food analysis handbook [3,4].

To increase the extraction efficiency and allow a simultaneous treatment of numerous samples, several continuous extraction methodologies have been described. The method most used for solid food products is the Soxhlet. There have been several modifications in order to improve their lipid recovery efficiency, although the quantitative results of these different methods are similar [5,6]. Some automated or semi-automated fat analysers based on the Soxhlet device are commercially available such as the *Soxtec Extractor* [7] and *Ankom Fat Extractor* [8].

In addition, several other extraction techniques have been developed [4, 9] such as, microwave-assisted extraction (MAE)[10], supercritical fluid extraction (SFE) [11], focused microwaveassisted Soxhlet extraction (FMASE) [12], dynamic ultrasoundassisted extraction (DUAE) [13] and pressurised liquid extraction (PLE, also named ASE, for accelerated solvent extraction) [14], PLE is an extraction technique that combines elevated temperature and pressure with liquid solvents to achieve fast and efficient extraction. This high temperature causes an increase in the solubility of the analyte in the solvent, a fast diffusion and a better mass transference; consequently the solvent can seep easily through the matrix. This automation reduces solvent use and operating cost. Although the required instrumentation has a higher cost than the one from standard methods, this additional cost is worthy when the number of analysis is high and taking into account that the solvent cost is reduced. In conclusion PSE is faster and much more efficient than traditional methods. General characteristics of the main available extraction methodologies for solid samples which have been mentioned previously are discussed in Refs. [3, 10].

Instrumental spectrometric techniques such as infrared spectroscopy (IR) [15], or nuclear magnetic resonance (NMR) [16], are being also used for the direct determination of fat in food, generating large amounts of data which provide information after chemometric treatment. These methods are quick but they have an important drawback since it is necessary to build a good mathematical model previously, they also show a poor precision.

Since the introduction of the first commercial PLE instrument a few years ago, PLE has proved to be a good alternative to replace other extraction

methods. Recently, PLE has been exploited in different areas, including environmental pollutants [17], pharmaceuticals [18], biological materials [19,20] and foods [21]. For instance, in this last area, PLE has been applied to extract fat and oil from cereals [22,23], oilseeds [24], dairy products [25], fish tissues [26] and meat [27] using either pure solvents such as hexane and petroleum or mixtures such as hexane/acetone and hexane/dichloromethane/methanol. In addition, a formal strategy of statistical experimental design could be easily employed to deal with the simultaneous optimisation of all the variables but application examples of this methodology on PLE optimisation are scarcely found in scientific literature [28,29] and one-at-a-time variable optimisation is usually used.

Surprisingly, in spite of a great number of articles published where methods are described for the determination of total fat content in foods, it is only in a few cases that a proper validation study appears after the extraction method has been described [30,31]. A good single-laboratory validation practice requires the use of a representative certified reference material or similar, or the comparison with a recognised reliable analytical method. As a last resort, a well-organised method-performance collaborative interlaboratory study could be carried out. As a result, the method performance characteristics in terms of accuracy (trueness and precision), selectivity and range of application could be estimated [32]. In addition, both traceability [33] and uncertainty [34] of the results could be established.

This paper focuses on the development of an alternative analytical method, easy to apply, for the extraction of total fat/oil contents in bread and derivatives products using a pressurised solvent extractor, and subsequent quantification by gravimetric measurements. The variables of the method have been optimised using the statistical methodology of the design of experiments. The method has been validated properly using, as in-house reference material, bread elaborated in the laboratory with known olive oil content, and the expanded uncertainty of the results has been estimated. Finally, the proposed method has been applied to several commercially available samples of Spanish bread snacks containing olive oil as an ingredient.

2. Materials and methods

2.1. Solvents and reagents

All the solvents (analytical grade) used for extraction (hexane, 2-propanol, chloroform, methanol and ethanol) were supplied by PANREAC. Diatomaceous earth (supplied by Dionex) was used as inert solid. Deionised water was obtained from a purification system (Milli-Q; Millipore), and nitrogen (99.99%) was from Air Liquide.

2.2. Equipment and software

Extractions were performed on an Accelerated Solvent Extractor ASE 100 (Dionex), using 34 ml steel extraction cells. This equipment was validated for the extraction of non-bounded oil from solid samples by applying an internal procedure for quality assurance of pressurised liquid extractors. A calibrated three-figure analytical balance (Mettler Toledo PB303) was used for weight measurements. A Büchi RE-124 rotatory evaporator equipped with a vacuum pump V-700 (Büchi) was used to remove the remaining solvents after extraction. A household grinder (Taurus) was used for previous sample homogenisation and a household bread machine (Taurus) to elaborate bread containing a known olive oil content as homemade reference material for the validation process.

The Statgraphics Plus 5.1 software package [35] was used for statistical treatment and interpretation of collected data.

2.3. Sample extraction

Six characteristic spanish bread snacks (edible products made available in small sizes, which are attractive, appetizing, and ready to be eaten as such or in combination) named "Regañás", "Picos", "Palitos", "Panecillos", "Mini Tortas de Pan" and "Saladitos", which contained olive oil in different proportions (5–20%) were used as samples bread and derivatives products. They are all food products obtained from bread dough, comprising mainly flour, water, yeast, salt and edible fats, sugars, extracts and other

conventional additives of this type. All samples were purchased from common markets.

Samples were grounded with a mixer to fine particles, until complete homogenisation. By decreasing the particle size, the surface area was increased and this results in an improvement on the efficiency of the extraction process. They were dried in a drying oven at 105°C for 2 h. The samples were stored in opaque glass desiccators at room temperature until their analysis. Samples were weighed before and after the drying process in order to determine the moisture content (it was estimated that the analysed samples had an average moisture content of approximately 1.5%).

For the analysis, an amount of around 5 g of sample was exactly weighed with an approximation of 10mg in a watch glass. Next the sample portion was placed in a mortar and mixed with 3 g of diatomaceous earth, and was then placed in the extraction cell, previously prepared with a cellulose filter to prevent clogging of the metal on the base of the extraction cell. The remaining dead volume was filled with diatomaceous earth (approximately 2 g). The prepared cell was placed on the equipment support and was then extracted into a 100 ml collection bottle. Each sample was analysed three times. The solvent extraction used was mixture hexane/isopropanol, 3/2 (v/v) (see Section 3.1). The operating pressure was 1500 psi.

For total fat yield data, the fat extract with the solvent was transferred into a 100-ml glass flask and the entire solvent was distilled in a rotary evaporator. The fat extract was then kept in a drying oven for 30 min at 60°C to stabilisation of the weight and finally the extracted mass was measured on an analytical balance at room temperature.

2.4. Production of an in-house reference material

Homemade bread was used as reference material to validate the proposed method. For production of this in-house reference material with a well-known amount of olive oil was used a commercial bread machine (TAURUS, My Bread). All the ingredients were carefully weighted with approximation 0.01 g before adding to the dough. The ingredients were water

(300 g), sugar (5 g), salt (1.5 g), flour (450 g), yeast (3 g) and olive oil (76 g). The bread was weighed after baking and cooling and then the percentage of olive oil was calculated taking into account the amount of olive oil added firstly. After making this bread with olive oil, bread with the same amounts of ingredients, but without olive oil, was made in order to use as blank correction. The homemade bread elaborated in the laboratory contained a well-known amount of 9.64 g of olive oil in 100 g dry weight, that was added previously to the raw dough before baking and consequently it could be considered as in-house reference material. In a parallel way, it was elaborated bread that did not contain added olive oil for which it was obtained a fat content of 0.39 g/100 g dry weight. This blank correction was applied to the values of obtained fat content in the bread reference material.

This homemade bread could be used as representative material for any bread and derivative products since it had the same characteristics and ingredients. Moreover, there were not oil losses during bread preparation or baking due to an exhaustive weight control, which was carried out before and after the baking process.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of the extraction process

The proper application of a PLE method requires the optimization of an instrumental variable set such as temperature, pressure, heating time, extraction time, number of extraction cycles, flush volume and purge time. In addition, these variables have to be optimised in conjunction with other analytical variables like the amount of sample, sample particle size, extraction solvent or hydrolysis conditions (when necessary).

Optimisation of the extraction process begins, generally, with the selection of an appropriate extraction solvent. Different experiences, based on what we found on bibliography for bread and derivatives products [20], were carried out. Different solvents and solvents mixtures were tested: chloroform/methanol 2/1 (v/v) [36], ethanol [37], and hexane/isopropanol

3/2 (v/v) [38]. With the mixture chloroform/metanol 2/1, it was extracted a total fat content of 12.97% for a sample which had 15% of total fat. Extractions with ethanol gave incorrect results; they were greater than the nominal fat content, maybe either because of different compounds were extracted from the matrix or a wrong value on the label. The mixture hexane/isopropanol 3/2 (v/v), recommended by the extractor supplier, was found to be more effective than the others and it was chosen as the extraction solvent.

The ASE 100 extractor can use extraction cells of 10, 34, 66 and 100 ml and a collection bottle of 250 ml. The 34 ml cell was selected because it is suitable for 5 g of sample containing 5–20% fat. Next, the main variables implied in the pressurised liquid extraction process (temperature, static time of extraction, flush volume, purge time and number of extraction cycles) were optimised by applying a methodology of statistical design of experiments in two steps: (i) screening of significant variables, and (ii) establishment of the selected variable optimum values. The operating pressure was not optimised because the ASE 100 only operates at 1500 psi (100 bar). For the optimization process, due to all the bread and derivatives products used in this work had similar composition, one of the snacks, "regañas", was used as a test sample to optimize the extraction process.

For the variable screening analysis, a 2-level saturated fractional factorial design for 5 variables (2^{7-4}) resulting in an 8-run experimental matrix was applied; the experimental domain (Table 1) of the investigated variables was determined based on information from the equipment supplier.

Table 1. Variable experimental domain to be optimized.

VARIABLES	CODE		
	-1	0	+1
A = Temperature (°C)	100	125	150
B = Number extraction cycles	1	3	5
C = Static time (min)	3	5	7
D = Purge time (s)	50	100	150
E = Flush volume (ml)	20	60	100
F = Dummy #1	-	-	-
G = Dummy #2	-	-	-

The design matrix and the results of each experimental run, where the response variable is the measured fat content (F) expressed in grams of fat per 100 g of dried sample (g/100 g dry weight), and the effect of each variable, are presented in Table 2. The experimental runs were carried out randomly to avoid occasional effects on the variables and all the experiences were carried out carefully by qualified personnel.

Two "dummy variables" were added to complete the mathematical structure of the design matrix, although they do not have any physical-chemistry meaning and, therefore, they do not produce any effect in the experimental response.

The effect of the variables and their importance are graphically evaluated by a pareto-chart of standardised effects (Fig. 1). A value of ± 0.4 g/100 g dry weight was selected by us as the in-house significance threshold based on previous experiences and on acceptable errors for fat extraction (<5% experimental mean value). Only two variables, temperature and purge time, show a significant effect on the extracted fat content. The temperature

shows the highest positive effect (+0.51 g/100 g dry weight for each 25 °C temperature change) which implies that the higher the temperature, the higher the obtained fat content. The effect of extraction temperature could be explained by the increase of the diffusion coefficient in the liquid solvent into the solid matrix while the extraction temperature increases, favouring the kinetics of desorption of the compounds from the matrix [39].

Table 2. Experimental matrix and measured fat content for each experimental run, and estimated effects for each variable. The fat content and effects are expressed in grams of extracted fat per 100 grams of dried sample (g/100 g dry weight)

Run	Variables							Measured fat content
	A	B	C	D	E	F	G	
1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	10.51
2	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	9.16
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	9.78
4	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	9.50
5	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	9.96
6	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	9.54
7	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	9.90
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9.92
							Mean	9.78
Effects	0.51	-0.09	-0.31	-0.39	0.02	-0.18	0.16	

Also, higher temperatures enhance the vapour pressure (volatility) of extract compounds favouring the extractions from the vegetable porous matrix. Purge time shows the lowest negative effect (-0.39 g/100 g dry weight for each 50 s interval) which implies that decreasing the purge time leads to a higher obtained fat content. This effect could be explained by the fact that during the purge process, some amount of fat extract could be lost due to the high pressure which it takes place. Flush volume, static time, and number of extraction cycles do not show significant influence on the extraction process

in the experimental domain studied. In addition, significant interactions between variables are not observed.

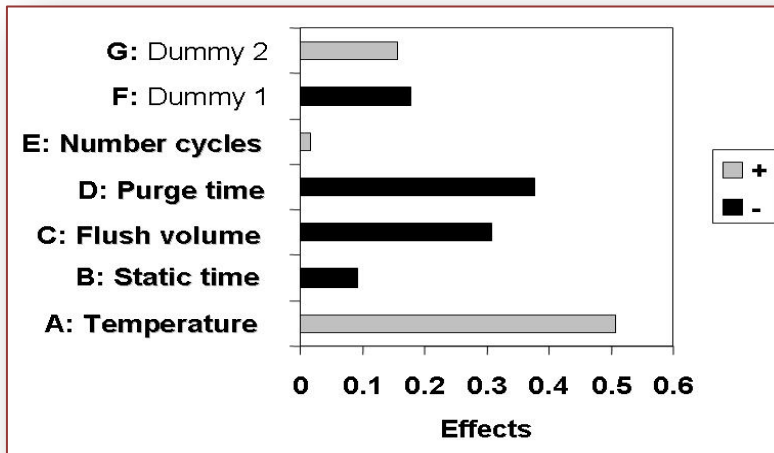


Figure 1. "Pareto chart" of standardised effects. The black bars represent the variables that produce negative effects on the responses (g/100 g non-dried sample) and the grey bars those variables that produce positive effects.

Next the two significant variables were studied in order to find the optimal value for each. First the area around the central point of the experimental domain was studied to determine the direction of highest rise in the experimental response in order to continue the experimental study in this direction. The greatest measured fat content was found for minimum values of purge time and maximum values of temperature. Thus the optimum values for purge time and temperature were located at 100s and 175 °C, respectively. Figure 2 illustrates the optimisation strategy followed and the obtained responses in each case.

Because of the effects of the remaining variables (static time, flush volume and number of extraction cycles) were not significant, the operating values were chosen according to the more favourable operation for the

process. Static time (5min) was selected according to the central point of the experimental domain (see Table 1), flush volume (40%) was chosen because at this value the extraction efficiency was not affected and the solvent cost was minimal, at last the number of extraction cycles (1 cycle) was selected because the fat content did not differ too much and the extraction time was less.

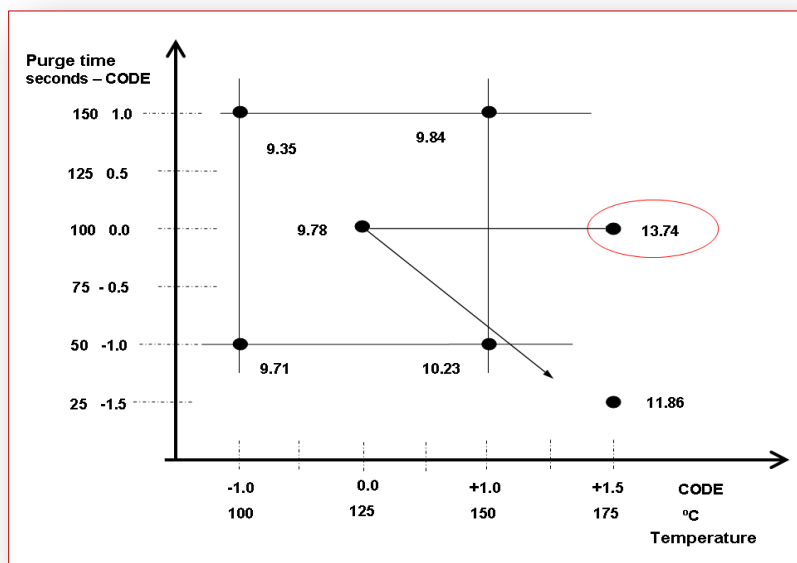


Figure 2. Experimental strategy followed in the simultaneous optimisation of both extraction temperature and purge time.

Finally, the optimised conditions for extraction were a temperature of 175 °C, heating period of 5min, extraction (static) time of 5min with one static extraction cycle per sample, flush volume of 40% and purge time 100 s. The overall time required for the extraction was 12 min.

3.2. Method validation

The validation procedure was carried out by applying the analytical method, at the operation conditions previously optimised and using homemade bread produced in the laboratory. The average net recovery

obtained, once the blank correction is applied, after ten extractions from different portions of the reference bread was 9.57 g/100 g dry weight with a standard deviation of 0.211 g/100 g dry weight.

The precision and trueness of the method, expressed as relative standard deviation (RSD) and recovery (\mathfrak{R}) in percentage, were 2.11% and 99.27% respectively. The estimated precision is similar to other analytical methods of determination of total fat in food by extraction [30], but significantly better than the instrumental techniques of direct determination. It is observed that there is no significant bias because $|100-\mathfrak{R}| \ll \text{RSD}$ and so the trueness of the analytical method is satisfactory. In addition, the use of a calibrated balance and a qualified extractor jointly with the high-purity solvents and the room temperature control, assure the traceability and the comparability of the results.

An estimation of the limit of quantification (LOQ) of the method was also calculated from 10 times the standard deviation. The analytical method is suitable for analysis of bread and derivatives products with a total fat and oil content no less than 2 g/100 g dry weight.

3.3 Uncertainty estimation

For the uncertainty estimation, a parameter that characterizes the dispersion of the results obtained from the analytical method, the following steps are followed [34]:

3.3.1. Specifying the measurand

The measurand is the total fat content, F , expressed in grams of fat per 100 g of non-dried sample (g/100 g non-dry weight).

3.3.2. Modelling the measurement

Express mathematically the relationship between the measurand and all of the input quantities upon which the measurand depends. The equation for quantifying the total fat content:

$$F = \left[\left(\frac{m_1 - m_0}{M_1 - M_0} \right)_{\substack{\text{reference} \\ \text{sample}}} - \left(\frac{m_1 - m_0}{M_1 - M_0} \right)_{\substack{\text{blank} \\ \text{sample}}} \right] \times 100 = \left[\left(\frac{\Delta m}{\Delta M} \right)_{\substack{\text{reference} \\ \text{sample}}} - \left(\frac{\Delta m}{\Delta M} \right)_{\substack{\text{blank} \\ \text{sample}}} \right] \times 10$$

where: m_0 is the weight, in grams, of empty flask used for the extracted fat collection; m_1 is the weight, in grams, of collection flask with the extract; M_0 is the weight, in grams, of the empty watch glass used to weigh the sample; and M_1 is the weight, in grams, of the watch glass with the sample. The terms Δm and ΔM designate the measured mass of analyte (fat) and sample respectively.

3.3.3. Quantifying the uncertainty components and their associated uncertainties

Estimate the value of each input quantity either by the statistical analysis of repeated observations or by other means such as taking the uncertainty of a reference standard from a calibration certificate. The obtained values constitute the standard uncertainty components, u_i . In figure 3 all of the possible uncertainty components are shown in the extraction process by means of a cause-effect diagram. It is observed that all of them are related to the weight.

3.3.4. Combining the components

Calculate the combined standard uncertainty of the measurement result, $u(F)$, from the standard uncertainty components. The expression for uncertainty estimation is:

$$\frac{u^2(F)}{F^2} = \left(\frac{u^2(m_1) + u^2(m_0)}{(m_1 - m_0)^2} + \frac{u^2(M_1) + u^2(M_0)}{(M_1 - M_0)^2} \right) \times 2 + RSD_{\text{precision}}^2$$

or

$$\frac{u^2(F)}{F^2} = \left(\frac{u^2(\Delta m)}{\Delta m^2} + \frac{u^2(\Delta M)}{\Delta M^2} \right) \times 2 + RSD_{\text{precision}}^2$$

(Factor 2 is introduced because the determination is based on two complete analytical tests, one on the blank and another one on the sample.)

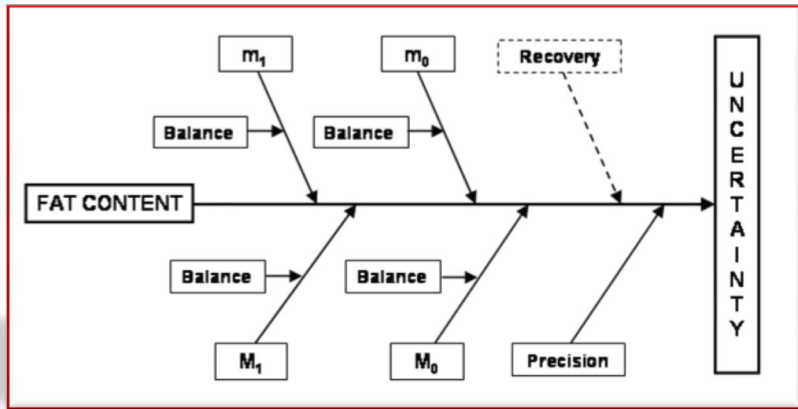


Figure 3. Cause-effect diagram of uncertainty components in the method validation process. All the components are related to the weight and the balance. (The dashed-line represents the uncertainty component due to the recovery. In this uncertainty budget this component is not taken into account because the recovery has a non-significant value).

3.3.5. Simplifying the expression

In order to simplify the formula, the uncertainty of mass subtractions, whose measured mass values do not differ too much from each other, can be expressed as:

$$u^2(\Delta m) = u^2(m_1) + u^2(m_0) \approx 2 u^2(m)$$

Reason why by including these terms in the initial equation of uncertainty calculation:

$$\frac{u^2(F)}{F^2} = 4 \times \left(\frac{u^2(m)}{\Delta m^2} + \frac{u^2(M)}{\Delta M^2} \right) + RSD_{precision}^2$$

The within-laboratory estimated uncertainty associated with each one of these mass measurements (< 0.2%) is small in relation to the precision relative standard deviation (~2%) and so it can be considered negligible. Because of this the formula can be simplified still more:

$$\frac{u^2(F)}{F^2} \approx RSD_{precision}^2 \Rightarrow \frac{u(F)}{F} = u_{rel}(F) \approx RSD_{precision}$$

As the representative value of precision, RSD was given the obtained value in the method validation procedure. In conclusion, the established relative standard uncertainty of the method, $u(F)$, is 2.11%.

3.3.6. Calculate the expanded uncertainty

The expanded uncertainty, $U(F)$, is calculated by multiplying the combined standard uncertainty with the coverage factor k ($k=2$ when a coverage probability of 95% is considered). So, the relative expanded uncertainty for the analytical method is stated as 4.2%.

3.4. Application to real samples

The developed validated method has been applied to the determination of the fat content in six characteristic Spanish snacks, quoted in Section 2.3. The obtained value for each sample, expressed in grams of fat per 100 g of non-dried sample, and their uncertainty are shown in Table 3. In addition, the value that appeared on the label provided by the manufacturer is shown.

As it can be seen the values of measured fat content are approximately similar to the values provided by the manufacturer on the label (except for one of them, it might be due to a mistake on the label provided by the manufacturer).

Table 3. Results obtained in the derivatives products of the bread analysis with their value of fat content provided by the manufacturer on the label and the measured values, with their expanded uncertainty ($k = 2$), when the proposed method extraction is applied. The fat content values are expressed in g / 100 g non-dried sample.

SAMPLES ^a	Fat content on the label	Measured fat content ± uncertainty
"Regañás"	15.8	14.2 ± 0.6
"Picos"	5.3	7.3 ^a ± 0.3
"Palitos"	12.0	11.7 ± 0.5
"Panecillos"	21.0	22.5 ± 1.0
"Mini Tortas de Pan"	14.0.	14.6 ± 0.6
"Saladitos"	19.8	17.6 ± 0.8

^a Derivatives products of the bread, obtained from a bread dough, comprising mainly flour, water, yeast, salt and edible fats, sugars, extracts and other conventional additives of this type.

^b This value shows a greater difference according to the fat content on the label fat content. It might be due to a mistake on the label provided by the manufacturer.

These values from the labels have not been used to validate the method. They were only used as reference values in order to compare with our values. As it is shown in Table 3, for all the products tested, both values, the values on the label, and the found values, were quite consistent, which proves the applicability of the proposed method for the intended purpose.

4. Conclusions

As it can be seen from the present communication, pressurised liquid extraction technique together with the proposed gravimetric analytical method can be successfully applied for the extraction and quantification of total fat and oil from different bread and derivatives products. Also, the proposed method could be applied for food routine laboratories to quantify fat. The extractor was qualified properly following an internal procedure before being used.

A mixture of hexane:isopropanol 3:2 (v/v) was selected as solvent extraction and the remaining variables were optimised with an statistical methodology. The extraction method has been validated. Moreover, the expanded uncertainty for the analytical method has been calculated with a value of 4.2% and the limit of quantification (LOQ) is established to be 2 g/100 g dry weight. Finally, the method has been tested on six commercial samples. The performance characteristics of the proposed analytical method reported here and the obtained results permit to conclude that PLE is a suitable technique for the quantification of total fat on bread and derivatives products. Furthermore, the possibility of coupling PLE with other steps in the analytical process is one of the most interesting aspects of this methodology.

Acknowledgments

The authors would like to thank to the Spanish Ministry of Education and Science (Dirección General de Investigación, project CTQ2006-15066-C02-02) and the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, project P07-FQN-02667, and Consejería de Agricultura y Pesca) for financial assistance. This work has also been partially supported by European Regional Development Funds (ERDF). One of the authors, C.R.S., is also grateful to the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa) for the personal postgraduate grant.

References

- 1 R. Self, in: P.S. Belton, *Extraction of Organic Analytes from Foods*, Norwich: RSC, 2005, pp. 111-152.
- 2 L. Hyvönen, *FoodChem.* 57(1996) 23-26.
- 3 F. Shahidi, P.K.J.P.D. Wanasundara, in: C.C. Akoh, D.B. Min (Eds.), *Food Lipid. Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 132-167.
- 4 W.W. Christie, *Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, 3rd ed., The Oily Press, Bridgwater, 2003.
- 5 P. Manirakiza, A. Covaci, P. Schepen, *J. Food Comp. Anal.* 14 (2001) 93-100.
- 6 T. Pérez-Palacios, J. Ruiz, D. Martín, E. Muriel, T. Antequera, *Food Chem.* 110 (2008) 1025-1029.

- 7 S. Anderson, in: D.L. Luthria (Ed.), *Oil Extraction and Analysis. Critical Issues and Comparative Studies*, AOAC Press, Champaign, 2004, pp. 11–24.
- 8 R.J. Komarek, A.R. Komarek, B. Layton, in: D.L. Luthria (Ed.), *Oil Extraction and Analysis. Critical Issues and Comparative Studies*, AOAC Press, Champaign, 2004, pp. 39–68.
- 9 R. Self, in: P.S. Belton (Ed.), *Extraction of Organic Analytes from Foods*, RSC, Norwich, 2005, pp. 1–43.
- 10 C. Sparr-Eskilsson, E. Björklund, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 227–250.
- 11 T. Doane-Weideman, P.B. Liescheskii, in: D.L. Luthria (Ed.), *Oil Extraction and Analysis. Critical Issues and Comparative Studies*, AOAC Press, Champaign, 2004, pp. 69–99.
- 12 F. Priego Capote, M.D. Luque de Castro, *Talanta* 65 (2005) 81–86.
- 13 J. Ruíz Jiménez, M.D. Luque de Castro, *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 75–82.
- 14 B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1033–1039.
- 15 L.K. Sorensen, *Food Chem.* 113 (2009) 1318–1322.
- 16 H. Todt, G. Guthausen, W. Burk, D. Schmalbein, A. Kamlowski, *Food Chem.* 96 (2006) 436–440.
- 17 L. Ramos, E.M. Kristenson, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 3–29.
- 18 T.H. Hoang, R. Farkas, C. Wells, S. McClintock, M. di Maso, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 257–261.
- 19 K. Schäfer, *Anal. Chim. Acta* 358 (1998) 69–77.
- 20 E. Carabias Martínez, E. Rodríguez Gonzalo, P. Revilla Ruiz, J. Hernández Méndez, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 1–17.
- 21 J.A. Mendiola, M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibáñez, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 234–246.
- 22 N.T. Dunford, M. Zhang, *Food Res. Intern.* 36 (2003) 905–909.
- 23 R.A. Moreau, M.J. Powell, V. Singh, *J. AOCS* 80 (2003) 1063–1067.
- 24 B. Matthaeus, E. Bruehl, *J. AOCS* 78 (2001) 95–102.
- 25 R.K. Richardson, *J. AOACInt.* 84 (2001) 1522–1533
- 26 E.D. Dodds, M.R. McCoy, A. Geldenhuys, L.D. Rea, J.M. Kennish, *J. AOCS* 81 (2004) 835–840.
- 27 T. Gallina Toschi, A. Bendini, A. Ricci, G. Lercker, *J. FoodLipid* 15 (2008) 309–325.
- 28 G. Isaac, M. Waldeba, U. Eriksson, G. Odham, K.E. Markides, *J. Agric. FoodChem.* 53 (2005) 5506–5512.
- 29 R.A. Jacques, C. Darivac, J.V. de Oliveira, E. Bastos Caramão, *Anal. Chim. Acta* 625 (2008) 70–76.
- 30 K.M. Phillips, M.T. Tarragó-Trani, T.M. Grove, I. Grün, R. Lugogo, R.F. Harris, K.K. Stewart, *J. AOCS* 74 (1997) 137–142.
- 31 K.M. Phillips, D.M. Ruggio, K.R. Amanna, *Food Chem.* 83 (2003) 551–555.
- 32 IUPAC Technical Report, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835–855.

- 33 EURACHEM/CITAC Guide, Traceability in chemical measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement. Available from: <http://www.eurachem.org/guides/EC Trace 2003.pdf>, 2003 (accessed January 2009).
- 34 EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying uncertainty in analytical measurement, second ed. Available from: www.measurementuncertainty.org/mu/QUAM2000-1.pdf, 2000 (accessed January 2009).
- 35 Statgraphics Plus 5.1, Statistical Graphics Corporation, Manugistics Inc., Rockville, USA, 2002.
- 36 T. Gallina Toschi, A. Bendini, A. Ricci, G. Lercker, *Food Chem.* 83 (2003) 551–555.
- 37 J.F. Robert, A. Elias, *Clin. Chim. Acta* 21 (2003) 255–263.
- 38 DIONEX, Application Note 321, Determination of unboundfat in various food matrices using accelerated solvent extraction (ASE R). Available from: www.dionex.com/en-us/webdocs/4322 AN321.pdf, 2004 (accessed October 2007).
- 39 M. Herrero, P.J. Martín-Álvarez, F.J. Señorans, A. Cifuentes, E. Ibáñez, *Food Chem.* 93 (2005) 417–423.

5. **Discusión**

Como se dijo al inicio, este capítulo corresponde a los estudios realizados para conseguir el título de Máster, en el primer año del doctorado. Los estudios se plantearon inicialmente para desarrollar un método que mediante la técnica de extracción presurizada con disolventes, consiguiera extraer y cuantificar el aceite de oliva en alimentos y realizar el posterior análisis cromatográfico para determinar así su perfil de triglicéridos.

A pesar de las debilidades y amenazas, presentadas en el análisis DAFO, con las que se contaban al inicio del estudio, los objetivos inicialmente planteados han sido conseguidos. Además el extractor fue verificado y validado, previamente a su uso. Así como el método de extracción también ha sido validado y se ha calculado la incertidumbre de los resultados. Con todo esto se confiere calidad a los resultados obtenidos.

Al mismo tiempo, el método desarrollado ha permitido su aplicación en muy diversos productos alimenticios, distintos a los de panadería expuestos en el estudio, como galletas, embutidos, frutos secos, mantecados etc. Por esto ha demostrado ser un método bastante robusto y reproducible y transferible a cualquier laboratorio de análisis.

Los objetivos que se derivarán en los siguientes estudios estarán relacionados con el desarrollo y optimización de un método cromatográfico para el análisis de este aceite de oliva extraído y poder así resolver el problema analítico planteado inicialmente.

Comunicaciones a Congresos derivadas de este capítulo

- ◆ M.E. Nuñez Salces, C. Ruiz Samblás, L. Cuadros Rodríguez. *Validación de un método de extracción con líquidos presurizados y cuantificación del contenido de grasa total en galletas*. VI Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de la Calidad en Laboratorios (VI IBEROLAB, 2011). Comunicación electrónica.
- ◆ I. García Garrido, P. de la Mata Espinosa, C. Ruiz Samblás, L. Cuadros Rodríguez. *Extracción (con líquidos presurizados) y caracterización de la fracción grasa de frutos secos*. XII Reunión del grupo regional andaluz de la sociedad española de química Analítica (GRASEQA, 2010). Póster.
- ◆ P. de la Mata Espinosa, C. Guerrero García, C. Ruiz Samblás, A. González Casado, L. Cuadros Rodríguez. *Extracción (con líquidos presurizados) y caracterización de la fracción grasa de embutidos que contienen aceite de oliva*. XIV Feria Internacional del aceite de oliva e industrias afines. (XIV EXPOLIVA, 2009). Póster.
- ◆ C. Ruiz Samblás, L. Cuadros Rodríguez, A. González Casado. *Procedimiento para la verificación y validación de un equipo de extracción con líquidos presurizados*. V Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de la Calidad en Laboratorios (V IBEROLAB, 2009). Comunicación electrónica.
- ◆ C. Ruiz Samblás, L. Cuadros Rodríguez, A. González Casado. *Validación de un método de extracción con líquidos presurizados y cuantificación del contenido de grasa total en productos de panadería*. V Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de la Calidad en Laboratorios (V IBEROLAB, 2009). Comunicación electrónica.
- ◆ C. Guerrero García, A.P. de la Mata Espinosa, C. Ruiz Samblás, L. Cuadros Rodríguez. *Validación de un método de extracción con líquidos presurizados y cuantificación del contenido de grasa total en patatas fritas envasadas y en embutidos*. V Congreso Virtual Iberoamericano sobre

CAPÍTULO I

Gestión de la Calidad en Laboratorios (V IBEROLAB, 2009).
Comunicación electrónica.

- ◆ C. Ruiz Samblás, L. Cuadros Rodríguez, P. de la Mata Espinosa. *Aplicación de la extracción presurizada con disolventes para la cuantificación del contenido total de grasas en alimentos de panadería*. XI Reunión del Grupo Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA, 2008). Póster.

ANEXO:

**Procedimiento para la Verificación, Validación y
Mantenimiento de Extractores con Disolventes Presurizados**



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 1 de 25

Procedimiento para la verificación, validación y mantenimiento de un equipo de extracción con líquidos presurizados (PLE)

DISTRIBUCIÓN:	Esta instrucción técnica se distribuye a todos los miembros del grupo de investigación AnAMA (FQM-232).
Número de copias:	Sin restricción.

(*)	Nombre	Fecha	Firma
Elaborado por:	Cristina Ruiz Samblás	13 julio 2009	
Revisado y aprobado por:	Luis Cuadros Rodríguez	13 julio 2009	

* Este procedimiento ha sido elaborado en el marco del proyecto de investigación QuOLEO, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), antes Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), y la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (CICE) de la Junta de Andalucía.

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 2 de 25

CONTROL DE REVISIONES (HISTÓRICO)

Nº REV	FECHA	NATURALEZA DE LAS MODIFICACIONES
1.0	20 abril 2009	Primera edición del Procedimiento
2.0	13 julio 2009	1) Cambios en los procedimientos de verificación: 2) Modificaciones en los valores umbrales de los criterios de conformidad.

ANAMA

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 3 de 25

ÍNDICE

	Página
1. Objeto	5
2. Campo de Aplicación	5
3. Referencias	5
4. Definiciones	5
5. Generalidades	5
5.1. Fundamentos	5
5.2. Servicios	7
5.3. Equipos	7
5.3.1. Aparatos y Materiales	7
5.1.2. Reactivos	8
5.4. Personal	8
5.5. Precauciones de seguridad	8
6. Realización	9
6.1. Operaciones preliminares	9
6.2. Verificación de la temperatura del horno.....	10
6.3. Verificación del tiempo de purgado	10
6.4. Verificación del volumen de disolvente que atraviesa la celda de extracción y volumen de succión de la bomba	11
6.5. Validación del equipo	12
7. Evaluación de la Conformidad	14
7.1. Requisitos de aceptabilidad para la verificación	14
7.2. Requisitos de aceptabilidad para la validación	14
7.3. Declaración de la conformidad	14
8. Operaciones de Mantenimiento	15
8.1. Mantenimiento diario	15
8.2. Mantenimiento periódico	15
8.2.1. Reemplazo del precinto de la tapa de la celda	15
8.2.2. Reemplazo del "anillo-O" de la celda	16
8.2.3. Limpieza del sensor óptico	16

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 4 de 25

8.3.	Apagado	17
8.3.1.	Apagado entre extracciones	17
8.3.2.	Apagado duradero	17
8.4.	Transporte	18
9.	Anexos	19
Anexo 1:	Hoja de registro de datos para la verificación de la temperatura	20
Anexo 2:	Hoja de registro de datos para la verificación del tiempo de purgado	21
Anexo 3:	Hoja de registro de datos para la verificación del volumen de disolvente ...	22
Anexo 4:	Hoja de resultados de la validación del método	24
Anexo 5:	Informe de validación	25

ANAMA



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 5 de 25

1. OBJETO

El documento que se presenta pretende proporcionar las directrices para llevar a cabo el proceso de verificación de un equipo de extracción con disolventes presurizados para efectuar extracciones en muestras sólidas y conseguir así resultados que aseguren la conformidad del sistema con los requisitos exigidos por un procedimiento analítico de determinación del contenido total de grasa en un alimento.

Además describe el mantenimiento diario y periódico que hay que efectuar.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento está diseñado para ser aplicado a un extractor Dionex ASE 100, el cual incorpora únicamente una botella de disolvente y una celda de extracción.

No obstante puede ser aplicado a cualquier equipo de extracción presurizada independientemente del número de botellas de disolvente o celdas de extracción que contenga.

3. REFERENCIAS

- Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual. Documento N° 031842, Revisión 01, Mayo 2002.

4. DEFINICIONES

- Verificación. Confirmación por examen y aportación de evidencias objetivas de que un determinado equipo cumple los requisitos especificados.
- Validación. Tipo de verificación donde los requisitos especificados son adecuados para un uso particular.
- Mantenimiento. Conjunto de operaciones y cuidados necesarios para que instalaciones, edificios, industrias, etc., puedan seguir funcionando adecuadamente.

5. GENERALIDADES

5.1. FUNDAMENTO

En los últimos años se están desarrollando nuevas técnicas de preparación de la muestra debido a que la mayoría de las muestras que se analizan por métodos instrumentales de separación son demasiado complejas, están demasiado diluidas o son incompatibles con el sistema

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 6 de 25

cromatográfico, lo que impide su introducción directa. Como consecuencia de esto, se necesita preparar la muestra antes de su introducción en el sistema, mediante fraccionamiento, extracción o preseparación.

En las técnicas tradicionales de extracción (ej. Soxhlet), el líquido a la temperatura de ebullición se pone en contacto con la muestra sólida. Los problemas más comunes que se presentan en este caso son una difusividad lenta del disolvente, intercambio de energía poco eficaz y procesos estáticos o semi-estáticos. Esto da lugar a una extracción lenta y poco eficaz.

Los principios comunes a las nuevas técnicas de separación son:

- Se emplean disolventes de alta difusividad elevando la temperatura y controlando la presión (disolvente presurizado).
- Debido a los mayores coeficientes de difusión, las extracciones se aceleran considerablemente.

La técnica de extracción con disolventes presurizados se utiliza tanto como para extraer compuestos orgánicos e inorgánicos de una gran variedad de muestras sólidas y/o semisólidas. Esta técnica usa disolventes a altas temperaturas y presiones para acelerar el proceso de extracción. La alta temperatura eleva la extracción cinética, mientras que la presión elevada previene la ebullición del disolvente durante el proceso de extracción. Después de un calentamiento, el extracto es separado de la muestra en la celda de extracción y recogido en un frasco de vidrio de donde es tomado para su posterior análisis.

Los principales componentes de un equipo de extracción presurizada son:

- Panel de control
- Compartimiento para la celda de extracción
- Horno
- Mecanismo de Inyección
- Botella de Disolvente con una capacidad mínima de 0,5 L.
- Frasco de recogida de residuos.
- Frasco de recogida de extracto.

En la Figura 1 se representa un diagrama de las componentes del equipo del equipo.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 7 de 25

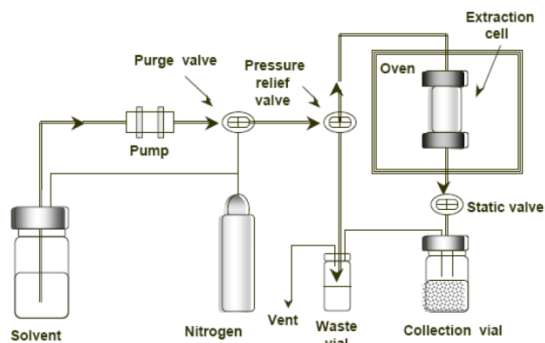


Figura 1. Esquema de los distintos módulos que consta un equipo de extracción presurizada con disolventes.

Además de los componentes principales existen otros componentes auxiliares como son:

- Celda de extracción de diferentes volúmenes (10 mL, 34 mL, 66 mL, 100 mL). Las celdas deben ser hechas de acero inoxidable o de otro material capaz de soportar los niveles de presión que son necesarios para este proceso (>1000 psi).
- Tapas para las celdas con dos bandas con cierre de rosca.
- Filtros de teflón/silicona de 22 mm para el frasco de recogida de muestra.

5.2. SERVICIOS

Se precisa un punto de toma de 99,9 % de nitrógeno capaz de suministrar una presión comprendida entre 10-12 bares. También, debido a que se producen gases durante el proceso de extracción, es necesaria una campana extractora.

Todo esto junto con los servicios habituales en un laboratorio analítico.

5.3. EQUIPOS

5.3.1. Aparatos y Materiales

- Espátula de metal.

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 8 de 25

- Mortero y maza de vidrio.
- Frascos de recogida de muestra.
- Balanza analítica capaz de proporcionar medidas fiables en un intervalo de 0-300 g con una resolución mínima de 0,01 g.
- Filtros de celulosa de 30 mm para la celda de extracción.
- Matraces de 250 mL.
- Rotavapor.
- Bomba de vacío.
- Sonda termométrica capaz de proporcionar medidas fiables en un intervalo de 50-200 °C, con una resolución mínima de 0,5 °C.
- Cronómetro.

5.3.2. Reactivos

- Tierra de diatomeas como diluyente sólido inerte.
- Hexano. Pureza mínima 95 %, de calidad de análisis.
- Isopropanol. Pureza mínima 95 %, de calidad de análisis.
- Etanol. Pureza mínima 95 %, de calidad de análisis. o cualquier otro disolvente comercial de pureza estándar del que se disponga en el laboratorio para realizar las verificaciones y cuya densidad sea conocida.

5.4. PERSONAL

Este procedimiento sólo puede ser llevado a cabo por personal debidamente calificado.

5.5. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

1. El laboratorio es responsable de mantener un ambiente seguro del entorno de trabajo así como de disponer de un archivo con la información general de las regulaciones con respecto al uso seguro de los productos químicos enumerados en este método. Un archivo de la referencia de las hojas de datos de seguridad debe estar disponible para todo el personal implicado en estos análisis.
2. El uso de disolventes orgánicos, a temperaturas elevadas, y altas presiones muestra un riesgo asociado que debe ser tenido en cuenta. El sentido común del operador de laboratorio debe ser empleado para minimizar estos riesgos. Las secciones a seguir describen los pasos adicionales que deben ser tomados.

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 9 de 25

- Las celdas de extracción en el horno están bastante calientes y pueden quemar la piel desprotegida. Permitir que las células se enfrien durante 10-15 minutos antes de retirarlas del horno o utilizar el equipo protector apropiado (e.j., guantes o pinzas aislantes), según lo recomendado por el fabricante.
- Durante el paso de purga del gas, algunos vapores provenientes del disolvente pueden salir a través de un puerto respiradero en el instrumento. Seguir las direcciones del fabricante para conectar este puerto con una campana de humo o a otros medios para prevenir el lanzamiento de vapores disolventes a la atmósfera del laboratorio.
- El instrumento puede contener sensores inflamables al vapor y se debe trabajar con todas las cubiertas y las puertas cerradas para asegurar la operación apropiada de los sensores. Seguir las instrucciones del fabricante con respecto al reemplazo de los sellos de la célula de la extracción para asegurarse contra escapes del vapor.

6. REALIZACIÓN

Los parámetros que se verificarán en este procedimiento normalizado son:

- Temperatura del horno.
- Tiempo de purgado.
- Volumen de disolvente que atraviesa la celda de extracción y volumen de succión de la bomba.

Para todos los parámetros a verificar se utiliza etanol como disolvente. Por ello la botella se rellena previamente a cada verificación con etanol. Sin embargo, se podrá utilizar cualquier disolvente que cumpla los requisitos especificados en el apartado 5.3.2.

6.1. OPERACIONES PRELIMINARES

- Establecer la ficha del extractor presurizado para identificar el instrumento: marca, modelo, número de serie e identificación del laboratorio que realiza la verificación.
- Verificar que el aparato se encuentra en buen estado: limpio y ubicado en un sitio, libre de vibraciones y fuentes de calor.
- Leer el manual de instrucciones del equipo para conocer el manejo, mantenimiento y cualquier instrucción específica de manejo que pueda existir.
- Medir las condiciones ambientales: temperatura, humedad y presión, las cuales se anotarán en la hoja de registro de datos correspondiente.
- Comprobar que la corriente neumática de nitrógeno se encuentra dentro de los valores preestablecidos.
- Preparar el disolvente, en este caso etanol, que va a usarse para la verificación.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0 Página 10 de 25

7. Seleccionar la temperatura para la cual se va a realizar la verificación.
8. Purgar del circuito, destinado a la eliminación de aire y disolvente que haya podido quedar dentro del circuito. Este proceso de purga se realizará antes y después de la utilización del equipo.

6.2. VERIFICACIÓN DE LA TEMPERATURA DEL HORNO

Utilizando el software del equipo extractor, se selecciona la temperatura de trabajo del horno. Para el proceso de verificación que se detalla a continuación, se ha seleccionado una temperatura de 100 °C.

A continuación, utilizando la sonda termométrica se toman 10 medidas de la temperatura cada 1-2 minutos, durante un periodo comprendido entre 15-30 minutos aproximadamente. Habrá que tener en cuenta a la hora de realizar las mediciones con la sonda, que esta se coloque en una posición lo más cercana posible a la del sensor de temperatura del equipo. En este equipo se encuentra situado en la parte inferior del horno y ligeramente desplazado a la izquierda.

Para cada medida se comprueba que la temperatura que indica el software y la que mide la sonda coincide, y que esta no varíe más de los requisitos previamente establecidos en el apartado 7.1 de este procedimiento.

Se debe repetir también el proceso a otras temperaturas, en caso de que así este estipulado en el procedimiento de análisis correspondiente.

La fecha, hora de inicio, condiciones ambientales, temperatura del equipo, el operador que realizó las medidas, así como el valor de las mismas se anota en el formato descrito en el Anexo 1.

6.3. VERIFICACIÓN DEL TIEMPO DE PURGADO

El tiempo de purga indica el intervalo de tiempo que la celda de extracción es purgada con nitrógeno. Este tiempo varía de 20 a 900 segundos y suele tomar un valor por defecto para las extracciones de 100 segundos pero varía en función del tamaño de la celda de extracción. Por ejemplo para una celda de 100 mL este tiempo puede variar de 70 a 110 segundos. Para el proceso de verificación que se detalla a continuación se ha comprobado para un tiempo de purga de 100 segundos. Las condiciones de trabajo del equipo se fijarán previamente, careciendo estas de importancia para la verificación del tiempo de purga.

Para el proceso de verificación se utilizará un cronómetro y se comprobará que el tiempo marcado en el equipo coincide con el cuantificado por el cronómetro. Para ello se activará el cronómetro cuando en el panel de control del extractor presurizado aparezca la etapa de purgado y se parará cuando termine esta etapa, comprobando así que el tiempo marcado por el cronómetro coincide con el valor prefijado en el equipo o en su defecto está dentro de la tolerancia exigida por el procedimiento y que se especifica en el apartado 7.1.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 11 de 25

La comprobación del tiempo de purgado se efectuará al menos 3 veces.

La fecha, hora de inicio, operador, condiciones del equipo, y el valor de las medidas, se anota en el formato descrito en el Anexo 2.

6.4. VERIFICACIÓN DEL VOLUMEN DE DISOLVENTE QUE ATRAVIESA LA CELDA DE EXTRACCIÓN Y VOLUMEN DE SUCCIÓN DE LA BOMBA

Se va a proceder al proceso de verificación del flujo de disolvente que atraviesa la celda de extracción, esto es el porcentaje de volumen de celda que se va a llenar de disolvente para realizar la extracción. Por ejemplo si el flujo de volumen se fijara en el panel de control al 50 %, 5 mL de disolvente pasarían a través de la celda de 10 mL, 17 mL a través de la celda de 34 mL y así sucesivamente para otros volúmenes de celda.

Además, hay que tener en cuenta que en la primera etapa del proceso de extracción, o llenado ("Fill"), la bomba carga aproximadamente unos 37 mL (según dato de la pantalla) de disolvente, a los que posteriormente añadirá el disolvente de extracción prefijado en cada etapa.

La siguiente verificación se realizará utilizando etanol como disolvente y colocando la celda de extracción vacía sin ningún tipo de muestra. Los pasos a seguir en el proceso de verificación son los siguientes:

1. Se limpia completamente el frasco de recogida de extracto, donde se recogerá el volumen de etanol prefijado en el panel de control junto con el volumen de succión inicial, y se determina su peso.
2. Se toma una celda de extracción vacía, por ejemplo de 34 mL, se coloca en el soporte y se selecciona en el panel de control un porcentaje de "Flush Volume" igual al 100 % lo que implicaría que el volumen de flujo que pasará a través de la celda de extracción será el 100 % de su volumen debiéndose recoger un volumen de etanol equivalente al volumen nominal de la celda utilizada, junto con el volumen cargado por la bomba inicialmente.
3. Al final de la simulación del proceso de extracción se comprueba que el volumen obtenido en el frasco de recogida coincide con el esperado. Para ello se pesa el frasco en la balanza y por diferencia con la pesada inicial se calcula la masa de etanol.

Dicha masa se relaciona con el volumen a través de la densidad. La densidad debe ser conocida de forma precisa y teniendo en cuenta la temperatura a la que se ha llevado el proceso de extracción.

La comprobación del volumen de flujo se realizara al menos 3 veces para cada proceso.

A continuación se debe realizar la verificación tomando como porcentajes de volumen de flujo 20%, 40%, 60%, 80% y 100%.

Este proceso se repetirá para cada una de las celdas disponibles 10, 34, 66, y 100 mL,

En el proceso de verificación se debe obtener una representación gráfica donde, para cada

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 12 de 25

tamaño de celda se obtiene una relación lineal en la cual la pendiente de la recta corresponde al volumen nominal de celda que se esté verificando y la ordenada en el origen es el volumen de succión que carga la bomba.

Las ecuaciones de las rectas teóricas a obtener son:

Volumen de celda, mL	Relación Lineal Teórica
100	$y = 100 x + 37$
66	$y = 66 x + 37$
34	$y = 34 x + 37$
10	$y = 10 x + 37$

Los puntos obtenidos se ajustan a una línea recta mediante una regresión lineal y se anotan los valores estimados de pendiente y ordenada en el origen.

Se aplicará un intervalo de aceptabilidad, el cual se especifica en el apartado 7.1. Se deberá tener en cuenta que pueden haber pérdidas de disolvente debidas a que algo puede ir al frasco de recogida de residuos.

La fecha, hora de inicio, operador, condiciones ambientales, condiciones del equipo, y el valor de las medidas, se anota en el formato descrito en el Anexo 3.

6.5 VALIDACIÓN DEL EQUIPO

El objetivo último de la validación es constatar que el grado de exactitud de los resultados, cuando el equipo trabaja en un proceso de extracción estándar, es admisible dentro de una tolerancia previa.

Para ello se realiza un proceso de extracción de una cantidad previamente conocida de una grasa añadida sobre el diluyente inerte.

Los pasos a seguir en el proceso de validación son los siguientes:

1. Seleccionará el tamaño de la celda de extracción que más se ajuste a la cantidad de muestra que se va a utilizar. La celda de extracción no tiene que ser llenada completamente, sin embargo, una celda llena usará menos disolvente en el proceso de extracción que una que se encuentre parcialmente llena. Se utilizará para el proceso de validación una celda de 34 mL.
2. Se preparará una muestra estándar, que contenga la misma cantidad de sólido diluyente que en el proceso analítico (aproximadamente 3 g de tierra de diatomeas) y sobre la que se añade como analito 1 g de grasa (se puede utilizar cualquier aceite vegetal). La adición del aceite, así como del sólido diluyente, se realizará directamente sobre la celda de extracción colocada sobre la balanza tarando previamente la misma.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 13 de 25

3. Posteriormente, se seleccionará el disolvente de extracción adecuado al proceso analítico, en este caso se validará con la mezcla hexano / isopropanol (3/2 v/v).
4. Pesarse el matraz de recogida de extracto vacío y seco, para el cálculo posterior de la grasa obtenida.
5. Programar el método adecuado en el equipo. Las condiciones de extracción para las que se va a validar el equipo son las siguientes:

Temperatura	175 °C
Tiempo estático	5 min
Flujo de volumen	40 %
Tiempo de purga	100 s
Nº ciclos estáticos	1

6. Al finalizar el proceso de extracción, y una vez que se haya evaporado el disolvente mediante un rotavapor, se procederá a pesar el matraz de recogida con el analito. El cálculo del porcentaje de recuperación de grasa bruta en la muestra, % \mathcal{R} , se realiza mediante la siguiente expresión:

$$\% \mathcal{R} = \frac{(m_1 - m_0)}{(M_1 - M_0)} \times 100$$

donde:

m_0 = Masa en gramos del matraz de recogida vacío.

m_1 = Masa en gramos del matraz de recogida con el extracto.

M_0 = Masa en gramos de la celda de extracción con diluyente inerte (aprox 3 g).

M_1 = Masa en gramos de la celda de extracción con el diluyente inerte y el aceite.

Se ha de comprobar que el porcentaje de recuperación de grasa bruta que se obtiene es aproximadamente del 100 % con el intervalo de tolerancia establecido en el apartado 7.2.

El proceso de validación debe repetirse al menos diez veces. Del conjunto de valores obtenidos se calcula la recuperación media de grasa medio, MED (% \mathcal{R}), y la desviación estándar, DE (% \mathcal{R}), de los diferentes valores de contenido de grasa encontrados.

La precisión se expresa en forma de porcentaje de desviación estándar relativa (% DER):

$$\% \text{DER} = \frac{\text{DE} (\% \mathcal{R})}{\text{MED} (\% \mathcal{R})} \times 100$$

La veracidad se expresa como error relativo del sesgo (% Er), donde el valor del sesgo corresponde a la diferencia entre el porcentaje medio obtenido, MED (% \mathcal{R}) y el valor de referencia asignado, REF, que coincide con el porcentaje de grasa (aceite) añadido:

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 14 de 25

$$\text{SESGO} = \text{MED} (\%Er) - \text{REF}$$

El valor de referencia será el 100 % por lo que:

$$\%Er = \frac{\text{SESGO}}{\text{REF}} \times 100 = \text{SESGO}$$

7. EVALUACIÓN DE CONFORMIDAD

Si alguno de los requisitos especificados no se cumpliera, sería necesario realizar mantenimiento y posteriormente un nuevo proceso de verificación y/o validación.

7.1. REQUISITOS DE ACEPTABILIDAD PARA LA VERIFICACIÓN

Se especifican a continuación las tolerancias requeridas para cada uno de los parámetros verificados:

- Temperatura del horno: se aplicará un intervalo de 10 ° C de la temperatura esperada.
- Tiempo de purga: 0.5 % del tiempo esperado.
- Volumen de flujo de disolvente que atraviesa la celda de extracción: se aplicará un 5 % de tolerancia a la pendiente obtenida.
- Volumen de succión de la bomba: la ordenada de la recta obtenida no variará mas de un 10% sobre el valor indicado en la pantalla del panel de control.
- El coeficiente de determinación (R^2) de la recta de regresión debe de ser como mínimo 0.995.

7.2. REQUISITOS DE ACEPTABILIDAD PARA LA VALIDACIÓN

Se acepta una % DER inferior al 3 %.

$$\% \text{DER} \leq 3 \%$$

El sesgo no deberá ser mayor que dos veces la desviación estándar obtenida anteriormente:

$$\text{SESGO} \leq 2 \times \text{DE}$$

7.3. DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD

La comparación de los datos de los parámetros calculados con los requisitos de aceptabilidad permite establecer la conformidad del equipo.

- EQUIPO CONFORME:



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 15 de 25

Resultado del parámetro de verificación \leq Requisito de aceptabilidad

▪ EQUIPO NO CONFORME:

Resultado del parámetro de verificación $>$ Requisito de aceptabilidad

8. OPERACIONES DE MANTENIMIENTO

8.1. MANTENIMIENTO DIARIO

1. Rellenar el frasco de disolvente si fuera necesario. Después de rellenarlo, siempre efectuar dos ciclos de enjuagado para aclarar las líneas de posibles burbujas,
2. Vaciar el frasco de recogida de pérdidas si es necesario.
3. Comprobar, mediante el manómetro correspondiente, que la presión del gas es la adecuada.
4. Sacar la bandeja de recogida de gotas que se encuentra bajo el horno y comprobar que el plástico está perfectamente limpio de todo residuo. Si la bandeja contiene líquido eliminarlo y recolocar la bandeja.

8.2. MANTENIMIENTO PERIÓDICO

1. Limpiar el precinto de la celda con agua y jabón aproximadamente cada dos semanas si se utilizan muestras que puedan ensuciarlo, si no es el caso, se puede hacer mensualmente. Además reemplazar el precinto de la celda después de aproximadamente 50 extracciones o cuando este muy dañado.
2. Reemplazar el "Anillo O" después de aproximadamente 50 extracciones o cuando este muy dañado.
3. Limpiar el sensor óptico que comprueba que el bote de recogida de extracto se encuentra lleno aproximadamente después de 50 extracciones.
4. Limpiar las celdas de extracción así como las tapaderas de las mismas aplicando un baño de ultrasonidos
5. Verificar que el sistema de inyección está derecho. Si no lo está, intentar doblarlo ligeramente hasta que recupere su posición. Si con esto no se soluciona, debería ser reemplazado.
6. Aproximadamente cada 6 meses, abrir la puerta de extracción e inspeccionar la parte más baja del precinto. Asegurarse que la punta no está dañada, golpeada o erosionada, si lo está reemplazarla.

8.2.1. Reemplazo del precinto en la tapa de la celda

- Desenroscar la tapadera de la celda del cuerpo.

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0 Página 16 de 25

- Sacar el anillo de cierre de la tapadera usando una herramienta adecuada (P/N056684). Para ello insertar las terminaciones de la herramienta en los dos agujeros del precinto, juntar para hacer presión y eliminar la tensión del anillo. Al mismo tiempo, con cuidado, tirar del anillo hacia fuera de la tapadera.
- A continuación sacar todas las partes que conforman la tapadera de la celda y reemplazar o limpiar las que corresponda.
- Para instalar el anillo de cierre, insertar la herramienta comentada anteriormente en los agujeros del anillo y ajustar para acercar los extremos del anillo. Insertar el anillo en la tapadera y empujar con los dedos hasta el tope. Después verificar que el anillo está bajo el saliente, sacar la herramienta de este.
- Unir la tapadera a la celda y apretar con los dedos.

8.2.2. Reemplazo del "anillo-O" de la celda

- Usar la herramienta P/N 046985 suministrada con el equipo para sacar el O-Rin. Para ello insertar la punta de la herramienta en el final de la tapadera y sacar hacia fuera el anillo.
- Colocar un nuevo "anillo-O" en la abertura y presionar hasta su lugar usando la herramienta de inserción (P/N 049660).

8.2.3. Limpieza del sensor óptico

Este sensor óptico comprueba que el bote de recogida de extracto se encuentra lleno. Su limpieza será necesaria cada dos meses. El sensor óptico se encuentra en la parte superior del soporte del bote de recogida de extracto debajo de los dos tornillos y a ambos lados. Para su limpieza será necesario introducir un bastoncillo previamente humedecido en metanol varias veces. Después se procederá al secado utilizando una corriente de aire.

Para ello será necesaria la retirada del panel frontal de protección del equipo, el cual se retira de la siguiente manera:

1. Apagar el equipo, mediante el interruptor principal.
2. Desenroscar el bote de recogida de residuos y de su lugar y colocarlo fuera.
3. Subir el sistema de inyección. Si el bote de recogida de muestra esta instalado, sacarlo de su lugar.
4. Apagar el suministro de gas. Desconectar el suministro desde el panel de control del equipo.
5. Retirar el panel frontal:
6. Colocarse delante del equipo con las palmas de ambas manos hacia arriba y enganchar dos dedos de cada mano bajo la parte superior donde se encontraban los botes de recogida de extracto y residuos respectivamente.
7. Coloca los dedos pulgares contra la parte inferior de la puerta de celda y el panel de



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 17 de 25

control y tirar hacia delante hasta eliminar lo que asegura la parte superior del panel.

8. A continuación, coloca los dedos índices en las depresiones que se encuentran en la parte inferior a ambos laterales y tirar hacia atrás.
9. Retirar el panel interior del ASE 100:
10. Insertar un destornillador en los dos tornillos que se encuentran en el panel interior, cercanos al sistema de inyección.
11. Insertar el destornillador en el agujero que se encuentra debajo del tornillo superior. Empujar el destornillador hasta que el lado derecho del panel deslice hacia atrás aproximadamente ½ pulgada. Evitar arañazos u otros daños al panel, para ello no dejarlo caer bruscamente.

Para reinsertar el panel:

1. Meter las pequeñas lengüetas en la parte superior e inferior del panel en las ranuras del chasis. Empujar el panel hacia delante hasta que se coloque en su sitio.
2. Recolocar los dos tornillos del panel interior.
3. Cuidadosamente alinear la parte inferior del panel con el margen del instrumento y entonces empujar el panel a su sitio.
4. Reinstalar el bote de recogida de residuos.
5. Encender el equipo, mediante el interruptor principal.
6. Encender el suministro de gas.

8.3. APAGADO

8.3.1. Apagado entre extracciones

- Después de una extracción con un disolvente orgánico 100%, se puede apagar el equipo inmediatamente. No se requiere otra acción.
- Después de extracciones con disolventes ácidos o básicos, enjuagar el sistema con disolvente orgánico 100% (acetona, metanol) o agua destilada antes de apagar el equipo.

8.3.2. Apagado duradero

Antes de apagar el equipo durante más de una noche:

- Después de extracciones con disolventes ácidos o básicos, enjuagar el sistema con disolvente orgánico 100% (acetona, metanol) o agua destilada antes de apagar el equipo.

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0 Página 18 de 25

- Apagar el suministro de gas.

8.4. TRANSPORTE

1. Después de extracciones con disolventes ácidos o básicos, enjuagar el sistema con disolvente orgánico 100% (acetona, metanol) o agua destilada antes de apagar el equipo.
2. Vaciar el bote de disolvente, reconectando el bote al sistema y efectuando uno o mas ciclos de enjuagado para asegurar que todo el disolvente es eliminado de la línea.
3. Eliminar el bote de disolvente.

ANAMA



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
VERIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES	Revisión: 2.0
	Página 19 de 25

9. ANEXOS

- Anexo 1: Formato de "Hoja de registro de datos para la verificación de la temperatura".
- Anexo 2: Formato de "Hoja de registro de datos para la verificación del tiempo de purgado".
- Anexo 3: Formato de "Hoja de registro de datos para la verificación del volumen de disolvente".
- Anexo 4: Formato de "Hoja de resultados de la validación del equipo".
- Anexo 5: Formato de "Informe de validación".

ANAMA

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
ANEXO 1 : FORMATO DE "HOJA DE REGISTRO DE DATOS PARA LA VERIFICACIÓN DE LA TEMPERATURA"	Revisión: 1.0
	Página 20 de 25

Fecha:		Hora de Inicio:	
---------------	--	------------------------	--

Operador(es):	
----------------------	--

Temperatura de trabajo del horno (°C)	
--	--

Condiciones ambientales

Presión (mbar)	
Temperatura (°C)	
Grado de Humedad (%)	

Nº Medida	Tiempo, min	Temperatura, °C
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

Observaciones:

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
ANEXO 2 : FORMATO DE "HOJA DE REGISTRO DE DATOS PARA LA VERIFICACIÓN DEL TIEMPO DE PURGADO"	Revisión: 1.0
	Página 21 de 25

Fecha:		Hora de Inicio:	
---------------	--	------------------------	--

Operador(es):	
----------------------	--

Temperatura de purga (s)	
---------------------------------	--

Condiciones del equipo

Temperatura (°C)	
Tiempo Estático (min)	
Volumen de Flujo (%)	
Nº Ciclos Estáticos	

Nº Medida	Tiempo (s)
1	
2	
3	

Observaciones:

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
ANEXO 3 : FORMATO DE "HOJA DE REGISTRO DE DATOS PARA LA VERIFICACIÓN DEL VOLUMEN DE DISOLVENTE"	Revisión: 1.0
	Página 22 de 25

Fecha:		Hora de Inicio:	
---------------	--	------------------------	--

Operador(es):	
----------------------	--

Volumen de succión de la bomba (dato en panel de control) :

Condiciones ambientales

Presión (mbar)	
Temperatura (°C)	
Grado de Humedad (%)	

Condiciones del equipo

Temperatura (°C)	
Tiempo Estático (min)	
Volumen de purga (s)	
Nº Ciclos Estáticos	

Volumen de celda	Porcentaje de disolvente	Medida	m ₁ (g)	m ₂ (g)	Δm (g)	V (mL)
10 mL	20 %	1				
		2				
		3				
	40 %	1				
		2				
		3				
	60 %	1				
		2				
		3				
	80 %	1				
		2				
		3				
	100 %	1				
		2				
		3				

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
ANEXO 3 : FORMATO DE "HOJA DE REGISTRO DE DATOS PARA LA VERIFICACIÓN DEL VOLUMEN DE DISOLVENTE"	Revisión: 1.0
	Página 23 de 25

Volumen de celda	Porcentaje de disolvente	Medida	m ₁ (g)	m ₂ (g)	Δm (g)	V (mL)
34 mL	20 %	1				
		2				
		3				
	40 %	1				
		2				
		3				
	60 %	1				
		2				
		3				
	80 %	1				
		2				
		3				
	100 %	1				
		2				
		3				
66 mL	20 %	1				
		2				
		3				
	40 %	1				
		2				
		3				
	60 %	1				
		2				
		3				
	80 %	1				
		2				
		3				
	100 %	1				
		2				
		3				
100 mL	20 %	1				
		2				
		3				
	40 %	1				
		2				
		3				
	60 %	1				
		2				
		3				
	80 %	1				
		2				
		3				
	100 %	1				
		2				
		3				

Observaciones:

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
ANEXO 4 : FORMATO DE "HOJA DE RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL EQUIPO"	Revisión: 1.0
	Página 24 de 25

Fecha:		Hora de Inicio:	
---------------	--	------------------------	--

Operador(es):	
----------------------	--

Condiciones ambientales

Presión (mbar)	
Temperatura (°C)	
Grado de Humedad (%)	

Medida	M ₀ (g)	M ₁ (g)	m ₀ (g)	m ₁ (g)	Recuperación (% R)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

PRECISIÓN:

MEDIA(%R)	
s(%R)	
% DER	

VERACIDAD:

SESGO	
% Er	

Observaciones:

CAPÍTULO I



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-ASE
ANEXO 5 : FORMATO DE "INFORME DE VALIDACIÓN"	Revisión: 1.0
	Página 25 de 25

INFORME DE VALIDACIÓN

Las instalaciones utilizadas para la realización de dicho procedimiento fueron los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

Fecha:	
---------------	--

Responsable:	<small>Nombre y firma</small>
---------------------	-------------------------------

Descripción del equipo:	
--------------------------------	--

Parámetro analítico :	Contenido en grasa bruta en un sólido
Matriz :	Tierra de diatomeas
Material de referencia :	Tierra de diatomeas (inerte) con un contenido conocido de aceite de oliva añadido
Valor de referencia :	10 % de grasa

PRECISIÓN:

MEDIA (%R)	
s (%R)	
% DER	

VERACIDAD:

SESGO	
% Er	

Observaciones:

Capítulo II

Índice

1. Presentación	109
2. Introducción.....	110
3. Análisis DAFO.....	121
4. Artículo N° 2	123
Abstract	124
Introduction.....	125
1. Analytical Applications	134
1.1. Dairy products	135
1.2. Vegetable oils and seeds.....	140
1.3. Others	144
Conclusions	146
References	147
5. Artículo N° 3	159
Abstract	160
1. Introduction.....	161
2. Materials and methods	164
2.1. Samples	164
2.2. Instrumentation	165
3. Results and discussion.....	166
References	176
6. Artículo N° 4	179
Abstract	180
1. Introduction.....	181
2. Experimental	183
2.1. Reagents and samples.....	183
2.2 Standard and sample analysis	184
2.3. Instrumentation	185

CAPÍTULO II

2.4. Analytical performance	186
3. Results and discussion	188
4. Conclusion	192
5. Complementary material: Estimation of FA profile	193
Reference	195
7. Apéndice	199
8. Discusión.....	207
Comunicaciones a Congresos derivadas de este capítulo	208
Procedimiento para la Verificación y Mantenimiento del equipo de Cromatografía de Gases con Detector de Espectrometría de Masas (GC-MS)	209

1. Presentación

Uno de los objetivos del Proyecto QuOleo, en el que se enmarca esta Tesis Doctoral, era demostrar la vigencia de la cromatografía de gases a alta temperatura acopada a la espectrometría de masas, como una técnica válida para identificar y caracterizar el perfil de triglicéridos (TAGs) en aceites vegetales (oliva, maíz, girasol, semillas etc.). Para ello era necesario el desarrollo de un método cromatográfico, siguiendo así con la hipótesis planteada inicialmente. Este capítulo presenta el método desarrollado para ello.

Debido al carácter polar de los triglicéridos y a su alto peso molecular, la cromatografía gaseosa utilizada ha sido de alta temperatura, la cual presenta algunas peculiaridades con respecto a la cromatografía convencional. Para aclarar este aspecto, se presenta además una revisión donde se exponen las principales aplicaciones de esta técnica en el análisis de aceites vegetales y alimentos.

El objetivo específico de este capítulo ha sido:

- ✓ Desarrollar un método analítico sencillo para la identificación y caracterización del perfil de triglicéridos mediante cromatografía de gases a alta temperatura acoplada a espectrometría de masas utilizando diferentes modos de trabajo.

Además como objetivo secundario se busca conseguir una estimación aproximada del perfil de ácidos grasos en aceites vegetales, a partir del perfil de TAGs sin necesidad de realizar un proceso de cuantificación directa tras una reacción de derivatización previa en el laboratorio.

Siguiendo el esquema de trabajo, basado en un sistema de calidad, se ha llevado a cabo el procedimiento de verificación y mantenimiento del equipo de GC-MS, el cual se anexa al final del capítulo.

2. Introducción

Los triglicéridos

Una clasificación muy sencilla dividiría a los componentes de las grasas o aceites en mayoritarios y minoritarios. Entre los primeros se encuentran los acilgliceroles, exclusivamente, y todos los restantes como ácidos grasos libres, fosfolípidos, esteroides, vitaminas solubles en grasas, tocoferoles, pigmentos, ceras y alcoholes grasos, entre otros, [1] podrían agruparse en el segundo. (clasificación muy simple pero con excepciones como es el caso del aceite/o grasa de jojoba) [2].

La estructura molecular de un triglicérido es importante para la química y tecnología de los alimentos, en bioquímica y nutrición. Los triglicéridos o triacilgliceroles (TAGs) consisten en un esqueleto de glicerol, donde cada grupo hidroxilo es esterificado por un ácido graso (FAs). En la naturaleza estos compuestos son sintetizados mediante reacciones enzimáticas, que determinan el centro de asimetría y los diferentes formas enantioméricas, con ácidos grasos diferentes en cada posición (figura 1).

La estructura molecular de cada especie de TAG se puede describir con tres atributos:

- (i) el número total de átomos de carbono (CN) presentes en las cadenas alifáticas de los tres FAs;
- (ii) el grado de insaturación de cada FA; y
- (iii) la posición y configuración de los dobles enlaces en cada ácido graso.

-
- 1 R.D. O'Brien, *Fats and Oils. Formulating and Processing for Applications* 3th edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009, pp 7-9.
 - 2 E. Graciani, in: E. Graciani, *Los Aceites y Grasas: Composición y Propiedades*, AMV ediciones, 2006, pp 11-88.

Los tres ácidos grasos, pueden ser iguales, diferentes o dos de ellos iguales y el tercero distinto, dando lugar a especies que pueden ser diferenciadas en esteroisómeros, dependiendo de la posición exacta en la que los tres FAs se enlacen para formar el correspondiente TAG.

Hay una variedad de métodos cromatográficos y espectrométricos para el análisis de TAGs, sin embargo, la determinación estéreo-específica de la distribución posicional de los ácidos grasos supone todavía un desafío analítico.

Los ácidos grasos se diferencian entre sí en la longitud de la cadena y el número y las posiciones de los dobles enlaces que puedan tener. LA mayoría de los FAs están compuestos de cadena lineal y número par de átomos de carbono, comprendido entre 12 y 22. Las propiedades físicas y químicas de los aceites y/o grasas están influenciadas por el tipo y la posición de los ácidos grasos en la molécula de glicerol.

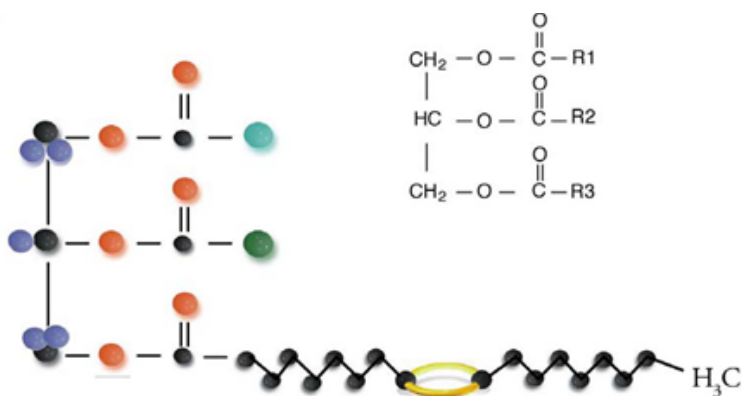


Figura 1. Molécula de un triglicérido

(Tomada de: M. Amelio-ONAOO *Chemical-physical characteristics of olive oils*, 2003).

En los aceites y grasas, normalmente no se encuentran ácidos grasos libres, sino sólo en pequeñas cantidades, comunicando a la grasa cierta acidez.

Normalmente los FA están formando ésteres con la glicerina para dar lugar a los glicéridos (mono, di y TAGs).

El procedimiento más usual para derivatizar los ácidos grasos, antes de su análisis por cromatografía de gases, es formando esteres metílicos, que son más volátiles y apolares que los ácidos libres. En literatura se pueden encontrar métodos para ello [3,4,5], los procedimientos más usuales se llevan a cabo en medio metanólico con catálisis alcalina, con catálisis ácida, con catálisis alcalina y ácida o bien mediante metilación con diazometano o trifloruro de boro, etc. [6].

Sin embargo, la ventaja de usar el análisis de TAGs intactos, comparado con el de FA, es que se conservan la distribución estéreo-específica, genéticamente controlada, en el enlace glicerol y además la información contenida es mucho mayor.

Por otra parte, cualquier alteración de una grasa, bien por ser mezclada con otras o por una manipulación industrial que favorezca la isomerización de los enlaces y la transesterificación de triglicéridos afecta a su composición.

La tabla 1, que se muestra a continuación, recoge algunos ácidos grasos de interés.

-
- 3 ISO 5509 (2000). Animal and vegetable fats and oils - Preparation of methyl esters of fatty acids. International Standardization Organization, Geneva.
 - 4 Seppanen Laakso, T., Laakso, I. and Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465:39-62.
 - 5 Mendez Antolin, E., Marrero Delange, D., and González Canavaciolo, V. (2008). Evaluation of five methods for derivatization and GC determination of a mixture of very long chain fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46: 194-199.
 - 6 AOAC Official Method 996.06 (2000). Fat (total, saturated and unsaturayed) in foods. Hydrolytic extraction gas chromatographic method. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed. AOAC International, Maryland.

CAPÍTULO II

Tabla 1. Nombres químicos y descripciones de Ácidos Grasos Comunes

Nombre Común	Nombre Sistemático	Estructura Química	C:D
Ácidos Grasos Saturados			
Cáprico	n-Decanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	10:0
Láurico	n-Dodecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0
Mirístico	n-Tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	14:0
Palmítico	n-Hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0
Estearico	n-Octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18:0
Araquídico	n-Eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	20:0
Behénico	n-Docosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	22:0
Lignocérico	n-Tetracosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	24:0
Ácidos Grasos Insaturados			
Palmitoleico	cis-9-Hexadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	16:1
Oleico	cis-9-Octadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1
Linoleico	cis,cis-9,12-Octadecadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2
Linolénico	9,12,15-Octadecatrienoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:3
Gadoleico	9-Eicosenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	20:1
Araquidónico	5,8,11,14-Eicosatetraenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	20:4
Erucico	13-Docosenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	22:1

Cromatografía de gases a alta temperatura

La cromatografía de gases para el análisis de TAGs ha sido aplicada desde la década de los setenta. En 1987, la IUPAC adoptó un método para resolverlos según su CN, en aceites y grasas, donde la determinación de triglicéridos se

hace mediante factores de corrección y son identificados mediante una disolución de patrones de estos [7].

Normalmente se considera que una temperatura de trabajo por encima de 300°C es HTGC. Este tipo de cromatografía ofrece interesantes posibilidades, aunque hay algunos problemas asociados con, el sistema de inyección, el deterioro de las columnas o la estabilidad de los compuestos [8]. Sin embargo, es cierto que el desarrollo actual de los materiales ha hecho que todas estas limitaciones vayan corrigiéndose.

Mediante HTGC se separan los TAGs en grupos ordenados según número creciente de carbonos (CN). Para resolver los esteroisómeros en función del número de insaturaciones dentro de cada grupo, es necesario aumentar la polaridad de la fase estacionaria (> 50% grupos fenilo) [9].

La columna en HTGC es muy importante, en ella se concentran la mayoría de los mecanismos necesarios para la identificación, separación y cuantificación de los componentes de la muestra.

En cromatografía de gases se usan dos tipos generales de columnas, las *empaquetadas, o de relleno y las capilares*. En un principio, las columnas más utilizadas eran las empaquetadas pero hoy en día el uso de las columnas capilares está mucho más expandido.

Uno de los problemas más extendidos de la cromatografía de gases a alta temperatura, es la degradación de la fase estacionaria de la columna [10].

7 IUPAC Method 2.323 (1987). IUPAC Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th ed, Paquot, C., Hautfenne A.(Eds.), Blackwell, Oxford.

8 Christie, W.W. (2005). High-temperature gas chromatography of triacylglycerols: a cautionary note. *Lipid Technology*, 17:88-90.

9 B.X. Mayer, P. Zöllner, E. Lorbeer, W. Rauter (2002). *Journal of Separation Science*, 25, 60-66.

10 E.F. Barry, in R. L. Grob, E. F. Barry, *Modern Practices of Gas Chromatography* 4th edition, John Wiley & Sons Inc. Publication, pp 65-192.

En la figura 2 aparecen ordenadas en función de la polaridad varias fases estacionarias [11].



Figura 2. Clasificación de fases estacionarias en función de su polaridad.

Las fases estacionarias que se han usado con mayor éxito en la separación de TAGs son las fases polarizables de fenil-metil-silicona (poliéteres, poliésteres y los polisiloxanos), capaces de soportar temperaturas de 360-370 °C durante largo tiempo. Estas fases permiten resolver los TAGs por número de átomos de carbono y por el número de insaturaciones

La columna cromatográfica utilizada en los trabajos, que se han llevado a cabo en esta Tesis, contenía una fase estacionaria compuesta por 65% de difenil y 35% dimetil-polisiloxano, la cual es la más polar comercialmente disponible en la actualidad. Con esta columna se ha conseguido una separación de los triglicéridos de acuerdo a su CN y dentro del mismo CN, atendiendo al grado de insaturaciones.

Por último, haciendo referencia al sistema de detección, el más usado para el análisis de TAG es el de ionización de llama (FID).

Sin embargo la cromatografía de gases, en combinación con espectrometría de masas, es una de las técnicas más eficientes que existen actualmente para el análisis de triglicéridos.

11 D. Rood, *The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2007, pp 34-50.

Espectrometría de masas

Los avances más importantes en el análisis de mezclas de TAGs, han sido llevados a cabo mediante la combinación de técnicas separativas y espectrometría de masas. Su interés, cuando se trata de moléculas de elevado peso molecular, reside sobre todo, en la información que aporta con fines de identificación estructural.

El principio de la espectrometría de masas es simple: la molécula a identificar se lleva a una energía muy elevada en la cámara de ionización, dando un ión molecular, además de iones de fragmentación y de reagrupamiento; todos estos iones son clasificados mediante un analizador, de acuerdo con su relación masa/carga, para ser recogidos por un detector que registra el espectro de masas característico.

Son posibles muchos modos de ionización (impacto electrónico, ionización química positiva o negativa, etc.) del mismo modo que existen diferentes tipos de analizadores (cuadrupolo, trampa de iones tiempo de vuelo, etc.). El modo de ionización utilizado, así como el analizador, marcarán la fragmentación y la resolución en el espectro obtenido.

Ahora bien, la interpretación del espectro no siempre es fácil, y el procedimiento seguido consiste en la búsqueda en una biblioteca de espectros previamente registrados; es necesario por tanto, y muy importante, que esta base haya sido obtenida en condiciones idénticas a la del análisis [12].

El espectrómetro de masas utilizado en esta Tesis, consta de un modo de ionización de impacto electrónico y de un analizador de masas tipo trampa de iones.

La fuente de impacto electrónico (figura 3a) consiste en un filamento caliente que desprende electrones. Estos son acelerados hacia un ánodo y colisionan con las moléculas gaseosas de la muestra inyectada.

12 E. Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry. Principles and Applications 3th ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.

Esta técnica de ionización funciona bien para muchas moléculas en fase gas, pero introduce una excesiva fragmentación con lo cual el ión molecular no siempre se observa.

La trampa de iones está formada por tres electrodos hiperbólicos: un electrodo con forma de anillo y dos electrodos por encima y por debajo del anillo (figura 3b). Los iones son retenidos o expulsados de la trampa en función de su relación masa/carga. Una vez que los iones son expulsados de la trampa pasan al detector.

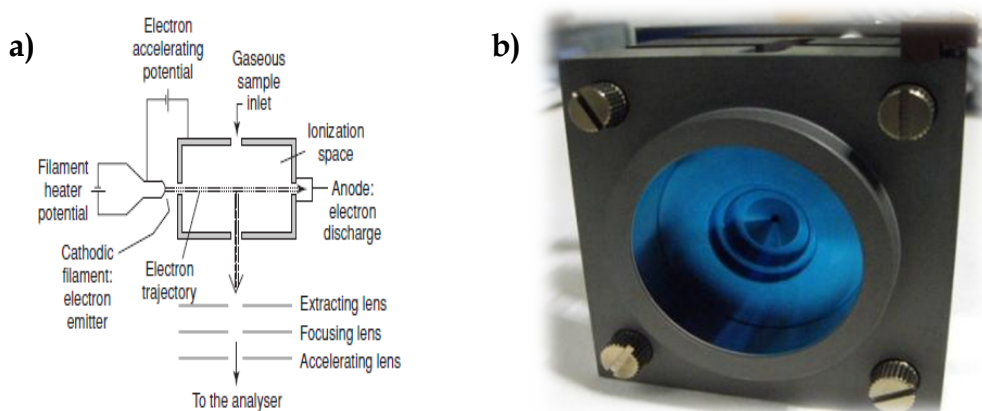


Figura 3. (a) Diagrama de una fuente de impacto electrónico (tomada de E. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry. Principles and Applications* 3th ed, 2007, Wiley, p16.; (b) Fotografía de la trampa de iones del 4000 MS Varian

Por otro lado, también podemos utilizar diferentes modos de adquisición del espectro, entre ellos, *Full Scan*, *SIM*, etc.. El modo *Full Scan* consiste en la medida del espectro completo entre dos límites de masas. El modo *SIM* (*single ion monitoring*), consiste en enfocar el analizador a solo aquellos iones con un ratio m/z específico.

Este método es mucho más sensible que el modo *Full Scan* ya que la cantidad de tiempo de integración de la señal es mayor y se consigue así un incremento de la relación señal/ruido en la señal resultante. Esta ganancia en sensibilidad en el modo *SIM*, resulta en una baja flexibilidad. En cambio, el modo *Full Scan*

permite ver datos completos, con lo cual información estructural nueva puede extraerse para responder cuestiones iniciales.

Haciendo referencia a los fragmentos más abundantes en el espectro de impacto electrónico, estos corresponden a los fragmentos iónicos $[M-RCOO]^+$, donde hay una pérdida de uno de los ácidos grasos. Otro de los iones importantes son los que contienen fracciones de ácidos grasos de la forma RCO^+ , $[RCO+74]^+$, estas 74 una adicionales corresponden al esqueleto glicerol, y $[RCO+128]^+$ [13,14].

La mayor desventaja del espectro de masas en impacto electrónico es la poca abundancia de iones que proporcionen información sobre el peso molecular, tales como los iones M^+ ó $[M-18]^+$. La ionización química, en cambio, conduce a un proceso de fragmentación mucho menor que el anterior, lo que permite obtener información sobre el peso molecular [15]. La extensión de la fragmentación en ionización química se puede controlar con el gas reactante (metano, isobutano o amoniaco).

Proceso experimental

Los estudios que se presentan en esta tesis se han llevado a cabo con un cromatógrafo de gases GC 3800 Varian, acoplado a un espectrómetro de masas 4000 MS Varian (PA, USA). Las muestras han sido introducidas automáticamente mediante el uso de un módulo auto-muestreador (Combipal, CTC ANALYTICS, Switzerland) (figura 4).

-
- 13 P. Laakso, (2002). Mass spectrometry of triacylglycerols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104:43-49.
 - 14 S. Hauff, W. Vetter (2009), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 3423-3430.
 - 15 R. Aichholz, V. Spitzer, E. Lorbeer (1997). *Journal of Chromatography A*, 787, 181-194.

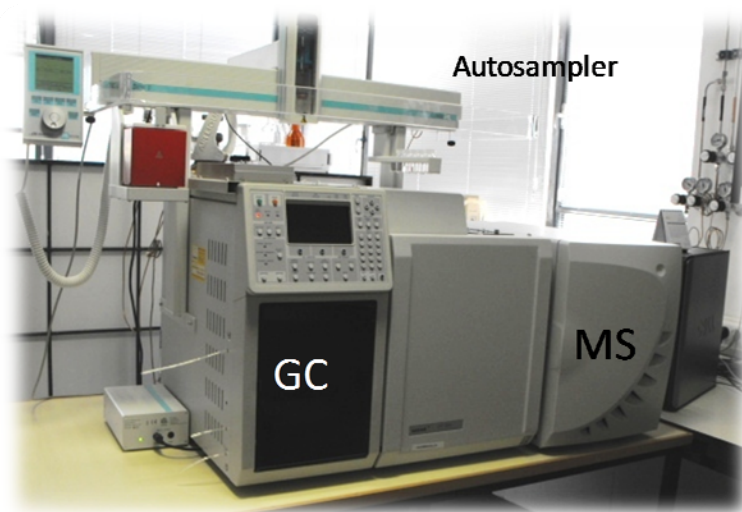


Figura 4. GC-MS utilizado en los análisis

Tanto los patrones de triglicéridos como las muestras de aceites vegetales se prepararon del modo que se resume en la figura 5. Cada patrón de triglicérido o muestra de aceite vegetal, se peso exactamente y fue diluido en cloroformo hasta una concentración final del 1% (m/m). Estas disoluciones se almacenaron en oscuridad a -15°C hasta su uso. Las disoluciones de trabajo eran preparadas diariamente a partir de las anteriores, por medio de dilución hasta 0.2% (m/m).



Figura 5. Diagrama de flujo de un análisis cromatográfico simple

A continuación se muestran, en las tablas 2 y 3, las condiciones del método utilizado para obtener los cromatogramas.

Tabla 2. Condiciones del cromatógrafo de gases

Columna	Rtx-65TG, Restek; 30 m x 0.32 mm i.d. x 0.1 μ m film thickness Restek Corp., Bellefonte, PA, USA).		
Modo de Inyección	Split (división de flujo) 1:10		
Inyector	Varian 1079 (Temperature Programmable)		
Programa Inyector	Temp. (°C)	Hold (min)	
	370	0.10	
Programa T^a GC	Temp. (°C)	Rampa^o(C/min)	Total (min)
	315	0.0	0.00
	350	1.0	35.0
Gas Portador	Helio a 1.5 mL/ min, EFC modo de flujo constante.		

Tabla 3. Parámetros MS

Modo	Impacto Electrónico
Tipo Scan	Full Scan/SIM
Línea de Transfrerencia	350°C
Temp. Trampa de iones	250°C
Manifold	50°C

Después de la oportuna introducción al capítulo, se procede de forma normal, con la presentación del análisis DAFO y los artículos científicos.

3. Análisis DAFO

<i>DEBILIDADES</i>	<i>AMENAZAS</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Desconocimiento de la cromatografía de gases✓ Necesidad de crear un método de análisis nuevo✓ Analizador de trampa de iones, mayor fragmentación de la molécula de TAG✓ Fragmentaciones muy similares entre TAGs	<ul style="list-style-type: none">✓ Uso mayoritario en bibliografía de cromatografía de líquidos para análisis de TAGs✓ Dificultades técnicas con el espectrómetro de masas✓ No existencia de materiales de referencia de TAGs
<i>FORTALEZAS</i>	<i>OPORTUNIDADES</i>
<ul style="list-style-type: none">✓ Nuevos retos✓ Técnica relativamente sencilla✓ Desarrollo de un método sencillo	<ul style="list-style-type: none">✓ Manejo de técnicas analíticas nuevas CG y MS✓ Posibilidad de resultados novedosos

4. Artículo N° 2

"Determinación de triglicéridos mediante cromatografía de gases a alta temperatura en el análisis de aceites vegetales y alimentos"

En revisión en: Critical Reviews in Science and Nutrition (2012)

Triacylglycerols determination by high temperature gas chromatography in the analysis of vegetable oils and foods

C. Ruiz-Samblás, A. González-Casado, L. Cuadros-Rodríguez
Department of Analytical Chemistry, University of Granada,
Av. Fuentenueva s.n., E-18071, Granada, Spain.

Abstract

The analysis of triacylglycerols by high temperature gas chromatography, along the last ten years has been reviewed in this paper. The interest in this topic has grown along the last years due to the triacylglycerols are the main components of oils and fats and they are being used for the characterization and authentication of foods products.

The most commonly used procedures, including the official methodologies, applying high temperature gas chromatographic techniques are shown. Their importance in the characterization of different kind of samples, vegetable oils, seeds, dairy products, etc., is considered.

This review is not intended to be a comprehensive dissertation on the field of triacylglycerols analysis since that would require sufficient space to occupy a book in its own right. Rather, it will outline selected considerations and developments, where the technique has been applied.

Keywords:

Triacylglycerols, high temperature gas chromatographic (HTGC), dairy products, vegetable oils, foods.

Introduction

The molecular structure of a triacylglycerol (TAG) (figure 1), is important for food chemistry and technology, biochemistry and nutrition. TAGs (also commonly termed "triglycerides") consist of a glycerol skeleton, where each hydroxyl group is esterified to a fatty acid. In nature, these compounds are synthesized by enzyme systems, which determine that a centre of asymmetry is created about carbon-2 of the glycerol backbone, and they exist in different enantiomeric forms, i.e. with different fatty acids (FAs) in each position.

The molecular structure of each individual TAG species can be described by a few basic attributes: (a) the total carbon number (CN), which is the sum of the alkyl chain lengths of each of the 3 FAs, (b) the degree of unsaturation in each FA, and (c) the position and configuration of the double bonds in each FA. The TAG molecule shows optical activity when the two primary hydroxyl groups are esterified with different FAs.

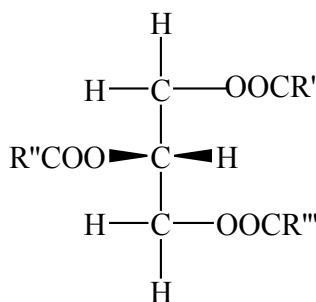


Figure 1. Fischer projection of a triacyl-*sn*-glycerol

The stereochemistry of TAGs can be described by the "stereospecific numbering" (*sn*) system as recommended by a IUPAC-IUB Commission on the Nomenclature of Glycerolipids. Due to this, it is crucial to say that the analysis of the TAG composition is a very challenging task because an

enormous number of individual TAG species is possible due to the large number of possible FA combinations on the glycerol backbone.

Usually, the TAGs are converted into fatty acid methyl esters (FAMES) for gas chromatography (GC) analysis. Many different methylation methods are described in literature and four of them are commonly used: acid or base-catalyzed methylation, borontrifluoride methylation, methylation with diazomethane and silylation (ISO 5509, 2000; Seppanen-Laakso et al., 2002; Mendez-Antolin et al., 2008). The first method is more acceptable than other methods because it uses less aggressive reagents than other methods. This review is most concerned with the direct determination of TAGs, therefore no references will be given considering the analytical parameters of the analysis of FAMES. The interested reader is referred to the AOAC Official Methods 996.06 and Petrovic et al., 2010.

However, the advantage of using TAG analysis, as compared to FA profiling, is that the genetically controlled stereo-specific distribution of the FA moieties on the glycerol backbone is preserved and, thus, the information content of intact TAGs is usually higher.

In the last decades, a very wide range of analytical tools has been developed for lipid analysis. Particularly powerful are the chromatographic methods, either or not in combination with spectrometric techniques such as mass spectrometry (MS) (Laakso, 2002), GC and liquid chromatography (LC) combined with MS are the key techniques in all areas of lipid analysis. The possibilities and limitations of these two chromatographic methods in TAG profiling, have been described in a number of excellent reviews. Buchgraber et al. discuss the application of GC, HPLC in normal and reversed phase mode, thin-layer chromatography and supercritical fluid chromatography for the qualitative and quantitative determination of TAGs (Buchgraber et al, 2004a). Furthermore, the chromatographic and spectrometric methods usually used for the analysis of common and less common edible vegetable oils and fats are reviewed by Andrikopoulos (Andrikopoulos, 2002a; Andrikopoulos, 2002b; Andrikopoulos et al., 2004).

Particularly, techniques for the gas and liquid chromatographic separation of complex mixtures of TAGs have been reviewed in detail over the past two decades. For instance, in 1995, Myher reviewed strategies in the analysis of lipids in general, and emphasize already the importance of chromatographic methods to identify specific species (Myher et al., 1995). In the same year, Ruiz-Gutierrez and Barron reviewed the methods for the analysis of TAGs and state the significance of the column for the separation of the TAGs (Ruiz-Gutierrez and Barron, 1995). In particular, de la Fuente and Juarez studied the TAGs on milk samples taking into account the use of GC to separate according to the CN (de la Fuente and Juarez, 1999) and Nikolova-Damyanova reviewed the principles and applications of thin-layer chromatographic for the analysis of TAGs (Nikolova-Damyanova, 2000).

In addition, combinations of two chromatographic dimensions have been applied for those situations where the resolving power of a one-dimensional method was insufficient. Although it is not the aim of this review, it is important to point that recently, the analytical benefits of comprehensive two-dimensional (2D) chromatography, in its various operational modes, have been exploited by the oil and fat chromatographic community to solve problems (Janssen et al., 2003; de Koning et al., 2006; Janssen et al., 2009). Thus, Tranchida et al. reports on the employment of comprehensive chromatographic methods, based on GC, LC, LC-GC and packed supercritical fluid chromatography (pSFC), in the field of lipid analysis (Tranchida et al., 2007).

On the other hand, for identity, control and authentication purposes of fats and oils, milk fat and special fats like extra virgin olive oil; the knowledge of the TAG composition has become an indispensable tool. On this matter, Aparicio and Aparicio-Ruiz discuss the contribution and trends in chromatography for the authentication of vegetable oils, establishing the TAG composition as a measurement of the quality and purity of vegetable oils (Aparicio and Aparicio-Ruiz, 2000). In addition, Ulberth and Buchgraber revise the technical merit of different analytical platforms to establish the authenticity of oils and fats (Ulberth and Buchgraber, 2000), and the same authors review strategies to detect and analyze cocoa butter equivalents

added to genuine cocoa butter or to chocolate products, for authentication purposes (Ulberth and Buchgraber, 2003).

Applications of various chromatographic techniques and electrophoretic methods employed for the analysis in macro- and micro-components in vegetable oils and dairy products are compiled and critically evaluated by Cserháti et al. as well as the employment of these methods for authenticity tests and traceability is discussed (Cserháti et al., 2005). In other reconsideration, de la Fuente and Juárez intends to provide the advantages and disadvantages for detecting the authenticity of dairy products by new approaches such as polymerase chain reaction and isotope ratio mass spectrometry (IRMS) versus a traditional procedures such as chromatographic and electrophoretic method (de la Fuente and Juárez, 2005).

According to regulations, IUPAC-AOAC has adopted a method to resolve TAGs, based on the numbers of similar carbon atoms by HTGC, of solutions of oil and fat, under temperature-programmed conditions, where the determination is made by corrections factors and identified by reference to standard triglyceride solution (IUPAC Method 2.323; AOAC Official Method 986.19). In addition, the method for determination of TAGs by their partition numbers (or equivalent carbon numbers, ECN) in vegetable oils by LC, was adopted by AOAC-IUPAC-AOCS (Wolffi et al., 1991; Firestone, 1994).

There has always been an interest in pushing GC to the highest temperatures possible. The exact definition of "high temperature gas chromatography" (HTGC) is somewhat arbitrary and subject to some developments over the years. Normally it is considered that separations above 300°C are HTGC. It offers interesting possibilities (efficiency, stability, etc.) although there are some problems associated with the injection system, deterioration of the columns, stability with temperature, etc. In the right hands and for suitable samples, HTGC is a valuable tool for determining TAGs. If it is used inappropriately, it can give meaningless results (Christie, 2005).

HTGC need not be described in detail here, since it has been described previously. The evolution of the concept is presented and a brief comment on the chromatography suitability of HTGC for area of analysis is warranted by Pereira et al., (Pereira et al., 2004). Any sample subjected to HTGC must be both thermally stable and resistant to thermal re-arrangement; TAGs are a group of high-boiling-range compounds that are well suited for HTGC analysis.

As a result of the high molecular mass of the intact TAGs, GC analysis requires final column temperatures of 350 °C or higher. Elution is largely based on the CN, with weak selectivity towards the number of double bonds on some phases.

For the highly unsaturated TAGs lower responses are generally seen. Literature is not conclusive whether this is due to thermal instability or the result of polymerization (Christie, 2005). All the authors agree, however on the precautions that can be taken to minimize losses. Thermal stress should be kept to a minimum by eluting the compounds as rapidly as possible at the lowest elution temperature feasible. In practice this means column length should be minimized and the lowest possible film thickness should be used. The gas linear velocity should be as high as possible. To minimize the loss of column efficiency as a result of the use of high linear velocity, hydrogen is the preferred carrier gas (Kaal and Janssen, 2008). But because additional structural information about TAG composition is valuable, considerable effort has been made, along the years, to develop selective high-temperature stationary phases that resolve TAGs according to the number of unsaturated FAs composing the molecule and carbon number simultaneously.

The introduction of open tubular columns (capillary columns) by Golay in 1958 represented the most important breakthrough in gas chromatography. Compared to packed columns, these allow a higher resolution, i.e. higher separation capacity, and there have been further developments in column fabrication and instrument design. Originally, nonpolar stationary phases of polysiloxane type were habitually used. Those phases, which are marketed under a variety of different brand names (OV-1,

OV-101, SE-30, DB-1, HP-1, Ultra-1, SPB-1, CP-Sil 5 CB, Rtx-1, BP-1, AT-1, etc) for 100% dimethyl polysiloxane and OV-3, SE-54, DB-5, HP-5, Ultra-2, SPB-5, CP-Si 18-CB, Rtx-5, BP-5, AT-5, etc. for the slightly more polar 5% phenyl-95% dimethyl polysiloxane stationary phase, allow only separation according to the CN of TAGs, even in capillary columns (Buchgraber et al, 2004).

For example, more than two decades ago, Geeraert et al. separated coffee oil on a 15-m glass column coated with OV-101, where the CN54 were separated into 3 fractions according to the number of unsaturated FAs in the molecule, but not by the number of double bonds within each acid (Geeraert et al., 1983). In addition, Collomb et al. also separated TAGs groups differing with respect to the number of unsaturated FAs of different oils and fats such as palm, rapeseed, soybean, etc., on a DB-5 column (Collomb et al., 1998). Harrison et al. discuss about a rapid GC-FID technique with a BP-5 column for the simultaneous quantitative analysis of FFA (free fatty acids), MAG (monoacylglycerols), DAG (diacylglycerols), TAG, sterols, and squalene in vegetable oils (Harrison et al., 2005). Molkentin controlled the purity of milk fat by gas chromatographic determination of TAGs based on separation by CN using a column filled with 3% OV-1 (Molkentin, 2007).

On nonpolar columns, like these ones mentioned above, unsaturated TAGs eluted before saturated ones. The reason for this consists in the remarkable difference in vapor pressure between saturated and unsaturated FAs. Among unsaturated FAs differences are too small to effect further separations, thus fractionation according to the degree of instauration is not possible. The elution sequence for TAGs with a given CN is: UUU, SUU, SSU, SSS (S - saturated FA, U - unsaturated FA). A clear example of this is shown in Mayer and Lorbeer, 1997; the authors investigated the quality of different fused-silica capillary columns with a mixture of TAGs at high temperatures (figure 2).

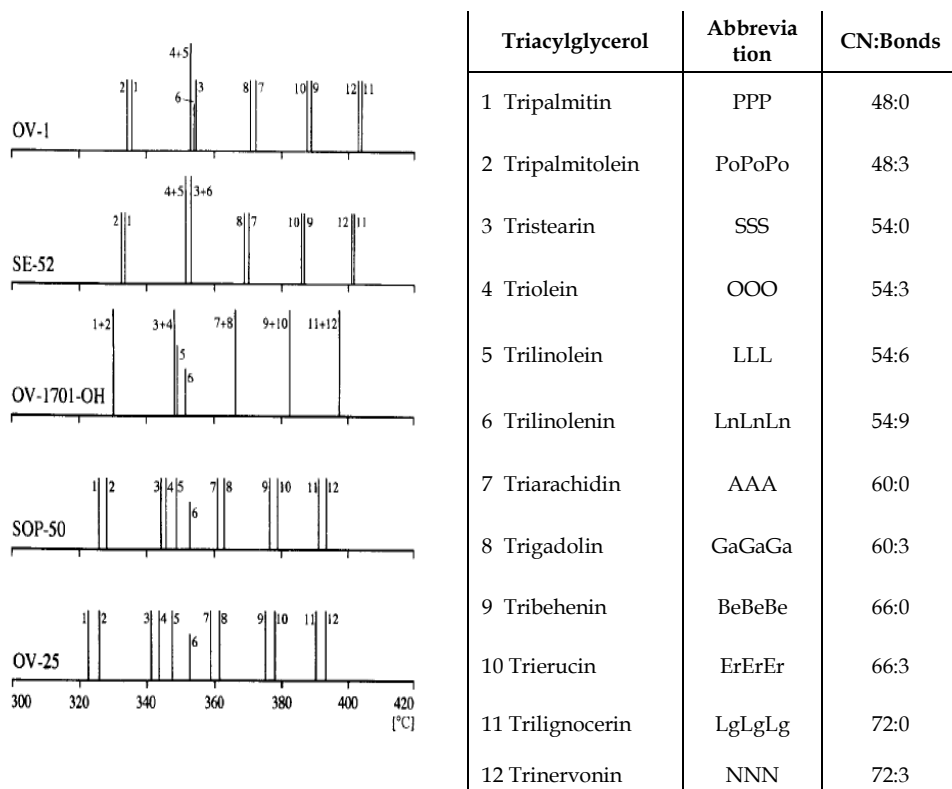


Figure 2. Elution pattern of the TAG mixture of five stationary phases: OV-I, SE-52, OV-1701-OH, SOP-50 and OV-25. (taken from Mayer and Lorbeer, 1997; with permission).

Progress in separation efficiency of TAGs has been achieved by using capillary columns coated with more polar polysiloxane phases containing a higher proportion of phenyl groups (50-65%). The highly efficient separation of individual TAGs became possible due to the application of thermostable stationary phases based on polysiloxane with methyl, phenyl, and cyanopropyl groups attached to the surface of capillary columns. The availability of cross-linked and chemical bonded phases improved the properties of columns considerably by extending the column lifetime and reducing baseline drift at elevated temperatures. The use of temperature resistant medium polarity capillary columns enhances the resolution power largely, and allows determining individual TAG species. HTGC on medium

polarity stationary phases has been extensively applied for the comprehensive separation of TAGs in a wide range of fats and oils (Ruiz Samblás et al., 2011). Capillary columns with somewhat more polar stationary phases are available commercially. These columns are known as the CB-TAP CB for TAGs from Agilent, Rtx-65-TG column (Restek, 65% diphenyl-35% dimethyl polysiloxane) from Restek (Bellefonte, PA) and DB-17ht (50%-phenyl)-methylpolysiloxane from J&W Scientific. They allow introducing additional selectivity for double bonds.

In 2002, Mayer et al. described the preparation of fused silica capillary columns coated with 75% diphenyl-25% dimethylpolysiloxane, and compare it with two capillary columns currently commercial available OV-25, PS162 (Mayer et al., 2002). The increased polarity enabled a slightly improved resolution of TAGs that differ only by one double bond, *e.g.* SOO (1-stearin-2,3-diolein) and OOO (triolein). However, this column is not available commercially, only it is possible to find this kind of coating for packed columns (Ohio Valley, Ohio, USA) which do not bear high temperatures. Thus, commercially available siphenylene-siloxane copolymers are claimed to have similar, but not identical properties as methyl, phenyl-polysiloxanes (Mayer et al., 2003a).

The properties of stationary medium-polar phases at high temperatures such as selectivity, bleeding, working range, immobilization, inertness need to be studied with other parameters different from the usual ones. The Rohrschneider-McReynolds constants describe the selectivity of a stationary phase at low temperatures and it is restricted to analyte-stationary phase interactions at low temperatures. Additional parameters are required to describe the interactions at elevated temperatures, since temperature induced dipoles may change the selectivity. The TAG indices were used to evaluate interactions between analytes and stationary phase at elevated temperatures.

CAPÍTULO II

Table 1. TAG index for different stationary phases

<i>Stationary phase</i>	<i>TAG index</i>			<i>Reference</i>
	OOO	LLL	LnLnLn	
OV-1	53.16	53.16	53.72	
SE-52	53.40	53.63	54.30	
OV-17	54.26	55.25	56.54	
SOP-50	54.73	55.87	57.42	
007-65HT	54.88	56.17	57.86	
SOP-75	55.29	56.98	59.01	
SM-30	53.61	53.80	54.29	(Mayer et al., 2003a)
SM-50	53.85	54.18	54.60	
SP-50	54.51	55.39	56.58	
SP-43	54.63	55.68	56.93	
SP-25	54.99	56.39	58.14	
SP-20	55.06	56.49	58.25	
SMP-5	55.22	56.80	58.67	
SphTFP-25	53.84	54.19	54.51	(Mayer et al., 2003b)
SDPE-33	53.83	54.25	54.95	(Mayer et al., 2004a)
BGB-Silaren	54.01	54.56	55.41	
OV-25	54.87	56.17	57.99	(Mayer et al., 2004b)
SP-10	55.34	57.06	59.11	
Dexsil 300	53.54	53.67	54.27	(Martina et al., 2005)
Dexsil 400	53.69	54.00	54.51	

The polyunsaturated TAGs OOO, LLL (trilinolein) and LnLnLn (trilinolenin) served as probes, whereas the saturated TAGs PPP (tripalmitin), SSS (tristearin) and AAA (triarachidin) were used to generate a calibration line. TAG index, were made up by Mayer et al. (Mayer et al., 2003a).

Furthermore, the same authors, have evaluated in different phases between the years 2003 and 2005 (Mayer et al., 2003b; Mayer et al., 2004a; Mayer et al., 2004b; Petsch et al., 2005). Table 1 shows the TAG index for different medium-polar stationary phases.

Other critical aspects of practical HTGC concern the method of sample introduction. In conventional GC the sample is evaporated at a temperature that is higher than the column before admission. The injection technique has been considered as being most critical for accuracy (trueness and precision), since at this stage discrimination against less volatile high molecular weight compounds can occur while the sample is being transferred from the syringe to the column (syringe discrimination) (Grob Jr. and Neukon, 1980). Many authors published detailed studies concerning the effect of the injection technique on the recovery of TAGs (Grob Jr., 1979; Poi et al., 1981; Hinshaw and Seferovic, 1986; Termonia et al., 1987).

Finally, we have just given brief information on the history and the state of the art of the HTGC technique and all the aspect related to it. Thus, a variety of samples, along the last years, have been successfully analyzed by HTGC. The purpose of this paper is to present and discuss the ten last year's contribution as well as recent trends in HTGC to the analysis of TAGs in different samples such as oils, seeds, dairy products and plants.

1. Analytical Applications

HTGC is an important analytical technique for qualitative and quantitative analysis in a wide range of application areas. Though, as it has been mentioned before, there are some obstacles for obtaining reliable quantitative results in HTGC analysis of TAGs. For instance, the sample introduction is critical and discrimination against boiling point can occur if the injection mode is not properly selected or optimized. In addition, quantification of the TAGs, either as pure compounds or as carbon number clusters, requires accurate response factor if no chemometric tools are applied. Due to this, the possible thermal degradation of TAGs, at such as high temperatures, have to be taken into account. However, and despite of these obstacles several applications, to diverse kind of samples, have been

developed successfully. Recent research has resulted in better chromatographic columns and methods for sample preparation that enable a significant expansion of the molecular application range of HTGC (Kaal and Janssen, 2008). This work intends to provide an updated and extensive overview since 2001 on the principal applications. For organizational reasons, this paper has been structured based on the samples analyzed by this technique.

1.1. Dairy products

The analysis of intact TAGs is regarded as advantageous in dairy products, because the genetically controlled specific distribution of the FA moieties on the glycerol backbone is preserved; the information content is, thus, higher. More than 400 different FAs have been identified as components of milk fat (Buchgraber et al, 2004).

Due to the rapid progress of capillary column technology for GC packed columns are rarely used any longer. Nonetheless, the official European Union (EU) method for the determination of the purity of milk fat is based on the TAG composition by packed column (Commission Regulation (EC) N° 454/95) and its revised versions (Commission Regulation (EC) N° 2771/99; Commission Regulation (EC) N° 213/2001; Commission Regulation (EC) N° 273/2008). In addition, other alternatives using capillary GC have also been described (Molkentin and Precht, 1995; Ulberth et al., 1998).

The EU official method, based on the original idea of Timms (Timms, 1980) and which has been developed by Precht (Precht, 1991) is based on an evaluation algorithm ("TG formulae") using TAG data obtained by chromatographic determination. The same author, together with Molkentin in the year 2000, studied the equivalence of packed and capillary GC columns by the use of this method (Molkentin and Precht, 2000).

Currently, there is an international standard for the analysis of TAGs in milk and milk products created by ISO (International Organization for Standardization) and IDF (International Dairy Federation) jointly (ISO 17678/IDF 202:2010). The HTGC, coupled with a flame ionization detector, is

used for determination of TAGs. In this international standard, two kinds of chromatographic columns are proposed, either packed column, glass, of internal diameter 2 mm and length 500 mm, packed with a stationary phase of 3% OV-1 or capillary column, of length 5m, with a non polar stationary phase. The preparation, silanization, packing and conditioning of the packed column are described. All work was carried out by the Joint ISO-IDF Project Group on Foreign fats of the Standing Committee on Analytical methods for composition under the aegis of Molkentin.

Since HTGC, with different kind of columns, has been used to separate milk fat according to their CN along the last years and many researchers have employed this technique for TAG determination in dairy products, table 2 summarizes the research on this topic during the last ten years. Thus, information about the sample and the column used is given for each manuscript. In addition, some of them are discussed in the text.

Table 2. Dairy products

Sample	Technique, Detector	Column, Stationary phase, Manufacturer	Reference
Milk fat	GC	—	(Ito et al., 2000)
Foreign fat in butterfat	HTGC-FID	50 cm 3% OV-1 100/120 mesh Gas ChromQ 5 m HT-SimDist CB Ultimetel (Chrompack)	(Molkentin and Precht, 2000)
Goat's milk	HTGC-MS(FID)	30 m Rtx-65TG (Restek)	(Fontecha et al., 2000)
Cocoa butter	HTGC-FID	30 m DB-17-HT (J&W Scientific) 25 m CP-TAP (Chrompack)	(Buchgraber et al., 2000)
Salatrim	HTGC-FID	15 m DB5-HT (J&W Scientific Inc.)	(Jasper, 2000)
Chocolate formulations	HTGC	—	(Simoneau et al., 2000)
Bovine milk fat	HTGC-(E)MS	30 m Rtx-65TG (Restek)	(Mottram and Evershed, 2001)
Cocoa butter	fast GC	5 m nonpolar capillary column	(Barcarolo and Anklam, 2001)
Milk and milk products	HTGC-FID	50 cm 3% OV-1 100/120 mesh Gas ChromQ or capillary column	(EC, 2001)
Butter flavouring	HTGC-FID	50 cm 3% OV-1 100/120 mesh Gas ChromQ or non polar capillary column 5 m	(Bononi et al., 2001)
Butterfat	HTGC-(E)MS	30 m HP-5MS (Hewlett Packard)	(Zou, 2002a)
Caprylic/capric triglycerides	HTGC-(E)MS	30 m HP-5MS (Hewlett Packard)	(Zou, 2002c)
Cocoa butter	HTGC	10 m DB1 (J&W Scientific)	(Guyon et al., 2003)
Cocoa butter (review)	—	—	(Ulberth and Buchgraber, 2003)
Cocoa butter	HTGC-FID	30 m DB-17-HT (J&W Scientific) 25 m CP-TAP (Chrompack)	(Buchgraber et al., 2003)
Butter purity	HTGC	30 m Rtx-65TG (Restek)	(Naviglio and Raia, 2003a)
Butter oil	HTGC-FID	Rtx-65TG (Restek)	(Zeleny and Schimmel, 2003)
Butter	HTGC	50 cm 3% OV-1 100/120 mesh or capillary column	(Naviglio and Raia, 2003b)
Ewe's milk fat	HTGC	30 m Rtx-65TG (Restek)	(Goudjil et al., 2003)
Milk fat	HTGC-FID	2.5 m Rtx-65TG (Restek)	(Tateo and Bonomi, 2003)
Cocoa butter validation method	HTGC	Petrocol EX 2887	(Buchgraber et al., 2004b)

Table 2. Dairy products

<i>Sample</i>	<i>Technique, Detector</i>	<i>Column, Stationary phase, Manufacturer</i>	<i>Reference</i>
Cocoa Butter added to chocolate bars	HTGC	10 m DB-1 (J&W Scientific)	(Guyon et al., 2004)
Mozzarella di Bufala Campana	GC	—	(Romano et al., 2004)
Butter	GC	Petrocol EX 2887	(Barattero and Lucero, 2004)
Cocoa butter equivalent samples	HTGC-FID	25 m CB-TAP (Varian)	(Buchgraber et al., 2004c)
Cocoa butter interlaboratory	HTGC-FID	30 m DB-17-HT (J&W Scientific)	
Ovine milk fat	HTGC-MS	25 m CB-TAP (Varian-Chrompack)	(Buchgraber et al., 2004d)
Dairy Products (review)	—	30 m Rtx-65TG (Restek)	(Fontecha et al., 2005)
Dairy Products (review)	—	30 m Rtx-65TG (Restek)	(de la Fuente and Juárez, 2005)
Butterfat	HTGC-FID; GC-MS	25 m phenyl(65%)methylsilicone (Quadrex)	(Cserhádi et al., 2005)
Milk fat	HT(UFM)GC-FID	4 m DB5-HT (J&W Scientific Inc.)	(Kempinen and Kalo, 2006)
Origin cheeses (milk fat authenticity)	HT(UFM)GC-FID	2.5 m Rtx-65TG (Restek)	(Destailats et al., 2006)
PDO cheeses	HT(UFM)GC-FID	2.5 m Rtx-65TG (Restek)	(Fontecha et al., 2006a)
Tofu	HTGC-FID	2.5 m Rtx-65TG (Restek)	(Fontecha et al., 2006b)
Foreign fat in milk fat	HTGC-FID	50 cm 3% OV-1 100/120 mesh	(Prestamo and Fontecha, 2007)
Milk fat	UFM-GC	-----	(Molkentin, 2007)
Cow milk fat	HTGC-FID	4 m HP-1 (Agilent)	(Povolo et al., 2007)
Mozzarella di Bufala Campana	HT(UFM)GC-FID	2.5 m 100%dimethylpolysiloxane column	(Povolo et al., 2008)
Milk and milk products	HRGC	—	(Romano et al., 2008)
Cocoa butter	HTGC-FID	50 cm 3% OV-1 100/120 mesh Gas ChromQ or non polar capillary column 5 m	(EC, 2008)
Milk fat	HTGC	—	(Wang et al., 2009)
Non-milk fat in milk fat	Ultrafast GC	2.5 m 100% dimethylpolysiloxane	(Povolo and Contarini, 2009)
Milk and milk products	HTGC-FID	2 m HP-5 (Hewlett Packard)	(Gutierrez et al., 2009)
Camel milk	HTGC-FID	50 cm 3% OV-1 100/120 mesh or non polar capillary column 5 m	ISO 17678 – IDF 202 (2010)
Mozzarella di Bufala	HTGC-FID	30 m Rtx-65TG (Restek)	(Haddad et al., 2011)
	HTGC-FID	30 m Rtx-65TG (Restek)	(Romano et al., 2011)

In 2003, Buchgraber et al. reported a intercomparison study, in which 13 laboratories applied HTGC on columns coated with medium-polarity stationary phases to determine the TAG profile of cocoa butter (Buchgraber et al., 2003). The results showed that this technique was robust and reliable for this purpose. Previously, the same authors had studied this sample by comparing HPLC and GC techniques (Buchgraber et al., 2000). The same matrix was studied also by Guyon et al. and compared HTGC with MS, showing this last technique more advantages (Guyon et al., 2003).

Furthermore, milk fat TAG composition is affected by variations in feeding, depending on the season and region, due to this fact, determination by HTGC of classes of milk fat into groups of identical numbers of acyl-C atoms (C24-C54) has been reported to be a more effective criterion than FA composition for determining their origin (Fontecha, 2006a, Fontecha, 2006b). The authenticity assessment of dairy products has become a very important issue.

Most current analytical approaches to authenticity issues in milk fat constituents are essentially based on the GC separation of its components. Nowadays, the best way of revealing the presence of foreign fats in milk fat includes the study of the TAG profile. Many authors have researched about this topic. For instance, de la Fuente and Juárez provided an extensive overview since 1991 on the principal applications for detecting the authenticity of dairy products (de la Fuente and Juárez, 2005). Subsequently, a method to detect adulteration of milk fat with partially hydrogenated vegetable oils (PHVOs) was developed by Destailats et al. (Destailats et al., 2006). Therefore, Povolo et al. studied the authenticity of pure milk fat, together with mixtures of milk fat containing two levels of four foreign fats (coconut fat, sunflower oil, lard and beef tallow), the method was based on the application of formulae deriving from multiple linear regressions (Povolo et al., 2008).

Recently, Haddad et al. have characterized camel milk fat TAGs with a Rtx-65TG column, obtaining, with respect to the HPLC method, a best separation of camel milk (Haddad et al., 2011). Additionally, and with the same column, Romano et al. have studied the TAG and FA pattern in commercial samples of Mozzarella di Bufala Campana, a protected designation of origin (PDO) cheese. This was similar to the pattern of the parent milk and the bovine counterparts (Romano et al., 2011).

1.2. Vegetable oils and seeds

As triacylglycerols are the main component of all the fats and oils of commercial importance, a great deal of effort has been applied to their analysis. TAGs and other constituents are the main components of vegetable oils. Each oil has a characteristic pattern of TAG and the physical and chemical properties of a particular oil are determined mainly by the abundance of different TAG molecular species. Typical chain lengths of FAs, found in vegetable oils, range from 14 to 20. Here the carbon number is defined as the sum of the alkyl chain lengths of the three FAs. This results in TAGs with total carbon numbers typically between 46 and 56. A considerable number of oils have been characterized by GC measuring the composition of FA.

Furthermore, TAGs species are associated with the chemical and physical properties of oils, while the regio-types of TAGs species are associated with the intrinsic properties such as biochemical and nutritional aspects. Regarding to this, Martínez-Force et al. proposed the asymmetric α coefficient, which is calculated from the FA, sn-2 FA, and TAG composition of the oil, to calculate the stereochemical asymmetry of FA in TAG molecular species (Martínez-Force et al., 2004). Previously, Fernandez-Moya et al. identified the TAG molecular species of oils obtained from different sunflower mutant lines with increased amounts of palmitic or stearic acids in linoleic or high-oleic backgrounds (Fernandez-Moya et al., 2000). TAGs were identified and data corrected for the relative response of the FID according to the method described in Carelli and Cert, 1993. Their results showed a tendency to spread saturated FA within specific unsaturated TAG molecules.

As it has been mentioned before, TAGs have been used along the years as a tool of detection of adulterations in oils. Andrikopolous et al. studied individual TAG species of olive oil as well as several seeds oils (corn, cottonseed, palm, peanut, soybean, and sunflower), by a WCOT TAP CB fused-silica capillary column, to detect adulterations in olive oil (Andrikopolous et al., 2001). They achieved to verify an adulteration of olive oil with a low content (< 5%) of these seed oils (except peanut oil), by the detection of the increasing levels of OOO or PPP in olive oil in which these TAG species are normally absent or present at very low levels (< 0.5%). An adulteration with over 20% peanut oil could be detected by the increasing levels of PLL (1-palmitin-2,3dilinolein). Lately, Woo Park et al. have studied mixture of sesame oil with soybean oil and how the relative percentage of linolenic acid increased rapidly compared to those of oleic and linoleic acids as the ratio of soybean oil increased in the blended sesame oil (Woo Park et al., 2010). They propose the HTGC-FID as an appropriate tool for the TAG analysis from dairy foods with high contents of short chain length fatty acids. Finally, Ruiz Samblas et al. have achieved to distinguish between extra virgin olive oil from different varieties of olive oil fruit with the aid of HTGC and multivariate statistical tools (Ruiz-Samblas et al., 2011).

Table 3. Oils and seeds

<i>Sample</i>	<i>Technique, Detector</i>	<i>Column, Stationary phase, Manufacturer</i>	<i>Reference</i>
Soybeans	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2000)
Sunflower	HTGC-FID	15 m 400-65HT 65% phenyl silicone (Quadrex)	(Fernández-Moya et al., 2000)
Authenticity fats and oils (review)	—	—	(Ulberth and Buchgraber, 2000)
Authentication vegetable oils (review)	—	—	(Aparicio and Aparicio-Ruiz, 2000)
Nicotiana tabacum L. seed oil	GC	—	(Waheed et al., 2001)
Essential oils	GC	—	(Marriott et al., 2001)
Olive and corn oil	Fast GC	—	(Frega and Bocci, 2001)
Olive oil (corn, cottonseed, palm, peanut, soybean, and sunflower)	GC-FID	WCOT TAP-CB (Chrompack)	(Andrikopoulos et al., 2001)
Oils and fats (review)	—	—	(Andrikopoulos, 2002a)
Common edible vegetable oils (review)	—	—	(Andrikopoulos, 2002b)
Sunflower seeds	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2002)
Coconut oil	HTGC-(E)MS	30 m HP-5MS (Agilent)	(Zou, 2002b)
Olive oils	HTGC-FID	25 m HT-5 (SGE)	(Park and Lee, 2003)
Virgin olive oil (review)	—	—	(Ollivier, 2003)
Edible oils and fats	Comprehensive LC×GC	7 or 25 m DB-1-HT (J&W Scientific)	(Janssen et al., 2003)
Peanut oils	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2003)
Plant tissues	HTGC-FID	15 m DB-17-HT (J&W Scientific)	(Ruiz-Lopez et al., 2003)
Less common edible vegetable oils (review)	—	—	(Andrikopoulos et al., 2004)
Oils of rice, soybean, walnut hazelnut, olive and sunflower	HTGC-FID	15 m DB-17-HT (J&W Scientific)	(Martinez-Force et al., 2004)
Kernels of pumpkin seed	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2004a)
Pumpkin seeds	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2004b)

Table 3. Oils and seeds

Sample	Technique, Detector	Column, Stationary phase, Manufacturer	Reference
Vegetable oils (review)	—	—	(Cserháti et al., 2005)
Kidney beans	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2005)
Palm Oil	HTGC-FID	1.5 m BPX 5 (SGE)	(Lik et al., 2005)
Soybean	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2006)
Edible oils	HTGC-FID; AgLC×GC	5 m Ultimetal SIMDIS (Chrompack)	(de Koning et al., 2006)
Sesame seeds	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2007a)
Peas	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2007b)
Adzuki beans	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2008a)
Broad beans	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2008b)
Edible oils and fats (review)	Comprehensive chromatography	—	(Janssen et al., 2009)
Adzuki beans	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2009a)
Adzuki beans	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2009b)
Apiaceae seeds oils	HTGC-FID	30 m Rtx-65TG (Restek)	(Ngo-Duy et al., 2009)
Broad beans	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimalite mesh	(Yoshida et al., 2010b)
Animal fats and vegetable oils	HTGC-FID	50 cm 3% OV-1 100/120 mesh or non polar capillary column 5 m	(van Ruth et al., 2010)
Sesame and soybean oils	HTGC-FID	1.5 m 400-65 HT (Quadrex)	(Park et al., 2010)
Olive oil	HTGC-(EI)MS	30 m Rtx-65TG (Restek)	(Ruiz-Sambblas et al., 2010)
Azadirachta indica essential oil	HTGC-FID	9 m Cromas-5 HT 5%	(Pinto and Lencas, 2010)
Nicotiana species seed extracts	HTGC-FID ; (CI ⁽⁺⁾)-MS	30 m Rtx-65TG (Restek); 25 m CP-Tap (Varian)	(Moldoveanu and Chang, 2011)
Olive oil	HTGC-(EI)MS	30 m Rtx-65TG (Restek)	(Ruiz-Sambblas et al., 2011)

Related to the seeds field, Yoshida et al. isolated TAG by TLC, and analyzed them by GC with the method of Matsui, Watanabe and Ikekawa, from 1973 (Yoshida et al., 2000). They evaluated the changes in the molecular species composition and FA distribution of TAG from the seed coat of soybean roasted and they were compared with those results obtained using unroasted seed coats. The subsequent years later, the same authors, applied the same method to TAGs in sunflower seeds (Yoshida et al., 2002), peanuts oils, kernels of pumpkin seed, peas, adzuki beans etc. (see table 3). In addition, Destailats et al. developed a simple, fast, and accurate method for the regiospecific analysis of petroselinic, oleic, and cis-vaccenic acids in TAGs and validated it with natural oils of basil and coriander seeds (Destailats et al., 2002). This method constituted an improvement over the existing methods until that moment for the analysis of these acids in fats and oils since it provided a better separation of the isomers by GC and also provided information on TAG structure.

The recent year, Moldoveanu et al. describe, according to the authors, for the first time in the literature, the FA and TAG profile for selected *Nicotiana* species (tobacco seed extracts) (Moldoveanu et al., 2011) although ten years ago Waheed et al. investigated as well this matrix and report the FAs and TAGs profiles of this species (Waheed et al., 2001).

For the analysis of essential oils Marriot et al. reviewed the GC technologies applied for the analysis of essential oils (Marriot et al., 2001). Thus, newly, Pinto and Lancas, suggest a method for the analysis of TAGs (total carbon only) in *Azadirachta Indica* essential oil (Pinto and Lancas, 2010).

1.3. Others

Finally, in this section, it has been included some papers found in bibliography which either use HTGC in samples different from the ones mentioned before or have any special features. A summary is found in table 4.

Table 4. Others

<i>Sample</i>	<i>Technique, Detector</i>	<i>Column, Stationary phase, Manufacturer</i>	<i>Reference</i>
Monitoring of interesterification	HTGC-FID	25 m 65 HT (Quadrex)	(Mu et al., 2000)
Derivatization of monoacylglycerols	HTGC-FID	30 m Rtx-65TG (Restek)	(Destailats et al., 2002)
Vegetable fats	Computational estimation	—	(van Viet and van Kempen, 2004)
Animal and vegetable fats	HTGC-FID	2 m HP-5 (Agilent)	(Gutiérrez et al., 2004)
Sardine meat	GC-MS	25 m Supercap (Quadrex)	(Jittrepotch et al., 2006)
Fattening diet of Iberian pig	HTGC-FID	30 m DB-17-HT (J&W Scientific)	(Viera-Alcaide et al., 2007).
Subcutaneous adipose of Iberian pig	HTGC-FID	30 m DB-17-HT (J&W Scientific)	(Viera-Alcaide et al., 2008)
Black and red rice (review)	HTGC-FID	50 cm 2% OV-17 80/100 on silanized Shimadzu mesh	(Yoshida et al., 2010a)
Animal/vegetable fats and oils	HTGC-FID	50 cm 3% OV-1 100/120 mesh or non polar capillary column 5 m	(van Ruth et al., 2010)

Just to mention some of them, remarkably, in 2004, van Vliet and van Kempen developed a mathematical framework to estimate the TAG distribution based on any subset of GC and LC data since they claimed that, although notable separations could be obtained on some stationary phases, separation of all TAGs present in a sample using a single LC or GC column was impossible (van Vliet and van Kempen, 2004). Within this computational estimation, three different approaches are described: a least squares (LS) approach, a genetic algorithm (GA) approach and an expectation maximisation (EM) approach. They applied the developed algorithms by estimating the TAG distribution of palm oil, palm stearin and evening primrose. Thus, Gutierrez et al. illustrate a paper where chromatographic conditions are described that provide well-developed peaks of TAG of low molecular weight (C28 to C32) up to high molecular weight (C34 to C54) with a low polar column, so they do not distinguish between number of insaturations (Gutierrez et al., 2004). The profiles were obtained from the oils from: peanut, canola, sunflower, maize, olive and fish, and the fats of; raw milk, pork and beef. Recently, van Ruth et al, have published an interesting paper where they analyze, among others, the TAG composition of different animal and vegetable fats as well as oils in order to predict their identities (van Ruth et al, 2010).

Conclusions

In the present manuscript, the last ten year in the analysis of triacylglycerols by high temperature gas chromatography, has been reviewed and discussed. The progress in chromatographic techniques, as well as stationary phases in columns, have enormously facilitated the analysis of TAGs in different kind of sample and have favored the use of GC instead of LC as the official method suggests. Therefore, according to the results found in the literature, HTGC seems to be a simple, reliable and satisfactory methodology for the TAGs analysis.

Finally, it also has been observed that for authentication purposes, TAGs have shown to be good markers for prediction of identities, origin, varieties, etc. of fats, oils and dairy products. The challenge for researchers

now is to give a step ahead and to develop new methods to get a better insight into the TAGs representing oils, fats, seeds and dairy products.

Acknowledgements

The authors would like to thank to the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, project P07-FQN-02667, and Consejería de Agricultura y Pesca) for financial assistance. This work has also been partially supported by European Regional Development Funds (ERDF). The authors are also grateful to the Andalusia Regional Government for the personal postgraduate grant awarded to CRS.

References

- Andrikopoulos N.K., Giannakis I.G, and Tzamtzis V. (2001). Analysis of olive oil and seed oil triglycerides by capillary gas chromatography as a tool for the detection of the adulteration of olive oil. *Journal of Chromatographic Science*, **39**:137-145.
- Andrikopoulos, N.K. (2002a). Chromatographic and spectroscopic methods in the analysis of triacylglycerol species and regiospecific isomers of oils and fats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **42**:473-505.
- Andrikopoulos, N.K. (2002b). Triglyceride species compositions of common edible vegetable oils and methods used for their identification and quantification. *Food Reviews International*, **18**:71-102.
- Andrikopoulos, N.K., Chiou, A., and Mylona, A. (2004). Triacylglycerol species of less common edible vegetable oils. *Food Reviews International*, **20**:389-405.
- AOAC Official Method 986.19 (2000). Triglycerides in fats and oils. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed. AOAC International, Maryland.
- AOAC Official Method 996.06 (2000). Fat (total, saturated and unsaturated) in foods. Hydrolytic extraction gas chromatographic method. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed. AOAC International, Maryland.
- Aparicio, R. and Aparicio Ruiz, R. (2000). Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques, *Journal of Chromatography A*, **881**: 93-104.
- Barattero, M. and Lucero, G. (2004). GC analysis of triglycerides and detection limits for adulterating fats in butter. *Industria Alimentari*, **43**: 771-773.
- Barcarolo, R. and Anklam, E. (2001). Development of a rapid method for the

- detection of cocoa butter equivalents in mixtures with cocoa butter. *Journal of AOAC International* **84**:1485-1489.
- Bononi, M., Fossati, A., Lubian, E., Tateo, F. and Fasan, S. (2001). Characterisation of synthetic triglycerides as solvents in butter flavouring. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **78**:465-469.
- Buchgraber, M., Ulberth, F., and Anklam, E. (2000). Comparison of HPLC and GLC techniques for the determination of the triglyceride profile of cocoa butter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**:3359-3363.
- Buchgraber, M., Ulberth, F., and Anklam, E. (2003). Capillary GLC: a robust method to characterize the triglyceride profile of cocoa butter - results of an intercomparison study. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**:754-760.
- Buchgraber, M., Ulberth, F., Emons, H., and Anklam, E. (2004a). Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**: 621-648.
- Buchgraber, M., Ulberth, F. and Anklam, E. (2004b). Method validation for detection and quantification of cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate. *Journal of AOAC International*, **87**:1164-1172.
- Buchgraber, M., Ulberth, F. and Anklam, E. (2004c). Cluster Analysis for the Systematic Grouping of Genuine Cocoa Butter and Cocoa Butter Equivalent Samples Based on Triglyceride Patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**:3855-3860.
- Buchgraber, M., Ulberth, F. and Anklam, E. (2004d). Interlaboratory evaluation of injection techniques for triglyceride analysis of cocoa butter by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1036**:197-203.
- Carelli, A.A., and Cert, A. (1993). Comparative study of the determination of triacylglycerol in vegetable oils using chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, **630**:213-222.
- Christie, W.W. (2005). High-temperature gas chromatography of triacylglycerols: a cautionary note. *Lipid Technology*, **17**:88-90.
- Collomb, M., Spahni, M.S., and Buehler, T. (1998). Analysis of triglycerides. I. Optimization and validation of a rapid GC method and application to different vegetable and animal fats. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **89**:59-74.
- Commission Regulation (EC) No 454/95. Detailed rules for intervention on the market in butter and cream,. *Official Journal of the European Communities*, **L46**:1-30.
- Commission Regulation (EC) No 2771/99. Detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 for the application of Council Regulation

- EC No 1255/1999 as regards intervention on the market in butter and cream. *Official Journal of the European Communities*, **L333**:23-36.
- Commission Regulation (EC) No 213/2001. Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. Commission Regulation (EC) No 213/01. *Official Journal of the European Communities*, **L37**:42-99.
- Commission Regulation (EC) No 273/2008. Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. Commission Regulation (EC) No 273/08. *Official Journal of the European Communities*, **L88**:1-115.
- Cserháti, T., Forgács, E., Deyl, Z. and Miksik, I. (2005). Chromatography in authenticity and traceability tests of vegetable oils and dairy products: a review. *Biomedical Chromatography*, **19**:183-190.
- de Koning, S., Janssen, H.-G. and Brinkman, U.A.Th. (2006). Characterization of Triacylglycerides from Edible Oils and Fats using Single and Multidimensional Techniques. *LC GC Europe*, **19**:1-13.
- de la Fuente, M.A., and Juárez, M. (1999). Revisión: Aplicación de las técnicas cromatográficas al estudio de triglicéridos y esteroides de la grasa de la leche. *Food Science and Technology International*, **5**:103-119.
- de la Fuente, M.A., and Juárez, M. (2005). Authenticity Assessment of Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**:563-585.
- Destailats, F., Arula, J., Simon, J.E. Wolff, R.L., and Angers, P. (2002). Dibutyratization of monoacylglycerols for the resolution of regioisomers of oleic, petroselinic, and *cis*-vaccenic acids. *Lipids*, **37**:111-116.
- Destailats, F., de Wispelaere, M., Joffre, F., Golay, P., Huga, B., Giuffrida, F., Fauconnot, L., and Dionisi, F. (2006). Authenticity of milk fat by fast analysis of triacylglycerols. Application to the detection of partially hydrogenated vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, **1131**:227-234.
- Fernandez Moya, V., Martinez Force, E., and Garces, R. (2000). Identification of triacylglycerol species from high-saturated sunflower (*Helianthus annuus*) mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**:764-769.
- Firestone, D. (1994). Liquid chromatographic method for determination of triglycerides in vegetable oils in terms of their partition numbers: summary of collaborative study. *Journal of AOAC International*, **77**:954-957.
- Fontecha, J., Rios J. J., Lozada, L., Fraga, M. J and Juarez M. (2000). Composition of goat's milk fat triglycerides analyzed by silver ion adsorption-TLC and GC-MS. *International Dairy Journal*, **10**:119-128.
- Fontecha, J., Goudjil, H., Rios, J. J., Fraga, M. J. and Juárez, M. (2005). Identity of the major triacylglycerols in ovine milk fat. *International Dairy Journal*, **15**:1217-1224.

- Fontecha, J., Mayo, I., Toledano, G., and Juárez, M. (2006a). Use of changes in triacylglycerols during ripening of cheeses with high lipolysis levels for detection of milk fat authenticity. *International Dairy Journal* **16**:1498-1504.
- Fontecha, J., Mayo, I., Toledano, G., and Juárez, M. (2006b). Triacylglycerol composition of protected designation of origin cheeses during ripening. Authenticity of milk fat. *Journal of Dairy Science* **89**:882-887.
- Frega, N. and Bocci, F. (2001). Rapid analysis of olive oil. *Laboratorio 2000*, **15**:28-31.
- Geeraert, E., Sandra, P., de Schepper, D. (1983). On-column injection in the capillary gas chromatographic analysis of fats and oils. *Journal of Chromatography*, **279**:287-295.
- Goudjil, H., Fontecha, J., Fraga, M.J., and Juárez, M. (2003). TAG composition of ewe's milk fat. Detection of foreign fats. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **80**:219-222.
- Grob, Jr., K. (1979). Evaluation of injection techniques for triglycerides in CGC. *Journal of Chromatography*, **178**:387-392.
- Grob, Jr., K., Neukom, H.P. (1980). Factors affecting the accuracy and precision of cold on-column injections in capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, **189**:109-117.
- Gutierrez, R., Vega, S., Diaz, G., Sánchez, J., Coronado, M., Ramírez, A., Pérez, J., González, M. and Schettino, B. (2009). Detection of non-milk fat in milk fat by gas chromatography and linear discriminant analysis. *Journal of Dairy Science* **92**:846-1855.
- Gutiérrez Tolentino, R., Díaz González, G., Vega y León S., Méndez R., I., Delgadillo G., H., Pérez Flores, N., and Pinto Covarrubias, M. (2004). Determinación de los niveles de triacilgliceroles (% p/p) presentes en grasas de origen animal y vegetal mediante la técnica de cromatografía de gases capilar. *Agro Sur*, **32**:68-75.
- Guyon, F., Absalon, Ch., Eloy, A., Salagoity, M.H., Esclapez, M. and Medina, B. (2003). Comparative study of matrix-assisted laser desorption/ionization and gas chromatography for quantitative determination of cocoa butter and cocoa butter equivalent triacylglycerol composition. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **17**:2317-2322.
- Guyon, F., Destouesse, S., Moustirats, J., Esclapez, M., Salagoity, M.H. and Medina, B. (2004). Alternative method for the quantification by gas chromatography triacylglycerol class analysis of cocoa butter equivalent added to chocolate bars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 2770-2775.
- Haddad, I., Mozzon, M., Strabbioli, R., Frega, N.G. (2011). Electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of triacylglycerols molecular species in camel

- milk (*Camelus dromedarius*). *International Dairy Journal*, **21**:119-127.
- Harrison, L., Chiew, W., Yuen, M., Ah, N., Cheng, H. (2005). Simultaneous quantification of free fatty acids, free sterols, squalene, and acylglycerol molecular species in palm oil by high-temperature gas chromatography-flame ionization detection. *Lipids*, **40**:523-528.
- Hinshaw, J., Seferovic, W. (1986). Analysis of triglycerides by capillary gas chromatography with programmed-temperature injection. *Journal of High Resolution Chromatography*, **9**:731-736.
- ISO 17678 - IDF 202 (2010). Milk and milk products. Determination of milk fat purity by gas chromatographic analysis of triglycerides (Reference method). International Standardization Organization, Geneva.
- ISO 5509 (2000). Animal and vegetable fats and oils - Preparation of methyl esters of fatty acids. International Standardization Organization, Geneva.
- Ito, S., Muto T., Furuhashi, T., Nagai, T. and Mitsui, T. (2000). Application of multivariate analysis at customs laboratory - analysis of mixed fats. *Kanzei Chuo Bunsekishoho*, **39**:21-25.
- IUPAC Method 2.323 (1987). IUPAC Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th ed, Paquot, C., Hautfenne A.(Eds.), Blackwell, Oxford.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1967). The Nomenclature of Lipids. *Journal of Lipid Research*, **8**:523-528.
- Janssen, H.-G., Boers, W., Steenbergen, H., Horsten, R., and Flöter, E. (2003). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography× gas chromatography: evaluation of the applicability for the analysis of edible oils and fats, *Journal of Chromatography A*, **1000**:385-400.
- Janssen, H.-G., Steenbergen H., de Koning, S. (2009). The role of comprehensive chromatography in the characterization of edible oils and fats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **111**:1171-1184.
- Jasper J. P.(2000). GC-FID and acyl carbon number-based determination of characteristic groupings of complex triglyceride (Benefat S and other) mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**:785-791.
- Jittrepotch N., Ushio H. and Ohshima T. (2006). Oxidative stabilities of triacylglycerol and phospholipid fractions of cooked Japanese sardine meat during low temperature storage. *Food Chemistry*, **99**:360-367.
- Kaal, E., and Janssen, H.-G. (2008). Extending the molecular application range of gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1184**:43-60.
- Kemppinen, A. and Kalo, P. (2006). Quantification of triacylglycerols in butterfat by gas chromatography-electron impact mass spectrometry using molar correction

- factors for [M-RCOO]⁺ ions. *Journal of Chromatography A*, **1134**:260-283.
- Laakso, P. (2002). Mass spectrometry of triacylglycerols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**:43-49.
- Lik Nang Lau, H., Wei Puah, C., May Choo, Y., Ngan Ma, A. and Hock Chuah, C. (2005). Simultaneous quantification of free fatty acids, free sterols, squalene, and acylglycerol molecular species in palm oil by high-temperature gas chromatography-flame ionization detection. *Lipids*, **40**:523-528.
- Marriott, P.J., Shellie, R., and Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, **936**:1-22.
- Martínez Force, E., Ruiz López, N., Garcés, R. (2004). The determination of the asymmetrical stereochemical distribution of fatty acids in triacylglycerols. *Analytical Biochemistry*, **334**:175-182.
- Mayer, B. X., Rauter, W., Kählig, H., Zöllner, P. (2003b). A trifluoropropyl-containing silphenylene-siloxane terpolymer for high temperature gas chromatography. *Journal of Separation Science*, **26**:1436-1442.
- Mayer, B.X., Kählig, H., Rauter, W. (2003a). Chromatographic properties of tetramethyl-*p*-silphenylene-dimethyl, diphenylsiloxane copolymers as stationary phases for gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **993**:59-70.
- Mayer, B.X., Kählig, H., Rauter, W. (2004a). Tetramethyl-*p,p*-sildiphenylene ether-dimethyl, diphenylsiloxane copolymers as stationary phases in gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1042**:147-154.
- Mayer, B.X., Lorbeer, E. (1997). Triacylglycerol mixture for testing capillary columns for high temperature gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **758**: 235-242.
- Mayer, B.X., Rauter, W., Rauchbauer, G., Tomastik, C., Bangert, H., (2004b). Approaches for the coating of capillary columns with highly phenylated stationary phases for high-temperature GC. *Journal of Separation Science*, **27**:335-342.
- Mayer, B.X., Zoellner, P., Lorbeer, E., and Rauter W. (2002). A new 75% diphenyl, 25% dimethyl-polysiloxane coated on fused silica capillary columns for high temperature gas chromatography. *Journal of Separation Science*, **25**:60-66.
- Mendez Antolin, E., Marrero Delange, D., and González Canavaciolo, V. (2008). Evaluation of five methods for derivatization and GC determination of a mixture of very long chain fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **46**: 194-199.
- Moldoveanu, S.C., and Chang, Y. (2011). Dual analysis of triglycerides from certain common lipids and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**:2137-2147.

- Molkentin, J., and Precht, D. (2000). Equivalence of packed and capillary GC columns for detection of foreign fat in butter by use of the triglyceride formula method. *Chromatographia*, **52**:791-797.
- Molkentin, J., Precht, D. (1995). Entwicklung einer präzisen kapillar-GC-methode zur schnellen triglyceridanalytik von milchfett. *Fett, Wissenschaft, Technologie / Fat, Science, Technology*, **97**:43-49.
- Molketin, J. (2007). Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**:505-510.
- Mottram, H. R. and Evershed, R.P. (2001). Elucidation of the composition of bovine milk fat triacylglycerol using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **926**: 239-253.
- Mu H., Kalo P., Xu X. and Hoy C.E. (2000). Chromatographic methods in the monitoring of lipase-catalyzed interesterification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **102**:202-211.
- Myher, J.J., and Kuksis, A. (1995). General strategies in chromatographic analysis of lipids. *Journal of Chromatography B*, **671**:3-33.
- Naviglio, D. and Raia, C. (2003a). Application of a HRGC method on capillary column Rtx 65-TG for triglyceride analysis to monitor butter purity. *Analytical Letters*, **36**:3063-3094.
- Naviglio, D. and Raia, C. (2003b). Quality control of butter by means of capillary column Rtx 65-TG. *Industria Alimentari*, **42**:742-756.
- Ngo-Duy, C.C., Destailats, F., Keskitalo, M., Arul, J. and Angers, P. (2009). Triacylglycerols of apiaceae seed oils: composition and regiodistribution of fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **111**:164-169.
- Nikolova Damyanova, B. (1999). Quantitative thin-layer chromatography of triacylglycerols. Principles and application. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **22**:1513-1537.
- Ollivier, D. (2003). Detection of vegetable oil adulteration: Application to the quality of virgin oils, particularly virgin olive oil. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides*, **10**:315-320.
- Park, J.R. and Lee, D.S. (2003). Detection of adulteration in olive oils using triacylglycerols compositions by high temperature gas chromatography. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **24**:527-530.
- Park, Y. W., Chang, P.S. and Lee J., (2010) Application of triacylglycerol and fatty acid analyses to discriminate blended sesame oil with soybean oil. *Food Chemistry*,

123:377-383.

- Pereira, A.S., Costa, M., and Radler de Aquino F. (2004). Two decades of high temperature gas chromatography (1983-2003): what's next? *Microchemical Journal*, **77**:141-149.
- Petrovic, M., Kezic, N., and Bolanca, V. (2010). Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile of several food samples. *Food Chemistry*, **122**:285-291.
- Petsch, M., Mayer, B.X., Zöllner, V (2005). Preparation and characterization of fused-silica capillary columns coated with m-carborane-siloxane copolymers for gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **383**:322-326.
- Pinto, J.S.S, and Lancas, F.M. (2010). Hidrólise do óleo de Azadirachta indica em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicérides e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. *Quimica Nova*, **33**:394-397.
- Povolo M., Pelizzola V. and Contarini G. (2007). Effectiveness of ultrafast GC technique in milk fat authenticity assessment. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **84**:203-209.
- Povolo, M., Pelizzola, V. and Contarini, G. (2008). Directly resistively heated-column gas chromatography for the evaluation of cow milk fat purity. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**:1050-1057.
- Povolo, M., and Contarini, G. (2009). Fast gas chromatography: Applications in milk fat analysis. *Lipid Technology*, **21**:88-90.
- Poy, F., Visani, S., and Terrosi, F. (1981). Automatic injection in high-resolution gas chromatography: A programmed temperature vaporizer as a general purpose injection system. *Journal of Chromatography*, **217**:81-90.
- Precht, D. (1991). Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, **43**:219-242.
- Prestamo, G. and Fontecha, J. (2007). High pressure treatment on the tofu fatty acids and acylglycerols content. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **8**:188-191.
- Romano, R., Lambiase, G., Spagna Musso, S. and Chianese, L. (2004). The qualitative/quantitative distribution of milk fat induced by the processing of "Mozzarella di Bufala Campana". *Progress in Nutrition*, **6**:275-284.
- Romano, R., Borriello, I., Chianese, L. and Addeo, F. (2008). Mozzarella di Bufala Campana: Qualitative and quantitative determination of triglycerides and fatty acids (CLA) during the year by high resolution gas chromatography (HRGC). *Progress in Nutrition*, **10**:22-29.

- Romano, R., Giordano, A., Chianese, L., Addeo, F., and Musso, S.S. (2011). Triacylglycerols, fatty acids and conjugated linoleic acids in Italian "Mozzarella di Bufala Campana" cheese. *Journal and Food Composition and Analysis*, **24**:244-249.
- Ruiz Gutierrez, V., and Barron, L.J.R. (1995). Methods for the analysis of triacylglycerols. *Journal of Chromatography B*, **671**:133-168.
- Ruiz Samblás, C., Cuadros Rodríguez, L., González Casado, A., Rodríguez García, F.P., de la Mata Espinosa, P., and Bosque Sendra, J.M. (2011). Multivariate analysis of HT/GC-(IT)MS chromatographic profiles of triacylglycerol for classification of olive oil varieties. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **399**:2093-2103.
- Ruiz Lopez, N., Martínez Force, E. and Garcés, R. (2003). Sequential one-step extraction and analysis of triacylglycerols and fatty plant tissues. *Analytical Biochemistry*, **317**:247-254.
- Ruiz Samblás, C., González Casado, A., Cuadros Rodríguez, L. and García Rodríguez F. P. (2010). Application of selected ion monitoring to the analysis of triacylglycerols in olive oil by high temperature-gas chromatography/mass spectrometry. *Talanta*, **82**:255-260.
- Seppanen Laakso, T., Laakso, I. and Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, **465**:39-62.
- Simoneau, C., Naudin, C., Hannaert, P. and Anklam, E. (2000). Comparison of classical and alternative extraction methods for the quantitative extraction of fat from plain chocolate and the subsequent application to the detection of added foreign fat to plain chocolate formulations. *Food Research International*, **33**:733-741.
- Tateo, F. and Bononi, M. (2003). Verification of repeatability in GC analysis of triglycerides. *Industrie Alimentari*, **42**:500-503.
- Termonia, M., Munari, F., and Sandra, P. (1987). High oven temperature - cold on-column injection for the automated CGC analysis of high molecular weight compounds such as TGs. *Journal of High Resolution. Chromatography*, **10**:263-268.
- Timms, R.E. (1980). Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. *Journal of Dairy Research*, **47**:295-303.
- Tranchida, P., Donato, P., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L., (2007). Comprehensive chromatographic methods for the analysis of lipids. *Trends in Analytical Chemistry*, **26**:191-205.
- Ulberth, F. and Buchgraber, M. (2000). Authenticity of fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **102**:687-694.
- Ulberth, F. and Buchgraber, M. (2003) Analytical platforms to assess the authenticity

of cocoa butter. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**:32-42.

- Ulberth, F., Gaberning, R., Roubicek, D. (1998). Gas chromatographic triglyceride profiling of milk fat; comparison of packed and short metal capillary columns. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, **206**:21-24.
- van Ruth, S.M., Villegas, B., Akkermans, W., Rozijn, M., van der Kamp, H., and Koot, A. (2010). Prediction of the identity of fats and oils by their fatty acid, triacylglycerols and volatile compositions using PLS-DA. *Food Chemistry*, **118**:948-955.
- van Vliet, M.H., and van Kempen, G.M.P. (2004). Computational estimation of the triacylglycerol composition of vegetable fats from gas and liquid chromatography data. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**:697-706.
- Viera Alcaide, I., Vicario, I.M., Escudero Gilete, M.L., Graciani Constante, E. and León Camacho, M. (2008). A multivariate study of the triacylglycerols composition of the subcutaneous adipose tissue of Iberian pig in relation to the fattening diet and genotype. *Grasas y Aceites*, **59**:327-336.
- Viera-Alcaide, I., Vicario, I.M., Graciani-Constante, E. and León-Camacho, M. (2007). Authentication of fattening diet of Iberian pig according to their triacylglycerols profile from subcutaneous fat. *Analytica Chimica Acta*, **596**:319-324.
- Waheed, A., Mahmud, S., Javed, M.A., and Saleem, M. (2001). Studies on the lipid classes of *Nicotiana tabacum* L. seed oil. *Natural Product Sciences*, **7**:110-113.
- Wang, H., Chao, Q., Ge, Y., Zhou, Y., Zhang, H. and Lei, T. (2009). Identification of cocoa butter and its substitute fats in chocolate products. *Shipin Kexue*, **30**:66-69.
- Wolffi, P, Mordret, F.X. and Dieffenbacher, A. (1991). Determination of triglycerides in vegetable oils in terms of their partition numbers by high performance liquid chromatography. *Pure and Applied Chemistry*, **63**:1173-1182.
- Yoshida, H., Takagi, S., and Hirakawa, Y. (2000). Molecular species of triacylglycerols in the seed coats of soybeans (*glycine max* L.) following microwave treatment. *Food Chemistry*, **70**:63-69.
- Yoshida, H., Hirakawa, Y., Mizushina, Y., and Tanaka, T. (2002). Molecular species of triacylglycerols in the hulls of sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) following microwave treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**:347-352.
- Yoshida, H., Hirakawa, Y., Tomiyama, Y. and Mizushina, Y. (2003). Effects of microwave treatment on the oxidative stability of peanut (*Arachis hypogaea*) oils and the molecular species of their triacylglycerols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**:351-358.
- Yoshida, H., Shougaki, Y., Hirakawa, Y., Tomiyama, Y. and Mizushina, Y. (2004a). Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in the kernels of pumpkin (*Cucurbita* spp) seeds. *Journal of the Science of Food and*

Agriculture, **84**:158-163.

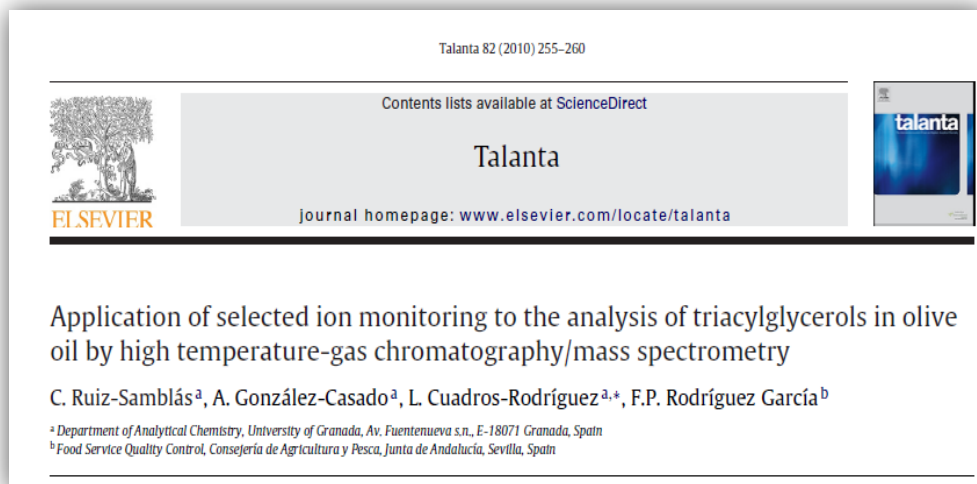
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Hirakawa, Y. and Mizushina, Y. (2004b). Variations in the composition of acyl lipids and triacylglycerol molecular species of pumpkin seeds (*Cucurbita* spp.) following microwave treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**:101-109.
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Kita, S. and Mizushina, Y. (2005). Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**:307-315.
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Kanrei, S. and Mizushina, Y. (2006). Tocopherol distribution and molecular species of triacylglycerols in soybean embryonic axes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **83**:345-351.
- Yoshida, H., Tanaka, M., Tomiyama, Y. and Mizushina, Y. (2007a). Antioxidant distributions and triacylglycerol molecular species of sesame seeds (*Sesamum indicum*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **84**:165-172.
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Tanaka, M. and Mizushina, Y. (2007b). Characteristic profiles of lipid classes, fatty acids and triacylglycerol molecular species of peas (*Pisum sativum* L.). *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**:600-607.
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Yoshida, N., Saiki, M. and Mizushina, Y. (2008a). Lipid classes, fatty acid compositions and triacylglycerol molecular species from adzuki beans (*Vigna angularis*). *Journal of Food Lipids* **15**:343-355.
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Yoshida, N., Saiki, M. and Mizushina, Y. (2008b). Lipid classes, fatty acid distributions and triacylglycerol molecular species of broad beans (*Vicia faba*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **85**:535-541.
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Yoshida, N. and Mizushina, Y. (2009a). Profiles of lipid components, fatty acid compositions and triacylglycerol molecular species of adzuki beans (*Vigna angularis*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **86**:545-552.
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Yoshida, N. and Mizushina, Y. (2009b). Characteristics of lipid components, fatty acid distributions and triacylglycerol molecular species of adzuki beans (*Vigna angularis*). *Food Chemistry*, **115**:1424-1429.
- Yoshida, H., Tomiyama, Y. and Mizushina, Y. (2010a). Lipid components, fatty acids and triacylglycerol molecular species of black and red rices. *Food Chemistry*, **123**:210-215.
- Yoshida, H., Tomiyama, Y. and Mizushina, Y. (2010b). Tocopherol distributions and triacylglycerol molecular species in broad beans (*Vicia faba*). *Food Science and Technology Research*, **16**:409-416.
- Yoshida, H., Hirakawa, Y., Mizushina, Y., and Tanaka, T. (2002). Molecular species of triacylglycerols in the hulls of sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) following

- microwave treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**:347-352.
- Yoshida, H., Takagi, S., and Hirakawa, Y. (2000). Molecular species of triacylglycerols in the seed coats of soybeans (*Glycine max* L.) following microwave treatment. *Food Chemistry*, **70**:63-69.
- Zeleny, R. and Schimmel, H. (2003). Determination and certification of the relative mass fractions of triglycerides and cholesterol in pure and adulterated butter oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**:508-517.
- Zou, J. (2002a). Determination of composition of triacylglycerols in butterfat by capillary gas chromatography-EI mass spectrometry. *Fenxi Ceshi Xuebao*, **21**:79-81.
- Zou, J. (2002b). Determination of the composition of triacylglycerols in coconut oil by high temperature gas chromatography-electron impact mass spectrometry. *Fenxi Huaxue*, **30**:428-431.
- Zou, J. (2002c). Determination of the composition of ODO by gas chromatograph-EI mass spectrometry. *Xiangliao Xiangjing Huazhuangpin*, **6**:16-17.

5. Artículo N° 3

"Aplicación de la monitorización de ión seleccionado al análisis de triglicéridos en aceite de oliva mediante cromatografía de gases a alta temperatura y espectrometría de masas."

Publicado en: Talanta 82 (2010) 255–260



Abstract

The analysis of the triacylglycerol (TAG) composition of oils is a very challenging task, since the TAGs have very similar physico-chemical properties. In this work, a high temperature-gas chromatographic method coupled to electron ionization-mass spectrometry (HT-GC/EI-MS), in the Selected Ion Monitoring (SIM) mode, method was developed for the analysis of TAGs in the olive oil; this is a method suitable for routine analysis. This method was developed using commercially available standard TAGs. The TAGs studied were separated according to their equivalent carbon number and degree of unsaturation. The peak assignment was carried out by locating the characteristic fragment ions having the same retention time on the SIM profile such as $[RCO+74]^+$ and $[RCO+128]^+$ ions, due to the fatty acyl residues on sn-1,sn-2 and sn-3 positions of the TAG molecule and the $[M-OCOR]^+$ ions corresponding to the acyl ions. The developed method was very useful to eliminate the interferences that appeared in the mass spectrum since electron ionization can prevent satisfactory interpretation of spectra.

Keywords:

High temperature-gas chromatography (HT-GC), Mass spectrometry (MS), Selected ion monitoring (SIM), Triacylglycerols (TAGs), Olive oil

1. Introduction

Edible oils are complex mixtures containing a wide range of compounds. They are mainly composed of triacylglycerols (TAGs) and other minor components, such as diacylglycerols (DAGs), free fatty acids (FFAs), sterols, wax ester, phospholipids, hydrocarbons, tocopherols and phenolic compounds. Every TAG molecule contains three fatty acids (similar or different) esterified to a glycerol backbone, which can vary in chain length, degree of unsaturation and position of double bonds [1]. The edible vegetable oil samples are usually mixtures of TAG. The quantity and the type of the minor components depend mainly on the variety of the oil [2].

Gas chromatography (GC) is an important analytical technique for qualitative and quantitative analysis of organic chemicals in a wide range of application areas. GC is fast and provides a high peak capacity; also it is sensitive and allows combination with a wide range of selective detection methods including mass spectrometry. However, the application of GC is limited because the molecules to be analysed have to be thermally stable and sufficiently volatile. A common approach to the analysis of TAGs is to release free fatty acid and perform GC after derivatization, for example, methylation. However, this approach does not identify actual intact TAG molecular species, but only determines the percentage of individual FA present in the total TAG fraction [3].

Whereas complete separation of the fatty acid methyl esters (FAMES) can be achieved in one way, TAG analysis has to be performed in two ways: the analysis can either focus on the intact TAGs or target the fatty acids after hydrolysis of the TAGs. An enormous number of individual TAG species are possible, due to the large number of possible FA combinations on the glycerol backbone. The analysis of the TAG composition of oils is a very challenging task, since the TAGs have very similar physico-chemical properties [4].

Recent research has resulted in better chromatographic columns that allow the most detailed analysis of TAGs. High temperature GC (HT-GC) on non-polar stationary phases separates them according to increasing acyl carbon number (ACN). The main problem is to separate TAGs according to

the degree of unsaturation and molecular weight simultaneously. Recently, high temperature (up to 370 °C) polar-phase capillary GC has been demonstrated as a powerful tool for separating acylglycerols according to the number of both double bonds and carbon atoms [5,6,7].

Usually chromatographic methods are necessary to identify TAGs. Chromatography-mass spectrometry combinations are the most efficient techniques nowadays to analyse them [8]. The recent developments of ionization techniques (electron impact EI, or chemical ionization CI, in either positive or negative ion mode) that are readily interfaced with mass spectrometers, have greatly simplified the sample preparation and could largely eliminate the need of derivatization [9,10,11].

TAGs presented in vegetable oils have been analysed by chromatographic methods for identification and quantification. Several methods that have been used for the analysis of oils and fats are reviewed. Among them high-performance liquid chromatographic (HPLC) [12,13], performed in several detection modes (UV, evaporative light scattering detector, ELSD) [14], charged aerosol detector (CAD) [15], flame ionization detector (FID), and mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (APCI)MS and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) [16,17]. In addition, thin layer chromatographic (TLC) [18] and supercritical fluid chromatographic (SFC) [19] methods have been applied effectively for the identification of different TAG species present in a majority of common vegetable edible oils (and fats).

On the other hand, mass techniques offer an unequivocal identification of a component apart from the inspection of the overall chromatogram of the mixture in the total ion chromatogram (TIC) mode [20]. The identification of the components is achieved by the mass spectra of each component, the ionized overall molecule and from ionized fragments of the molecule; the sum of all these is almost exclusive for every chemical compound [21]. TAGs in oils and fats are formed more or less selectively. In some cases information about actual TAG compositions is lost because of this. The combination of mass spectral and GC retention data may also serve to eliminate alternative structures [22].

One problem, in the analysis of higher molecular weight, is the high level of chemical background that results from column bleed into the mass spectrometer during HT-GC/MS analyses that employ EI, which can prevent satisfactory interpretation of spectra [23].

Moreover, TAG molecules do not fragment in an arbitrary manner but tend to split at weaker bonds, such as those adjacent to specific functional groups. Standard EI mass spectra are achieved with 70 eV, which results in extensive fragmentation of the odd-electron molecular ions due to excess of their internal energy. The major disadvantage of EI mass spectra is the low abundance of ions providing molecular weight information, such as M^+ or $[M-18]^+$ ions. EI mass spectra of TAGs typically exhibit several fragment ions useful for structure elucidation.

A partial solution to the problem is to carry out GC/MS analyses in the single-ion mode. In selected ion monitoring (SIM) certain ion fragments are entered into the instrument method and only those mass fragments are detected by the mass spectrometer. The advantages of SIM are that the detection limit is lower since the instrument is only looking at a small number of fragments during each scan and more scans can take place each second. In addition, since only a few mass fragments of interest are being monitored, matrix interferences are typically lower. In the SIM profile of TAGs, the peak identification is accomplished by localizing certain fragment ions having the same retention times, such as RCO^+ , $[M-RCO_2]^+$, $[M-RCO_2H_2]^+$, $[RCO+128]^+$, and $[RCO+74]^+$ (where R is an aliphatic hydrocarbon chain) [8,24]. The first two ions are most abundant, and the third one is formed only by cleavage from the sn-1 and sn-3 positions, permitting positional estimations [25,26]. Different applications of the SIM mode can be found on bibliography [27,28,29]. Actually, it has also been used with the aim of diagnosing if cross-contamination in olive oils by other vegetable oils [30].

The aim of this work is to use an alternative, highly sensitive and selective method for the identification of TAGs, the high sensitivity and selectivity of GC coupled with (EI)MS performed in the selected ion monitoring mode using selective fragment ions to the peak assignments. Three kinds of ions $[M-RCO_2]^+$, $[RCO+128]^+$ and $[RCO+74]^+$ corresponding to the fatty acyl residues on the glycerol moiety are examined, which is sufficient for peak

identification instead of the molecular ion. Finally, satisfactory peak identification for olive oil was achieved by monitoring several characteristic fragments and with the ions derived from the electron impacted of the TAG molecules.

2. Materials and methods

2.1. Samples

TAGs are abbreviated by means of three letters corresponding to the fatty acids bound to glycerol. The following abbreviations are used: (P) palmitic acid (C16:0); (O) oleic acid (C18:1); (S) stearic acid (C18:0) and (L) linoleic acid (C18:2).

PPP (tripalmitin) and OOO (triolein) of >99% purity were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). PPS (1,2-palmitin-3-stearin), PPO (1,2-palmitin-3-olein), PPL (1,2-palmitin-3-linolein), PSO (1-palmitin-2-stearin-3-olein), OOP (1,2-olein-3-palmitin), POL (1-palmitin-2-olein-3-linolein), SSO (1,2-stearin-3-olein), OOS (1,2-olein-3-stearin), OOL (1,2-olein-3-linolein), LLS (1,2-linolein-3-stearin), LLO (1,2-linolein-3-olein) and LLL (trilinolein) of >99% purity were purchased from Larodan Fine Chemicals AB (Sweden).

100 mg of each pure standard was accurately weighed into a clean and dry vial and then was diluted using chloroform (99%, reagent grade) to a final weight of 10 g to prepare the stock solution of reference working standard of 1% (w/w). Standard stock solutions were stored in the darkness at -15 °C until their use; under these conditions, the TAGs are stable for several months. Working solutions are freshly prepared from stock solutions, previously kept at room temperature, by chloroform dilution.

A simulated olive oil was prepared from a mixture of fourteen TAG standard species, an aliquot of 0.05 g was taken from each standard solution and it was taken to a final concentration of 700 ppm (w/w) of each TAG.

For optimisation purpose, a commercial extra virgin olive oil (Spain) was used. It was stored at 4 °C until its analysis. Olive oil was dissolved in

chloroform to a final concentration of 0.2% (w/w). Any further sample preparation was not needed prior to analysis.

2.2. Instrumentation

All separations were performed with a VARIAN GC 3800 gas chromatograph (PA, USA) equipped with a split/splitless injector coupled to a mass spectrometer (ion trap). A split injection with a ratio of 1:10 was used. The samples were introduced using a robotized autosampler module (Combipal, CTC ANALYTICS, Switzerland). The sample volume injection was 2 μ l. The analytical column was a capillary column coated with 65% diphenyl-35% dimethyl-polysiloxane stationary phase (Restek Rtx-65TG; 30m \times 0.32mm i.d. \times 0.1 μ m film thickness, maximum temperature 370 °C; Restek Corp., Bellefonte, PA, USA).

The GC oven temperature was programmed from 315 °C to 350 °C at 1 °C/min. The injection port was held isothermally at 370 °C. Helium (99.995%) was used as the carrier gas and its flow rate was 1.5 ml/min.

A VARIAN 4000 ion trap mass spectrometer (PA, USA) equipped with an electron impact (EI) source was used to perform the mass analyses. The mass spectrometric conditions were as follows. The ion source temperature was held at 250 °C during the GC/MS runs.

The transfer-line temperature was maintained at 350 °C throughout the analyses. The electron energy was 70 eV and the emission current 10 μ A. In full-scan mode, average spectra were acquired in the m/z range of 200–1000m/z and were recorded at a scan speed of 1.20 s. Scan control, data acquisition, and processing were performed by a MS Workstation software (VARIAN) data system.

Selected ion monitoring (SIM) mode was performed for the following ions [RCO+74]⁺, [RCO+128]⁺ and [M-RCO₂]⁺, which were the most abundant peaks in the EI mass spectra and they could be used for TAG identification.

3. Results and discussion

A simulated olive oil, made in the laboratory, in which all the TAGs were in the same concentration, was used in order to optimize the chromatographic conditions (details are described in materials and methods section). Fig. 1 shows a total ion chromatogram of the GC/(EI)MS analysis (scan mode). An excellent chromatographic performance, under the GC/(EI)MS conditions employed, is evident from triacylglycerols containing up to fifty-four acyl carbon atoms. In preliminary studies, TAG species were well-separated even species with identical carbon number and number of double bonds (54:4) such as LLS and OOL. In order to achieve this chromatographic separation, it was necessary to raise the column temperature as high as 350 °C.

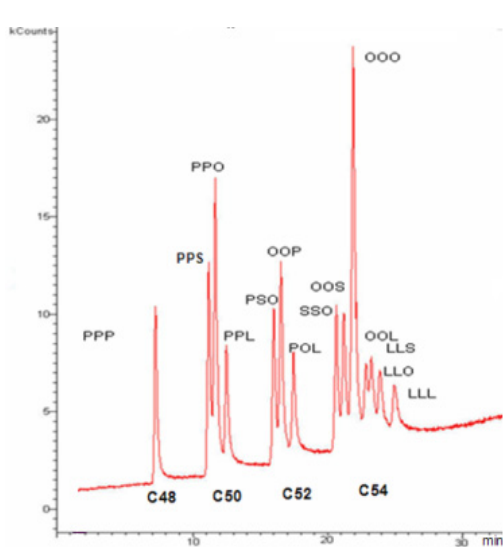


Figure 1. TIC Profile for the high-temperature of GC/MS analysis of standard triacylglycerols. Temperature programming was to 350°C. (For further practical details see experimental section).

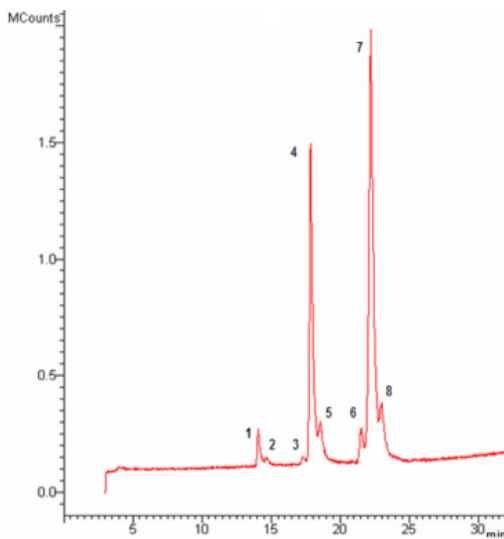


Figure 2. Total Ion Chromatogram (TIC) profile for the high-temperature of GC/MS analysis of triacylglycerols in the olive oil. The peaks are numbered from 1 to 8. (For peak identification, see Table 2 and discussion in section 3).

The mass spectra of these standard TAGs were obtained by using electron ionization (EI) mode and with an ion trap mass spectrometer.

Depending on the type of mass spectrometer detector used in the analysis (quadrupole or ion trap), the mass spectra will be different according to fragmentation and grouping of ions. The available spectra on the library, in the commercial equipments, are obtained with a quadrupole mass spectrometer and due to this, a new library of forty-five different TAGs, with spectra obtained from our ion trap mass spectrometer, was built. It was observed that there are much more fragmentation, at low mass range, on the spectra from the library. However, with the ion trap mass spectrometer, these fragments are loosening. So, the "space-charge effects", were too many ions in the trap distort the electric fields leading to significantly impaired performance, are avoided.

The total ion chromatogram of olive oil is shown in Fig. 2; with the same experimental condition that in the previous case, it is noticed that, the chromatographic resolution is not achieved. The separations between peaks were incomplete. Only eight peaks are obtained even when the chromatographic method is able to separate according to degree of unsaturation and molecular weight simultaneously. This could be due to the different amounts of each triacylglycerol in the olive oil [9] and it could take place some overlapping peaks of TAGs.

Fig. 3 shows the GC/(EI)MS spectra of the peaks that appear in Fig. 2, corresponding to the TAGs of the olive oil, they show characteristic pattern, mainly in the low mass range, which are different for saturated or unsaturated TAGs. Also it is observed that the degree of dissociation of the acylium ion from the glycerol backbone is clearly dependent on the number of double bonds in the acyl chain. GC/(EI)MS spectra of TAGs contain abundant fragment ions in the form of $[RCO+74]^+$, $[RCO+128]^+$, $[M-OCOR]^+$ as it can be observed. Our preliminary study shows that the ion $[RCO]^+$ was quite small to use it to identify.

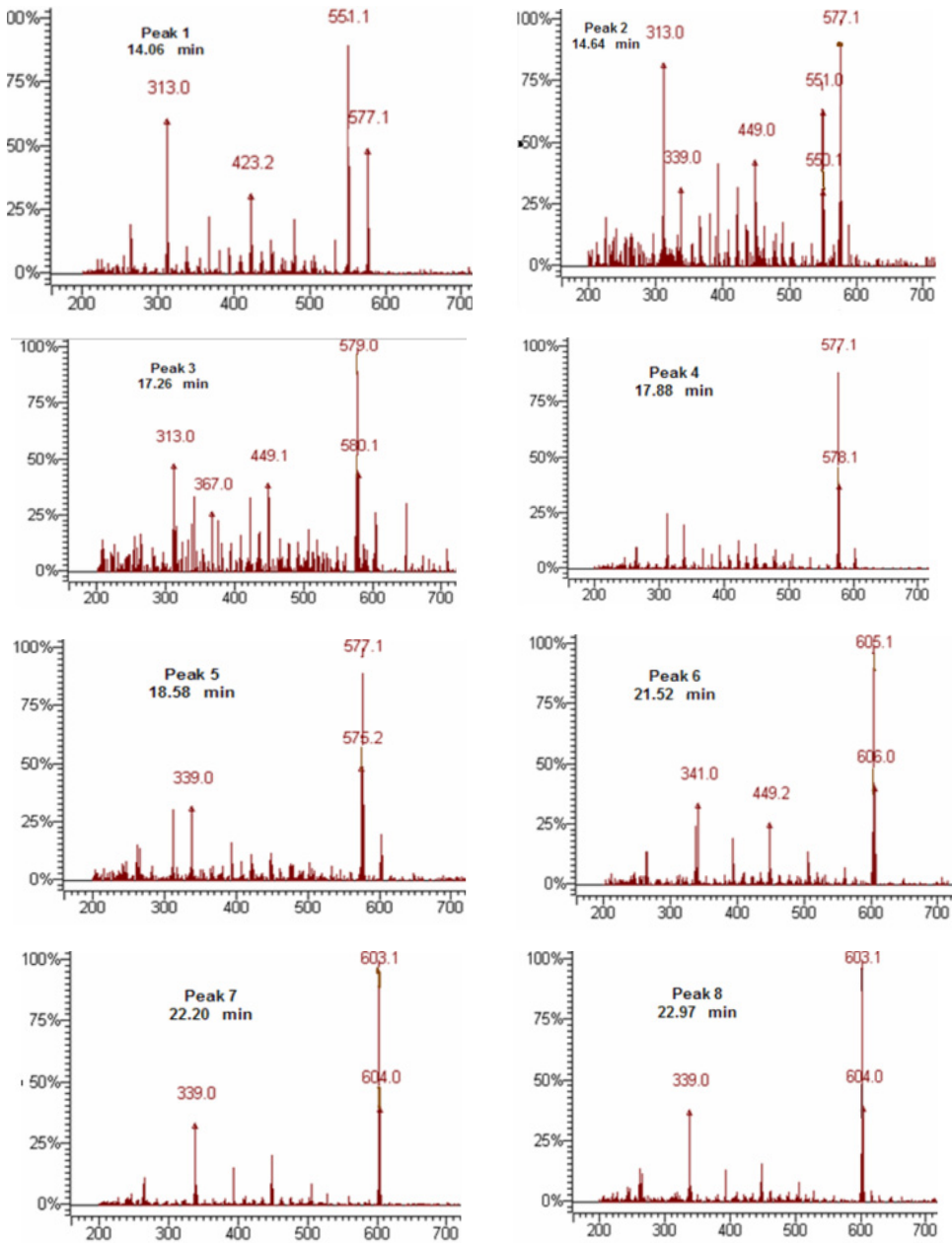


Figure 3. Mass spectra of each peak in the chromatogram of olive oil

Moreover, some of the spectra were formed by a mixture of different fragment ions, which increased the difficulty of the identification procedure and also some spectra look alike among them (for example peak 7 and peak 8). Owing to this, a methodology based on Selected Ion Monitoring (SIM) mode was used.

The peak assignment was accomplished by locating the fragment ions having the same retention time on the SIM profile that the ions due to the fatty acyl residues and then compared with the standard TAG. Table 1 shows different TAGs, ranging from the 48 to 54 in carbon number, those used in the simulation of olive oil and available commercially. They were previously studied from their fatty acid composition to simplify this peak assignment. The studied TAGs would be expected to yield individual fragment ions such as $[\text{RCO}+74]^+$, $[\text{RCO}+128]^+$ and $[\text{M}-\text{RCO}_2]^+$. All the fragments (eighteen chromatograms) that appear in Table 1 were studied individually by the SIM mode and used them for the identification of the TAGs in olive oil. These ions produce useful information about the structure of the triacylglycerol. The corresponding molecular weights are also summarised in Table 1.

Fig. 4 shows the profile of some of the fragment ions of the TAGs of olive oil. Monitoring was carried out at the m/z from the results of previous experiences (Table 1). The m/z 551 ion is due to the $[\text{M}-\text{OCOR}]^+$ yielded from $[\text{PP}]^+$ residue, the m/z 603 is due to the $[\text{OO}]^+$ residue and m/z 577 corresponds to $[\text{PO}]^+$ residue. The ions m/z 367 and m/z 313 are ascribed to the $[\text{RCO}+128]^+$ corresponding to the palmitic acid residue. This method was applied to every single fragment of the TAGs in order to obtain a combination of each fragment at the same retention time.

From the characteristic combination of the fragment ions obtained with the SIM mode at the same retention time, when monitoring, the particular species were identified.

CAPÍTULO II

Table 1. Calculated m/z of fragment ions from different molecular species of triacylglycerols used in the simulation of olive oil.

TAG	ACN:DB ^a	M ⁺	FA residue	m/z of fragment ions		
				[RCO+ 74] ⁺	[RCO+128] ⁺	[M-OCOR] ⁺
PPP	48:0	860	P	313	367	551
			P	313	367	551
			P	313	367	551
PPS	50:0	834	P	313	367	579
			P	313	367	579
			S	341	395	551
PPO	50:1	832	P	313	367	577
			P	313	367	577
			O	339	393	551
PPL	50:2	830	P	313	367	575
			P	313	367	575
			L	337	391	551
PSO	52:1	860	P	313	367	605
			S	341	395	577
			O	339	393	579
OOP	52:2	858	O	339	393	577
			O	339	393	577
			P	313	367	603
POL	52:3	856	P	313	367	601
			O	339	393	575
			L	337	391	577
SSO	54:1	888	S	341	395	605
			S	341	395	605
			O	339	393	607
OOS	54:2	886	O	339	393	605
			O	339	393	605
			S	341	395	603
OOO	54:3	884	O	339	393	603
			O	339	393	603
			O	339	393	603
OOL	54:4	882	O	339	393	601
			O	339	393	601
			L	337	391	603
LLS	54:4	882	L	337	391	603
			L	337	391	603
			S	341	395	599
LLO	54:5	880	L	337	391	601
			L	337	391	601
			O	339	393	599
LLL	54:6	878	L	337	391	599
			L	337	391	599
			L	337	391	599

^a ACN: the number of total acyl carbons; DB: the number of double bonds

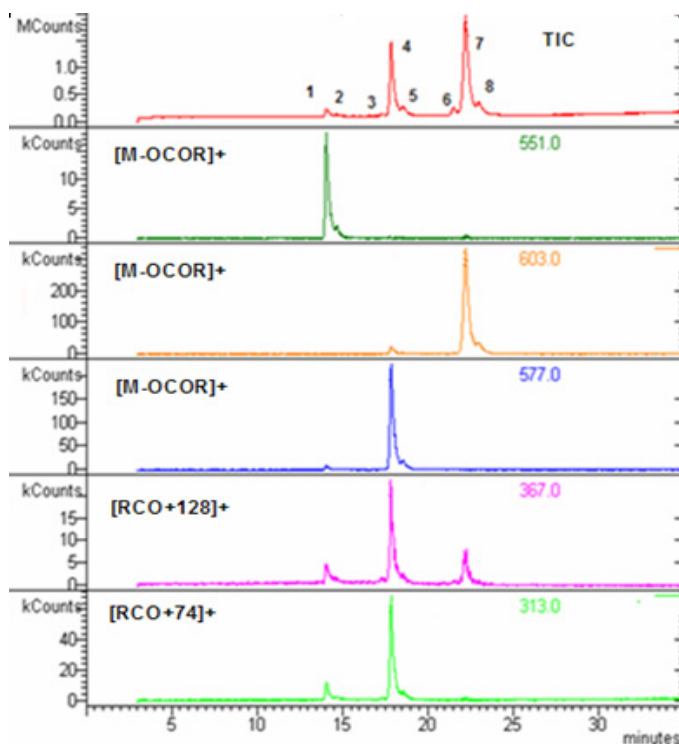


Figure 4. Total ion chromatogram of the olive oil profile (top). Selected ion-monitoring chromatogram of m/z 313, m/z 367, m/z 577, m/z 603 and m/z 551. Column Rtx-65TG, 65% diphenyl-35% dimethyl polysiloxane (30 m \times 0.32 mm i.d. \times 0.1 μ m) at 350°C.

The retention time (R_t) of peak #1 was 14.06 min and some of the fragment ions monitored at this time were m/z 577, m/z 551, m/z 367 and m/z 313. These fragments correspond to the $[RCO+74]^+$, $[RCO+128]^+$, $[M-OCOR]^+$ of the PPO component.

At R_t 14.64, peak #2, the fragment ions at m/z 577, m/z 551 and m/z 367 were detected between others. These ions result from the PPL. The component of peak #3 (R_t 17.26 min) had three kinds of $[M-OCOR]^+$ ions, m/z 605, m/z 579 and m/z 577. The only TAG having this characteristic profile was regarded as PSO (see combination of characteristic ions in Table 1).

When monitored at m/z 603, an ion peak appeared at R_t 17.88, peak #4, and ions such as m/z 577 $[M-OCOR]^+$, m/z 313 $[RCO+74]^+$ and m/z 367 $[RCO+128]^+$, were also detected at the same R_t . These residues corresponded to the molecule of OOP.

At the retention time 18.58, peak #5, four important kinds of fragments $[M-OCOR]^+$, m/z 577, m/z 575, m/z 576, m/z 601 and m/z 603 appeared (see part a in Fig. 5). This is due to a mix of triacylglycerols molecules co-eluted with the same number of carbons and double bonds. The m/z 577, m/z 575 and m/z 601 correspond to $[PO]^+$, $[PL]^+$ and $[OL]^+$ fragments respectively. The first two fragments are due to the neutral loss of and linoleic acid and oleic acid respectively, of the POL molecule. However the other two ion fragments (m/z 576 and m/z 603), that appear at the same retention time, correspond to $[PoO]^+$ and $[OO]^+$ fragments. This strongly suggests that the triacylglycerol is PoOO, and it is co-eluted with POL (see part b in Fig. 5).

At the retention time of 21.52 min, peak #6, the ion peaks monitored were m/z 605, m/z 393, m/z 339 and m/z 265, this last one corresponding to $[RCO]^+$ of an oleic acid residue. The other fragments correspond to $[M-OCOR]^+$, $[RCO+128]^+$, $[RCO+74]^+$ fragment ions of the OOS.

The characteristic ion resulting from the unsaturated triacylglycerols OOO is m/z 603, which corresponds to $[M-OCOR]$ due to cleavage of an oleic acid anion. With this information, and from other ion fragments such as m/z 339 and m/z 393, it was possible to identify peak #7, at retention time 22.20 min, as OOO definitely.

The last peak, peak #8, at 22.97 min (see part c in Fig. 5), was identified as OOL due to the fragments that appeared at this retention time such as m/z 603, m/z 601 and m/z 339 (see part d in Fig. 5). Even when in the mass spectrum of this peak in Fig. 4 (peak #8), the fragment ion of m/z 601 did not come out because of the overlapping with the previous peak (OOO), with the SIM mode a right identification was possible.

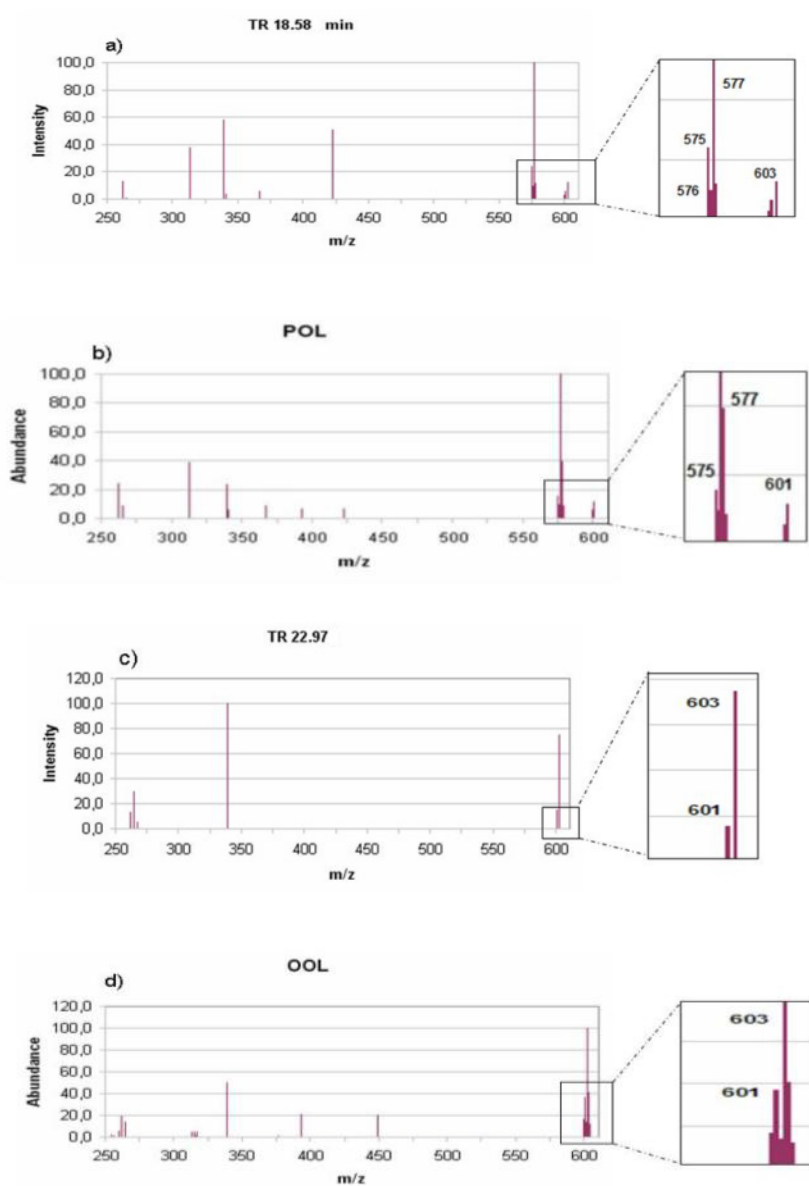


Figure 5. Simulated spectra with the fragments obtained at the same retention times (Parts a and c). Spectra of the corresponding standard triacylglycerol. (Parts b and d).

After the identification of each peak, with every single m/z at the same retention time, diagrams were made in order to simulate the mass spectrum of the previously identified triglyceride and then compared to the mass spectrum of the standard TAG (Fig. 5). This was used to validate the fragment ions obtained from the SIM profile at the same retention time.

As it can be seen the simulated spectra are slightly similar to the corresponding standard TAG. Furthermore with the SIM mode, it has been possible to reject fragments that are not useful for identification.

Although olive oil may contain the group acyl linolenic (Ln), no fragment ion peaks corresponding to this group were found in the SIM profile. This is probably due to the instability of the linolenic acid, during electron impact ionization and due to the high polarity of this compound [4]. Moreover it was observed that the signal intensity of the product, due to the neutral loss of a sn-2 fatty acid was smaller than that of the other two product ions, indicating that neutral loss of the sn-2 fatty acids was less favourable than loss of the fatty acid from the sn-1 or sn-3 position. In addition, the TAGs having unsaturated fatty acyl groups, these ions were relatively more intense than those from saturated triacylglycerols.

By using this method it was possible to identify the eight peaks of the chromatogram. Moreover it was possible to solve the problem of similar spectra because of overlapping between TAGs as well as to eliminate the interferences. The identified peaks that appeared in the total ion chromatogram profile for the high temperature GC-MS analysis of olive oil (Fig. 3) are shown in Table 2.

Although GC-MS offers much valuable information concerning the molecular species of TAGs, many applications of high polar column and high temperature in combination with mass spectrometer have not yet been achieved. The problem here may be that an unresolved peak leads to confusion in the peak assignment when using SIM profiles.

Table 2. Correspondence between peaks number in the chromatogram of olive oil profile and the identified triacylglycerols. The peak numbers refer to Figure 2.

Peak	TAG	Rt (min)
1	PPO	14.06
2	PPL	14.64
3	PSO	17.26
4	OOP	17.88
5	POL / PoOO	18.58
6	OOS	21.52
7	OOO	22.20
8	OOL	22.97

The previous results suggest that the SIM of $[M-OCOR]^+$, $[RCO+128]^+$ and $[RCO+74]^+$ ions is useful for the identification of TAGs in the olive oil with saturated, monounsaturated, and diunsaturated acid groups, but may not be suitable for those with more highly unsaturated acyl chains. Moreover, the peak assignment is possible under no good conditions such as high background and column bleeding. In further studies, authors will go ahead with this method by using different ratios of TAGs to detect adulterations in olive oils.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Education and Science (Dirección General de Investigación, project CTQ2006-15066-C02-02) and the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, project P07-FQN-02667, and Consejería de Agricultura y Pesca) for financial assistance. This work has also been partially supported by European Regional Development Funds (ERDF). One of the authors, C.R.S., is also grateful to the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa) for the personal postgraduate grant.

References

- 1 A. Kiritsakis, W.W. Christie, in: R. Aparicio, J. Hardwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil*, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD, USA, 2003, pp. 135–162.
- 2 A. Jakab, K. Nagy, K. Heberger, K. Vekey, E. Forgacs, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 2291–2297.
- 3 J. Ryur Park, D. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* 24 (2003).
- 4 M. Buchgraber, F. Ulberth, H. Emons, E. Anklam, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106 (2004) 621–648.
- 5 N.R. Antoniosi, E. Carrilho, F.M. Lanc, as, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70 (1993) 1051–1053.
- 6 V. Spitzer, W. Tomberg, R. Hartmann, R. Aichholz, *Lipids* 32 (11) (1997) 1189–1201.
- 7 R. Aichholz, V. Spitzer, E. Lorbeer, *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 181–194.
- 8 P. Laakso, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104 (2002) 43–49.
- 9 N.K. Andrikopoulos, *Food Rev. Int.* 18 (2002) 71–102.
- 10 J.J. Myher, A. Kuksis, *J. Chromatogr. B* 671 (1995) 3–33.
- 11 W.C. Byrdwell, in: W.C. Byrdwell (Ed.), *Qualitative and Quantitative Analysis of Triacylglycerols by Atmospheric Pressure Ionization (APCI and ESI) Mass Spectrometry Techniques*, AOAC Press, Urbana, IL, 2005, pp. 298–412.
- 12 D.L. Compton, J.A. Laszlo, M.A. Berhow, *J. AOCS* 83 (9) (2006) 753–758.
- 13 F.M. Haddada, H. Manai, I. Oueslati, D. Daoud, J. Sanchez, E. Osorio, M. Zarrouk, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 10941–10946.
- 14 S.C. Cunha, M.B.P.P. Oliveira, *Food Chem.* 95 (2006) 518–524.
- 15 M. Lisa, F. Lynen, M. Holcapek, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 1176 (2007) 135–142.
- 16 N.K. Andrikopoulos, A. Chiou, A. Mylona, *Food Rev. Int.* 20 (4) (2004) 389–405.
- 17 A. Jakab, K. Nagy, K. Heberger, K. Vekey, Forgacs, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 2291–2297.
- 18 R. Tarandjiiska, I. Marekov, B. Nikolova-Damyanova, B.S. Amidzhin, *J. Sci. Food Agric.* 72 (1996) 403–410.
- 19 Y. Funada, Y. Hirada, *J. Chromatogr. A* 800 (1998) 317–325.
- 20 R.A. Hites, *Anal. Chem.* 42 (1970) 1736–1740.
- 21 N.K. Andrikopoulos, *Crit. Rev. Food Sci.* 42 (5) (2002) 473–505.
- 22 W.W.Christie, *Lipid Analysis: Isolation, Separation Identification and Structural Analysis of Lipids*, third ed., The Oil Press, Bridgwater, England, 2003.
- 23 R.P. Evershed, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 7 (1996) 350–361.
- 24 R. Ryhage, E. Stenhagen, *J. Lipid Res.* 1 (1960) 361–390.
- 25 H. Kallio, P. Laakso, R. Huopalahti, R.R. Linko, P. Oksman, *Anal. Chem.* 61 (1989) 699–700.
- 26 T. Ohshima, H.S. Yoon, C. Koizumi, *Lipids* 24 (1989) 535–544.
- 27 T. Ohshima, S. Wada, C. Koizumi, *Jpn. Soc. Sci. Fish.* 55 (5) (1988) 875–883.
- 28 T. Murata, *Anal. Chem.* 49 (14) (1977) 2209–2213.
- 29 S. Hauff, W. Vetter, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 3423–3430

- 30 J. Gamazo-Vazquez, M.S. Garcia-Falcon, J. Simal-Gandara, Food Control 14 (2003) 463–467.

6. Artículo N° 4

"Cuantificación sencilla de triglicéridos (y ácidos grasos) en aceites de oliva virgen extra mediante cromatografía de gases a alta temperatura"

Publicado en: Analytical Methods 4 (2012) 753-758

A straightforward quantification of triacylglycerols (and fatty acids) in monovarietal extra virgin olive oils by high-temperature GC

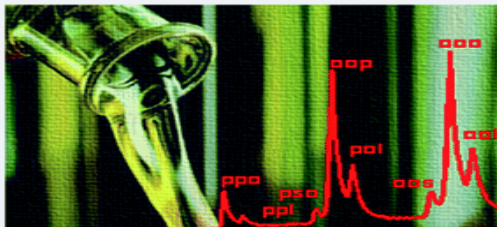
Cristina Ruiz-Samblás, Luis Cuadros-Rodríguez, Antonio González-Casado and Francisco P. Rodríguez-García

Anal. Methods, 2012, Advance Article

DOI: 10.1039/C2AY05574K, Paper

[Collapse](#) | [PDF](#) | [Rich HTML](#)

A HTGC method, without any previous sample treatment, which offers a valid analytical methodology to characterise the TAG profile in extra virgin olive oils, is proposed.



Abstract

The analytical characterization of the triacylglycerol (TAG) profile of samples which include ten Spanish monovarietal extra virgin olive oils ("Hojiblanca", "Manzanilla", "Picual", "Picudo", "Cornicabra", "Lechin", "Verdial", "Empeltre", "Blanqueta" and "Arbequina") is reported. High temperature gas chromatography-(ionic trap) mass spectrometry, HTGC-(IT)MS, was employed for TAG profiling in olive oils. No sample treatment was required. For quantification purposes, a standard calibrant mixture, including all the previously identified TAGs in olive oils, was used. Results showed that triolein (27–50%) and 1,2-olein-3-palmitin (19–38%) were the most abundant TAGs in the analyzed samples, though their relative proportion changed between samples which corresponded to different varieties of olive oils. An estimation of the composition of main fatty acids (FAs) was also enabled in a simple approach from the TAG profiles. This analytical methodology for FA profiling in olive oil was validated by using two external olive oil reference materials. The results were found to constitute an approach, in a fast and easy way without using any derivatization reactions, to a conventional fatty acid methyl ester (FAME) gas chromatography method, when no high analytical performances are mandatory.

Keywords: Fatty acids, High temperature-gas chromatography, Olive oil, Triacylglycerols.

1. Introduction

Edible vegetable oils are valuable products derived from vegetable fruits or seeds by mechanical pressure or extraction with organic solvents. Together with (animal) fats, they contribute significantly to the daily caloric intake in human nutrition. Olive oil is one of the most consumed edible vegetable oils in the South of Europe.

Extra virgin olive oil is a high-quality vegetable oil traditionally produced in the countries of Mediterranean areas. It is a high-quality vegetal edible oil produced by mechanical means from the fruit of the olive tree (*Olea europaea* L.); in fact, it is only olive fruit juice and requires no refinement prior to consumption [1]. This fat source is extremely appreciated not only for its organoleptic attributes but also for its health and nutritional properties [2]. The chemical composition of an extra virgin olive oil is well-known to exhibit a greater variability than other vegetable oils as it is largely influenced by agronomical practices, geographical origins, harvesting periods, and processing technologies [3,4].

Olive oil is mainly composed of triacylglycerols (TAGs)(95-96%). The minor lipids constituents comprise classes such as free fatty acids and fatty alcohols, phospholipids, waxes and long-chain hydrocarbons, phytosterols and derivatives, phenolic compounds and tocopherols, etc. Monoglycerides and diglycerides, mainly residues from incomplete TAG biosynthesis or products of TAG hydrolysis, are also present in small amounts [5]. In particular, the effect of the cultivar-environment interaction on the amounts of major (i.e., TAGs) and minor (e.g., phytosterols or antioxidant molecules as phenols) chemical components is considered of great importance to define the final quality of the product and to guarantee a high stability to auto- and thermal oxidation processes [6].

The biosynthesis and metabolism of TAGs are stereo- and regiospecific reactions, and the positional distribution of the three fatty acids (FAs) in TAGs affects their biological and physical properties such as crystal structure, solubility, viscosity and melting point [7]. The occurrence of certain TAG species in some oils in high amounts has been used for the detection of

adulteration of other higher-priced oils, in which these TAG species are absent or present only at trace levels [8,9,10].

The attributes of TAGs are determined by the number of carbon atoms in the fat chains (acyl carbon number, ACN), their degree of unsaturation and the position and configuration of the double bonds in each FA chain. The TAG species may be differentiated in regiospecific/stereospecific isomers by determining the exact position of the three FAs on the glycerol backbone [11]. The determination of the TAG composition of an oil or fat is a challenging task because an enormous number of individual TAG species, which have very similar physico-chemical properties, is possible due to the large number of possible FA combinations on the glycerol backbone. For example a fat containing only two different FAs results in the theoretical number of six possible isomers.

The most common approach to the indirect knowledge of TAGs is to release free fatty acid and perform GC after methylation. Moreover, the fatty acid methyl esters (FAMES) of the vegetable oils are determined using conventional GC techniques. Additional information on this topic could be found in several specific monographs [12]. Nonetheless, this transesterification, necessary for FA determination by GC, implies a loss of structural information, for example the position of the fatty acid residues on the glycerol backbone.

Identification and quantification of the intact TAGs present in edible vegetable oils could be obtained by chromatography as well [13,14]. Several chromatographic methods that have been used for the analysis of oils and fats are reviewed. Among them high performance liquid chromatography (HPLC)[15,16] performed in several detection techniques, such as ultraviolet-diode array(UV-DAD), refractive index (RID) [17], evaporative light scattering (ELSD) [18],charged aerosol (CAD) [19,20], and flame ionization (FID).Thin layer chromatography (TLC)[21] and supercritical fluid chromatography (SFC)[22] have been applied effectively for identification of different TAG species present in a majority of common vegetable edible oils (and fats). Finally, mass spectrometry coupled to liquid chromatography has

proved to be a very suitable analytical technique for direct elucidation of region isomer composition of TAGs in oils and fats [23,24].

HTGC, over 300 °C, on non-polar stationary phases was reported in the seventies–eighties, to separate TAGs according to increasing ACN [25,26]. The main problem was to separate TAGs according to the degree of unsaturation and molecular weight simultaneously. Low bleeding at high-temperature (as far as 370–400 °C) polar-phase, 50–65% phenylmethyl silicone coatings, capillary GC columns have been demonstrated as powerful tools for separating acylglycerols according to the ACN and, within each ACN group, according to the number of double bonds [27,28,29,30,31].

The aim of this study was to revisit and enhance the importance of the high temperature-gas chromatography coupled to mass spectrometry as an analytical technique which is valid to identify and characterize the triacylglycerol and fatty acid profiles from different monovarietal extra virgin olive oils. A straightforward and easy calibration methodology, by means of a single external standard, was used for the quantification of TAGs with a good reproducibility. In addition, an approximated estimation of the major-FA profile is described in Appendix 1. It was carried out with a spreadsheet which permits us to calculate the mass fraction of FA from the mass fraction of TAGs. In addition, this last analytical methodology was validated by using two olive oil external reference materials supplied by an accredited laboratory.

2. Experimental

2.1. Reagents and samples

TAGs are abbreviated by means of three letters corresponding to the fatty acids bound to glycerol. The following abbreviations are used: (P) palmitic acid (C16:0); (O) oleic acid (C18:1); (S) stearic acid (C18:0); and (L) linoleic acid (C18:2).

The TAG standards used were: PPP (tripalmitin) and OOO (triolein) of >99% purity obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). PPS (1,2-palmitin-3-stearin), PPO (1,2-palmitin-3-olein), PPL (1,2-palmitin-3-

linolein), PSO (1-palmitin-2-stearin-3-olein), OOP (1,2-olein-3-palmitin), POL (1-palmitin-2-olein-3-linolein), SSO (1,2-stearin-3-olein), OOS (1,2-olein-3-stearin), OOL (1,2-olein-3-linolein), LLS (1,2-linolein-3-stearin), LLO (1,2-linolein-3-olein), and LLL (trilinolein) of >99% purity were purchased from Larodan Fine Chemicals AB (Sweden). Chloroform (99%, PAI grade, supplied from PANREAC, Spain) was used as solvent.

Ten samples, each one of a different Spanish variety of extra virgin olive oils ("Hojiblanca", "Manzanilla", "Picual", "Picudo", "Cornicabra", "Lechin", "Verdial", "Empeltre", "Blanqueta" and "Arbequina"), were used and purchased from common markets of Spain. The authentication of the samples was made based on the product label. Due to the fact that the official quality controls, which the olive oil follows in Spain, incompliance with the European Regulation on marketing, are very rigorous, it was not required to apply another authentication process since this information was assured.

Two olive oil external reference materials (supplied by the Food Quality Official Laboratory of Atarfe (Granada, Spain), an ISO 17025 accredited laboratory recognised by the International Olive Oil Council (IOOC) for olive oil quality control) were used to validate the method of quantification of fatty acid composition in the extra virgin olive oils.

2.2 Standard and sample analysis

100 mg of each pure TAG standard was accurately weighed in a clean and dry glass vial and then was diluted using chloroform to a final weight of 10 g to prepare the stock solution of the reference working standard of 1% (w/w). Stock standard solutions were stored in the darkness at -15 °C until their use; under these conditions, the TAGs were stable for several months. Working solutions are freshly prepared from stock solutions, previously kept at room temperature, by chloroform dilution.

A mixture of fourteen TAGs standard species (PPP, PPL, PPS, PPO, PSO, OOP, POL, SSO, OOS, OOO, OOL, LLS, LLO, and LLL), which are more common in olive oil and commercially available, were prepared from aliquots of 500 mg of each stock standard solution and diluted by chloroform to a final

concentration of 700 $\mu\text{g g}^{-1}$ for each TAG in order to optimise the chromatographic conditions.

In addition, a standard calibrant mixture including all the previously identified TAGs in olive oil by us (PPL, PPO, PSO, OOP, POL, OOS, OOO, and OOL) was prepared by adding different quantities of each standard TAG in chloroform, according to their proportions at the olive oils. The composition (in w/w percent) of this calibrant mixture was 4% of PPO, 2% of PPL, 3% of PSO, 20% of OOP, 10% of POL, 10% of OOS, 32% of OOO and 19% of OOL.

The olive oil samples were stored at 4 °C until their analysis. Olive oil was dissolved in chloroform to a final concentration of 0.3% (w/w). Any further sample preparation was not needed prior to analysis.

2.3. Instrumentation

All separations were performed with a Varian GC 3800 gas chromatograph (PA, USA) equipped with a split/splitless injector coupled to a mass spectrometer (ion trap). An 1:10 split ratio was selected as an injection method according to Frega et al. [28] and Filho et al. [29]. The samples were introduced using a robotized autosampler module (Combipal, CTC ANALYTICS, Switzerland). The sample volume injection was 2 ml. The analytical column was a capillary column coated with 65% diphenyl-35%dimethyl polysiloxane stationary phase (Restek Rtx-65TG; 30 m x 0.32 mm i.d. x 0.1 μm film thickness, maximum temperature 370 °C; Restek Corp., Bellefonte, PA, USA).

The GC oven temperature was programmed from 315 °C to 350 °C at 1 °C min^{-1} . The injection port was held isothermally at 370 °C. Helium (99.995%) was used as the carrier gas and its flow rate was 1.5 ml min^{-1} .

A Varian 4000 ion trap mass spectrometer (PA, USA) equipped with an electron impact (EI) source was used to perform the mass analyses. The mass spectrometric conditions were as follows. The ion source temperature was held at 250 °C during the GC/MS runs. The transfer-line temperature was maintained at 350 °C throughout the analyses. The electron energy was 70 eV and the emission current 10 μA .

Chromatograms were recorded in full-scan mode. Average spectra were acquired in the m/z range of 200–1000 m/z and were recorded at a scan speed of 1.20 s. Scan control, data acquisition, and processing were performed by a MS Workstation software (Varian) data system.

2.4. Analytical performance

Identification of TAGs. In another study [32], peak identification of the TAGs, in the analyzed olive oils samples, was made by the comparison with retention times of the corresponding standard and by its mass spectra obtained. The use of TAG pure substance standards is essential to ensure a correct identification because the fragmentation is slightly different between different TAG species.

Moreover, the fourteen TAGs mixture solution was first analyzed to determine both the best chromatographic condition and the retention times of these components. Each TAG was also confirmed with this mixture of standard.

Calibration and TAG quantification. Previous tests were carried out to study the homogeneity of the TAG response factors. It was verified that the same quantity of each TAG yields a different response intensity in the detector system and, for quantification purposes, no single calibrant could be used. Because of this, a multiple standard calibrant, which included a known amount of each identified TAG, at a similar concentration as that in the olive oil, was prepared and measured. This multiple standard calibrant was then analysed twice, at the beginning, middle and at the end of the sequence of sample injections, in order to calculate the calibration factors of each TAG by mean of these six replicates. Furthermore, this calibration strategy has a supplementary advantage since it could be also used for process quality control. With this one-standard external calibration methodology [33], it was possible to obtain directly the calibration factor CF_{std} of each TAG in the standard calibration mixture. In this case, the CF_{std} values are calculated directly from the quotient between the mass fraction (w/w) of each TAG in the calibration mixture standard x_{std} and the measured peak height of each TAG h_{std} .

Thus, the mass fraction of the TAG "i" in the sample, $(x_i)_{\text{spl}}$, is calculated from the calibration factor of the corresponding TAG $(CF_i)_{\text{std}}$ and considering the measured peak height on the sample chromatogram.

For quantification purpose, peak heights were preferably selected as analytical signals, instead of peak areas; since with only moderate tailing, height measurements offer a clear accuracy advantage for poorly resolved peaks, as the overlap contribution to peak height from the tailing produces less error than the area contribution. The method used for the peak height integration was the "drop method" which involves addition of a vertical line from the valley between the peaks to the horizontal baseline, which is drawn between the start and stop points of the peak group.

Precision of the method was calculated as pooled standard deviation (s_p) [34], this standard deviation is used when the combination of several series of measurements (n) is performed under similar conditions to achieve an improved estimate of the precision of the process, in this case s_p is a better estimation than the individual estimated standard deviations $s_1, s_2, \dots s_k$. The pooled standard deviation s_p from k series of measurements (ten different varieties of olive oils) can be calculated from the weighted average of all the variances (not standard deviations) with regard to the corresponding degrees of freedom of each one (n_i-1). For this special case where n is the same (in our case, three) for all the measurements, the calculation is reduced to the corresponding arithmetic mean.

Finally, the LOD (limit of detection) was calculated for each quantified TAG, based on three times the baseline signal/noise ratio (S/N). This ratio was measured in four points close to the peak groups and the average was kept as a representative value. The LOQ (limit of quantification) was defined simply as about 10 times the S/N.

Validation. There are no reference materials commercially affordable including the TAG composition as a certified parameter. For this, just the subsequent method for calculating the FA composition has been validated (the estimation methodology is described in Appendix 1). Two external olive oil reference materials (see "Reagents and samples" section for details) were

analysed five times each, by the HTGC-MS method, and then the FA quantification methodology was applied.

3. Results and discussion

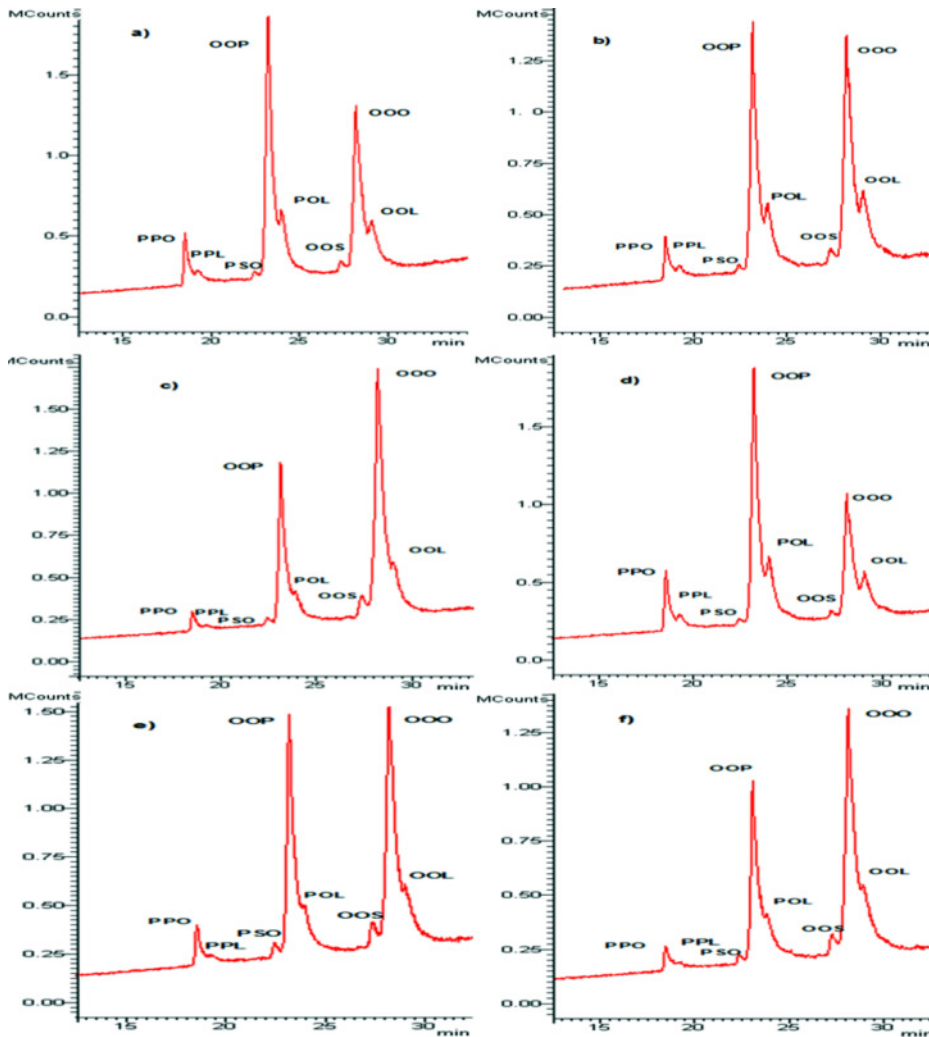


Figura 1. HTGC-MS triacylglycerol chromatograms of six representative Spanish monovarietal olive oils. (a) Arbequina, (b) Blanqueta, (c) Cornicabra, (d) Empeltre, (e) Picual, and (f) Manzanilla.

Eight major TAG species were identified in all the studied oil samples. These identified TAGs were PPO, PPL, PSO, OOP, POL, OOS, OOO and OOL (see Fig. 1). The TAGs are separated according to their degree of insaturation and molecular weight simultaneously, giving a much more detailed picture of the TAG composition in comparison to the profile obtained by a conventional nonpolar column [35].

A typical chromatogram of the TAG calibration standard obtained is shown in Fig. 2. This sample contained the same chromatographic profile as that of the olive oil and it was used in order to calculate the calibration factors, $(CFi)_{std}$.

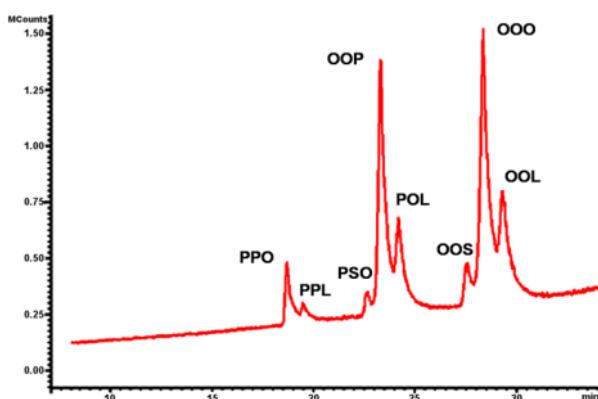


Figure 2. HTGC-MS chromatogram of the calibration mixture of TAG standards.

As expected, in the bulk of samples the OOO and the OOP composition were the most abundant. Furthermore, the obtained TAGs profile demonstrated significant variations among the samples coming from different varieties of olive oils. The samples which match with the varieties named as "Manzanilla", "Picudo" and "Cornicabra" had especially high OOO fractions (50.2, 49.0 and 47.5%, respectively). On the other hand, the sample "Empeltre" showed the lowest OOO profile (27.1%) followed by the "Arbequina" one (29.4%). TAGs were quite dominant among the compositions with both OOO and OOP fractions, followed by the OOL and

POL compositions. However the lowest TAG composition was PPL ranging between 0.6 and 2.2% for the samples of "Cornicabra" and "Arbequina", respectively (see Table 1). Table 1 also shows the precision of the method for each TAG, the calibration factors and the limit of detections. The precision results are shown in percentage points. An averaged value of 0.5% and 1.5% for limit of detection and limit of quantification, respectively, could be considered as representative for all TAGs.

Table 1. Relative TAG composition of extra virgin olive oils from ten Spanish varieties found by HTGC-(IT)MS. Calibration factors used for quantification, precision and detection limits of the method for each TAG.

Olive oil variety	TAG Composition (%)							
	PPO	PPL*	PSO*	OOP	POL	OOS	OOO	OOL
Arbequina	5.7	2.2	1.4	34.5	14.4	3.0	29.4	11.4
Cornicabra	2.2	0.6	1.5	19.8	6.4	8.0	47.5	14.1
Empeltre	8.2	1.9	1.6	38.1	6.7	3.4	27.0	13.0
Picual	3.9	0.9	1.9	26.0	7.3	7.6	40.5	11.8
Hojiblanca	4.0	1.1	2.3	23.2	8.6	8.1	43.7	9.1
Manzanilla	2.0	0.7	1.7	22.3	7.7	7.1	50.1	8.5
Blanqueta	4.5	1.6	0.9	28.8	13.4	3.1	37.8	9.9
Verdial	2.7	0.9	1.8	23.2	7.5	8.0	45.2	10.7
Picudo	2.4	0.9	1.3	22.2	8.1	7.0	49.0	9.2
Lechín	4.4	1.1	2.2	22.2	7.1	7.3	42.2	13.7
FIGURES OF MERITS								
calibration factors ($\times 10^7$)	0.80	1.69	1.30	0.92	2.33	2.48	1.49	2.54
precision (s_p , %)	0.21	0.11	0.13	1.00	0.43	0.51	1.97	0.62
detection limits (%)	0.2	0.5	0.4	0.3	0.6	0.7	0.4	0.7

* Some values should be considered as approximated because they could be less than the corresponding quantification limit ($LOQ \approx 3,3 \times LOD$).

All these results clearly point out that HTGC-MS could easily fingerprint the TAG profile in a fast and easy way without performing derivatization procedures.

Finally, the results of validation with two external olive oil reference materials are shown in Table 2. In addition, in spite of being a semi-quantitative methodology, a good correspondence between the obtained value by this method and the value from the external reference material could be observed (less than 3percentage points).

Table 2. Comparison of the major FA obtained for the two olive oils external reference material with the reference values.

Fatty Acid	FA Composition (%)			
	EVOO A		EVOO B	
	Found	Reference	Found	Reference
P (C16:0) ^a	12.0	10.8	12.9	11.2
S (C18:0) ^b	3.1	3.5	2.5	3.1
O (C18:1) ^c	74.6	77.7	74.6	77.3
L (C18:2) ^d	5.9	5.6	5.9	5.8

^a palmitic acid; ^b stearic acid; ^c oleic acid; ^d linoleic acid.

Some differences were observed in the fatty acid profiles obtained. There might be a number of reasons for this, first of all, the methodology used to calculate the TAG composition by HTGC-MS. Moreover, only four major fatty acids of the olive oil were considered, this was because TAGs containing other, less abundant, fatty acids were either not identified or difficult to distinguish. The palmitic and oleic acid seems to vary a bit from the certified value, this might be due to there being another TAG (PoOO, 1-palmitoleic-2,3-olein) co-eluted with the POL [32] that it was not possible to quantify due to there being no standard commercially available and the peak of POL being much larger than the one for the PoOO. However calculations with the presence of this TAG were estimated taking into account the PoOO mass

fraction supplied in the reference materials and then, the obtained FA values were close to those of the certificate. No differences larger than 1.5 percentage points were found (results are shown in Appendix 1).

4. Conclusion

In conclusion, the HTGC proposed method in this paper, without any previous sample treatment or clean-up, has been verified to offer a valid analytical method to characterise the TAG profile of olive oils. In addition, implicitly, the FA profile has been calculated with an alternative approach to the conventional FAME gas chromatography method which is reliable and fast for determining the FA profiles without any derivatization in extra virgin olive oils.

Moreover, as fatty acids are not found unbounded in oils, a method enabling determination of the intact TAGs, rather than from the derivatization, has great value. Finally, this method has been applied in ten different Spanish monovarietal extra virgin olive oils and it has been validated with good results.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, project P07-FQM-02667, and Consejería de Agricultura y Pesca) for financial assistance. This work has also been partially supported by European Regional Development Funds (ERDF). One of the authors, C.R.S., is also grateful to the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa) for the personal postgraduate grant.

5. Complementary material: Estimation of FA profile

The fatty acid compositional profile was estimated with a spreadsheet which permits to calculate the mass fraction of each FA from the mass fraction of each TAG previously measured. This was calculated by applying a mass balance and summarizing all the FA mass fractions found in each TAG. A total of the contributions of the different TAGs results in the fraction of the specific fatty acid. For example, if the mole fraction of oleic acid (O) in 1,2-olein-3-palmitin (OOP) is 2/3, and its abundance in the sample of "Picual" variety is 25.99% (w/w) (Table A1), therefore the contribution of this TAG to the O mass fraction in this sample will be $2 \times 25.99 \times (M_O / M_{OOP})$, which is 17.18% (w/w); M_O and M_{OOP} are the molecular mass of O and OOP respectively.

Table A1. Fatty acid profile of extra virgin olive oils from ten Spanish olive oil varieties.

Olive oil variety	FA Composition (%)			
	P (C16:0) ^a	S (C18:0) ^b	O (C18:1) ^c	L (C18:2) ^d
Arbequina	21.4	1.5	67.8	9.3
Cornicabra	11.1	3.2	78.8	7.1
Empeltre	22.2	1.7	68.9	7.2
Picual	15.0	3.2	75.2	6.7
Hojiblanca	14.8	3.5	75.5	6.2
Manzanilla	12.3	2.9	79.1	5.6
Blanqueta	18.5	1.3	71.9	8.3
Verdial	13.2	3.3	77.2	6.4
Picudo	12.7	2.8	78.5	6.1
Lechín	14.1	3.1	75.5	7.3

^a palmitic acid; ^b stearic acid; ^c oleic acid; ^d linoleic acid.

A similar estimation methodology has been also applied by Chapagain and Wiesman [36], however an improvement has been added, by introducing the molecular weights of each FA or TAG in the calculations. This semi-quantitative methodology would be just valid for virgin olive oil (where the sum of the total contents of free fatty acids plus waxes have to be smaller than 1%) because other FA sources (free FA, waxes) are not being considered and the results are only obtained from the bonded FAs as TAGs.

The next aspect regards to the determination of the FAs in the olive oils from the TAG compositional profile. The major FAs (on a percent basis larger than 1%) from the ten monovarietal extra virgin olive oils are shown in Table A1.

All oil samples demonstrated typical fatty acids profiles. As expected, oleic acid (18:1) was the most dominant fatty acid by far, followed by palmitic (16:0) and linoleic acid (C18:2). However, significant variations were found among the different varieties of extra virgin olive oil, in all FAs. The highest level of oleic acid was found in the sample matching to "Manzanilla" (77.14%) and the lowest in the "Arbequina" (67.82%) one. Moreover, the highest level of palmitic acid was found in the "Empeltre" sample (22.22%) and the lowest in the "Cornicabra" (11.05%) one. Nevertheless, the sample corresponding to "Blanqueta" showed the lowest level in stearic acid (1.33%) and the "Hojiblanca" one the highest level (3.48%). These results shows that the compositional distribution of fatty acids of these oil samples are within the normal range expected for olive oil as defined by IOOC standard [37], and EU regulation [38].

Next, in the tables A2 and A3, the obtained results of the two external reference materials are shown. It has been taking into account the TAG PoOO and the mass fraction of POL has been recalculated, since they both might be co-eluted, and consequently the percentage of palmitic, linoleic and oleic acid may be different.

As it can be seen in both tables the value of palmitic and linoleic acid decrease due to the drop in the percentage of POL; on the other hand the mass fraction of oleic acid increase due to the existence of PoOO.

CAPÍTULO II

Table A2. Comparison of the major FA obtained for the olive oil external reference material (EVOO A) with the reference value. Calculations with PoOO are shown in the last row.

	% L	% O	% P	% S	% Po
Reference value	5.58	77.72	10.80	3.46	0.88
Initial obtained value	5.9	74.6	12.0	3.1	-
Recalculated with PoOO	5.0	76.3	11.1	3.1	0.9

Table A3. Comparison of the major FA obtained for the olive oil external reference material (EVOO B) with the reference value. Calculations with PoOO are shown in the last row.

	% L	% O	% P	% S	% Po
Reference value	5.80	77.33	11.23	3.12	0.88
Initial obtained value	5.9	74.6	12.9	2.5	-
Recalculated with PoOO	4.9	75.9	12.0	2.6	0.9

Reference

- 1 G. Petrakis, in D. Boskou, *Olive Oil: Chemistry and Technology*, 2nd. ed. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 2006, pp. 191-223.
- 2 A. Bendini, L. Cerretani, A. Carrasco Pancorbo, A.M. Gómez Caravaca, A. Segura Carretero, A. Fernandez Gutierrez, G. Lercker, *Molecules* 2007, 12, 1679-1719
- 3 L. Di Giovacchino, S. Sestili, D. Di Vincenzo, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002, 104, 587-601.
- 4 L. Cerretani, A. Bendini, A. Del Caro, A. Piga, V. Vacca, M.F. Caboni, T Gallina Toschi, *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 222, 354-361.
- 5 N.K. Andrikopoulos, *Food Rev. Int.* 2002, 18, 71-102.

- 6 S. Vecchio, L. Cerretani, A. Bendini, E. Chiavaro, *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 4793-4800.
- 7 F.D. Gunstone, in F.D. Gunstone, *Food Technology: Composition, Properties and Uses*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2002, pp. 1-17.
- 8 R. Aparicio, R. Aparicio-Ruiz, *J. Chromatogr. A*, 2000, 881, 93-104.
- 9 E. Christopouloua, M. Lazarakia, M. Komaitisb, K. Kaselimisb, *Food Chem.* 2004, 84, 463-474.
- 10 J.R. Park, D-S. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* 2003, 24, 527-530.
- 11 M. Buchgraber, F. Ulberth, H. Emons, E. Anklam, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2006, 106,621-648.
- 12 W.W. Christie, X. Han, *Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*, The Oily Press, Bridgwater, 2010.
- 13 N.K. Andrikopoulos, *Food Rev. Int.* 2002, 18, 71-102.
- 14 N.K. Andrikopoulos, A. Chiou, A. Mylona, *Food Rev. Int.* 2004, 20, 389-405.
- 15 D.L. Compton, J.A. Laszlo, M.A. Berhow, *J. AOCS* 2006, 83, 753-758.
- 16 F.M. Haddada, H. Manai, I. Oueslati, D. Daoud, J. Sanchez, E. Osorio M. Zarrouk, *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 10941-10946.
- 17 COMMISSION REGULATION (EC) No 2472/97 amending Commission Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive residue oil and on the relevant methods of analysis, *Off. J. Eur. Union*, 1997, L 341/25-39.
- 18 S.C. Cunha, M.B.P.P. Oliveira, *Food Chem.* 2006, 95, 518-524.
- 19 M. Lisa, F. Lynen, M. Holcapek, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 2007, 1176, 135-142.
- 20 P. de la Mata Espinosa, J.M. Bosque Sendra, L. Cuadros Rodríguez, *Food Anal. Meth.* 2011, 4,574-581.
- 21 R. Tarandjiiska, I. Marekov, B. Nikolova-Damyanova, B.S. Amidzhin, *J. Sci. Food Agric.* 1996, 72,403-410.
- 22 Y. Funada, Y. Hirada, *J. Chromatogr. A* 1998, 800,317-325.
- 23 W.C. Byrdwell, in: W.C. Byrdwell, *Modern Methods for Lipid Analysis by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Related Techniques*, AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 2005
- 24 H. Leskinen, J.P. Suomela, H. Kallio, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21, 2361-2373.
- 25 K. Grob Jr., *J. Chromatogr.* 1979, 178, 387-392.
- 26 E. Geeraert, P. Sandra, *J.High Resol. Chromatog. Chromatogr Commun.* 1985, 8, 415-422.
- 27 M.L. Lee, J.C. Kuei, N.W. Adams, B.L. Tarbel, M. Nishioka, B.A. Jones, J.S. Bradshaw, *J.Chromatogr.* 1984, 302, 303-318.
- 28 N. Frega, F. Bocci, E. Lercker, *Ital. Food Sci.* 1990, 4, 257-264.
- 29 N.R.A. Filho, E. Carrilho, E.M. Langas, *J. AOCS*, 1993, 70, 1051-1053.
- 30 M.T. Rodríguez Estrada, N. Frega, E. Lercker, *Grasas Aceites.* 2002, 53, 76-83.
- 31 R.P. Evershed, M.C. Prescott, L.J. Goad, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 49, 345-347.

CAPÍTULO II

- 32 C. Ruiz Samblás, A. González Casado, L. Cuadros Rodríguez, F.P. Rodríguez García, *Talanta* 2010, 83, 25-30.
- 33 L. Cuadros Rodríguez, M.G. Bagur González, M. Sánchez Viñas, A. González Casado, A.M. Gómez Sáez, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1158, 33-46.
- 34 A.D. McNaught, A. Wilkinson, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology - The Gold Book*, 2nd ed., Blackwell Science, Oxford, UK, 1997.
- 35 A.S. Huang, L.R. Robinson, L.G. Gursky, A. Pidel, G. Delano, B.J. Softly, G.J. Templeman, J.W. Finley, G.A. Leveille, *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 1834-1844.
- 36 P. Bishnu, Z. Wiesman, *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1135-1142.
- 37 COI/T.15/NC no.3/Rev.1. Trade standard applying to olive oil and olive-pomace oils. International Olive Oil Council (IOOC), 2003.
- 38 COMMISSION REGULATION (EC) No 702/2007 amending Commission Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive residue oil and on the relevant methods of analysis, *Off. J. Eur. Union*, 2007, L 161/11-27.

7. Apéndice

Información adicional sobre aspectos relativos a la calibración y cuantificación de TAGs no publicados en el artículo n° 4.

En el apartado anterior se aplica una metodología de cuantificación que es poco usual ya que se utiliza un único patrón de calibración externa para el cálculo de los factores de calibración de cada uno de los triglicéridos. Estos factores de calibración han sido aplicados a los valores de altura de pico de cada uno de los triglicéridos medidos sobre los cromatogramas de las diferentes muestras de aceite de oliva analizadas.

A continuación se describe los pasos previos que se recorrieron para seleccionar dicha metodología de calibración y cuantificación.

Calibración externa multipunto: establecimiento de rectas de calibrado

Siguiendo la metodología tradicional, primeramente se realizaron rectas de calibrado independientes para cada triglicérido identificado, mediante la inyección en el cromatógrafo del mismo volumen de diferentes disoluciones de los patrones de estos triglicéridos de concentración creciente. Todos los TAGs fueron cromatografiados por triplicado para cada nivel.

A partir de los datos de altura de pico de cada uno de los TAGs para cada nivel de concentración, y aplicando la regresión por mínimos cuadrados, se ajustaron las correspondientes rectas de calibrado que fueron sometidas a la habitual validación estadística. En la figura 1 se muestran las diferentes rectas de calibrado obtenidas.

Sin embargo los resultados encontrados no fueron buenos ya que la linealidad mostrada era escasa, y además se encontraron valores significativos, tanto positivos como negativos, para la ordenada en el origen de difícil justificación.

CAPÍTULO II

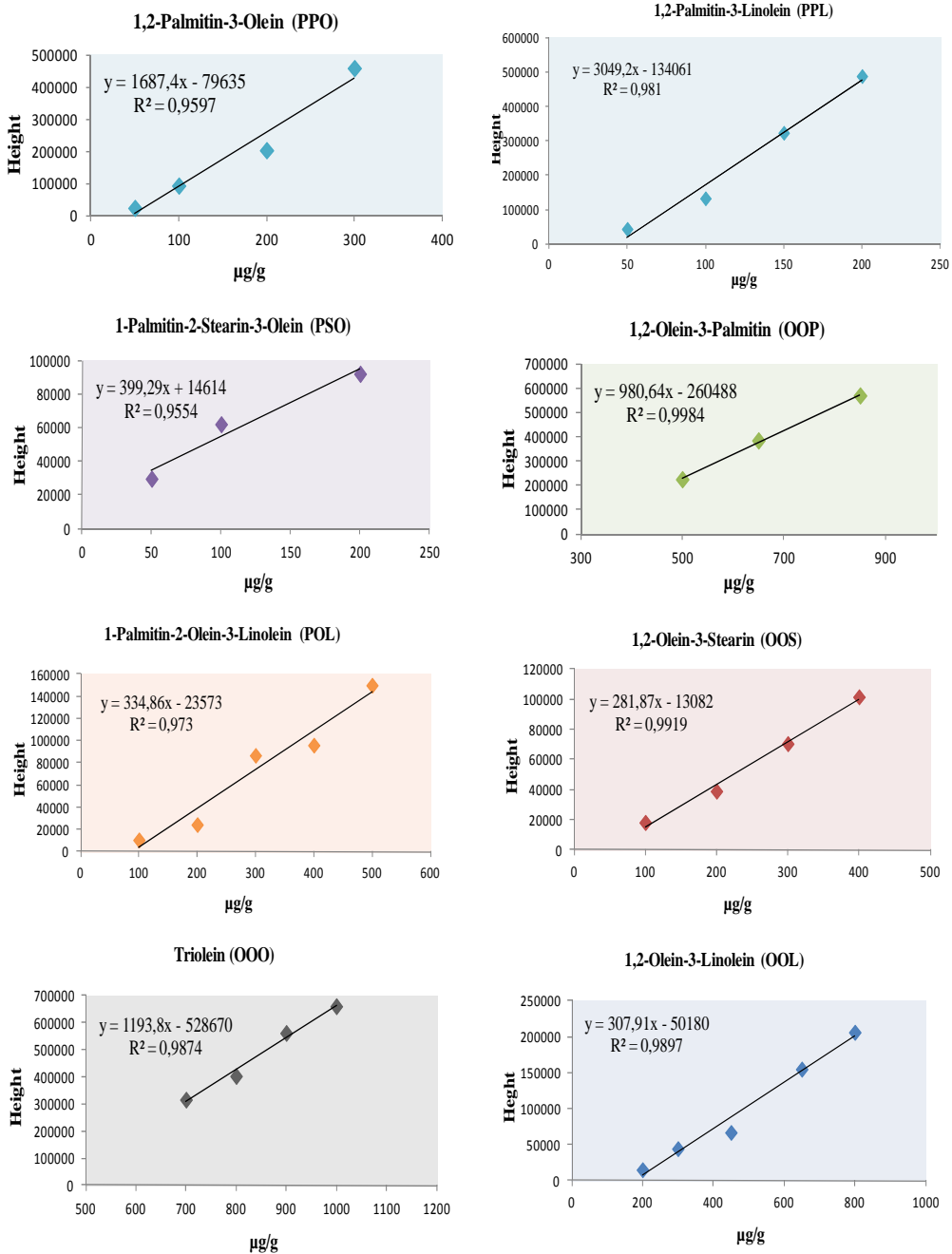


Figura 1. Rectas de calibración de los TAGs.

Posiblemente el procedimiento no estaba bajo control y estaba sometido a errores experimentales no caracterizados diferentes a los errores aleatorios, ya que éstos son minimizados si se llevan a cabo replicas del punto de calibración. Además, la correspondiente cuantificación tampoco dio los resultados esperados ya que utilizando una mezcla sintética de TAGs cuyos valores de concentración eran conocidos (material de referencia interno, tipo "matriz"), se obtuvieron errores de cuantificación significativos.

Teniendo en cuenta que esta metodología de calibración es preceptiva fundamentalmente cuando el rango esperado de analito o analitos en las muestras a ser analizadas es amplio, lo cual no es nuestro caso, y que además el establecimiento y control de diferentes rectas de calibrado de forma simultánea es un tarea bastante laboriosa, se opto por la opción de llevar intentar llevar a cabo una calibración externa con un único patrón multianalito.

Calibración externa en un punto utilizando un único patrón multianalito

Esta es una metodología de calibración muy poco utilizada en los laboratorios académicos, pero que demuestra su utilidad en análisis de rutina y es ampliamente recomendada en los métodos oficiales. Requiere disponer de un patrón externo que contenga todos los analitos a cuantificar en concentración conocida (a ser posible, incluyendo la incertidumbre) que se utilizará para establecer los factores de calibración (o factores de respuesta) de cada uno de los analitos, y que posteriormente se aplicarán a los resultados encontrados en el análisis de las muestras.

Para métodos analíticos multi-analito, como el caso de los TAGs, y una situación muy común cuando se aplican técnicas separativas, el patrón de calibración suele estar constituido por una mezcla conteniendo los diferentes analitos en las cantidades adecuadas. El "multi-patrón" es apropiado cuando el número de analitos lo permite, se puede medir y se dispone de los patrones necesarios. Además. Como se verá seguidamente, la validez de esta metodología incrementa cuando la concentración de cada analito en el patrón es similar a la concentración esperada en la muestra.

Los analitos incluidos en el patrón idealmente deben responder al proceso de medida de la misma forma que lo hacen en una muestra original. Por tanto, las diferencias entre la matriz del patrón (usualmente disolvente) y la matriz de la muestra no deben generar diferencia en el valor del factor de calibración ya que este hecho podría introducir un error sistemático cuando estos efectos ("efecto matriz") son ignorados. El no cumplimiento de esta premisa constituye una de las principales limitaciones de la calibración externa. Sin embargo, en nuestro caso, como el multi-patrón estaba compuesto por analitos (TAG), los cuales en sí mismos componen el 98% de la matriz (aceite de oliva), esta suposición es correcta.

Además, en algunos casos, es cierto que el pretratamiento de la muestra puede implicar algunas operaciones que provoquen pérdida del analito. En esos casos, el patrón debe ser sometido al mismo pretratamiento que la muestra, para que la posible pérdida ocurra de igual manera en los dos, compensando así las posibles fuentes de errores sistemáticos. Sin embargo esta limitación tampoco nos afectaba ya que no existe un tratamiento previo del aceite antes de su análisis, aparte de la propia disolución del mismo.

Y por último existe una tercera limitación que condiciona la elección de las concentraciones de cada uno de los analitos en el patrón. Idealmente el factor de calibración propio de cada analito deberá ser estable y constante, e independiente de la concentración del propio analito, al menos en el intervalo de aplicación del método analítico. Cuando esta condición se cumple, se suele elegir un patrón de calibración que contenga todos los analitos en la misma concentración y ajustados a un valor medio en relación con las muestras a analizar. En caso contrario, es necesario preparar el patrón de forma que las concentraciones de cada analito sean lo más parecido posible a las que dichos analitos tendrán en las muestras originales. Obviamente esta metodología sólo es aplicable cuando las muestras a analizar mantienen una composición bastante homogénea en relación a los analitos a cuantificar.

Sin embargo, como ha quedado establecido en el apartado anterior, el hecho de que las rectas de calibrado presentaran valores significativos de la ordenada en el origen es señal de que cada uno de los factores de calibración

son dependientes de la concentración del analito considerado [16,17,18]. Esto queda más claro a continuación.

Cuando llevamos a cabo una calibración externa multipunto, la función lineal estimada por regresión sería de la forma:

$$(y_i)_{std} = a + b \times (x_i)_{std}$$

donde el subíndice "std" se refiere al patrón de cada TAG, a es la ordenada en el origen de la recta de calibrado, cuando no hay patrón (señal de blanco), y b la sensibilidad del sistema de medida. Aquí el factor de respuesta vendría dado por:

$$(y_i)_{std} = \left(\frac{a}{(x_i)_{std}} + b \right) (x_i)_{std}$$

donde el factor de calibración se calcularía de la siguiente forma:

$$FC = \frac{1}{FR} = \frac{1}{\left(\frac{a}{(x_i)_{std}} + b \right)} = \frac{(x_i)_{std}}{a + b(x_i)_{std}}$$

Con esta ecuación se comprueba que el factor de calibración depende de la ordenada en el origen. Sólo si $a \approx 0$, el factor de calibración permanece constante; dependerá únicamente de la inversa de la sensibilidad, y será independiente de la concentración de analito, $(x_i)_{std}$. Este hecho es crucial para evitar errores a la hora de seleccionar estrategias de cuantificación.

-
- 16 L. Cuadros Rodriguez, L. Gámiz Garcia, E.M. Almansa López, J.M. Bosque Sendra. Calibration in chemical measurements processes. II. A methodological approach, Trends in Analytical Chemistry, 2001, 20,620-636.
 - 17 L. Cuadros Rodriguez, A. González Casado, M. Gracia Bagur, M. Sánchez Viñas, A.M. González Sáez. En: A. Fernández Gutiérrez, L.F. Capitán Vallvey, J.L. Vilchez Quero (Eds.). Investigación Actual en la Escuela Analítica de Granada. Libro Homenaje al Profesor Don Fermín Capitán. Editorial Universidad de Granada, Granada (España), 2007, pp. 707-738.
 - 18 L. Cuadros Rodriguez, M. Gracia Bagur, M. Sánchez Viñas, A. González Casado, A.M. González Sáez. Principles of analytical calibration/ quantification for the separation sciences, Journal of Chromatography A, 2007, 1158, 33-46.

Sin embargo, como esto no ocurría en las rectas de calibrado calculadas, fue necesario calcular cada uno de los factores de calibración, para los patrones de TAGs, atendiendo a las concentraciones en que se encontraban en las muestras de aceite de oliva.

Teniendo todo lo anterior en cuenta, se explica a continuación, de forma más desarrollada, la metodología que se ha presentado en el artículo anterior.

Se preparó un multi-patrón hecho en el laboratorio, que incluía todos los TAGs identificados previamente en el aceite de oliva (PPL, PPO, PSO, OOP, POL, OOS, OOO, OOL). Este se elaboró añadiendo diferentes cantidades de cada patrón en cloroformo, según la proporción en la cual se encuentran en el aceite de oliva. La composición (en porcentaje peso/peso) de este calibrante fue 4 % de PPO, 2 % de PPL, 3 % de PSO, 20 % de OOP, 10% de POL, 10 % de OOS, 32 % de OOO and 19 % de OOL.

Durante el experimento, el calibrante se replicó dos veces, al comienzo, en medio y al final de la secuencia de inyecciones. Con esto la cuantificación se lleva a cabo usando el factor de calibración, $(CF_i)_{std}$, calculado de las seis replicas, la cantidad de analito patrón $(X_i)_{std}$ media y la señal analítica $(h_i)_{std}$, aplicando la expresión:

$$(CF_i)_{std} = \frac{(x_i)_{std}}{(y_i)_{std}}$$

donde el subíndice "i" se refiere al patrón de cada TAG. Donde la fracción másica de cada TAG "i" en la muestra $(X_i)_{spl}$, es calculada como:

$$(x_i)_{spl} = (y_i)_{spl} \cdot (CF_i)_{std}$$

El requerimiento de linealidad puede ser evitado cuando la cantidad de analito en el patrón de calibración es muy cercana a la de la muestra, lo cual es posible cuando se conocen las características de la muestra, como es nuestro caso.

La precisión del método se calculó mediante la "desviación estándar combinada". Se calcula sumando cuadráticamente las contribuciones, asociadas a todos los componentes y se usa cuando se llevan a cabo series de medidas donde la media puede variar entre muestras pero se considera que la precisión permanece igual.

$$s_p = \left(\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + \dots + (n_k - 1)s_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k} \right)^{1/2}$$

Los números 1, 2,...k se refieren a las diferentes series de medidas (diez variedades de aceite de oliva), en este caso s_p será una mejor estimación que las desviaciones estándar individuales $s_1, s_2, \dots s_k$. Para nuestro caso como n es el mismo para todas las medidas, la ecuación se reduce a:

$$s_p = \left(\frac{\sum_{i=1}^k s_i^2}{k} \right)^{1/2}$$

Siguiendo esta sistemática se ha conseguido desarrollar un método sencillo y fiable para la cuantificación del perfil de TAGS en aceite de oliva, así como indirectamente del perfil de ácidos grasos.

8. Discusión

A la vista de los resultados obtenidos, se pone de manifiesto la demostrada validez de la cromatografía de gases a alta temperatura en el análisis de triglicéridos frente a la cromatografía de líquidos. Ésta ha demostrado ser una técnica perfectamente válida para poder desarrollar un método tradicional de calibración y cuantificación de TAGs en aceites vegetales, aunque este no era el objetivo principal de esta Tesis.

Conjuntamente, tras la extensa búsqueda bibliográfica realizada para la escritura del *review*, se ha observado como esta técnica ha sido muy utilizada también a lo largo de la historia, para múltiples aplicaciones en productos alimenticios. Por ejemplo en productos lácteos está muy establecido, mediante legislación, el uso de cromatografía gaseosa para su análisis; del mismo modo en grasas y aceites su uso está aumentando viendo los buenos resultados en el área de autenticación.

Por otro lado, en relación al detector utilizado, el espectrómetro de masas; las dificultades técnicas que se encontraron al comienzo de este trabajo, por poseer una trampa de iones como analizador, que producía mucha fragmentación de los TAGs, reagrupaciones de los fragmentos, muy similar entre sí y además impedía su comparación con los espectros obtenidos con los de la librería, por ser estos últimos obtenidos mediante diferente analizador, han sido superadas con resultados satisfactorios mediante la utilización de "ión seleccionado".

En el siguiente capítulo, con ayuda de herramientas quimiométricas, se pretende proponer nuevas aplicaciones para la identificación y clasificación de variedades de aceite de oliva virgen extra, así como de categorías, atendiendo a sus perfiles de triglicéridos y en su caso, de volátiles, pero sin un paso previo de calibración y/o cuantificación, es decir, usando toda la información que nos proporciona el cromatograma completo, lo que se conoce como "huella dactilar" ("fingerprinting").

Comunicaciones a Congresos derivadas de este capítulo

- ◆ C. Ruiz-Samblás, A. González-Casado, L. Cuadros Rodríguez, F.P. Rodríguez García. *Análisis del perfil de triglicéridos en el aceite de oliva mediante cromatografía de gases a alta temperatura acoplada a espectrometría de masas en modo SIM*. XII Reunión del grupo regional andaluz de la sociedad española de química Analítica (GRASEQA 2010). Póster.
- ◆ C. Ruiz-Samblás, L. Cuadros-Rodríguez, A. González-Casado, F.P. Rodríguez-García. *Triacylglycerol and fatty acid profiles characterization in vegetables oils by High Temperature GC-(IT)MS*. 7th Euro Fed Lipid Congress, 2009. Póster.
- ◆ C. Ruiz Samblás, A. González Casado, L. Cuadros Rodríguez, F.P. Rodríguez García. *Caracterización del perfil de triglicéridos en aceite de oliva mediante GC-FID a alta temperatura utilizando columnas capilares de diferente polaridad*. XIV Feria Internacional del aceite de oliva e industrias afines (XIVEXPOLIVA, 2009). Póster.
- ◆ A.P. de la Mata Espinosa, E. Pérez Castaño, C. Ruiz Samblás, L. Cuadros Rodríguez, D. Gázquez Evangelista, A. González Casado. *Identification and quantification of TAGs in olive oil by high-temperature GC-FID and GC-IT/MS*. 12^{as} Jornadas de Análisis Instrumental (JAI, 2008). Póster.

ANEXO:

**Procedimiento para la Verificación y
Mantenimiento del equipo de Cromatografía de Gases
con Detector de Espectrometría de Masas (GC-MS)**



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 1 de 25

Procedimiento para la verificación y mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)

DISTRIBUCIÓN:	Esta instrucción técnica se distribuye a todos los miembros del grupo de investigación AnAMA (FQM-232).
Número de copias:	Sin restricción.

(*)	Nombre	Fecha	Firma
Elaborado por:	Cristina Ruiz Samblás	30/03/09	
Revisado y aprobado por:	Antonio González Casado		

* Este procedimiento ha sido elaborado en el marco del proyecto de investigación QuOLEO, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), antes Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), y la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (CICE) de la Junta de Andalucía.

CAPÍTULO II



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 2 de 25

CONTROL DE REVISIONES (HISTÓRICO)

Nº REV	FECHA	NATURALEZA DE LAS MODIFICACIONES
0.0	03 marzo 2009	Primera edición del Procedimiento
1.0	16 septiembre 2009	1) Cambios en el título del procedimiento. Algunos cambios menores de formato. 2) Se han añadido dos tablas como anexos al final del procedimiento para el registro de datos de las verificaciones de fugas en el inyector y ruido del detector.

CAPÍTULO II



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 3 de 25

ÍNDICE

	Página
1. Objeto	4
2. Campo de Aplicación	4
3. Referencias	4
4. Definiciones	5
5. Generalidades	5
5.1. Fundamentos	5
5.2. Servicios	7
5.3. Equipos	7
5.4. Personal	8
5.5. Precauciones de seguridad	8
6. Operaciones Generales	8
6.1. Apagar el MS	9
6.2. Conexión del MS	9
6.3. Mover el 4000 MS del 3800 GC	10
6.4. Aislar el 4000 MS	10
7. Operaciones de Verificación	11
7.1. Operaciones de verificación del cromatógrafo de gases	11
7.2. Operaciones de verificación del espectrómetro de masas	14
8. Operaciones de Mantenimiento	16
8.1. Operaciones de mantenimiento del cromatógrafo de gases	16
8.2. Operaciones de mantenimiento del espectrómetro de masas	20
8.3. Trampa de iones	22
8.4. Ionización interna	24
8.5. Detector	25



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 4 de 25

1. OBJETO

El documento que se presenta a continuación pretende proporcionar las directrices para llevar a cabo el proceso de verificación y mantenimiento de un equipo de un equipo de cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas (GC-MS) y poder conseguir así resultados que aseguren la conformidad del sistema con los requisitos exigidos por un procedimiento analítico.

Este procedimiento describe las operaciones de verificación y mantenimiento, tanto diario como periódico, que hay que hacer al equipo (GC 3800-MS 4000 VARIAN) para así asegurar su buen funcionamiento.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

El equipo GC-MS de VARIAN está compuesto por un cromatógrafo de gases GC 3800 y por un detector de masas MS 4000. El cromatógrafo de gases VARIAN CP 3800 está equipado con un inyector capilar VARIAN 1079 (presenta cinco modos de inyección: SPLIT/SPLITLESS isoterma, SPLITLESS con programación de temperatura, ON COLUMN con programación de temperatura (PTV) y con grandes volúmenes) y columna Rtx-65TG (30 m*0.25 mm I.D*0.1µm).

Los componentes principales del espectrómetro de masas son: trampa de iones, para operar mediante fuente de ionización interna (dos filamentos prealineados y seleccionables mediante software para operar en impacto electrónico, (EI); analizador trampa de iones, de sencillo mantenimiento, con electrodos "Silchrome" ultra inertes para análisis de trazas; detector con dinodo de alta energía (HED) de +/- 10 KV para aceleración de iones y electromultiplicador (EM); sistema de alto vacío (bomba turbomolecular y rotatoria); línea de transferencia directa con calentamiento hasta 350 °C y sistema de bayoneta que permite ser desmontada por el propio usuario mediante simple giro, sin necesidad de herramientas.

El mantenimiento del GC-MS es una tarea importante a realizar por parte del usuario ya que los materiales sufren deterioro como consecuencia del uso y necesitan cuidados frecuentes. Para las tareas electrónicas del equipo es aconsejable que lo lleve a cabo un técnico especializado.

Esta instrucción técnica sólo se aplica a este equipo "GC 3800-MS 4000 VARIAN".

3. REFERENCIAS

- *Hardware Operation Manual*. Varian, Inc, U.S.A, 2004-2007.
- *Qualification of GC Equipment. PA/PH/OMCL (06) 86 DEF - OMCL Guideline on Qualification of GC equipment (Annex 2), 2006.*

CAPÍTULO II



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 5 de 25

4. DEFINICIONES

- o **Verificación:** Confirmación por examen y aportación de evidencias objetivas de que un determinado equipo cumple los requisitos especificados.
- o **Mantenimiento:** Conjunto de operaciones y cuidados necesarios para que instalaciones, edificios, industrias, etc., puedan seguir funcionando adecuadamente.

5. GENERALIDADES

5.1. FUNDAMENTO

La **cromatografía de gases** es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. En la GC, la retención de los analitos en la fase estacionaria, se produce mediante diferentes mecanismos, el que se emplea más en la actualidad es el basado en procesos de adsorción. La GC se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna, un horno, y el detector.

En la figura 1 se representa un diagrama de los componentes del equipo del equipo.

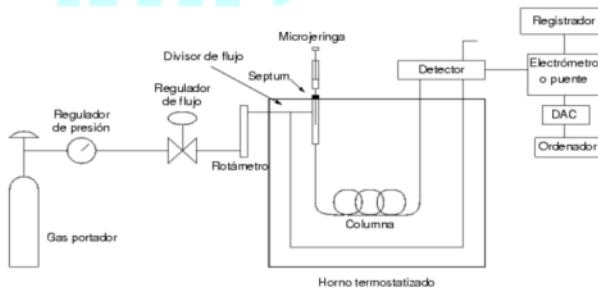


Figura 1. Diagrama de un cromatógrafo de gases.

El gas portador cumple básicamente dos propósitos: Transportar los componentes de la muestra, y crear una matriz adecuada para el detector. La inyección de muestra es un apartado crítico, ya que se debe inyectar una cantidad adecuada, y debe introducirse de tal forma que sea rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida. El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna.

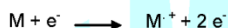


PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 6 de 25

La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medida de iones derivados de moléculas. Los datos se obtienen de forma espectral ya que la abundancia relativa de los fragmentos de masas de una muestra se registran como una serie de líneas o picos. Se basa en la separación a vacío de iones en fase gaseosa en función de su relación masa-carga (m/z).

La muestra que eluye de la columna se introduce en el MS por la interfase (transfer line). Esta entrada permite la entrada de muestra en cantidad suficiente sin perder o modificar significativamente el vacío dentro del espectrómetro de masas.

La muestra es sometida a un proceso de ionización por medio del cual las moléculas se rompen en fragmentos. El modo de ionización que presenta este equipo es mediante impacto electrónico (EI). La ionización ocurre empleando electrones de alta energía (70eV) que chocan con la molécula produciendo un ión molecular inestable que subsecuentemente se fragmenta.



Al llegar la muestra gaseosa a la fuente de ionización, las moléculas no colisionan entre sí debido al vacío (10⁻⁶ mbar). Las moléculas se encuentran con una cortina de electrones procedentes de un filamento incandescente (tungsteno), produciéndose por tanto impactos (interacción entre los e^- incidentes y las moléculas bombardeadas). Si la energía de los e^- procedentes del filamento es mayor al potencial de ionización de nuestras moléculas, al producirse el choque, éstas se ionizarán por emisión estimulada de un nuevo e^- generándose así los iones moleculares. Si el choque ha sido muy eficaz, la energía comunicada por el e^- será mayor a la necesaria para la ionización, quedando así el exceso de energía en forma de energía vibracional, lo que provoca la fragmentación del ión molecular por rotura de uno o varios enlaces.

En la figura 2 se muestra un esquema típico de un analizador de trampa de iones.

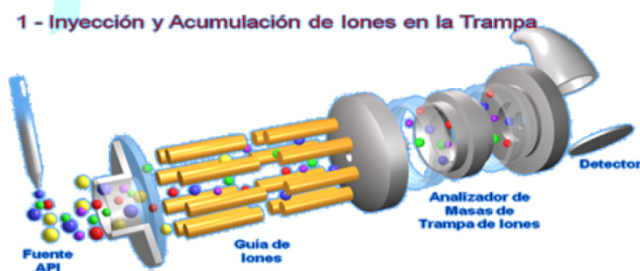


Figura 2. Esquema de una trampa de iones



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 7 de 25

Los fragmentos moleculares entran en la cámara del sistema separador donde se someten a la acción de diferentes campos. Esta cámara tiene que estar sometida a un vacío elevado para evitar los choques entre los fragmentos. Como sistema separador este equipo usa la trampa de iones.

Una trampa de iones es un dispositivo en el que los iones pueden ser confinados durante largos periodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos. Consiste en un electrodo anular y un par de electrodos colectores. Se aplica al electrodo anular un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados con tierra. 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. Con este sistema estabilizamos los iones de nuestro analito y los "atrapamos". El resto de iones sale de la trampa (se los lleva el vacío). Una vez que solo tengo los iones de mi analito los dejo que salgan hacia el detector.

5.2. SERVICIOS

Se requiere de un sistema de Alimentación Interrumpida (SAI). Es conveniente equipar la línea conectada al detector de MS, con un sistema de protección frente a caídas de la red no previstas, para evitar que el sistema arranque de nuevo, lo que con caídas sucesivas podría provocar averías.

Otro requisito imprescindible es la alimentación eléctrica que debe de ser con corriente monofásica, 200-260 V. Para el componente espectrómetro de masas requiere 6 A y para la bomba rotatoria 2 A.

Para el rendimiento del sistema GC-MS y evitar daños en componentes es necesario que la pureza de los gases sea de 99.9% y a una presión de 5 bares.

Todo esto junto con los requerimientos habituales en un laboratorio de análisis.

5.3. EQUIPOS

5.3.1. Aparatos y Materiales

- Cromatógrafo de gases con trampa de iones (IT/MS)
- Balanza analítica capaz de proporcionar medidas fiables en un intervalo de 0-300 g con una resolución mínima de 0,01 g.
- Material volumétrico calibrado (probeta, matraces, pipetas).
- Sonda de temperatura calibrada.
- Medidor de condiciones ambientales.
- Ultrasonidos
- Pipeta Pasteur
- Herramientas (Llave para la línea de transferencia 3/16", llave 5/16", llave 1,5 mm, destornillador y pinzas).

CAPÍTULO II



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 8 de 25

- Bastoncillo
- Guantes
- Papel de lija

5.3.2. Reactivos

- Metanol. Pureza mínima 99,9%, de calidad de análisis.
- Cloroformo calidad analítica
- Diclorometano. Pureza mínima 99,9%, de calidad de análisis.
- Agua purificada Ultrapura (Milli- Q, Millipore).

5.4. PERSONAL

Este procedimiento sólo puede ser llevado a cabo por personal debidamente calificado o autorizado para su realización.

5.5. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

Ninguno de los reactivos o disolventes empleados en este procedimiento muestra un riesgo/peligro especial en lo que se refiere a la salud y seguridad de los operadores.

El laboratorio es responsable de mantener un ambiente seguro del entorno de trabajo así como de disponer de un archivo con la información general de las regulaciones con respecto al uso seguro de los productos químicos enumerados en este procedimiento.

No obstante, se tomarán las precauciones habituales en un laboratorio de análisis para llevar a cabo el mantenimiento del equipo:

1. Utilizar guantes, bata de laboratorio.
2. Almacenar los residuos en lugares especializados para ello a través de un programa especial de desechos y no a través del sistema convencional.
3. Disponer de una superficie amplia y limpia para colocar piezas del equipo.

Hay que hacer verificaciones periódicas de temperatura y humedad relativa en el ambiente de trabajo así como de las líneas de gas y del filtro. No permitir que las líneas de gas se doblen o se pinchen. Mantenerlas alejadas de zonas de paso y de calor ó frío excesivo.

6. OPERACIONES GENERALES

A continuación se muestran una serie de operaciones necesarias para poder realizar el mantenimiento del equipo de MS así como algunas verificaciones.

CAPÍTULO II



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 9 de 25

6.1. APAGAR EL MS

1. Se selecciona el modulo 4000 MS desde SYSTEM CONTROL.
2. Se selecciona la tabla de diálogo de STARTUP/SHUTDOWN.
3. Se pincha sobre el botón SHUT DOWN. Las zonas calentadas empezarán a enfriarse y la velocidad de la bomba se reducirá gradualmente hasta 35%. Hay que esperar a que las zonas calentadas se enfrien $\leq 50^\circ$ C si se hace mantenimiento del equipo; si solamente es apagarlo basta con que la velocidad de la bomba sea del 35%.
4. Cuando SHUT DOWN se ha completado, se indicará en la ventana de mensajes (LOG WINDOW).
5. Se sale del programa SYSTEM CONTROL.
6. Se desconecta el 4000 MS.
7. Se desenchufa el cable de transmisión del 4000 MS en la parte posterior del instrumento.
8. Se desenchufa la bomba del 4000 MS.
9. Se abre la puerta del 4000 MS y se purga girando la válvula de purga en sentido contrario a las agujas del reloj. Se purga 10 minutos para que alcance un equilibrio la presión.
10. Se cierra la válvula de purga.

6.2. CONEXIÓN DEL MS

1. Se debe de asegurar que la llave de purga está cerrada.
2. Se comprueba que todos los cables están enchufados.
3. Se comprueba que la columna está instalada correctamente.
4. Se comprueba que la línea de transferencia está inmovilizada en su posición de funcionamiento.
5. Se enchufa el cable de transmisión del 4000 MS en la parte posterior del instrumento.
6. Se enchufa el cable de la bomba rotatoria para vacío en la parte posterior del 4000 MS.
7. Se pulsa ON en el interruptor que hay en la parte posterior.
8. Se abre el programa SYSTEM CONTROL. Automáticamente se activa el método C:\Varian\MS\4000Service\4000MS Int Service. mth.
9. Se selecciona la tabla de diálogo STARTUP/SHUTDOWN situada en el modulo 4000 MS.
10. Se comprueba el estado de vacío. Para ello se selecciona la tabla de DIAGNOSTICS en SYSTEM CONTROL desde el modulo 4000 MS. Los rangos de operación típicos son los indicados en la siguiente tabla:

SPEED	100%
CURRENT	200-300 mA
POWER	9-13 Walts
ION GAUGE PRESSURE	< 20 μ Torr
FORELINE LINE	< 50 mTorr

Al principio la bomba borbotea durante 10-20 seg., esto es normal.
 Si la velocidad de vuelta de la bomba no aumenta, puede haber un escape en el sistema.
 En esta tabla se hacen los tres test de diagnostico.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 10 de 25

11. En MANUAL CONTROL se ajusta los niveles de agua y aire, se ajusta el gas de calibración y se ajusta la rampa de RF si fuese necesario. Si la trampa tiene agua se debe de hacer un BAKEOUT.
12. Se hace un BAKEOUT para eliminar el agua y los contaminantes que pueda haber en el colector (MANIFOLD). Los pasos a seguir son:
Se selecciona la tabla de diálogo de TEMPERATURES.
Se selecciona BAKEOUT. Se indica: TIME BAKEOUT de 2-6 horas, TRAP a 250 °C, TRANSFER LINE a 350 °C y MANIFOLD a 120 °C. Estas temperaturas dependen de las condiciones en las que se esté trabajando con el equipo.
Se pulsa sobre el botón START BAKEOUT.
Cuando se ha realizado el BAKEOUT, se reestablece la temperatura del análisis en la trampa al menos 2 horas. La temperatura del colector debe estar entorno a 50 °C.
13. Se chequea de nuevo el aire y agua de la trampa de iones. Un mensaje indicará que los niveles de aire y agua son aceptables.
14. Se hace un AUTO TUNE.

6.3. MOVER EL 4000 MS DEL 3800 GC

Normalmente esto se lleva a cabo para aislar la trampa de iones porque presenta problemas.

1. Se apaga el horno.
2. Se abre la puerta del horno del GC.
3. Se asegura de que aproximadamente 30 cm del final del espectrómetro de masas de la columna capilar cuelga libremente.
4. Se comprueba que hay suficiente longitud de cables para mover el 4000 MS.
5. Se desliza con cuidado el 4000 MS del 3800 GC. La línea de transferencia (TRANSFER LINE) debe ser quitada.

6.4. AISLAR EL 4000 MS

Para aislar el 4000 MS se debe quitar la columna de la trampa de iones con el sistema apagado (ver apartado 6.1.) y se tapa la línea de transferencia con una férula sin agujero.

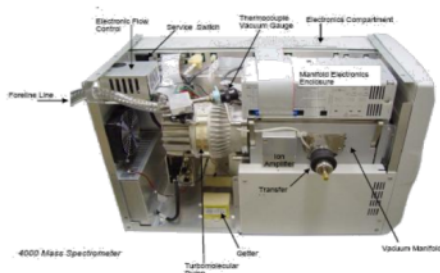


Figura 3. Modulo 4000 MS aislado

CAPÍTULO II



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 11 de 25

7. OPERACIONES DE VERIFICACIÓN

7.1 OPERACIONES DE VERIFICACIÓN DEL CROMATOGRFO DE GASES

En la siguiente tabla se proponen diferentes verificaciones basadas en aproximaciones generales, en las cuales muchos parámetros se comprueban al mismo tiempo en procedimientos combinados para obtener información del sistema completo (por ejemplo, la precisión del área de pico, la precisión del tiempo de retención, la reproducibilidad del programa de temperatura, etc.).

Sin embargo, también sería aceptable comprobar estos parámetros individualmente usando otros procedimientos.

Parte del equipo	Parámetro a comprobar	Límites de tolerancia
1. Sistema de inyección	<ul style="list-style-type: none"> • Test de fugas en el inyector. • Estabilidad y precisión de la presión/flujo • Reproducibilidad de la inyección: <ul style="list-style-type: none"> - Split - Splitless 	<ul style="list-style-type: none"> - Caída de presión ≤ 15 en 5 min. - Repetibilidad del tiempo de retención: DER $\leq 2.0\%$ - Precisión del área de pico: DER $\leq 3\%$
2. Horno	<ul style="list-style-type: none"> • Reproducibilidad de las características de temperatura del horno. 	La DER de cada TRR entre dos inyecciones consecutivas debe de ser $\leq 1.0\%$

7.1.1. VERIFICACIÓN DEL SISTEMA DE INYECCIÓN

- Test de fugas en el inyector: si no se especifica otra cosa por el fabricante, el test de fugas se lleva a cabo según el procedimiento que aparece en el manual o en el propio instrumento. También se podría utilizar el test que se describe a continuación:
 - desconectar la columna del inyector y cerrar la salida del inyector con una tuerca ciega.
 - Cerrar el septum de la purga.
 - Ajustar el flujo y el controlador de presión hasta el máximo valor posible.
 - Ajustar el controlador de flujo a cero.
 - Leer la presión después de un minuto y recoger el valor.
 - Recoger los valores obtenidos después de cinco minutos. (Anexo 1)

Se aceptará un límite de caída de presión inferior o igual a 15 KPa dentro de los cinco minutos.

- Estabilidad y precisión de la presión/flujo:
Una medida directa de estos parámetros no se considera práctica o necesaria, pero las condiciones óptimas de flujo/presión pueden ser verificadas por el test 1.
- Reproducibilidad de la inyección:
La verificación de este parámetro aparece en el test 1. Se debe llevar a cabo en ambos modos, split y splitless.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 12 de 25

• **Estabilidad y precisión de la temperatura del inyector:**

Debido al hecho de que la temperatura no puede ser medida sin abrir y modificar el sistema y debido a las dificultades de introducir una sonda dentro del módulo, la verificación de este parámetro se considera en el test 2.

TEST 1

El test 1 completo cubre los siguientes parámetros:

- Estabilidad y precisión del flujo/presión en el sistema de inyección: reproducibilidad del tiempo de retención.
- Reproducibilidad de la inyección: precisión del área de pico en modo split y splitless.

Modo Split:

Disolución: 1-octanol en 1 hexano 1% (v/v).

Parámetros:

Columna: SPB-1 (30mx0.32 mm IDx 0.25 µm)

Gas portador: He

Velocidad: 25cm/seg

Inyección: 1 µl

Temperatura del Inyector: 220 °C

Temperatura del horno: 100 °C isoterma.

Temperatura del detector: 250 °C

Tiempo: 8 min.

Tiempo de retención del 1-octanol: sobre 5 min.

Modo Splitless:

Disolución: 1-octanol en 1 hexano 1% (v/v).

Disolución test: diluir 10 ml de la disolución anterior con n-hexano a 100 ml (corresponde a 1µl/ml de 1-octanol en n-hexano).

Parámetros:

Columna: SPB-1 (30mx0.32 mm IDx 0.25 µm)

Gas portador: He

Velocidad: 30cm/seg

Inyección splitless: válvula de purga cerrada durante 2 min.

Inyección: 0.2µl de la disolución test

Temperatura del Inyector: 220°C

Temperatura del horno: Inicial 60°C durante 4min, 15C/min hasta 135°C, tiempo final 1min.

Temperatura del detector: 250 °C

Tiempo: 9.5 min.

Tiempo de retención del 1-octanol: sobre 8 min.

CAPÍTULO II



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 13 de 25

Método:

Realizar 6 inyecciones consecutivas de la disolución test y calcular la desviación estándar relativa (DER) de los tiempos de retención y de las áreas de los picos.

7.1.2. VERIFICACIÓN DEL HORNO

- Reproducibilidad de las características de temperatura del horno

Debido al hecho de que la temperatura no puede ser medida sin abrir ni modificar las condiciones del sistema y que incluso introduciendo una sonda dentro del horno, su localización no reflejará la temperatura las condiciones de temperatura real en todos los puntos, la verificación de este parámetro se cubre con el test 2.

TEST 2

El test 2 completo cubre los siguientes parámetros:

- *Precisión y estabilidad del Inyector y del horno*

Disolución:

- 0.035 ml 1-octanol.
- 0.035 ml 2-octanona.
- 0.035 ml 2,6-dimetil anilina.
- 0.035 ml n-tridecano
- 0.035 ml n-tetradecano.
- 35 mg n-eicosano
- Disuelto em 50 ml de diclorometano

Parámetros:

- Columna: SPB-1 (30mx0.32 mm IDx 0.25 µm)
- Gas portador: He
- Velocidad: 25cm/seg
- Split: 1:100
- Inyección: 1 µl
- Temperatura del Inyector: 220°C
- Temperatura del detector: 300°C
- Programa de gradiente: 60°C (4 min), 5°C/min, 270°C (3 min)

Método:

Inyectar la disolución dos veces y calcular los tiempos de retención relativos en relación al n-eicosano (TRR=1).

La siguiente tabla muestra aproximadamente los tiempos de retención relativos esperados:

Analito	1-octanol	2-octanona	2,6-dimetil anilina	n-tridecano	n-tetradecano
TRR	0.30	0.22	0.37	0.52	0.60



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 14 de 25

7.2 OPERACIONES DE VERIFICACIÓN DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS

Las principales operaciones de verificación del 4000 MS VARIAN se realizan desde el software del equipo a través de SYSTEM CONTROL (Abrir programa MS Worstation → 1^{er} icono (System Control)). El resto de operaciones se llevan a cabo directamente sobre el equipo.

Desde MANUAL CONTROL (MS Worstation → System Control → Modulo 4000 MS → Manual Control) se visualiza en tiempo real el estado de la trampa de iones cargando el método 4000 MS Int Service. mth, el cual contiene los parámetros necesarios para poder realizar las distintas operaciones de verificación.

7.2.1. Verificación del gas

El gas de calibración tiene las siguientes masas las cuales tienen que visualizarse a la hora de hacer la calibración: 28, 69, 131, 264, 414, 464, 501, 614.

En CALIBRATION GAS ADJUSTMENT se indica que comience al pinchar sobre el botón START. La barra indicadora del nivel del gas tiene que estar con un valor óptimo si es menos ó es más, se ajusta con la válvula que se aloja en la parte frontal del modulo 4000 MS y se gira en sentido contrario a las agujas del reloj, una vez ajustado se pulsa Done.

7.2.2. Ajustar rampa RF

En RF RAMP ADJUSTMENT, se determina el voltaje RF.

Para ajustar la RF se debe emplear el tornillo que se aloja en la parte frontal del modulo 4000 MS, para ello se gira hasta observar una pendiente y un valor de Highest lo más bajo posible. Se debe de hacer cuando esté en caliente el masas.

7.2.3. Aire / Agua

En todo momento la relación del aire-agua (masa 19/28) dentro de la trampa de iones, debe estar dentro de unos límites. En AIR/WATER CHECK se visualiza la relación entre la masa 19 y la 28 y se informa sobre la relación entre ambas y la cantidad de esta que hay en la trampa. Un mensaje indicará que está OK.

7.2.4. Temperaturas del equipo

En la ventana TEMPERATURES aparece el control y estado de diferentes zonas de temperatura:

TRAP TEMPERATURE.
 MANIFOLD TEMPERATURE.
 TRANSFERLINE TEMPERATURE.

CAPÍTULO II



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 15 de 25

Temp Zone	Min (°C)	Max (°C)	Specified Internal Configuration (°C)	Specified Bakeout (°C)
Ion Trap	50	270	250	250
Manifold	0	120	50	120
Transfer Line	0	350	350	350

7.2.5. Eliminación de agua

Para eliminar el contenido elevado de agua en la trampa de iones se debe de hacer desde la sección de BAKEOUT.

Se pincha sobre el botón START BAKEOUT para empezar el BAKEOUT.

Se hace BAKEOUT cuando el sistema se reanuda tras estar apagado y cuando se ha purgado.

En la sección de BAKEOUT, TRANSFER LINE no debe de superar 30 °C de la temperatura más alta que permita la columna ni debe de calentarse por encima de la temperatura máxima especificada para la columna capilar en el método creado.

Si se modifican cambios de las zonas de temperatura se pincha sobre el botón SAVE y si se quiere volver a las condiciones previas se pincha sobre el botón RESTORE.

7.2.6. Exactitud de la medida m/z

La exactitud de la medida m/z es comprobada mediante el modo de ionización usado para la calibración empleando diferentes componentes.

La información que debe contener debe de ser:

- valores de referencia m/z
- número de determinaciones llevadas a cabo.

7.2.7. Poder de resolución

El poder de resolución depende de la trampa de iones. Durante su evaluación, tiene que estar bastante claro:

- Rango testado m/z
- Modo de registro de la señal iónica
- Procesamiento de la señal iónica
- Expresión de los resultados



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 16 de 25

7.2.8. Vacío

Ver apartado 6.2.

7.2.9. Auto Tune

El AUTO TUNE es un proceso automático para optimizar el alcance del 4000 MS sobre el rango de masas.

Se hace cuando el instrumento se pone en marcha por primera vez.

Se debe de hacer cuando el sistema se ha apagado (SHUT DOWN), cuando el sistema se vuelve a poner en marcha y después de hacer un BAKEOUT.

7.2.10. Diagnostico

Desde la ventana de DIAGNOSTIC se hace el correspondiente test de diagnostico:

- Verificación del sistema.
- Generador de ondas
- Test de adquisición y scan.

8. OPERACIONES DE MANTENIMIENTO

8.1. OPERACIONES DE MANTENIMIENTO DEL CROMATOGRAFO DE GASES

8.1.1. MANTENIMIENTO DIARIO

- ✓ Comprobar que las tuercas de las columnas, inyectores y línea de transferencia están apretadas, ya que debido a las altas temperaturas tienden a aflojarse.
- ✓ Comprobar la presión de los gases en los manómetros instalados.

Es muy importante saber si al equipo GC-MS Varian le está pasando fase móvil a través de la columna. El valor que debe indicar es de aproximadamente 5 bares o entre 70-80 lb/in².

8.1.2. MANTENIMIENTO PERIÓDICO

8.1.2.1. Cambio del inserto del inyector 1079

Cambio del inserto del inyector frontal. Este inyector presenta EFC (caudal de flujo electrónico) frontal tipo 1 con presión de salida atmosférica. El inyector se cambiará mensualmente.

1. Enfriar el horno de columna y el inyector a 50°C.
2. Quitar la tapa del inyector y con ayuda de la llave de tuerca (P/N 03-908423-00) se quita la tuerca del inyector. La tuerca se coloca en una superficie limpia.
3. Con unas pinzas se quita el septum. Se quita el soporte del septum también con pinzas. Normalmente cuando se quita el soporte del septum, el inserto y la férula se quedan en el



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 17 de 25

soporte del septum. Si la férula y el inserto están en el cuerpo del inyector después de quitar la tuerca del soporte del septum se cogen con pinzas.

- Se quita la férula de grafito que se encuentra en el inserto/liner. Este puede ser limpiado y reutilizado.

Nota 1: Cuando el inserto se ha cambiado del orden de 3 o 4 veces entonces se reemplaza la férula de grafito de 5mm.

Nota 2: La férula de grafito se pone cuando el inserto que se va a colocar en el inyector es para trabajar en modo split/splitless. Si se emplea un inserto para on-column no se pone férula y el extremo de la columna se desliza con cuidado a través del inyector y se introduce en el inserto tipo on-column hasta donde permita (hasta llegar al estrechamiento).

A) Reemplazar inserto tipo split/splitless en el inyector

- Se usa la llave posicional del inserto/férula para colocar la férula de grafito de 5 mm dentro del inserto y en el soporte del septum.
- Se coloca el inserto con la férula y el soporte del septum en el inyector.
- Con las pinzas se coloca un nuevo septum sobre el soporte del septum.
- Se coloca la tuerca del inyector en el inyector y se aprieta con la mano hasta que se encuentre resistencia.
- Se condiciona el inserto colocando el inyector en modo split y purgando con el gas transportador (He) durante 30min a 300°C.

B) Limpieza de insertos

Para limpiar los insertos depende de la naturaleza de las muestras inyectadas.

- Enjuagar el inserto con disolvente o empapar el inserto con ácido caliente.
- Calentar el inserto en un vaso (500°C) o pasar el inserto por una llama de un mechero.
- Lavar con una mezcla 1:1:1 de metanol:cloruro de metileno:hexano en un baño ultrasónico durante 30-60 minutos, luego se seca el inserto en un horno.

Normalmente se limpian los insertos en un baño ultrasónico durante varios minutos con diclorometano. Después se secan los insertos al aire libre.

C) Limpieza del cuerpo del inyector

- Se pone el horno e inyector a $\leq 50^\circ\text{C}$. Se espera a que las zonas calentadas alcancen esa temperatura.
- Se apaga el horno desde el teclado del 3800 GC. En COLUMN OVEN se pincha sobre el botón TURN OVEN OFF.
- Se desenrosca la tuerca que une la columna con el inyector. Cuidado con la férula y la fase estacionaria de la columna.
- Se quita la tuerca del inyector.
- Se quita el septum.
- Se quita el soporte del septum con férula (si es en modo split/splitless) e inserto pegado.
- Se humedece con un bastoncillo de algodón con metanol el cuerpo del inyector.
- Se examina el final de la columna por si esta dañada.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 18 de 25

9. Se conecta la columna con la tuerca y férula al inyector.
10. Se comprueba si hay fuga de gases.
11. Se enciende el horno desde el panel de control del cromatógrafo de gases, en COLUMN OVEN al pulsar sobre el botón TURN OVEN ON

8.1.2.2. Reemplazar septum del inyector

Cambio del septum cada 50 o 100 inyecciones dependiendo del tipo de analito.

1. Se enfría el horno e inyector a $\leq 50^\circ\text{C}$.
2. Se quita la tuerca del inyector con la llave de tuerca (P/N 03-908423-00).
3. Se quita el viejo septum con pinzas metálicas.
4. Se coloca el nuevo septum de nuevo con las pinzas metálicas.
5. Se vuelve a poner la tuerca del inyector. Se ajusta hasta que se sienta resistencia.

Nota: El tamaño del septum apropiado para el inyector 1079 es de 11.5 mm de diámetro. Este septum resiste hasta 325°C . Para trabajar con temperaturas mayores se recomienda usar septum especiales que tienen 11 mm de diámetro y soporta hasta 375°C . Hay que tener cuidado a la hora de colocar este tipo de septum para evitar que haya una fuga. Si hay fuga se observa en el panel de control del cromatógrafo de gases en la sección STATUS. Se observa en flujo y presión de columna.

8.1.2.3. Columnas

El acondicionamiento de columna de llevará a cabo cuando se requiera según las circunstancias.

A) Conectar columna capilar al inyector 1079

Para conectar la columna capilar al inyector se hace lo siguiente:

1. Se corta el precinto final de la nueva columna.
2. Se introduce la columna en el horno.
3. Se desenrolla 10 cm al final del inyector de columna.
4. Se desliza la tuerca de la columna apropiada y la férula de grafito hasta el final de la columna. Las columnas capilares normalmente se instalan con una tuerca columna capilar (P/N 03-949551-00) y una férula de grafito 0.4 mm ID (CR211104).
5. Se hace un corte limpio al final de la columna normalmente 2 cm. El corte tiene que ser liso y cuadrado. Se limpia con MeOH para evitar contaminación.
6. Se introduce la columna por el inyector.
7. Se introduce la columna por el inserto tipo on-column hasta que lo permita. Tener mucho cuidado.
8. Se coloca el inserto en el inyector.
9. Se desliza la columna a través del inyector con cuidado para evitar que se salga la columna del inserto.
10. Se aprieta la tuerca con los dedos sosteniendo la columna en el lugar, entonces se aprieta desde $1/4$ a $1/2$ giro con una llave $5/16''$.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 19 de 25

NOTA: La longitud de la columna que se conecta al inyector depende del tipo de inyector instalado así como del tipo de inserto.

Para el inyector tipo 1079 si el inserto es split/splitless hay que dejar 7.5 cm de columna dentro del inyector, sin embargo, para on-column no.

Hay ciertas modificaciones dependiendo del tipo de inyector instalado.

B) Conectar columna capilar al detector

Después de que la columna ha sido acondicionada, hay que conectarla al detector. Para conectarla al detector de ionización de llama se hace lo siguiente:

1. Se comprueba que la tuerca y férula de grafito están instaladas en la columna.
2. Se desenrolla sobre 20 cm del final de la columna.
3. Se mueve la tuerca y férula hasta 5 cm del final de la columna. La distancia de columna hacia el detector FID es de 9.5 cm.
4. Se coloca la columna en la base del detector.
5. Se aprieta la tuerca y férula con los dedos.
6. Se desliza la columna en el detector hasta la señal sobre la columna.
7. Se sostiene la columna mientras se aprieta la tuerca.

C) Comprobación del funcionamiento de la columna

1. Comprobar las fugas.
2. Ajustar los caudales de los gases de relleno y del detector.
3. Ajustar la temperatura del inyector y la del detector. No puede superar la TMAX de la columna.
4. Acondicionar la columna a la temperatura recomendada durante dos horas.
5. Analizar las mezclas de prueba para comprobar la instalación y el rendimiento de la columna.
6. Calibrar el instrumento y se inyecta las muestras.
7. Los pasos 5 y 6 no son siempre necesarios. Estos pasos se llevan a cabo cuando se dispone de mezclas de prueba.

8.1.2.4. Cambio de jeringa

Cambiar la jeringa cuando sea necesario por las condiciones de análisis.

Para quitar la jeringa del automuestreador "COMBI PAL" se puede hacer de dos formas:

1. Desde el panel de control del automuestreador "COMBI PAL".
Se selecciona en la pantalla MENU. Se presiona sobre la tecla F1 que es cambio de jeringa.
La jeringa se mueve hacia una posición para que sea fácil de quitar del adaptador y reemplazarla. La nueva jeringa debe de colocarse antes de presionar ENTER.
2. Desde el adaptador de jeringa instalado en la unidad de inyección del automuestreador "COMBI PAL":
 - 2.1. Se desliza la tapa de plástico en la unidad de inyección hasta su tope.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 20 de 25

- 2.2. Se gira el soporte de la jeringa.
- 2.3. Se desenrosca la tuerca que hay en el soporte del émbolo.
- 2.4. Con cuidado se quita la jeringa del adaptador.

Una vez quitada la jeringa hay que reemplazarla.

Antes de instalar la jeringa hay que comprobar que funciona correctamente y hay que limpiarla (se quita el émbolo y se aspira varias veces hasta observar que no coja aire, es decir, que no haya burbujas).

Para instalar la jeringa:

1. Se introduce en el adaptador la jeringa.
2. Se enrosca la tuerca que hay en el soporte del émbolo.
3. Se gira el soporte de la jeringa.
4. Se cierra la tapa de plástico en la unidad de inyección.

8.1.2.5. Cambio del filtro para gases

Cambiar el filtro de gases cuando sea necesario debido a que se haya producido alguna saturación de agua u oxígeno.

El filtro de gas se debe cambiar cuando lo muestre el indicador. El filtro instalado es el filtro de oxígeno recomendado para columnas capilares y elimina el oxígeno y el vapor de agua.

El cambio del filtro de oxígeno es muy sencillo y rápido. Se desenrosca la unidad de conexión, se quita el filtro dañado y se coloca el nuevo filtro a conectar.

8.2. OPERACIONES DE MANTENIMIENTO DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS

Se muestra una tabla con las tareas de mantenimiento del 4000 MS a tener en cuenta.

MANTENIMIENTO	FRECUENCIA
Chequear el sistema de fugas de aire/agua	A diario
Chequear la bomba	
Limpiar los electrodos de la trampa	Cuando se requiera
Limpiar los espaciadores de cuarzo de la trampa	
Limpiar la entrada del montaje de la ionización interna	
Limpiar la base de la fuente interna	
Reemplazar los filamentos	

8.2.1. CONECTAR COLUMNA CAPILAR AL DETECTOR

1. Se pasa la columna desde el horno hasta la línea de transferencia (TRANSFER LINE).
2. Se pone la tuerca y la ferrula de grafito/vespel (0.4 mm I.D. 0.25mm).
3. Se desliza la columna por la línea de transferencia.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 21 de 25

4. Se aprieta un poco la tuerca instalada en la parte delantera de la línea de transferencia para poder deslizar la columna.
5. Se quita el casquillo que tiene de color marrón situado por la parte posterior de la línea de transferencia y se coloca el casquillo de color negro que indica la medida de la columna.
6. Se corta un trozo de columna. El corte debe de ser limpio. Se limpia con MeOH para evitar contaminación por si se han quedado restos del casquillo.
7. Se desliza la columna hasta la señal del casquillo negro.
8. Se aprieta la tuerca instalada en la parte delantera de la línea de transferencia.
9. Se quita el casquillo y se pone el anterior.
10. Se coloca la línea de transferencia que previamente se ha retirado (movimiento en forma Z) para introducir la columna.

8.2.2. ANALIZADOR

El analizador de trampa de iones tiene un calentamiento programable hasta 250°C y es totalmente accesible por el propio usuario.

A) Quitar el montaje del analizador

1. Se separa el 4000 MS del 3800 GC.
2. Se quita la tapadera del 4000 MS. Tener cuidado por la exposición a voltajes. Desenchufar los cables.
3. Se extrae las etiquetas para quitar el regulador del cable colector.
4. Se tira de la etiqueta blanca para quitar el cable colector de la lente.
5. Se presiona sobre el conector y se saca para quitar el cable de transmisión colector.
6. Tras asegurarse de que la línea de transferencia está fría se retira cogiéndola por la parte delantera y dando vuelta en sentido contrario a las agujas del reloj tirando. El movimiento es Z.
Sino se puede sacar la línea de transferencia, se abre la válvula para purgar, para asegurar que el analizador está a la presión atmosférica.
Si aún es difícil de sacar, se usa la herramienta para la línea de transferencia.
7. Se levanta el montaje del analizador y se pone al revés en el área de trabajo.
8. Se cubre la abertura del colector para evitar que entre polvo.

B) Reinstalar el montaje del analizador

Antes de instalar el analizador, se tiene que comprobar si hay cualquier partícula dentro del colector (MANIFOLD) o en el montaje del analizador. Si fuese el caso hay que limpiarlo.

Hay tres tubos que resaltan del fondo del colector. Hay que verificar que los tubos están derechos y para arriba, de lo contrario hay que cambiarlos porque es indicativo de que están dañados.

Tras hacer estas comprobaciones previas se hace lo siguiente:

1. El montaje del analizador tiene cuatro alfileres metálicos que tienen que alinearse con los cuatro agujeros que hay en el colector.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
	Revisión: 1.0
	Página 22 de 25

2. Se reconectan los tres cables asociados con el analizador (el regulador del cable colector, el cable colector de la lente y el cable de transmisión colector).
3. Se empuja con cuidado el montaje de la línea de transferencia hacia el colector.

8.3. TRAMPA DE IONES

En la trampa de iones se acumula suciedad dependiendo del número de inyecciones realizadas y del tipo de muestra a analizar, por lo que hay que limpiarla de forma periódica o cuando sea necesario.

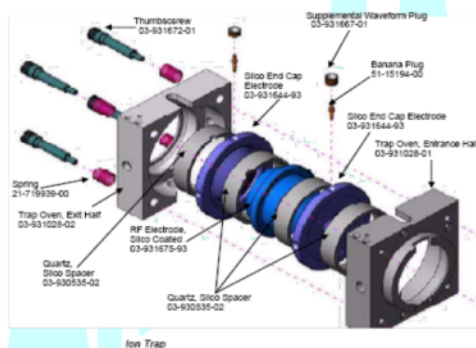


Figura 4. Esquema interior de la trampa de iones

8.3.1. QUITAR EL MONTAJE DE LA FUENTE DE LA TRAMPA DE IONES

1. Se quitan los tres tornillos del reborde del analizador unido a la fuente de la trampa de iones.
2. Se quitan los dos tornillos que unen la fuente con la placa de calor.
3. El montaje se coloca con los revestimientos de la fuente hacia arriba, nunca hacia abajo.

8.3.2. REINSTALAR EL MONTAJE DE LA FUENTE DE LA TRAMPA DE IONES

1. Se comprueba que todos los conectores manuales de la conexión sean uniformes.
2. Se coloca el montaje de la trampa de iones/fuente sobre el reborde del analizador con los conectores manuales (son 3).
3. Se alinean los dos agujeros de los tornillos sobre el reborde con los tornillos.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 23 de 25

4. Se aprietan los dos tornillos.
5. Se coloca la placa de calor.
6. Se comprueba los alfileres de la conexión de la fuente para saber si hay la alineación apropiada y si fuese necesario se enderezan.
7. Se empuja los conectores para que se alineen correctamente los alfileres y no se doblen. Se aconseja emplear pinzas para alinearlos.

8.3.3. DESMONTAR LA TRAMPA DE IONES

1. Se quitan los cuatro tornillos de retención.
2. Se despegan el horno de la trampa. Se coloca en un lugar limpio y con papel científico.
3. Se quitan los espaciadores de cuarzo y los electrodos de la trampa que se encuentran colocados de forma alternativa.

8.3.4. MONTAR LA TRAMPA DE IONES

Tras limpiar la Trampa de Iones hay que montarla de nuevo. Los pasos a seguir son:

1. Se coloca cada enchufe de banana a cada electrodo.
2. Se pone el espaciador de cuarzo al fondo del horno de la trampa.
3. Se pone uno de los dos electrodos de trampa con el enchufe de banana. El enchufe de banana tiene su lugar para encajar (se pone al mismo lado que los conectores de oro). El cono del electrodo debe quedar hacia fuera.
4. Se pone espaciador de cuarzo.
5. Se pone el anillo del electrodo de la trampa.
6. Se pone el electrodo de la trampa con el enchufe de banana en la posición de encaje del enchufe y con el cono hacia abajo.
7. Se pone el espaciador de cuarzo.
8. Se pone la tapa del horno de la trampa.
9. Se colocan los cuatro tornillos.

8.3.5. LIMPIEZA DE LOS ELECTRODOS REVESTIDOS DE SILICONA

1. Se quita los dos enchufes de banana de poliamida.
2. Se emplea un detergente (pH=6-7.5) para limpiar las piezas de la trampa. Este detergente puede ser jabón líquido para las manos o lavavajillas. No se usa óxido de aluminio u otros abrasivos porque quitan la capa de silicona en la trampa. Para limpiarlos se emplea cepillo de dientes especial. Hay que hacerlo con mucho cuidado.
3. Se coloca cada electrodo en un vaso con agua desionizada. Se aclara con agua desionizada.
4. Se pone en un baño ultrasónico con diclorometano.
5. Se seca al aire o en horno a 120 °C durante treinta minutos.
6. Se vuelve a colocar los enchufes de banana.

Nota: El paso 2 no es necesario.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 24 de 25

8.3.6. LIMPIEZA DE LOS ESPACIADORES DE CUARZO

1. Se coloca cada espaciador de cuarzo en un vaso de precipitado con diclorometano.
2. Se secan los espaciadores en el aire sobre papel científico o en horno a 120 °C durante treinta minutos.

Nota: los espaciadores de cuarzo no se ponen a baño ultrasónico para evitar que el cuarzo desaparezca.

8.4. IONIZACIÓN INTERNA

En este equipo se trabaja con ionización interna y no con ionización externa o híbrida.

8.4.1. LIMPIEZA DEL MONTAJE DE LA IONIZACIÓN INTERNA

Pasos previos para llevar a cabo la limpieza del montaje de la ionización interna:

1. Se apaga el 4000 MS. Ver apartado 5.1.
2. Se quita el montaje del analizador. Ver apartado 7.3.1.
3. Se quita el montaje de la fuente de la trampa de iones. Ver apartado 7.4.1.
4. Se quita el montaje de la ionización interna.
5. Se quitan los dos tornillos que sostienen el montaje de ionización interna.
5. Se quita el montaje y se coloca sobre una superficie limpia o papel científico.
6. Se quita el tornillo de retención del filamento.
7. Se quita la placa de cerámica.
8. Se quita el montaje del filamento.
9. Se quita el tornillo de retención de la entrada (GATE)
10. Se empuja el anillo de centro para quitarlo.

8.4.2. LIMPIEZA DE LA ENTRADA (GATE)

1. Se limpia el centro de la entrada con un bastoncillo de algodón empapado con MeOH.
2. En un vaso de precipitado lleno de agua desionizada se introduce y se mete en un baño ultrasónico durante varios minutos. A continuación se llena un vaso de precipitado con MeOH, se mete la entrada y se pone al baño ultrasónico durante varios minutos.
3. Se limpia la base de la fuente interna.

8.4.3. LIMPIEZA DE LA BASE DE LA FUENTE INTERNA

1. Se limpia el tubo del centro en la base de la ionización interna con un bastoncillo de algodón usando la mezcla de óxido de aluminio y agua desionizada (DI) previamente preparada en un vaso de precipitado.
2. Se introduce en un vaso de precipitado con agua desionizada para aclararla.
3. Se pone en un baño ultrasónico con agua desionizada durante dos minutos.
4. A continuación se pone en un baño ultrasónico con MeOH durante dos minutos.



PROCEDIMIENTO OPERATIVO	Código: PO-GC-MS
Verificación y Mantenimiento del equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS)	Revisión: 1.0
	Página 25 de 25

5. Se seca al aire o en horno a 120°C durante treinta minutos.

8.4.4. MONTAJE DE IONIZACIÓN INTERNA

Hay que seguir los siguientes pasos para hacer el montaje de ionización interna.

1. Se empuja el anillo de centro sobre la ENTRADA para que encaje a presión hacia el surco alrededor del borde.
2. Se pone la ENTRADA en la base de la fuente interna.
3. Se inserta el aislador en el agujero del tornillo.
4. Se coloca el tornillo y se aprieta en el aislador.
5. Se pone el montaje en la base de la fuente interna.
6. Se pone la placa cerámica.
7. Se asegura de que el montaje del filamento está bien colocado empujando hasta abajo.

8.5. DETECTOR

Para reemplazar el electrón multiplicador se tiene que apagar el masas según el apartado 6.1. Se quita el montaje del analizador según apartado 8.2.2.

Se quitan los dos tornillos que hay sobre el lugar que contiene el multiplicador. Se quita la parte cúbica de la cubierta levantando hacia fuera.

Se afloja los tornillos que sujetan al multiplicador y se saca para reemplazarlo por otro.

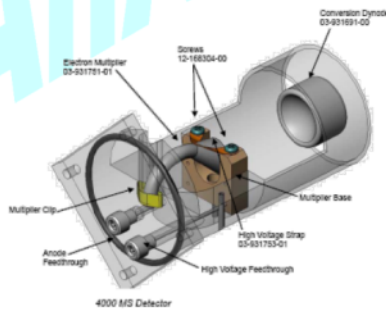


Figura 5. Esquema interior del detector dentro del espectrómetro de masas

Capítulo III

Índice

1. Presentación	239
2. Introducción.....	240
3. Análisis DAFO.....	273
4. Artículo N°5	275
Abstract.....	276
Introduction.....	277
Materials and Methods	280
Reagents and samples.....	280
Chromatographic conditions.....	281
TAG chromatograms	281
Chemometric analysis.....	283
Results and discussion.....	285
Hierarchical cluster analysis.....	285
Principal components analysis.....	287
Partial least squares-discriminant analysis.....	290
Conclusions	292
References	293
5. Artículo N°6	297
Abstract.....	298
1. Introduction.....	299
2. Materials and methods	302
2.1. Sampling procedure.....	302
2.2. VOC fingerprinting.....	302
2.3. Chemometric analysis.....	303
3. Results and discussion.....	305
3.1. VOC fingerprint of EVOO.....	305
3.2. Classification of monovarietal EVOO by PLS-DA.....	309

CAPÍTULO III

4. Conclusion	312
References	313
6. Discusión.....	317
Comunicaciones a congresos derivadas de este capítulo.....	318
Otras Comunicaciones a congresos relacionadas.....	318

1. Presentación

Este capítulo hace referencia a la autenticación del aceite de oliva, atendiendo tanto a sus variedades, dependiendo del fruto, y a sus categorías. Está compuesto de dos estudios, donde difieren principalmente en la técnica analítica utilizada y los cuales tienen en común el uso de "huellas dactilares" instrumentales, como datos primarios y, para el tratamiento de los mismos, la aplicación de diversos métodos de "reconocimiento de pautas" (estos términos serán explicados en la introducción).

En el primero de ellos se ha utilizado la cromatografía de gases a alta temperatura con detector de espectrometría de masas (HTGC-MS). En el segundo, se ha hecho uso de la técnica conocida como espectrometría de masas acoplada a un sistema de ionización de reacción por transferencia de protones (PTR-MS). Este estudio ha podido realizarse gracias a la realización de una estancia predoctoral de investigación en el *RIKILT-Institute of Food Safety*, en Wageningen, (The Netherlands), bajo la supervisión de la Dra. S.M van Ruth.

El objetivo general de este capítulo, cuyos resultados se recogen aquí y que sigue en concordancia con el Proyecto QuOLEO descrito en el capítulo α , se expone a continuación.

- ✓ Desarrollar métodos, que junto con la ayuda de herramientas quimiométricas, nos permitan la caracterización y autenticación del aceite de oliva (diferentes variedades y categorías).

Para la ejecución de este objetivo se han procesado matemáticamente, mediante herramientas quimiométricas de reconocimiento de pautas (PCA, HCA, PLS-DA), los datos obtenidos a partir de las señales analíticas proporcionadas por las medidas de HTGC-MS y PTR-MS y se han obtenido modelos que nos permiten la autenticación del aceite de oliva.

2. Introducción

El olivo, un poco de historia...

El cultivo del olivo se inició en Asia Menor, en la región que se extiende desde Siria a Grecia, hace unos 6.000 años, y su expansión coincidió con el florecimiento de las civilizaciones y culturas que se desarrollaron en la Cuenca Mediterránea. Así lo atestiguan las hojas fósiles encontradas en yacimientos pliocénicos y del Paleolítico Superior de Italia y Norte de África, o los trozos de acebuche (olivo silvestre) y huesos de aceituna hallados en excavaciones del Neolítico y de la Edad de Bronce en España.

En Grecia los olivares adquieren gran importancia en el siglo IV a.C., en el que se llegan a formular decretos regulando su plantación ya que alimentaban a sus tropas con aceitunas. Desde esta zona se extiende a Egipto y también a toda la cuenca del Mediterráneo. A Italia llega el olivo hacia el siglo VII antes de Cristo.

En España, las primeras plantaciones de olivos pudieron tener un doble origen: por una parte griegos y fenicios tenían colonias en la Bética; por otra, el Imperio Romano llevaba consigo todos aquellos cultivos que pudieran servir para abastecer a sus legiones y a la Metrópoli [1].

A finales del siglo IV, el olivar entra en regresión en el Valle del Guadalquivir, y hemos de esperar a la influencia de la cultura árabe para el inicio de una nueva expansión, que recupera las zonas de cultivo romanas y del litoral mediterráneo, hasta Aragón y Cataluña.

Al-Andalus es en el siglo XII una región de gran riqueza olivarera, con importantes producciones en Sevilla, Córdoba y Jaén.

En el siglo XVI los españoles llevan estacas de olivo al Nuevo Continente, donde se ha asentado la producción olivarera, principalmente en California,

1 J.C. Ávila Rosón, J.F. Fernández Sánchez, in: A. Fernández Gutiérrez, A. Segura Carretero, *El aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía*, Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja, 2009, pp 9-22.

CAPÍTULO III

Méjico y Argentina. En mucha menor medida el olivo también se cultiva actualmente en Perú y Chile [2].

El olivo pertenece al género *Olea*, que está integrado por unas 35 especies, algunas tan dispares como el aligustre y el fresno. La principal especie cultivada es la *Olea europaea sativa*, que al parecer proviene del cruce de otras dos: *Olea chrysochila* (variedad silvestre) y *Olea oleaster* (el acebuche, variedad semisilvestre que produce unas aceitunas pequeñas llamadas acebuchinas).

El árbol es muy longevo. Puede durar siglos y como, además, se reproduce vegetativamente (por estacas) y no por semillas, resulta que el mismo germoplasma puede durar milenios.

Variedades de aceituna

Se calcula que existen en el mundo más de 200 variedades de la especie *sativa*. La mayor parte de ellas se emplean en la obtención de aceite.

Se distinguen dos grandes grupos:

- *Aceitunas de molino* o de almazara, destinadas preferentemente a la obtención de aceite.
- *Aceitunas de aderezo*, de aliño o de mesa, destinadas preferentemente a ser comidas, previo tratamiento.

Ambos grupos son intercambiables, aunque existen variedades como la "gordal" que no suele destinarse a aceite salvo en ocasiones muy excepcionales. Asimismo muchas variedades típicas de molino se pueden recoger poco antes de la maduración y aliñarse.

Entre las aceitunas de molino algunas de las principales variedades son [3]:

-
- 2 A. Polymerou-Kamilakis, in: D. Boskou, *Olive Oil Chemistry and Technology* 2nd ed., AOCS Press Champaign, Illinois, 2006, pp 1-5.
 - 3 J. Humanes Guillén, M. Civantos López-Villalta, *Producción de aceite de oliva de calidad. Influencia del cultivo* 2nd ed., Consejería de Agricultura y Pesca, 2001, pp 19-36.

CAPÍTULO III

Picual. Forma elipsoidal, pero con un pico en el ápice (polo opuesto al pedúnculo) que da nombre a esta variedad. Conocida también como "marteño", "nevadillo blanco" o "lopereño". Color morado cuando madura. Se distribuye por Jaén, Córdoba y Granada fundamentalmente. Es la variedad más abundante, existiendo en la actualidad más de 700.000 ha de superficie en producción. Su aceite es muy apreciado por su alta estabilidad (resistencia a la oxidación), su gran contenido en polifenoles y alto porcentaje de ácido oleico.



Picual



Hojiblanca

Hojiblanca. Se encuentra distribuida fundamentalmente en las provincias de Córdoba, Málaga y Sevilla. Fruto casi esférico. Color verde oscuro que vira incompletamente a morado. Se conoce también como "lucentino". Sus aceites tienen un alto contenido en tocoferoles y estabilidad media. También se utiliza para aceituna de mesa, en verde o en negro.



Cornicabra

Cornicabra. Elipsoide más alargado que la picual, algo deformada (cuerno de cabra). Fruto verde que vira a morado poco intenso cuando madura. Se distribuye fundamentalmente por la zona de Toledo y Ciudad Real. Se conoce también como "cornezuelo", "corniche" y "osnal".

CAPÍTULO III

Arbequina. Fruto pequeño ovalado y corto. Color verde oscuro que vira a verde morado y luego a negro. Es la variedad característica de la zona catalana: Tarragona y Lérida, y también se da en el Alto Aragón. Su porte pequeño y su precoz entrada en producción lo hacen especialmente apto para las nuevas plantaciones superintensivas y cultivo mecanizado, por lo que se ha extendido de forma generalizada en el resto de las zonas productoras.



Arbequina



Empeltre

Empeltre. Es también conocida como "aragonesa", "injerto" y "mallorquina". Fruto alargado y algo asimétrico, color negruzco en su madurez. Se la conoce fundamentalmente en el Bajo Aragón. También se da en Mallorca. Su aceite es de alto contenido en tocoferoles y ácido linoléico. Es también muy apreciada como aceituna de aderezo, que se deja ennegrecer en el propio árbol.

Picudo. Pezón característico en el ápice. Conocido también como "carrasqueño". Su distribución está localizada en Córdoba y parte de Granada. A pesar de ser muy apreciado por sus excelentes características sensoriales, su zona de producción es muy limitada, alrededor de 60.000 ha.



Picudo

Otras variedades españolas de molino: blanqueta, manzanilla cacereña, farga, morisca, verdial, etc. Entre las variedades de mesa, podemos encontrar, la

manzanilla, la cual puede dejarse madurar también para obtener aceites. Se cultiva en toda Andalucía y algo en Extremadura.

Entre las variedades de aceitunas de Italia podemos citar coratina, leccino, frantoio. A destacar esta última, prototipo de variedad italiana, que se cultiva en el centro del país, en la Toscana, y da lugar a un aceite de contenido medio en ácidos oleico y linoleico. Ejemplos de variedades de otros países son: en Grecia, la coronaiki; en Francia, la picholine; en Túnez, la chemlali, etc.

Por no ser de relevancia importancia para entender el objeto de esta tesis, no se va a explicar el proceso de elaboración del aceite de oliva, sin embargo este proceso global queda bastante bien ilustrado en la figura 1.

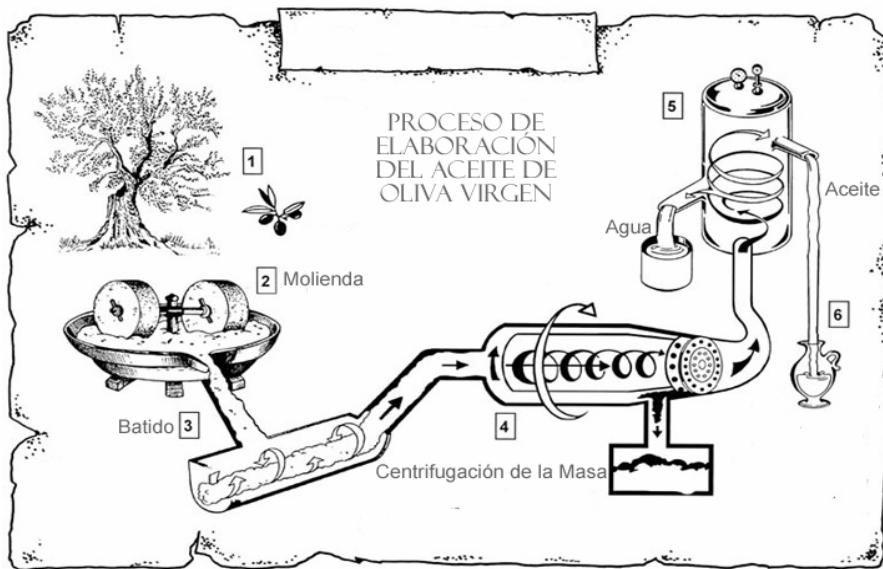


Figura 1. Proceso de elaboración del aceite de oliva [4].

4 J. Casallo Calderón, ¿Qué es el Aceite de Oliva?, Unión Europea, Comisión de Agricultura, 2006, p12.

Tipos de aceite de oliva

El reciente Reglamento (UE) N° 61/2011, que ha modificado el Reglamento (CEE) 2568/91, muestra las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

En el Reglamento (CE) N° 1513/2001, que modificó al Reglamento N° 136/66/CEE, se establecieron las denominaciones y definiciones de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva con arreglo al artículo 35 (texto literal):

1. Aceites de oliva vírgenes

Aceites obtenidos a partir del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos, en condiciones que no ocasionen la alteración del aceite, y que no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, la decantación, el centrifugado y la filtración...

Estos aceites serán objeto de la clasificación exhaustiva y de las denominaciones siguientes:

- a) aceite de oliva virgen extra: aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, como máximo de 0,8 g por 100 g...*
- b) aceite de oliva virgen: aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, como máximo de 2 g por 100 g...*
- c) aceite de oliva lampante: aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, superior a 2 g por 100 g...*

2. Aceite de oliva refinado

Aceite de oliva obtenido mediante el refinado de aceites de oliva vírgenes, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 0,3 g por 100 g.

3. Aceite de oliva

Aceite de oliva constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del aceite lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 1 g por 100 g...

CAPÍTULO III

4. Aceite de orujo de oliva crudo

Aceite obtenido a partir del orujo de oliva mediante tratamiento con disolvente o por medios físicos, o que corresponda, con excepción de algunas características determinadas, a un aceite de oliva lampante; con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza.

5. Aceite de orujo de oliva refinado

Aceite obtenido mediante refino de aceite de orujo de oliva crudo, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 0,3 g por 100 g.

6. Aceite de orujo de oliva

Aceite constituido por una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 1 g por 100 g.

Entre los aceites de oliva vírgenes extra podemos encontrar tres subtipos:

- ✓ monovarietal: obtenido a partir de una sola variedad de aceituna.
- ✓ mezcla de variedades: las cuales se pueden conocer previamente y hacerse para buscar unas características específicas (estas mezclas se denominan *coupage*) o no.
- ✓ denominación de origen (D.O.): generado a partir de aceitunas procedentes de una determinada área geográfica, donde se la elabora y embotella.

El adjetivo "monovarietal" le confiere un valor añadido al aceite de oliva y por esto además está protegido por regulaciones, lo que hace necesario protegerlo y *autenticarlo*.

A continuación, se muestra, en forma de esquema, que resume la clasificación actual del aceite de oliva (figura 2).

CAPÍTULO III

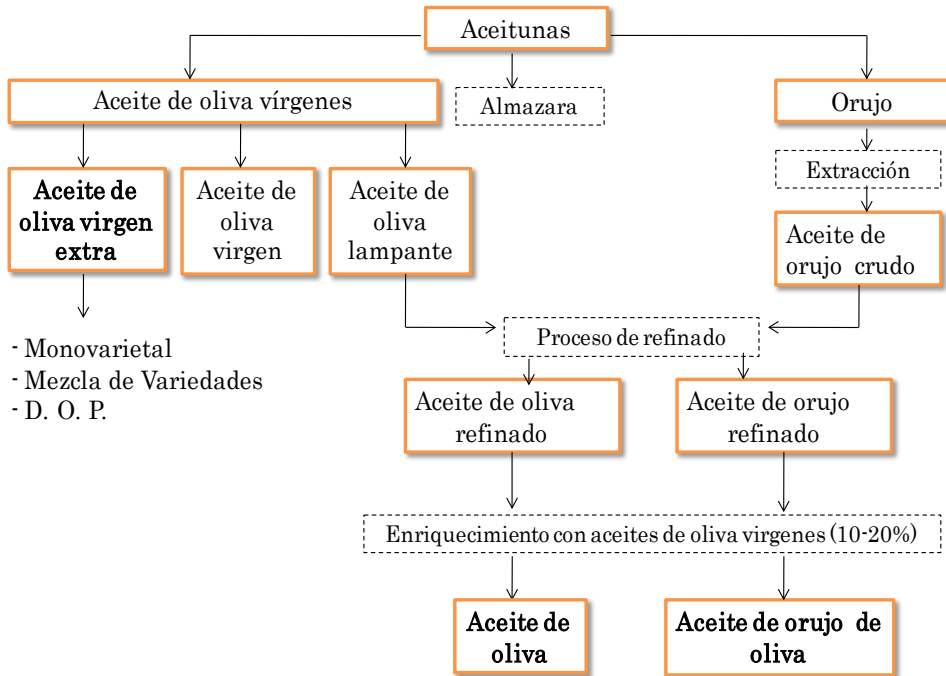


Figura 2. Clasificación de las categorías del aceite de oliva

El medio, la variedad y todas aquellas técnicas culturales que permitan obtener frutos bien desarrollados y sanos, conducirán con toda seguridad a obtener aceites de la mejor calidad.

En uno de los estudios que se presenta en este capítulo se ha utilizado la "huella dactilar" de volátiles para autenticar variedades de aceite de oliva virgen. Para ello la identificación de los volátiles no ha sido necesaria, ya que la información se obtiene manejando el registro completo de señal que nos proporciona el equipo PTR-MS. Sin embargo se va a hablar a continuación brevemente sobre el papel de los volátiles en el aceite de oliva antes de explicar en qué consiste esta técnica.

Volátiles en el aceite de oliva

Los volátiles suelen variar en el aceite de oliva según la variedad del fruto, el grado de madurez, el sistema de extracción y el origen geográfico.

Durante la moltura y batido de la pasta de las aceitunas, estas se aplastan y machacan. Se producen gotitas de aceite más grandes que surgen de los liposomas de las células. Aparte de la formación de estas gotitas, se forma una gran cantidad de enzimas y sustancias. Se producen diferentes reacciones catalizadas por las enzimas, y se forman los componentes volátiles que son los responsables del típico sabor del aceite de oliva.

El aroma del aceite de oliva está formado por una compleja mezcla de sustancias volátiles: aldehídos, alcoholes, cetonas, hidrocarburos, ésteres. Los volátiles mayoritarios que suelen aparecer en el aceite de oliva virgen son los C₆ correspondientes a aldehídos y C₅, como hexanal, trans-2-hexenal, hexan-1-ol y 3-metilbutan-1-ol, etc. [5].

La ruta de la lipoxigenasa es la ruta bioquímica directamente implicada en la formación de los compuestos volátiles mayoritarios del aceite de oliva. Los principales percursores son los ácidos grasos poliinsaturados y linoleico y α -linolénico. La figura 3 muestra los principales compuestos producidos a través de esta ruta. La formación de los compuestos alifáticos C₆ a partir de los 13-hidroperóxidos de los ácidos linoleico y linoleico está favorecida. El 2-hexenal, hexanal y 3-hexenal, son los mayoritarios encontrados en aceite de oliva. 3-hexen-1-ol, 2-hexen-1-ol y hexan-1-ol se encuentran normalmente en altas concentraciones, su proporción está influenciada por la variedad y estado de madurez de las aceitunas [6].

-
- 5 D. Boskou, G. Blekas, M. Tsimidou, in: D. Boskou, Olive oil: Chemistry and Technology 2nd ed., AOCS Press. Champaign, IL, 2006, pp. 41-72.
 - 6 M. T Morales, M. Tsimidou, in : R. Aparicio, J. Harwood, Manual del Aceite de Oliva, AMV Ediciones, Madrid, SP, 2003, pp 381-398.

CAPÍTULO III

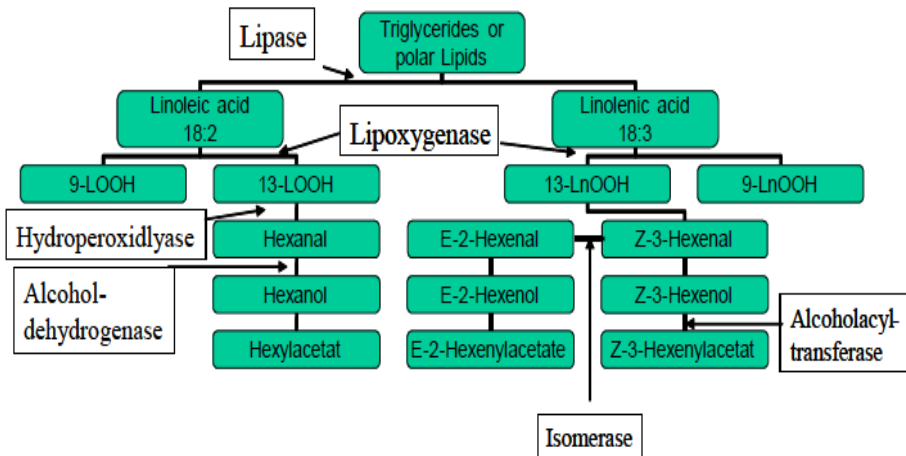


Figura 3. Secuencia de reacción de la actividad lipoxigenasa, que lleva a la formación de los componentes aromáticos característicos de los aceites de oliva [6].

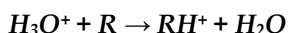
La variedad es de gran importancia en la producción de volátiles del aceite de oliva porque los enzimas, que dependen de las características genéticas de cada variedad son los responsables de la formación de estos compuestos.

A continuación se explica una de las técnicas analítica utilizadas en este capítulo para el análisis de volátiles en el aceite de oliva, ya que la otra técnica (cromatografía de gases a alta temperatura) se introdujo en el capítulo 2.

Espectrometría de masas con ionización por reacción de transferencia protónica (Proton Transfer Reaction-Mass spectrometry, PTR-MS)

PTR-MS es una técnica relativamente nueva y novedosa; aparece en el año 1995 y fue desarrollada en Austria, en la Universidad de Innsbruck [7]. Se utiliza para la medida en-línea de compuestos orgánicos volátiles en muestras muy variadas.

Las reacciones de transferencia de protones se utilizan para ionizar químicamente los vapores que se analizan. La reacción en que se fundamenta es la siguiente:



En el ionizador PTR se genera agua cargada, H_3O^+ , el cual actúa como agente protonador. Un protón se transfiere desde el agua cargada hasta el compuesto orgánico volátil (R) de la muestra. Esta reacción sólo ocurrirá si la afinidad del protón de R es mayor que la afinidad del protón del H_2O (691 kJ/mol).

En la figura 4 se muestran las afinidades de protón de algunos compuestos, todos se encuentran por encima del agua excepto los componentes volátiles del aire que poseen una afinidad menor que la del H_2O (N_2 , O_2 , Ar, CO_2 , etc.). Por esto cuando introducamos una muestra los iones H_3O^+ solo reaccionarán con los volátiles de ésta y no se verán influenciados por el gas portador, que es el aire. El detector, es un espectrómetro de masas. En este caso las cargas de las masas de los volátiles ionizados se convertirán en una señal eléctrica a medir. El resultado es una "huella dactilar" hecha con las masas de los compuestos volátiles de una muestra.

7 A. Hansel, A. Jordan, R. Holzinger, P. Prazeller, W. Vogel, W. Lindinger, Proton transfer reaction mass spectrometry: on-line trace gas analysis at the ppb level, International Journal of Mass Spectrometry, 1995, 149/150, 609-619.

CAPÍTULO III

classification	molecule	proton affinity/kJ mol ⁻¹
inorganic gases	O ₂	421
	N ₂	494
	CO ₂	541
	O ₃	626
	H ₂ O	691
	NH ₃	854
alkanes	methane	544
	ethane	596
	propane	626
	<i>i</i> -butane	678
alkenes	ethene	641
	propene	752
alkynes	acetylene	641
	propyne	748
aromatics	benzene	750
	toluene	784
	phenol	817
	aniline	883
other organics	chloromethane	647
	formaldehyde	713
	acetaldehyde	769
	ethanol	776
	acetonitrile	779

Figura 4. Ejemplos de afinidades de protón [8].

PTR-MS es interesante para la obtención de esta "huella dactilar" ya que: (i) no necesita un pretratamiento de la muestra, (ii) permite análisis rápidos (< 1 min para un espectro de masas completo) y (iii) es una técnica muy sensible (niveles de ppt).

La figura 5 muestra las tres partes principales por las que está formado este equipo. Un PTR-MS consiste en una fuente de iones (*ion source*) que está directamente conectado a un tubo (*drift tube*) y un analizador (cuadrupolo, tiempo de vuelo...).

8 R.S. Blake, P.S. Monks, A.M. Ellis, Proton-transfer reaction mass spectrometry, Chemical Reviews. 2009, 109, 861–896.

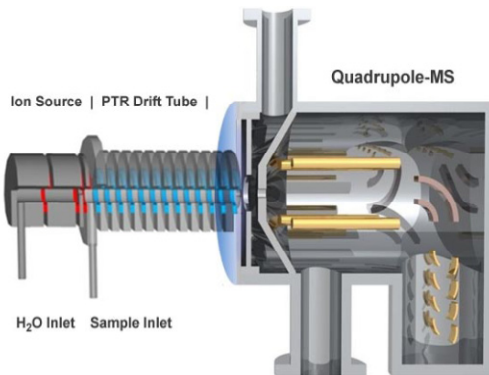


Figura 5. Funcionamiento interno de un PTR-MS.

Figura 6. Equipo PTR-MS

La metodología de funcionamiento sería la siguiente:

- **Fuente de iones** (*ion source*): aquí ocurre la producción de agua cargada H_3O^+ de alta pureza (hasta un 99%) procedente de vapor de agua al entrar en el cátodo.
- **Tubo de corriente** (*drift tube*): el aire que contiene los volátiles de la muestra es aspirado en este tubo mediante efecto venturi por la entrada de aire (presión en el tubo ~ 2.2 mbar). Los volátiles de la muestra son mezclados con los iones de H_3O^+ y son ionizados.
- **Analizador MS** (cuadrupolo): este analizador junto con un electrón multiplicador permite la separación de las masas y la detección de los iones atendiendo a su masa molecular [9].

Una de las ventajas que presenta es que no necesita una separación previa de los componentes de la muestra como por ejemplo ocurre en otra técnicas de análisis de volátiles como cromatografía de gases del espacio de cabeza, etc.

9 K. Buhr, S. van Ruth, C. Delahunty, Analysis of volatile flavour compounds by Proton-Transfer Reaction-Mass Spectrometry: fragmentation patterns and discrimination between isobaric and isomeric compounds. International Journal of Mass Spectrometry, 2002, 221, 1-7.

PTR-MS ha sido utilizado en los últimos años para autenticar diferentes tipos de productos alimenticios: (i) mozzarella, dependiendo de la materia prima y proceso de producción [10]; (ii) autenticación de quesos (DOP) [11]; y (iii) para la verificación del origen geográfico del aceite de oliva [12].

Además, al contrario de lo que suelen hacer las técnicas tradicionales encontradas en bibliografía, que se ocupan de identificar y cuantificar volátiles, el PTR-MS nos da una huella digital que caracteriza a cada muestra. Esta ventaja va a ser aprovechada en el aceite de oliva virgen extra según su variedad. Sin embargo debido a que esta huella está formada por cientos de masas (variables), la aplicación de estadística multivariante es necesaria para extraer toda la información inherente.

Quimiometría (Chemometrics)

En 1971 el profesor S. Wold, de la Universidad de Umea, Suecia, fue el primero que utilizó el término "Chemometrics" y rápidamente su colaboración con el Dr. Bruce Kowalski, de la Universidad de Washington lleva el término a los Estados Unidos.

Massart et al. definieron, en 1997, la Quimiometría como: *la parte de la química que se sirve de las matemáticas, estadística y lógica formal para: diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar información química relevante a partir del análisis de señales analíticas y, finalmente adquirir conocimiento de los sistemas químicos* [13].

-
- 10 F. Biasioli et al., Correlation of PTR-MS spectral fingerprints with sensory characterisation of flavour and odour profile of "Trentingrana" cheese. *Food and Quality Preferences*, 2006, 17, 63-75.
 - 11 S. A. Galle et al., 2011, Typicality and geographical origin markers of protected origin cheese from the Netherlands revealed by PTR-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(6), 2554-2563.
 - 12 N. Araghipour, J. Colineau et al., Geographical origin classification of olive oils by PTR-MS, *Food Chemistry*, 2007, 108 374-383.
 - 13 D. L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.C.M. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Symeyers-Verbeke. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. 1st ed., Elsevier, 1997.

Más recientemente la Sociedad Internacional de Quimiometría ha propuesto una nueva definición, de redacción más simple y genérica, que establece que Quimiometría es: *la ciencia que relaciona las medidas realizadas sobre un sistema químico o proceso con el estado del sistema mediante la aplicación de métodos matemáticos o estadísticos* [14].

Sin embargo, esta definición adolece de un defecto importante ya que no hace mención al propio proceso de la medida, íntimamente unido al uso que se va a hacer de los resultados de dicha medida [15], por lo que la Quimiometría queda como una disciplina complementaria a la Metrología y, extendiendo el concepto, a la Cualimetría. De esta forma se puede generar una jerarquía de aplicación por el cual las tres disciplinas quedan concatenadas según el siguiente esquema:

- Metrología \Leftrightarrow realizar de medidas y obtener de resultados
- Quimiometría \Leftrightarrow relacionar los resultados de las medidas con el estado de sistemas químicos
- Cualimetría \Leftrightarrow evaluar y describir la calidad de los resultados

En este sentido es la propuesta de J. Workman [16], la que identifica la quimiometría con un proceso que permite resolver problemas químicos rutinarios sobre la base de diferentes etapas: (1) medida de un fenómeno o proceso utilizando instrumentación química capaz de generar datos de forma económica; (2) análisis de los datos multivariantes; (3) iteración, si es necesario; (4) establecimiento y validación de un modelo; y (5) desarrollo de conocimiento multivariante.

La Quimiometría actual implica, por tanto, química, matemáticas (estadística) y medida de procesos (sensores).

-
- 14 D.B. Hibbert, P. Minkinen, N.M. Faber, B.M. Wise, IUPAC project: A glossary of concepts and terms in chemometrics, *Analitica Chimica Acta*, 2009, 642, 3-5.
 - 15 L. Cuadros Rodríguez, J.M. Bosque Sendra, *Mediterranean chemometrics, Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399, 1925-1927.
 - 16 J. Workman, *J. Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, 2002, 60, 13-23.

Son precisamente los desarrollos en Quimiometría, fundamentalmente en optimización, reconocimiento de pautas (clasificación y modelado) y calibración multivariantes, junto con otras herramientas como procesado de señales instrumentales, resolución matemática de mezclas complejas, análisis de imágenes químicas, métodos de inteligencia artificial, etc. los que dan sustento a los fundamentos de la química analítica actual.

En este capítulo y en el siguiente se han utilizado las técnicas de reconocimiento de pautas. Entre los objetivos fundamentales se encuentra la identificación de relaciones y/o vínculos entre objetos, en este caso muestras químicas o grupos de estas previamente caracterizadas a través de diversos métodos de análisis instrumental, que permitan su agrupamiento y clasificación según la similitud de sus espectros, cromatogramas, análisis elemental, imágenes etc. [17].

Se pueden diferenciar diferentes niveles entre los métodos para el reconocimiento de pautas:

- Análisis exploratorio de datos
- Métodos no supervisados
- Métodos supervisados.

El objetivo de los estudios quimiométricos que se presentan tanto en este capítulo como en el siguiente y que utilizan el cromatograma completo en el caso de la HTGC y el espectro de masas obtenido mediante PTR-MS, es la obtención de modelos que permitan caracterizar un aceite de oliva de modo que se pueda decir a que categoría o en el caso del virgen extra variedad pertenece una muestra determinada.

Análisis exploratorio de datos (Exploratory data analysis, EDA)

Consiste principalmente en las técnicas de análisis mediante componentes principales (*principal component analysis, PCA*) y análisis factorial (*factor*

17 R.G. Brereton, Chemometrics, Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant, Wiley & Sons Ltd, 2003.

analysis, FA). Las técnicas de exploración de datos se utilizan para identificar tendencias ocultas presentes en los datos y estudiar las causas o fuentes de varianza a que obedecen. También para lograr obtener las variables latentes y fundamentales del sistema y sobre todo lograr la reducción de dimensiones, de modo que la información relevante contenida en la matriz multidimensional pueda quedar reflejada, del mejor modo posible, sobre dos o tres dimensiones oblicuas obtenidas como combinaciones lineales de las variables originales [18].

Análisis en componentes principales (Principal component analysis, PCA)

PCA encuentra combinaciones de variables, o factores, que describen la las mayores tendencias en los datos. Si X es una matriz de datos con m filas y n columnas (siendo las columnas las variables y las filas las muestras), PCA descompone X como la suma de r términos t y p , donde r es el rango de la matriz X :

$$X = t_1 p^T 1 + t_2 p^T 2 + \dots + t_k p^T k + \dots + t_r p^T r$$

Aquí r debe ser menor o igual a la dimensión más pequeña de X . Los pares (t_i, p_i) son ordenados según la cantidad de varianza explicada. Los vectores t_i , se conocen como "puntuaciones" (*scores*) y contienen la información de cómo las muestras se relacionan unas con otras. Los p_i , son conocidos como "pesos" o "ponderales" (*loadings*) y contienen información de cómo las variables se relacionan unas con otras. Generalmente el modelo PCA se reduce hasta k componentes y los pequeños factores de varianza sobrante se consolidan en la matriz residual, E :

$$X = t_1 p^T 1 + t_2 p^T 2 + \dots + t_k p^T k + E$$

18 J.N. Miller J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed. Pearson Education, 2005.

$$X = TP' + E$$

$$\text{two-way array} = \begin{matrix} \text{Loading 1} \\ \text{Score 1} \end{matrix} + \begin{matrix} \text{Loading 2} \\ \text{Score 2} \end{matrix} + \begin{matrix} \text{Loading 3} \\ \text{Score 3} \end{matrix} + \dots$$

Figura 7. Descomposición en un análisis de componentes principales.

Cada componente principal (PC) consiste en un vector de *score* y en uno de *loading*. PC1 tiene la varianza más alta posible. El componente dos (PC2) es ortogonal (en *scores* y *loadings*) y tiene la varianza siguiente más alta posible [19] (ver figura 7).

Generalmente se encuentra (y ese es el objetivo) que los datos se pueden describir adecuadamente usando muchos menos factores que las variables originales. Además el problema de solapamiento de los datos puede ser resuelto observando menos *scores* que con las variables originales, sin pérdida significativa de información. También se suele encontrar a menudo que PCA combina variable de modo que proporciona descripciones útiles de eventos particulares.

Métodos de reconocimiento de pautas no supervisadas ***(Unsupervised pattern recognition methods)***

Consiste en un método más formal de tratamiento de datos, compuesto principalmente por el análisis de agrupamientos o conglomerados (*cluster*). En algunos casos la cantidad de información de la que se dispone es tan grande que este tipo de análisis es una manera de buscar similitudes. Los métodos no supervisadas no hacen uso de ningún conocimiento previo acerca de los datos (bien porque no se dispone de él o bien porque prefiere dejarse para la interpretación final de los resultados). Se tiene entonces como tarea,

encontrar las posibles clases existentes en la matriz de datos a partir del agrupamiento de objetos con similares características [20].

Análisis de agrupamientos (Cluster analysis)

Estos análisis se basan en la suposición de que muestras que están cercanas en el espacio de medida son similares. Los métodos de agrupamientos se pueden clasificar en 2 categorías principales: aglomerativos y particionales. Los métodos aglomerativos comienzan con cada objeto siendo su propio grupo, y progresa mediante la combinación (mediante aglomeración) de los agrupamientos existentes en otros más grandes. Los métodos partitivos comienzan con un solo grupo que contiene todos los objetos y progresa dividiendo los agrupamientos existentes en otros más pequeños [21].

La figura 8 muestra las funciones posibles en el análisis de conglomerados. Hay seis métodos diferentes aglomerativos y un método particional.

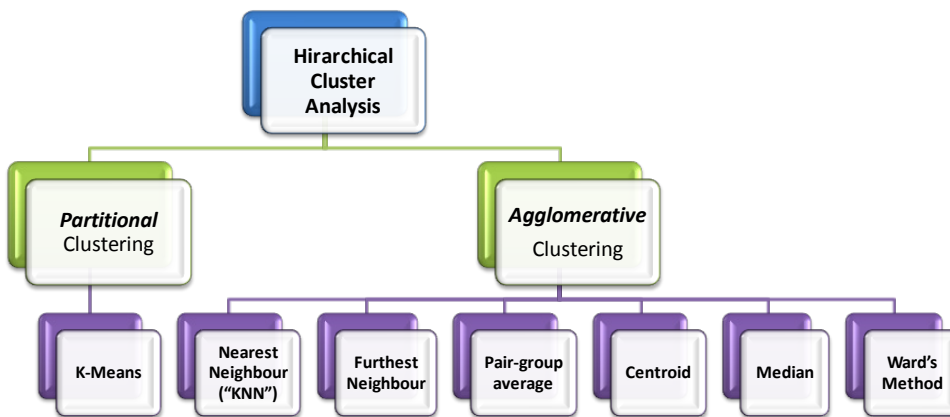


Figura 8. Esquema del Análisis de conglomerados

20 C. Mongay Fernández, Quimiometría, PUV, 2005.

21 <http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Cluster>

CAPÍTULO III

Como punto de partida, se puede usar o las variables originales o los PCA scores para determinar esta distancia. El uso de los PCA scores puede proporcionar beneficios de colinearidad y reducción de ruido, pero requiere la especificación adecuada del número de componentes.

Todos estos métodos requieren la especificación de una distancia medida para indicar la distancia entre objetos y subsecuentemente entre conglomerados. A continuación, entre los diferentes tipos de distancias, las más conocidas son la distancia euclídea y de Mahalanobis.

La distancia euclídea, viene definida según aparece en la figura 9, como la distancia d_{ij} entre las muestras x_i y x_j [22]. Además se muestra un ejemplo gráfico. Esta distancia es la usada más frecuentemente.

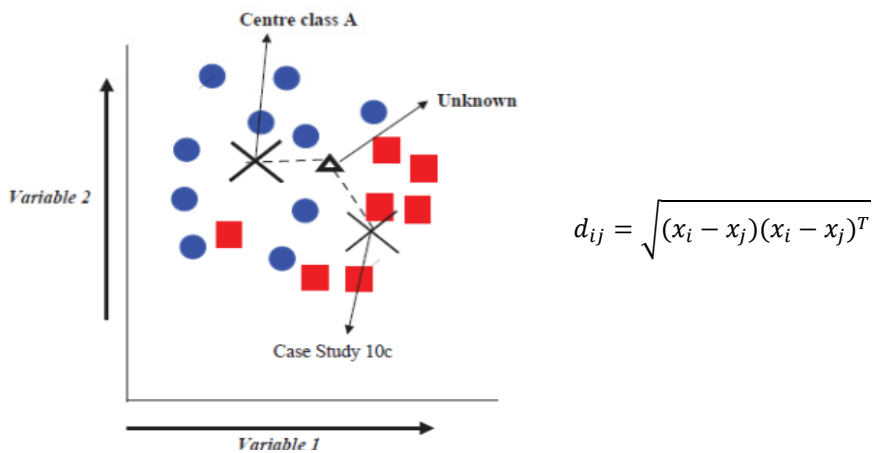


Figura 9. Principios de la distancia euclídea para dos variables y dos clases. La distancia de un objeto desconocido es calculada al centro de cada una de las clases y asignada a la clase cuyo centro este más cercano.

La distancia de Mahalanobis tienen en cuenta el hecho de que en muchos conjuntos de datos, las variaciones en algunas direcciones son más grandes que en otras, así como puede ser más significativa en unas direcciones que en otras. La distancia de Mahalanobis, basada en los datos iniciales vendría dada por:

$$d_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)C^{-1}(x_i - x_j)^T}$$

donde C es la matriz de covarianza de los datos, $cov(x) = \frac{x^T x}{m-1}$.

En este caso, todas las dimensiones en los datos son consideradas cuando se calcula la distancia. Esta medida no se recomienda para datos de elevadas dimensiones, con una covarianza fuerte porque sobre realza las dimensiones donde la variación es principalmente debida al ruido, motivo por el cual se ha utilizado en este capítulo la distancia euclídea.

En el análisis de agrupamientos que se ha utilizado en este capítulo se ha empleado el método de aglomeración de Ward [23], con la distancia euclídea, el cual une los dos grupos existentes de tal forma que varianza entre ellos se minimice.

En el método de Ward, en primer lugar se calcula la suma de las distancias al cuadrado, de cada miembro de un grupo, al centroide del mismo. A continuación, se consideran todas las posibles parejas de grupos y para cada combinación se determina la heterogeneidad del nuevo grupo. Obsérvese que en cada etapa se calcula la heterogeneidad de cada grupo, como la distancia al cuadrado de cada elemento a cada uno de los centroides. Se decide como grupo final de esta etapa aquel para el cual el aumento de la heterogeneidad sea mínimo.

En los métodos de agrupamientos habituales, cada muestra (o cada grupo de muestras) sólo puede entrar una vez en el proceso de ordenación, pero en el

23 J.H. Ward, Hierarchical grouping to optimize an objective function. Journal of the American Statistical Association, 1963, 53, 236-244.

método de Ward, una muestra (o grupo) puede estar inicialmente en un conjunto y pasar a otro a lo largo de sucesivas etapas de cálculo.

Este método conduce a agrupamientos bien estructurados y es uno de los métodos con frecuencia más usados [24].

El resultado final es un dendograma, que consiste en una representación gráfica de los datos en función de su similitud, teniendo en cuenta el grado de asociación entre ellos y que pone de manifiesto los agrupamientos que se forman.

Métodos de reconocimiento de pautas supervisadas (Supervised pattern recognition methods)

Hay un gran número de métodos incluidos en este grupo, principalmente centrados en la clasificación. Las técnicas de clasificación se pueden usar con el objetivo de encontrar una relación entre un vector independiente x y un vector cualitativo de respuestas. Por el término clasificación, se entiende la operación de asignar un objeto (muestra) a una categoría basada en las medidas llevadas a cabo. Geométricamente esto es lo mismo que identificar regiones en el hiperespacio de las variables, que correspondan a las diferentes clases.

Esencialmente consisten en lo siguiente [21]:

1. Selección del conjunto de entrenamiento (*training set*). Esto consiste en objetos de clasificación conocida, para los cuales se ha medido un cierto número de variables.
2. Selección de características, por ejemplo, la selección de variables que tienen sentido para la clasificación y eliminación de aquellas que no discriminan (es decir, no tienen poder modelador).

24 B.G.M. Vandeginste, D. L. Massart, L.C.M. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Symeyers-Verbeke. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B. 1st ed., Elsevier, 1998.

3. Aplicación de una regla de clasificación, usando el conjunto de entrenamiento.
4. Validación de la regla de clasificación, usando un test de muestras independientes.

Atendiendo al punto tres, entre estos métodos hay subdivisión muy importante, desde el punto de vista de la aplicación; se trata de la diferencia entre aquellos métodos de discriminación y aquellos que están dirigidos hacia el modelado de clases [25].

Las técnicas discriminantes son aquellas centradas en las diferencias entre muestras de diferentes clases y operan dividiendo el hiperespacio de las variables en tantas regiones como el número de categorías disponible (figura 10 a). Cuando se utiliza una técnica discriminante, las muestras siempre son asignadas a una de las clases disponibles. Por otro lado, las técnicas de modelado de clases se centran en las similitudes entre muestras de la misma clase en vez de en las diferencias entre estas, cada categoría es modelada separadamente (figura 10 b).

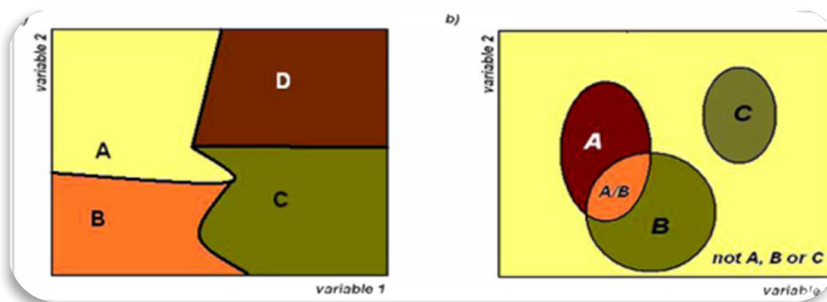


Figura 10. Técnicas discriminantes (a) y técnicas de modelado de clases (b) [25]

25 F. Marini, Classification methods in chemometrics, Current Analytical Chemistry, 2010, 6, 72-79.

En este capítulo se han utilizado, dentro del reconocimiento de pautas, las técnicas discriminantes, por tanto son las que se van a explicar a continuación.

***Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales
(Partial least square- discriminant analysis, PLS-DA)***

El análisis discriminante lineal (LDA) fue la primera técnica de clasificación presentada en la literatura. Fue introducida por Fisher en 1936, para el tratamiento de problemas de clasificación biológicos [26], y desde entonces es una de las técnicas más usadas frecuentemente debido a su simplicidad y robustez. El objetivo del LDA es encontrar una función, Y que sea combinación lineal de las variables originales X_1, X_2 , etc.:

$$Y = a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_nX_n$$

Las n medidas originales de cada objeto se combinan en un único valor de Y . Los coeficientes de los términos se eligen de manera que Y refleje la diferencia entre los grupos tanto como sea posible: los objetos en el mismo grupo tendrán valores similares de Y , y los objetos en grupos diferentes tendrán valores muy diferentes.

Desde un punto de vista estadístico, LDA asume que las probabilidades condicionales para cada clase están distribuidas normalmente. Además asume que las matrices de varianza/covarianza son iguales [22]. Bajo estas premisas, se obtienen las funciones de clasificación que son combinaciones lineales de las variables originales. Como consecuencia, las regiones correspondientes a las diferentes categorías se separan en el hiperespacio de las variables, mediante superficies lineales (hiperplanos).

Aunque es un modelo lineal, LDA tienen numerosas limitaciones que provienen de su fundamento estadístico. Por ejemplo para computar el

26 R.A. Fisher, The use of multiple measurements in taxonomic problems, *Annals of Human Genetics*, 1936, 7, 179-188.

centroide para cada clase y la matriz varianza-covarianza se necesita un ratio suficiente entre el número de muestras y el número de variables. Además no es capaz de sobrellevar datos altamente colineales, lo cual es bastante frecuente en problemas químicos.

Para superar estas limitaciones, una solución podría ser aplicar selección de variables, reducción o aplicar métodos como el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales, PLS-DA [27].

En PLS-DA se usan mínimos cuadrados parciales para desarrollar un modelo que predice el número de clase para cada muestra. La regresión por mínimos cuadrados parciales calcula un modelo lineal de los espacios X e Y bajo la premisa de que existe una relación lineal entre ambos espacios. El modelo resultante es un modelo lineal que es equivalente estadísticamente a la solución obtenida por LDA, pero con las ventajas de reducción de ruido y selección de variables de PLS donde los problemas anteriormente mencionados son resueltos.

El método PLS-DA ha sido aplicado en los dos trabajos presentados en este capítulo, con resultados satisfactorios, para clasificación de aceite de oliva atendiendo a sus variedades, para el caso del aceite de oliva virgen extra, y categorías, utilizando los datos de cromatografía gaseosa y los de espectrometría de masas por transferencia de protones.

Validación (Validation)

La validación es parte esencial de todas las técnicas quimiométricas, sobre todo, es muy común, cuando el principal objetivo es la evaluación de la habilidad predictiva. La validación, en los métodos de reconocimiento de pautas supervisadas es similar a la validación en calibración multivariante.

La situación ideal para la validación, se daría cuando hay muestras suficientes para crear un "conjunto de entrenamiento" (*training set*) y un "conjunto de

27 Barker, M.; Rayers, W., Partial Least Squares for discrimination. Journal of Chemometrics, 2003, 17, 166-173.

ensayo" (*test set*) independientes. Cuando esto no es posible, se suelen utilizar otras alternativas. La habilidad de predicción es determinada mediante el desarrollo del modelo en un parte del conjunto de entrenamiento y usando el resto como conjunto de ensayo. A menudo, esto se suele repetir hasta que todas las muestras del conjunto inicial han pasado por el conjunto de ensayo. Esto se conoce como "validación cruzada" (*cross-validation*).

El método de validación cruzada está basado en la validación interna, lo que significa que uno predice cada elemento en el conjunto de datos del resultado del análisis en los restantes. Esto se puede hacer dejando fuera un elemento cada vez, pero también dejando fuera grupos de elementos al mismo tiempo, lo cual reduce el número de análisis. Existen diversas modalidades para realizar la validación cruzada (*venetian blinds, random subsets, k-fold cross validation, etc.*) que se aplican dependiendo de las muestras contenidas en el set de prueba y las divisiones que se hagan en el set inicial de muestras para conseguirlo. Cuando se elimina una única muestra, cada vez, del conjunto de entrenamiento se conoce como "validación cruzada dejando uno fuera" (*leave-one-out cross validation*). Este procedimiento se suele utilizar cuando se disponen de pocas muestras en el conjunto de entrenamiento. En esencia, el conjunto de ensayo y la validación cruzada, simplemente proporcionan métodos para obtener residuales más realísticos que aquellos obtenidos por los modelos ajustados de forma ordinaria [28].

Preprocesado de los datos (Preprocessing)

El pretratamiento de los datos es un tema muy importante para el desarrollo de modelos predictivos mejores y que no conduzcan a resultados erróneos. Todos los métodos quimiométricos están influenciados por el preprocesado de datos, o la preparación de la información previa a la aplicación de los algoritmos matemáticos.

28 A. Smilde, R. Bro, P. Geladi, *Multi-way Analysis, Applications in the Chemical Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, 2004, pp 145-173.

Desafortunadamente no hay una regla establecida, un pretratamiento en particular puede mejorar un modelo en particular para una propiedad en particular y unos datos en concreto, pero perjudicar a otro modelo para un tipo de datos diferentes. Por tanto, cada caso necesita estudios particulares y diferentes ensayos son necesarios para encontrar el pretratamiento mas adecuado (esto normalmente requiere un proceso iterativo entre el analista y las opciones de preprocesado). Aunque también es cierto que hay situaciones bien conocidas para las cuales hay tratamientos establecidos que normalmente conducen a resultados mejorados [29].

A continuación se explican brevemente los que se han utilizado a lo largo de esta Tesis en los cromatogramas y espectros.

Corrección de línea base (Baseline correction)

Variaciones en la línea base cromatográfica tales como ruido, deriva, etc. son debidas a cambios pequeños en las condiciones experimentales, por ejemplo, gradientes de temperatura, sangrados de fases estacionarias, cambios en la respuesta del detector. Es muy usual encontrar este tipo de *alteraciones* en la línea base de los cromatogramas entre unos y otros. Estos efectos si no son resueltos, por ejemplo, pueden provocar la aparición de factores extra que intenten explicar estos cambios en el PCA.

Se han propuesto en literatura muchos métodos para corrección de la línea base, siendo la forma más común la de ajustar una curva a los datos y sustraer este valor de la señal. Este algoritmo ajusta una función polinomial a lo largo de segmentos del cromatograma usando regiones donde no eluyen picos de analitos para determinar los coeficientes del polinomio y entonces interpolar la señal de fondo de aquellas zonas donde se encuentran los picos. Las funciones son principalmente polinomiales de primer orden, sin embargo

29 J.M. Andrade-Garda, R. Boqué-Martí, J. Ferré-Baldrich, A. Carlosena-Zubieta, in: J.M. Andrade-Garda, *Basic Chemometric Techniques in Atomic Spectroscopy*, RSC Publishing, 2009, pp 194-200.

también se pueden usar de órdenes superiores. Una vez que se tiene determinada la función de la señal de fondo, se sustrae de la señal [30].

Para corregir la línea base de los cromatogramas, la cual presentaba variaciones debido a la deriva y al gradiente por la alta temperatura, tanto en este capítulo como en el siguiente, se ha utilizado el algoritmo conocido como mínimos cuadrados asimétricos (*asymmetric least squares, ALS*) [31]. Este algoritmo sustrae la línea base del cromatograma usando un procedimiento iterativo. Los puntos con un peso menor de cero son sobre estimados en cada iteración. Esto da lugar a un ajuste robusto con valores no negativos.

Alineamiento de los picos (Interval correlation shifting, icoshift)

En todas las separaciones, los tiempos de retención de los picos pueden variar fácilmente por unos segundos de un análisis a otro. Cuando se utilizan cromatogramas completos el alineamiento de picos es muy importante ya que se debe asegurar que cada pico, correspondiendo a uno o varios analitos, está registrado siempre en la misma posición en la matriz de datos, así los algoritmos reconocerán la señal correctamente.

Existen diferentes algoritmos para el alineamiento de picos en bibliografía [32,33]. Para el alineamiento de los cromatogramas de cromatografía de gases en este capítulo y el siguiente se ha utilizado el algoritmo icoshift [34].

-
- 30 R.G. Brereton, *Applied Chemometrics for Scientists*, John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
 - 31 P.H.C. Eilers, H.F.M. Boelens, Unpublished manuscript, http://www.science.uva.nl/~hboelens/publications/draftpub/Eilers_2005.pdf, (2005).
 - 32 G. Tomasi, F. Van den Berg, C. Andersson, Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data, *Journal of Chemometrics*, 2004, 18, 231-241.
 - 33 F. Van den Berg, G. Tomasi, N. Viereck, in: P.S., Belton, S.B. Engelsen, H.J. Jakobsen, *Warping: Investigation of NMR Preprocessing and Correction*, Cambridge 2005, pp. 131-138.

Este algoritmo es simple, rápido y muy útil cuando los datos requieren desplazamientos izquierda-derecha en el tiempo de retención. Este algoritmo alinea, empleando una transformada de Fourier, todos los cromatogramas simultáneamente, maximizando la correlación cruzada entre la muestra y una función objetivo dentro de una serie de intervalos definidos por el usuario. El uso de múltiples intervalos permite el alineamiento donde los desplazamientos ocurren en diferentes magnitudes y direcciones.

La ventaja que presenta este algoritmo sobre los demás, es la posibilidad del desplazamiento de la matriz simultáneamente, ya que un valor de desplazamiento único especialmente para datos cromatográficos, donde los picos se pueden desplazar en diferentes direcciones, no sería recomendado.

Centrado en la media (Mean-centering)

Un pretratamiento muy básico es el centrado en la media, es a veces tan común que no se considera como tal un pretratamiento. Corresponde a una variación de los datos en torno a la media y sirve para fijarse en las variaciones "entre" muestras. Este tratamiento de los datos previo se lleva a cabo calculando el vector medio de los datos en cada una de las columnas y sustrayéndolo punto a punto de cada vector de esa columna, así [35]:

$$X_{ijcen} = X_{ij} - \bar{X}_j$$

Después del centrado en la media, cada fila de datos incluye como las filas difieren de la muestra media en la matriz original de los datos. Geométricamente el proceso equivale a trasladar el origen de coordenadas al centroide o centro de gravedad. En la práctica, el centrado en la media puede tener gran influencia, por ejemplo, si hay problemas de línea base o solo se recoge una región pequeña de los datos. El centrado en la media a menudo, presenta una influencia significativa en el tamaño relativo del primer valor

-
- 34 F. Savorani, G. Tomasi, S.B. Engelsen Icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *Journal of Magnetic Resonance*, 2010, 202:190-202.
- 35 P. Gemperline, in: P. J. Gemperline, *Practical Guide to Chemometrics*, Taylor & Francis Group, 2006, pp 69-83.

propio (*eigenvalue*), el cual se ve reducido y puede influir en el número aparente de componentes significativos en el conjunto de datos.

Auto-escalado (Autoescale)

El escalado de variables es otro método muy común de pretratamiento en datos multivariantes. Estandarizar todas las variables a la misma varianza puede ser visto como una forma de dar a todas las variables la misma oportunidad de influir en el modelo. Muchas técnicas asumen que la magnitud de una medida es proporcional a su importancia y que el nivel de ruido es similar en todas las variables. Cuando las variables tienen diferentes escalas simplemente porque están en unidades diferentes, la magnitud de los valores no es necesariamente proporcional a la información contenida.

El autoescalado es un método que usa un centrado en la media seguido por la división de cada columna (variable) por la desviación estándar de la columna.

$$X_S = X \times S$$

donde X representa la matriz de datos y S es la matriz diagonal que corresponde a la inversa de la desviación estándar de cada columna. X_S es la matriz de los datos escalados. El resultado es que cada columna de X_S tiene una media de cero y una desviación estándar de uno.

Esta aproximación es válida si la fuente predominante de varianza en cada variable es señal en vez de ruido. Bajo estas condiciones, cada variable será escalada de tal forma que su señal útil tenga la misma influencia que la señal del resto de variables. Sin embargo si una variable tiene una contribución significativa de ruido o tiene una desviación estándar cercana a cero, el autoescalado provocará que este ruido de la variable tenga igual efecto que la señal en otras variables. Estas variables entonces, influenciarán adversamente

el modelo. Para estos casos se recomienda o excluir estas variables o usar el parámetro "offset" (o similar) que suele proporcionar el software [36].

El autoescalado fue aplicado en los datos de volátiles de los aceites de oliva virgen extra obtenidos mediante PTR-MS.

Autenticación - Técnicas basadas en "huella dactilares"

Como parte del título de esta Tesis y objetivo de la misma, la autenticación es un término que es necesario definir. Autenticidad de un alimento básicamente se refiere a si el alimento adquirido por el consumidor corresponde con su descripción. Descripciones falsas o erróneas se pueden dar de muchas maneras, desde adiciones no declaradas de materiales más económicos, declaraciones incorrectas de la cantidad de un ingrediente particular en el producto, hasta afirmaciones o declaraciones falsas sobre la fuente de los ingredientes, por ejemplo, su origen geográfico, origen animal o vegetal, variedad, etc. [37].

La autenticación cubre muchos aspectos, incluyendo adulteración, etiquetado, caracterización y origen. Atendiendo a estos aspectos, la autenticidad del aceite de oliva se ha convertido en un importante tema de estudio tanto desde el punto de vista comercial como de la salud [38].

El término autenticar esta principalmente relacionado con estos tres conceptos [39]:

- Detectar adulteraciones: el aceite de oliva "virgen extra" es un producto que por su importancia alimentaria, especialmente en los países mediterráneos, debe proteger su identidad y su valor añadido. Como consecuencia tiene un

36 B.M. Wise, N.B. Garragher, R. Bro, J.M. Shaver, W. Winding, R.S. Koch, Chemometrics Tutorial for PLS_Toolbox and Solo, Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, USA, 2006.

37 M. Lees, Food Authenticity and Traceability, CRC Press, Washington, DC, 2003.

38 W. Kamm, F. Dionisi, C. Hischenhuber, K.H Engel, Authenticity assessment of fats and oils, Food Reviews International, 2001, 17(3), 249-290.

39 F. Ulberth, M. Buchgraber, Authenticity of fats and oils, European Journal of Lipid Science and Technology, 102, 2000, 687-694.

CAPÍTULO III

precio más elevado en el mercado y está sujeto a fraudes, como la adición de aceites más baratos, mezcla de variedades, etc.

- *Identificar tipo procesado*: intentar diferenciar, vírgenes, vírgenes extra, refinados, etc. En los aceites que han sido extraídos en frío, sus características naturales (aroma, componentes minoritarios, etc.) se conservan frente a aquellos que han sufrido algún tipo de procesamiento (refinado, desodorización, etc.). Por esto es que las diferentes categorías de aceite de oliva están definidas por la legislación europea.

- *Caracterización origen geográfico-variedad*: normalmente se suele hacer en relación a los componentes minoritarios del aceite de oliva o en aquellos componentes mayoritarios que están afectados por el clima, suelo o variedad de una zona concreta.

Esta autenticación puede hacerse atendiendo al hecho de que algunos indicadores varían debido a factores biológicos, climáticos, agronómicos y temporales y las técnicas analíticas, en conjunto con las herramientas quimiométricas de las que se dispone en la actualidad, son capaces de ser sensibles a estos cambios.

Para llevar a cabo esta autenticación tanto de aceites de oliva, en este capítulo, como con mezclas de aceites vegetales en el siguiente, se han utilizado los datos obtenidos directamente tras el análisis mediante las técnicas analíticas (HTGC-MS y PTR-MS), lo que comúnmente se conoce como "huellas dactilares". Siguiendo el esquema que se presenta en la figura 7.

De esta manera, en la actualidad, el término "técnicas de huella dactilar" (*fingerprinting*) describe a una variedad de métodos analíticos que pueden medir la composición de productos alimentarios de una manera no-selectiva, esto es, mediante la colección de un espectro o un cromatograma.

El tratamiento matemático de la información contenida en esas "huellas dactilares" de cada muestra, es lo que permite la caracterización del producto alimentario o aceite en este caso [40].

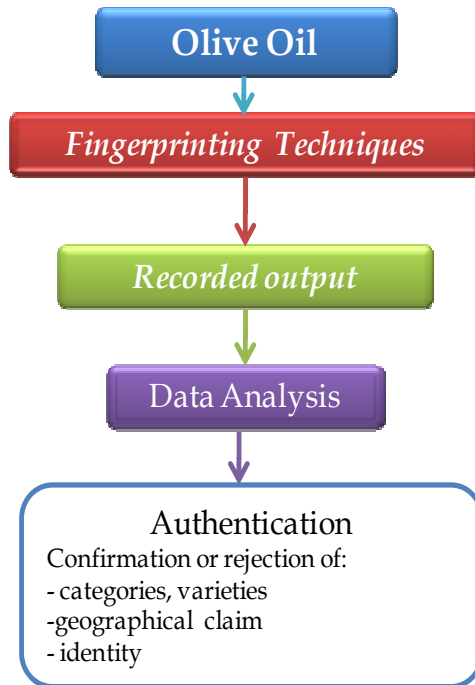


Figura 7. Esquema que describe las etapas de la metodología de las técnicas de "huellas dactilares".

Estas metodologías analíticas rápidas y precisas, pueden convertirse en herramientas muy potentes, de uso rutinario, para autenticación de alimentos en general y de aceite de oliva y aceites vegetales en particular, como se puede confirmar gracias a los resultados que se exponen en los artículos siguientes.

40 L. Mannina, V. Di Tullio, Food analysis by fingerprinting techniques, Trace Project, European Commission, 2009.

CAPÍTULO III

3. Análisis DAFO

<i>DEBILIDADES</i>	<i>AMENAZAS</i>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Necesidad de adaptación a un entorno nuevo de trabajo en corto tiempo. ✓ Inicio en el uso de técnicas nuevas sin experiencia previa. ✓ Acumulación de mucho trabajo y falta de tiempo 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Uso de cromatogramas completos en vez de datos de cuantificación. ✓ Necesidad de búsqueda de muestras. ✓ Posibilidad de no obtener resultados esperados
<i>FORTALEZAS</i>	<i>OPORTUNIDADES</i>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Realización de una estancia de investigación. ✓ Trabajo en un Instituto de Seguridad Alimentaria de elevado prestigio. ✓ Ilusión por nuevos retos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Uso de una técnica novedosa (PTR-MS). ✓ Establecer contactos con múltiples empresas internacionales. ✓ Nuevas líneas de investigación y colaboración

4. Artículo N°5

"Análisis multivariante de perfiles cromatográficos HT/GC-(IT)MS de triglicéridos para clasificación de variedades de aceite de oliva"

*Publicado en: Analytical and Bioanalytical Chemistry 399 (2011) 2093-2103
"Chemometrics special issue", que recoge algunos de las comunicaciones presentadas al VII Colloquium Chemiometricum Meditterraneum).*

Anal Bioanal Chem (2011) 399:2093–2103
DOI 10.1007/s00216-010-4423-z

ORIGINAL PAPER

Multivariate analysis of HT/GC-(IT)MS chromatographic profiles of triacylglycerol for classification of olive oil varieties

Cristina Ruiz-Samblás · Luis Cuadros-Rodríguez · Antonio González-Casado ·
Francisco de Paula Rodríguez García · Paulina de la Mata-Espinosa ·
Juan Manuel Bosque-Sendra

Abstract

The ability of multivariate analysis methods such as hierarchical cluster analysis, principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) to achieve olive oil classification based on the olive fruit varieties from their triacylglycerols profile, have been investigated. The variations in the raw chromatographic data sets of 56 olive oil samples were studied by high-temperature gas chromatography with (ion trap) mass spectrometry detection. The olive oil samples were of four different categories ("extra-virgin olive oil", "virgin olive oil", "olive oil" and "olive-pomace" oil), and for the "extra-virgin" category, six different well identified olive oil varieties ("hojiblanca", "manzanilla", "picual", "cornicabra", "arbequina" and "frantoio") and some blends of unidentified varieties. Moreover, by pre-processing methods of chemometric (to linearise the response of the variables) such as peak-shifting, baseline (weighted least squares) and mean centering, it was possible to improve the model and grouping between different varieties of olive oils. By using the first three principal components, it was possible to account for 79.50% of the information on the original data. The fitted PLS-DA model succeeded in classifying the samples. Correct classification rates were assessed by cross-validation.

Keywords. Triacylglycerols, Olive oil varieties, High-temperature gas chromatography–mass spectrometry, Chemometric multivariate classification.

Introduction

Vegetable oils are products derived from vegetable fruits or seeds by mechanical pressure or extraction with organic solvents. Olive oil is one of the most valuable edible vegetable oils. It is produced by mechanical means from the fruit of the olive tree (*Olea europaea* L.) and requires no refinement prior to consumption.

Brand named olive oil can be found in the market in four major categories: (i) "extra-virgin" olive oil, it is the pure natural juice of the olive without further processing beyond cold pressing. Its free acidity does not exceed 0.8% and it shows a perfect aroma and taste; (ii) "virgin" olive oil, it is the natural juice of the olive whose acidity varies between 0.9% and 2%; (iii) "olive oil", refined olive oil which contains a small percentage of natural juice from olive oil (virgin olive oil) usually between 20% and 30%; and (iv) "olive-pomace" oil (pomace is the ground flesh and pits left after pressing), which is the oil obtained by treating olive fruits solid residues with solvents or other physical treatments. This last one is considered the poorer-quality olive oil. In addition, for some categories it is also possible to distinguish different grades. Several recognised international bodies have introduced control measures to ensure standardised quality and classification of the different categories of olive oils available [1,2,3,4].

Extra-virgin olive oil is a high-quality vegetable oil traditionally produced in the countries of Mediterranean basin, and it can be consumed directly without purification. The chemical composition of an extra-virgin olive oil is well known to exhibit a greater variability than other vegetable oils as it is largely influenced by agronomical practices, geographical origins, harvesting periods and processing technologies [5,6]. In addition, different types of extra-virgin olive oils are marketed according to the variety of olive fruit used. In Spain, there are more than 200 botanical varieties of olive trees of which only around 15 have importance on marketing for olive oil. Their olives vary in size, oil content, taste, chemical characteristics, ripening time and many other factors. They could have different looks as well as growing characteristics and preferences. Although originally each variety was

characteristic of a geographical area, nowadays different varieties are cultivated in the same area and it is not possible to establish a one-to-one relationship between variety and geographical origin. Differences between varieties can be very subtle; however, it is now possible to use DNA fingerprinting to identify specific varieties [7,8].

When the olive oil is produced from a single variety, this olive oil is labelled as "monovarietal"; this is usual only for extra-virgin and virgin categories. Some few varieties are utilised only to produce monovarietal olive oil; the ones that have a high sensory quality. The "monovarietal" hallmark confers an added value to the olive oil and so it is protected by the producing corresponding countries.

The olive oil is mainly composed of triacylglycerols (TAGs >98%) and complex mixtures on other minor constituents of a wide range of chemical nature. A lot of different reviews on the analytical methods for the determination (identification and quantification) of the different chemical species of TAGs are available in the scientific literature, although the chromatographic methods are the most utilized [9,10,11,12]. The occurrence of certain TAGs species in some oils in high amounts has been used for the detection of adulteration of other higher-priced oils, in which these TAG species are absent or present only at trace levels [13,14].

Due to the large price gap between olive and other vegetable oils and also between the various categories of olive oil, extra-virgin may cost nearly twice as much as refined oils and adulteration of olive with cheaper oils is a temptation [15,16]. The search for the origin and the authenticity of olive oils has been the object of numerous studies in the past few years using the extremely varied physical-chemical determinations [17,18,19,20]. In addition, a chemometric treatment is usually required [21,22,23]. Chemometric applications have been classified in two main categories. In the first category, the samples are chemically treated in order to determine the composition of different constituents, for example fatty acids and triacylglycerols [24,25] or sterols [26,27]. On the other hand, the second option is the direct analysis of the sample without sample pre-treatment but with dilution. This option is

based upon the use of nonspecific analytical techniques such as fluorescence [28,29], raman [30] infrared (IR) [31] and nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometries [32] as well as mass spectrometry (MS) [33,34,35] and electronic nose [36], which provide characteristic fingerprints of the olive oil sample. The high amount of data in these fingerprints cannot be processed without chemometric tools (multivariate pattern recognition approaches), which enable adulterated samples of virgin olive oil to be detected.

In the case of chromatographic profiles, the whole run or selected time windows can be used as analytical data. In addition, the occurrence of unresolved peaks should not be taken as a negative issue, since chromatograms may be exploited as chemical fingerprints that provide specific information on the samples analyzed [37]. Because of this, in the recent years liquid chromatographic techniques, lonely or in conjunction with mass spectrometry, are also being used for fingerprint purposes [38,39].

Multivariate analysis for processing chromatographic data has been shown to be an efficient tool for classification and prediction in assessing authenticity of vegetable oils improving and searching similarities of oils samples and it shows promise for routine quality control of oils [40]. Spectra data handled from techniques, as IR, NMR or MS has been proposed for develop chemometric models to characterise and discriminate olive oil varieties [41].

Consequently, the availability of routine analytical methods, simple and fast, for the authentication of monovarietal virgin olive oils constitutes a growing necessity nowadays for the quality control laboratories [42]. From the point of view of the chemical analyses, this constitutes an arduous task because to find varietal chemical markers that can be applied to the majority of the olive oil products is not easy. Nowadays, the olive oil varieties can be differentiated from their flavour properties by sensory analysis, composition of volatile compounds [43], phenolic compounds [44]. In addition, a data set of the quality physico-chemical characteristics has been also applied [45].

Surprisingly, studies leading to the use of the chromatographic triacylglycerol profiles to discriminate and classify different olive oil varieties

have not been reported. In this paper, the TAGs profile from different selected Spanish olive oils were analyzed by high-temperature gas chromatography with (ionic trap) mass spectrometry detection. Fifty-six samples of four different olive oil categories ("extra-virgin olive oil", "virgin olive oil", "olive oil", and "olive-pomace" oil), and for the "extra-virgin" category, six different well-identified varieties ("hojiblanca", "manzanilla", "picual", "cornicabra", "arbequina", and "frantoio") and some blends of unidentified varieties were used as data set. This paper focuses on the use of TAGs profile obtained from the GC/MS fingerprint data to assess the authenticity and classifies the valuable "monovarietal" olive oils by using classical pattern recognition tools.

Materials and Methods

Reagents and samples

The olive oils samples distribution was as follows, fifty-six samples from four different categories: 46 samples were "extra-virgin", three were "virgin", four were "olive oil", (market blend of refined and virgin olive oil) and three samples were "olive-pomace" oil. They were purchased from common markets of Spain. The samples of extra-virgin category were divided in two groups: the first one, were labelled as monovarietals of six different varieties (seven samples of "hojiblanca", two samples of "manzanilla" eight samples of "picual", five samples of "cornicabra" six samples of "arbequina" and six samples of "frantoio" and the second one, 12 samples, were declared only as "extra-virgin" (they are generally the result of blending different varieties which are not stated by the producer).

The authentication of the samples was made based on the product label. Due to the fact that the official quality controls, which the olive oil follows in Spain, in compliance with the European Regulation on marketing, are very rigorous, it was not required to apply another authentication process since this information was assured.

The samples were stored at 4 °C until its analysis. For analysis, olive oil was dissolved in chloroform (99%, reagent grade) to a final concentration

of 0.2% (w/w). Any further sample preparation was not needed prior to chromatographic analysis.

Chromatographic conditions

All separations were performed with a VARIAN GC 3800 gas chromatograph (PA, USA) equipped with a split/splitless injector coupled to a VARIAN 4000 ion trap mass spectrometer (PA, USA) equipped with an electron impact source. A split injection with a ratio of 1:50 was used. The samples were introduced using a robotized autosampler module (Combipal, CTC ANALYTICS, Switzerland).

Scan control, data acquisition, and processing were performed by a MS Workstation software (VARIAN, PA, USA) data system. The sample volume injection was 2 μ l. A capillary column coated with 65% diphenyl-35% dimethylpolysiloxane stationary phase (Restek Rtx-65TG; 30 m \times 0.32 mm i.d. \times 0.1 μ m; maximum temperature 370 $^{\circ}$ C; Restek Corp., Bellefonte, PA, USA) was used.

The GC oven temperature was programmed from 315 to 350 $^{\circ}$ C at 1 $^{\circ}$ C/min. The injection port was held isothermally at 370 $^{\circ}$ C. Helium (99.995%) was used as the carrier gas and its flow rate was 1.5 ml/min. The mass spectrometric conditions were as follows. The ion source temperature was held at 250 $^{\circ}$ C during the GC/MS runs. The transfer-line temperature was maintained at 350 $^{\circ}$ C throughout the analyses. The electron energy was 70 eV and the emission current 10 μ A.

Chromatograms are recorded in full-scan mode. Average spectra were acquired in the m/z range of 200–1,000 m/z and were recorded at a scan speed of 1.20 s. Scan control data acquisition, and processing were performed by a MS Workstation software (VARIAN, PA, USA) data system.

TAG chromatograms

The presented method is simple since the diluted olive oil sample is directly injected into the system, without any preliminary chemical derivatization or purification step. Each recorded chromatogram is constituted by a vector of

1,724 elements. These are related to the signal intensity measured by the detection system and it was acquired between 0 and 35 min. Obviously, the signal maxima are the heights from the different chromatographic peak which correspond to the triacylglycerol profile of the different olive oils.

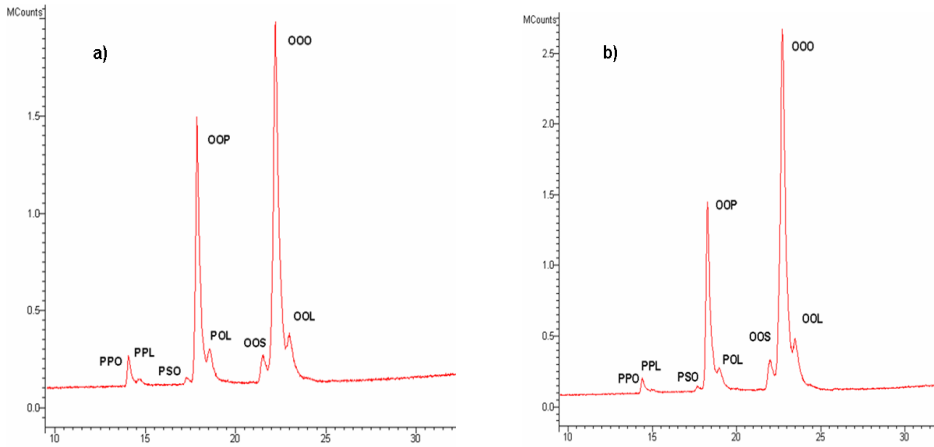


Figure 1. HT/GC-(IT)MS triglycerides profiles (total ion chromatogram) of two varieties of extra-virgin olive oils: a "picual" and b "cornicabra"

As it has already been commented in the Introduction section, in order to carry out the chemometric analysis, it is only necessary to have the data matrix corresponding to the chromatographic profile handled by the measuring instrument and the identification of the different species of TAGs is not mandatory. Nevertheless, in a previous paper the readers can find the methodology of identification [46].

Eight major TAGs species were identified in all studied oil samples. As representative example, two typical chromatograms, obtained under the conditions above described, of two monovarietals extra-virgin olive oils (picual and cornicabra) are shown in Fig. 1.

Chemometric analysis

The matrix employed to characterization of the olive oils samples was composed by as many rows as samples analyzed and as many columns as the entire chromatograms recorded during the data acquisition time. The whole set of data was imported to Excel from the GC/MS Workstation software (VARIAN, PA, USA). All chemometric treatments were performed by using the PLS Toolbox (Eigenvector Research Inc., West Eaglerock Drive, Wenatchee, WA) for Matlab® software (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA).

Hierarchical cluster analysis (HCA) was applied to determine the natural conformation of groups of samples. This statistical method organises the clustering of different objects without any prior knowledge of the class membership, on the basis of a similarity indicator (distance) calculated from mathematical relationships of the numerical properties of samples. In an iterative procedure, each sample was linked to the closest sample or group of samples and a characteristic distance was used to describe this union. The distance between groups of samples (commonly called classes or clusters) can be evaluated in different ways and is the main difference among common linkage methods. The Ward method was used and the difference of this method is that as distance measured, it considers the variance within clusters as well as separation between clusters [47].

Pre-processing In order to improve the data into a form suitable for principal component analysis (PCA), the data set, obtained from the entire chromatogram, was pretreated. The icoshift programme [48], designed for solving signal alignment problems, was used. The icoshift algorithm is based on correlation shifting of spectral intervals and employs a fast Fourier transform engine that aligns all spectra simultaneously. This algorithm independently aligns each signal to a target by maximising the cross-correlation between user-defined intervals. The dataset is split into the intervals defined by the user and aligns them towards the average spectrum using the highest allowed shift (fastest method) for each interval. Icoshift was applied to each kind of sample separately due to some differences were found in retention times within the samples. Figure 2 shows the alignment of all

chromatograms from "arbequina" and "picual" varieties using icoshift. It is observed that when the different chromatograms are overlapped, some differences in retention times are found between both varieties.

Moreover, the baseline (weighted least squares) preprocessing method was applied for automatically removing baseline offsets from data. Finally, mean centering preprocessing method, was used.

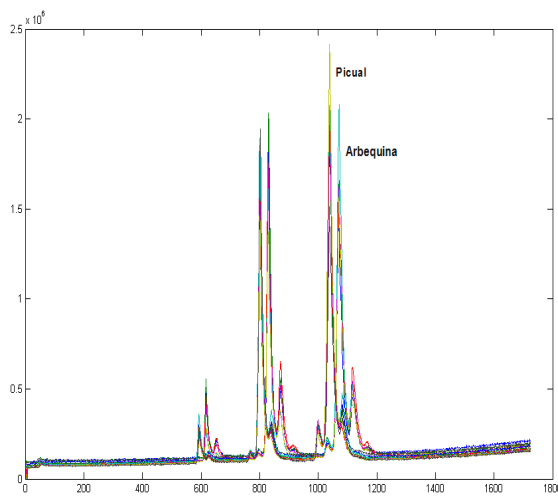


Figure 2. Overlapped chromatograms of "arbequina" and "picual" varieties after pre-treatment with Icoshift

Principal components analysis (PCA) is a technique for reducing the amount of data when there is correlation present. The idea is to find principal components which are linear combinations of the original variables describing each sample. These principal components explain the main point of the variance in the original data. PCA were applied to the data in order to find out a natural grouping tend as well as to detect the possible presence of outliers between the samples that were going to made up the training set [47].

Partial least squares-discriminant analysis. The principle of PLS is to find the components in the input matrix (X) that describe as much as possible of the relevant variations in the input variables, and at the same time have maximal correlation with the target value in Y, but without including the variations that are irrelevant or noisy. Y-matrix was constructed from the grouping variables consisting of zeros and ones. The matrix consisted of as many columns as there are classes and an observation had the value one for the class it belongs to and zeroes for the rest. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was performed in order to sharpen the separation between groups of observations and classify between the olive oil samples. Cross-validation was used for validation of the model.

Results and discussion

The chromatographic triglyceride profiles of the olive oils studied were all found to be qualitatively similar. In this study, the statistical analyses take advantage of the variations in the raw chromatographic data sets as fingerprints, in each sample, as a pattern for inter-comparison of the samples.

Hierarchical cluster analysis

The TAGs GC/MS chromatographic profile of the olive oil samples was used to examine the similarity (or dissimilarity) of oils by means of HCA. The results of HCA are presented in the form of a dendrogram, which shows the different groups at a normalised or rescaled distance of each kind of samples from the others, when it is read from right to left.

In Fig. 3, the dendrogram obtained from the 56 olive oil samples applying the Ward method is shown.

"extra-virgin" and "virgin" are together in one group, in addition to the monovarietals of "picual", "manzanilla" and "hojiblanca". Perhaps, these facts are due to these blends are made up by these varieties, which are the most cultivated, and probably have similar TAGs profile. The second group is also formed by the blends of varieties "olive-pomace" and olive oil" close to the monovarietals virgin olive oils "frantoio", "cornicabra" and "arbequina" varieties.

For test the robustness of the clusters, a resampling was performed exchanging labels of the data set. The results obtained were the same as the previous one.

Principal components analysis

Figure 4a shows the score plot on the PC2-PC1 plane. As it can be seen, the variance explained by the first and the second principal components was 63.90% and 14.84%, respectively. Regarding to the number of principal components (PCs) selected, in this study, four components were used to obtain the best representation of the objects under consideration and this number of PCs was enough to explain the 91.52% of the data variance. Due to separation among clusters was not complete, the analysis was extended until the third component (6.84% of the total variance) and reporting on the PC3-PC2 plane in which a better separation was achieved (Fig. 4b). This is due to several concurrent aspects such as the decrease in S/N associated with first order differentiation and that the first PC also describes the baseline. After PC1 explained all this ineffective information of the chromatographic profiles, PC2 and PC3 started to explain the relevant information related to the samples of olive oils.

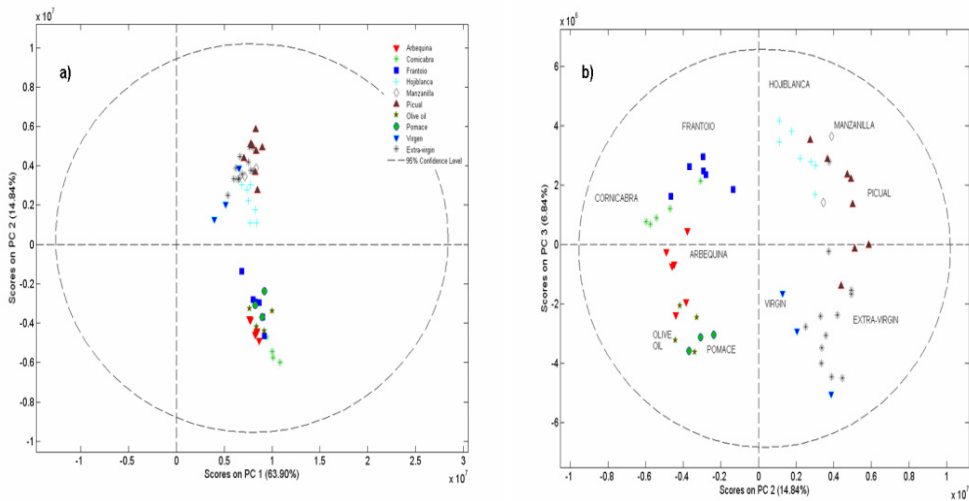


Figure 4. PCA scores plot obtained from the data of the TAGs chromatographic profile of the olive oils: a) scores on the PC2–PC1 plane; b) scores on the PC3–PC2 plane

Pre-processing methods were applied in order to improve the obtained model. The unaligned raw chromatograms were checked by a peak-shifting alignment (icoshift programme) to each variety and category in order to improve the signal alignment. Each signal was aligned by using the average spectrum as a reference. The user-defined intervals used for alignment were (1,300,550,900). If this peak-shifting alignment would have been carried out with all the samples together some valuable information would have been lost due to the differences in the retention times. The baseline (weighted least squares) correction and mean centering were also applied. Clearly, this pre-processing method had improved the PCA model significantly by reducing its complexity and obtaining a better grouping of the varieties. The pre-processing methods were also used in further analysis.

Figure 5, shows the score plot after pre-processing methods in which separation among clusters is roughly complete. As it can be seen in this figure, the previous preprocessing steps greatly improve the resolution power of the PCA model. The variances explained by the first and the second

CAPÍTULO III

components, respectively, are 43.35% and 19.31%. Three components were used to obtain the best representation and this number of PCs was enough to explain the 79.50% of the data variance. Similarities in sample clustering were observed.

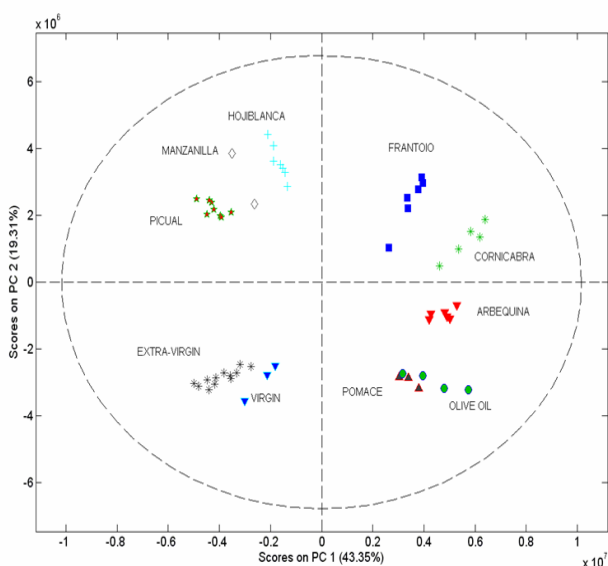


Figure 5. PCA plot obtained from the pre-processed chromatographic data of the olive oils samples

As it is shown on the score plot, in the positive part of PC1, the monovarietals extravirgin olive oils "frantoio", "arbequina" and "cornicabra" and the blends of "olive-pomace" and "olive oil" are located. The positive loadings in PC1 agree to the intensities of the major peaks matching to the triacylglycerides OOP (1,2-olein-3-palmitin) and OOO (triolein). On the negative part of PC1 the monovarietals extra-virgin olive oils "picual", "manzanilla" and "hojiblanca" and the blends of "extra-virgin" and "virgin" are found. The negative loadings in PC1 are mainly explained by the intensities of the chromatogram of PSO (1-palmitin-2-stearin-3-olein) and OOS (1,2-olein-3-stearin). On PC2, it can be observed a separation between monovarietals virgin olive oils ("picual", "manzanilla", "hojiblanca", "frantoio", "cornicabra")

and "arbequina") and the blends of different varieties ("olive oil", "olive-pomace", "virgin" and "extravirgin"). In addition the samples of each variety and blends of varieties are quite together. It is surprising that both "olive pomace" and "olive oil" categories are together. Perhaps, either same varieties were used to blend them or due to the process which is used for these kinds of oils, the information about the original TAG profile, related with the varieties used in these blends, has been lost and a new "manufactured" variety has come out.

Partial least squares-discriminant analysis

PLS-DA was carried out on the 56 samples in order to estimate a classification model for the olive oil samples. The fitted PLS-DA model succeeded in classifying the samples. The performance of the fitted model was evaluated using cross-validation from random subsets. For external validation, 25% of the samples were removed at random from the complete dataset. The remaining data were then used to fit a model, which was subsequently applied to predict class membership for the removed samples. This procedure was repeated to ensure that a prediction was available for all samples. The RMSEP of all classes was lower than 0.3. Three latent variables were used. The quality of the classification model has been considered on the basis of the validation results. According to the results and on the same way that the PCA analysis, the PLS-DA classification model was able to predict monovarietal virgin olive oils and the blends of different varieties ("olive-pomace", "olive oil", "virgin" and "extra-virgin").

The y-predicted plots of the PLS-DA model for some of the samples: (a) "frantoio", (b) "hojiblanca", (c) "picual" and (d) "extra-virgin" olive oil, are presented in Fig. 6.

CAPÍTULO III

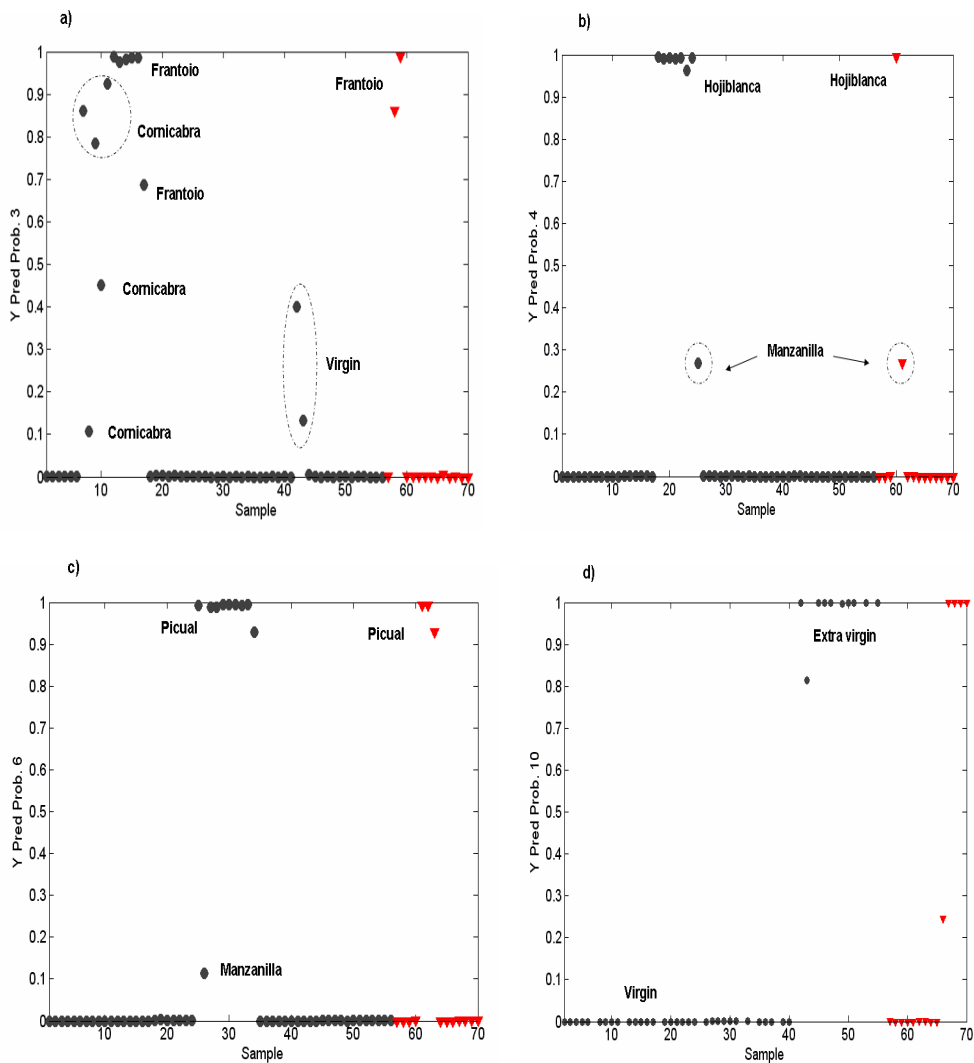


Figure 6. Results of each y-predicted PLS-DA for classification of the samples: a "frantoio", b "hojiblanca", c "picual" and d "extra-virgin" olive oil. Samples of validation (triangles) and the samples of calibration (circles)

Conclusions

The analysis of raw chromatographic data sets may bring additional advantages with respect to the previous studies. Firstly, no additional calculations of TAG concentrations through the corresponding calibration procedure were needed. Secondly, raw chromatogram vectors (values taken at each elution time), with some pre-processing methods, were directly used as multivariate data for HCA, PCA and PLS-DA analysis. Due to this, by using GC/MS analysis and different chemometric approaches, it has been demonstrated the singularity of olive oil regarding its chromatographic profile. All the described results have shown out there is a wide variability in the characteristics of the olive oils because of the diversity of the varieties and there is a certain tendency to the clustering due to this.

Finally, many types of extra-virgin olive oils are produced by mixing oils from different varieties of olive trees, and they are sold as monovarietals olive oils. Adulteration of the "added value" olive oils, involving the replacement of high-cost extra-virgin olive oil with lower grade, cheaper substitutes, could potentially be very lucrative for a manufacturer or raw material supplier. For this reason, the proposed method could be a way to distinguish them and to avoid these kinds of frauds.

Acknowledgements. The authors would like to thank the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, project P07-FQM-02667 and Consejería de Agricultura y Pesca) for financial assistance. This work had also been partially supported by European Regional Development Funds (ERDF). One of the authors, C.R.S., is also grateful to the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa) for the personal postgraduate grant.

References

- 1 Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils. CODEX STAN 33-1981 (Rev. 2-2003), Commission of the Codex Alimentarius.
- 2 Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive-Pomace Oils. COI/T.15/NC no.3/Rev. 1-2003, International Olive Oil Council (IOOC).
- 3 Commission Regulation (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. Off. J. Eur. Commun. 1991R2568-EN- 01.10.2008-022.001-1/110 (October 2008 consolidated text).
- 4 United States Standards for Grades of Olive Oil and Olive-Pomace Oil. Document ID: AMS-FV-08-0073-0006:2010. U. S. Department of Agriculture.
- 5 Di Giovacchino L, Sestili S, Di Vincenzo D (2002) Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol* 104: 587-601
- 6 Cerretani L, Bendini A, Del Caro A, Piga A, Vacca V, Caboni MF, Gallina Toschi T (2006) Preliminary characterisation of virgin olive oils obtained from different cultivars in Sardinia. *Eur Food Res Technol* 222:354-361
- 7 Gonzalo Claros M., Crespillo R., Aguilar M.L., Canovas F.M. (2000) DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (*Olea europea* L.). *Euphytica* 116:131-142.
- 8 Martins-Lopes P., Gomes S., Santos E., Guedes-Pinto H. (2008) DNA markers for Portuguese olive oil fingerprinting. *J. Agric Food Chem.* 56(24):11786-91.
- 9 Andrikopoulos NK (2002) Chromatographic and Spectroscopic Methods in the analysis of triacylglycerol species and regiospecific isomers of oils and fats. *Crit Rev Food Sci Nut.* 42:473-505
- 10 Andrikopoulos NK (2002) Triglyceride species compositions of common edible vegetable oils and methods used for their identification and quantification. *Food Rev Int.* 18: 71-102.
- 11 Buchgraber M, Ulberth F, Emons H, Anklam E (2004) Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. *Eur J Lipid Sci Technol*, 106: 621-648.
- 12 De Clercq N, Foubert I, Dewettinck K (2008) Separation and analysis of acylglycerols by chromatographic methods. *Lipid Technol* 20: 232-234.
- 13 Ryur Park J, Lee DS (2003) Detection of adulteration in olive oils using triacylglycerols compositions by high temperature gas chromatography. *Bull Korean Chem Soc* 24: 527-530.
- 14 Christopoulou E, Lazaraki M, Komaitis M, Kaselimis K (2004) Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils. *Food Chem* 84: 463-474.
- 15 Ulberth F, Buchgrader M (2000) Authenticity of fats and oils. *Eur J Lipid Sci Technol* 102: 687-694.
- 16 Firestone D (2001) Assuring the integrity of olive oil products. *J AOAC Int* 84: 176-180.

- 17 Aparicio R (2000) Authentication. In: Aparicio R, Harwood J (eds.) Handbook of olive oil. Analysis and properties, pp. 491-513. Aspen Publ., Gaithersburg (Maryland)
- 18 Aparicio R, Aparicio-Ruiz R (2000) Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques, *J Chromatogr A*, 881: 93-104.
- 19 Kamm W, Dionisi F, Hischenhuber C, Engel KH (2001) Authenticity assessment of fats and oils. *Food Rev Int* 17: 249-290.
- 20 Dionisi, F; Hug, B; Kamm, W (2003) Authenticité des graisses et des huiles. In: Ducauze CJ (ed.) *Fraudes alimentaires: approche réglementaire et méthodologie analytique*, pp. 221-280. Lavoisier, Paris
- 21 Aparicio R (2000) Characterization: mathematical procedures for chemical analysis. In: Aparicio R, Harwood J (eds.) Handbook of olive oil. Analysis and properties, pp. 285-355. Aspen Publ., Gaithersburg (Maryland)
- 22 Zhang G, Ni Y, Churchill J, Kokot S (2006) Authentication of vegetable oils on the basis of their physico-chemical properties with the aid of chemometrics. *Talanta* 70: 293-300.
- 23 Arvanitoyannis IS, Vlachos A (2007) Implementation of physicochemical and sensory analysis in conjunction with multivariate analysis towards assessing olive oil authentication/adulteration. *Crit Rev Food Sci Nut* 47: 441-498.
- 24 Ollivier D, Artaud J, Pinatel C, Durbec JP, Guérère M (2003) Triacylglycerol and fatty acid compositions of french virgin olive oils. Characterization by chemometrics. *J Agric Food Chem* 51: 5723-5731.
- 25 Brodnjak-Voncina D, Cencic Kodbab Z, Novic M (2005) Multivariate data analysis in classification of vegetable oils characterized by the content of fatty acids. *Chemometr Intell Lab Sys* 75:31-43.
- 26 Rui Alves M, Cunha SC, Amaral JS, Pereira JA, Oliveira MB (2005) Classification of PDO olive oils on the basis of their sterol composition by multivariate analysis. *Anal Chim Acta* 549: 166-178.
- 27 Galeano Diaz T, Durán Merás I, Sánchez Casas J, Alexandre Franco MF (2005) Characterization of virgin olive oils according to its triglycerides and sterols composition by chemometric methods. *Food Control* 16:339-347.
- 28 Poulli KI, Mousdis GA, Georgiou CA (2006) Synchronous fluorescence spectroscopy for quantitative determination of virgin olive oil adulteration with sunflower oil. *Anal Bioanal Chem* 386: 1571-1575.
- 29 Guimet F, Ferré J, Boqué R (2005) Rapid detection of olive-pomace oil adulteration in extra virgin olive oils from the protected denomination of origin "Siurana" using excitation-emission fluorescence spectroscopy and three-way methods of analysis. *Anal Chim Acta* 544: 143-152.
- 30 Zou MQ, Zhang XF, Qi XH, Ma HL, Dong Y, Liu CW, Guo X, Wang H (2009) Rapid authentication of olive oil adulteration by Raman spectrometry. *J Agric Food Chem* 57: 6001-6.

CAPÍTULO III

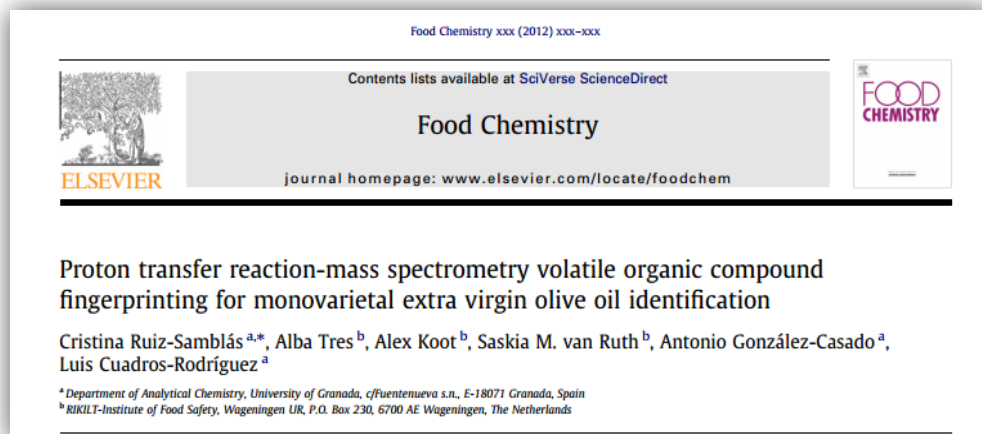
- 31 Vlachos N, Skopelitis Y, Psaroudaki M, Konstantinidou V, Chatzilazarou A, Tegou E (2006) Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Anal Chim Acta* 573-574:459-465
- 32 Mannina L, D'Imperio M, Capitani D, Rezzi S, Guillou C, Mavromoustakos T, Molero M, Herrera A, Thomas F, Aparicio R (2009) H NMR-based protocol for the detection of adulterations of refined olive oil with refined hazelnut oil. *J Agric Food Chem* 2009: 11550-11556.
- 33 A. Jakab, K. Nagy, K. Héberger, K. Vékey and E. Forgács. Differentiation of vegetable oils by mass spectrometry combined with statistical analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; 16: 2291-2297.
- 34 Gómez-Ariza JL, Arias-Borrego A, García-Barrera T, Beltrán R (2006) Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for olive oil authentication. *Talanta* 70:859-869.
- 35 Araghipour N, Colineau J, Koot A, Akkermans W, Moreno-Rojas JM, Beauchamp J, Wisthaler A, Mark TD, Downey G, Guillou C, Mannina L, van Ruth S (2008) Geographical origin classification of olive oils by PTR-MS. *Food Chem* 108: 374-383.
- 36 Cosio MS, Ballabio D, Benedetti S, Gigliotti C (2006) Geographical origin and authentication of extra virgin olive oils by an electronic nose in combination with artificial neural networks, *Anal Chim Acta* 567: 202-210
- 37 Amigo JM, Skov T, Bro R (2010) ChroMATHography: solving chromatographic issues with mathematical models and intuitive graphics. *Chem Rev* 110:4582-4605
- 38 Nagy N, Bongiorno D, Avellone G, Agozzino P, Ceraulo L, Vékey K (2005) High performance liquid chromatography-mass spectrometry based chemometric characterization of olive oils. *J Chromatogr A*, 1078: 90-97.
- 39 Gómez Ariza JL, Arias Borrego A, García Barrera T (2006) Use of flow injection atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry for fast olive oil fingerprinting. *Rapid Commun Mass Spect* 20: 1181-1186.
- 40 Priego Capote F, Ruiz Jiménez J. Luque de Castro MD (2007) Sequential (step-by-step) detection, identification and quantitation of extra virgin olive oil adulteration by chemometric treatment of chromatographic profiles. *Anal Bioanal Chem* 388: 1859-1865.
- 41 Marcos Lorenzo I, Pérez Pavón JL, Fernández Laespada ME, García Pinto C, Moreno Cordero B, Henriques LR, Peres MF, Simões MP, Lopes OS (2002) Application of headspace-mass spectrometry for differentiating sources of olive oil. *Anal Bioanal Chem* 374: 1205-1211.
- 42 Aparicio R, Luna G (2002) Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *Eur J Lipid Sci Technol*, 104: 614-627.

- 43 Morales MT, Luna G. Aparicio R (2006) Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile composition. *Food Chem*, 98: 243-252.
- 44 García Villalba R, Carrasco Pancorbo A, Oliveras Ferraros C, Vázquez Martín A, Menéndez JA, Segura Carretero A, Fernández Gutiérrez A (2009) Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *J Pharm Biomed Anal* 51: 416-529.
- 45 Marini F, Balestrieri F, Bucci R, Magrý AD, Magrý AL, Marini D (2004). Supervised pattern recognition to authenticate Italian extra virgin olive oil varieties. *Chemometr Intell Lab Sys* 73: 85-93.
- 46 C. Ruiz Samblás, A. González Casado, L. Cuadros Rodriguez, F.P. Rodríguez García (2010) Application of selected ion monitoring to the analysis of triacylglycerols in olive oil by high temperature-gas chromatography/mass spectrometry. *Talanta* 82: 255-260.
- 47 Varmuza K, Filzmoser P (2009). Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics. CRC Press, London.
- 48 Savorani F., Tomasi G., Engelsen S.B., (2010). Icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *J Magn Reson* 202: 190-202.

5. Artículo N°6

"Huellas dactilares de compuestos orgánicos volátiles mediante reacción por transferencia de protones-espectrometría de masas para identificación de aceite de oliva virgen extra"

Aceptado en: Food Chemistry (2012) In press
doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.135



Abstract

Proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS) is a relatively new technique that allows the fast and accurate qualification of the volatile organic compound (VOC) fingerprint. This paper describes the analysis of thirty samples of extra virgin olive oil, of five different varieties of olive fruit (Arbequina, Cornicabra, Frantoio, Hojiblanca, and Picual) by PTR-MS.

A multivariate pattern recognition method (partial least square-discriminant analysis, PLS-DA) was applied on the full spectra fingerprint of the PTR-MS measurements. The multivariate model was doubly validated: firstly by means of internal validation (cross-validation) and secondly with an external validation data set. The results showed that the five varieties could be successfully distinguished within them.

The proposed method provides a new valuable tool for extra virgin olive oil classification according to variety, and it could serve as a screening technique for the authentication of monovarietal extra-virgin olive oil and as a methodology to confirm that a variety is in agreement with claimed identity.

Keywords: *Monovarietal extra-virgin olive oil, Volatile organic compounds, PTR-MS, Chemometric discrimination*

1. Introduction

Extra-virgin olive oil (EVOO) is an edible oil, highly appreciated for its delicious taste and aroma. It is particularly important in the basic Mediterranean diet. Over the last years, the consumption of EVOO has increased considerably in relation to the consumption of virgin and refined olive oils (Trichopoulou, 2001). It is an oil produced by mechanical means from the fruit of the olive tree (*Olea europaea* L.); in fact, EVOO is only olive fruit juice and requires no refinement prior to consumption. Due to the entire procedure for its production, EVOO is a food of high quality and price.

There are hundreds of different varieties of olive trees. Some are very similar and sometimes they are identical with just slightly different names. Some of them have different physical aspects as well as growing characteristics. Their olive fruits vary in size, oil content, taste, physical and chemical characteristics, ripening time, and many other factors. Today, EVOO is a buoyant business where blends of different varietal virgin olive oils represent a high percentage of the olive oil market. Owing to its distinctive and peculiar intense taste, EVOO obtained from a single kind of variety is highly appreciated. This "monovarietal" hallmark confers an added value to the olive oil so it is protected by regulations to avoid fraud. This fraud could be committed not only by mixing EVOO with other cheaper oils, but also by mixing EVOO from several varieties (CODEX STAN 33-1981 (Rev. 2- 2003); COI/T.15/NC no.3/Rev. 1-2003). On the other hand, the chemical composition of an EVOO is well known to exhibit a greater variability than other vegetable oils because it is largely influenced by the cultivar, agronomical practices, geographical origins, harvesting periods and processing technologies (Di Giovacchino, Sestili & Di Vincenzo, 2002). From a generic point of view, olive oil is a complex mixture consisting of two main groups of substances: (a) saponifiable substances which represent nearly 98% of the chemical composition, such as triglycerides, partial glycerides, and waxes and (b) unsaponifiable substances, with many different chemical structures, such as sterols, hydrocarbons, pigments, phenols, flavonoids, or volatile organic compounds (VOC) (Aparicio & Aparicio-Ruíz, 2000). VOCs in olive oil comprise a wide variety of compounds, including saturated,

unsaturated, aromatic, and terpenic hydrocarbons, aldehydes, alcohols, ketones, esters, ethers, furans, acids, and other compounds such as yet unidentified VOC. The major VOC reported in virgin olive oils are the C6 and C5 volatile compounds, such as hexanal, trans-2-hexenal and hexan-1-ol (Boskou, 2006). They are enzymatically produced from the polyunsaturated fatty acids through the cascade of reactions collectively called "the lipoxygenase (LOX) pathway" and their concentrations depend on the level and the activity of each enzyme involved in this pathway. This LOX pathway is predominant in olive oils of high quality; however, other VOC might be originated from other pathways, such as the fatty acid auto oxidation (Angerosa, 2002; Angerosa, Servili, Selvaggini, Taticchi, Esposito & Montedoro, 2004).

The quality and authenticity of an EVOO is affected by factors such as variety, geographical origin, extraction method and composition. Due to its added value EVOO is susceptible to fraud (Ruiz-Samblás, Cuadros-Rodríguez, González-Casado, Rodríguez-García, de la Mata-Espinosa, Bosque-Sendra, 2011). According to this, there are analytical methods which have been developed to characterise and authenticate specific EVOO. Authentication methods for varieties of olive oils have been most frequently established using GC and HPLC related to different compounds (Aranda, Gómez-Alonso, Rivera del Álamo, Salvador & Fregapane, 2004; Bucci, Magri, Magri, Marini & Marini, 2002; Koprivnjak, Moret, Populin, Lagazio & Conte, 2005; Cichelli & Pertesana, 2004). In addition, the particular volatile profiles of the monovarietal EVOO show clear differences between cultivars although external parameters (climate, soil, harvesting and extraction conditions) modulate the final sensory profile (Angerosa, Servili, Selvaggini, Taticchi, Esposito & Montedoro, 2004). Due to this, the VOC profile has been proposed as a tool for olive oil authentication (Vichi, Castellote, Pizzale, Conte, Buxaderas & Lopez-Tamames, 2003; Escuderos, 2001).

Headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) is the most widely used method to separate and identify VOCs with a high sensitivity. However, it is a time consuming technique, and usually it is necessary to preconcentrate the analyte sample by absorbing VOC onto a

suitable adsorbent as well as a quantification procedure after analysis (Luna, Morales & Aparicio, 2006).

Due to this, more rapid, accurate, reliable and robust analytical methodologies are being requested for authentication purposes, and routine analysis. Electronic noses and other analytical sensor systems have been proposed as alternatives (García Gonzalez & Aparicio, 2003; González Martín, Perez-Pavon, Corder & Pinto, 1999; López Feria, Cárdenas & Valcárcel, 2008b). Also, recent developments in mass spectrometry make possible to fulfill those requirements, because the resolution reached with mass spectrometry allows injecting directly the volatile fraction present in the headspace of the sample, without prior chromatographic separation of its components, into the ionisation chamber of the MS, reducing the analysis time and sample preparation significantly (López-Feria, Cárdenas, García-Mesa & Valcárcel, 2008a; Mildner-Szkudlarz & Jelén, 2008).

These analytical tools provide a global signal of sample's VOC which can be considered a fingerprint of the total volatile profile of the sample and can be used to authenticate the commodity. Among them, PTR-MS has been a successful technique to measure VOC fingerprint for food authentication purposes (Biasioli, Gasperi, Aprea, Colato, Boscaini & Märk, 2003; Macatelli, Akkermans, Koot, Buchgraber, Paterson & Van Ruth, 2009). The PTR-MS outcome is a mass resolved fingerprint of the total volatile profile of samples that can be used as a identity to categorise the sample (Buhr, van Ruth & Delahunty, 2002; Biasioli et al., 2003). In addition, the identification and quantitation of the single VOC is not necessary and the data can be investigated by means of multivariate chemometric data analysis which is especially able to handle the large amounts of data produced by modern first- and second-order analytical instruments. The concerned reader could find more information about the methodology of identification of VOCs in olive oil in the bibliography (Kalua et al., 2007; Sabatini & Marsilio, 2008).

However, only a few studies have been carried out on the application of headspace fraction measurements of EVOO samples by means of PTR-MS with the aim of evaluating the geographical origin of olive oils (Araghipour et

al., 2008), to detect oxidative alterations of extra virgin and rancid olive oils (Aprea, Biasioli, Sani, Cantini, Märk & Gasperi, 2006) and to see the influence of olive fruit ripening (Vezzaro et al., 2011). Due advantages of PTR-MS in food authentication, and its successful applications in olive oil authentication, PTR-MS is a suitable candidate to authenticate monovarietal EVOO, however, none study has been conducted in this respect yet.

On the basis of these considerations, the objective of our study was to develop a method to identify and authenticate five monovarietal EVOO (Arbequina, Cornicabra, Frantoio, Hojiblanca, and Picual) using their VOC fingerprint analysed by PTR-MS and chemometric tools.

2. Materials and methods

2.1. Sampling procedure

Thirty samples of EVOO, from five different varieties of olive fruit, six samples of each variety, (Arbequina, Cornicabra, Frantoio, Hojiblanca, and Picual), being the more common varieties, and cultivated in Spain and Italy were purchased from common markets of Spain.

The olive oil samples were stored in a cold room at 4 °C in the absence light. Four hours prior to analysis samples were removed from the cold storage rooms and placed in the laboratory, which was at a room temperature of approximately 20 °C.

2.2. VOC fingerprinting

The VOC fingerprint was handled by PTR-MS. The sample gas is continuously introduced into a drift tube, where it is mixed with H_3O^+ ions formed in a hollow cathode ion source. VOC that have proton affinities higher than water (>166.58 kcal/mol) are ionised by proton transfer from H_3O^+ , mass analysed in a quadrupole mass spectrometer and eventually detected as ion counts/s (cps) by a secondary electron multiplier. By using H_3O^+ as the proton source, the ionisation of most of the common inorganic

constituents of air (N_2 , O_2 or CO_2) is avoided since they have proton affinities lower than H_2O . Furthermore, this soft ionisation avoids excessive fragmentation of ions, which makes multicomponent analyte mass spectra simpler and easier to interpret.

For the measurements of the volatile profile using PTR-MS, 4 mL of olive oil (at room temperature) were placed in a 250 mL screw cap glass vial. No sample preparation was required. Measurements were performed using a commercial PTR-MS system (Ionicon GmbH, Innsbruck, Austria). Samples were equilibrated at 30 °C for at least 30 min in a water bath under agitation (60 rpm). The headspace of the samples was delivered directly to the inlet of the PTR-MS system with a flow rate of 48 mL/min. The temperature of the inlet and drift chamber were both maintained at 60 °C to prevent loss of volatiles along the sampling inlet line for on-line analysis. A blank was measured before each sample. Measurements were carried out in the mass full-scan mode and the mass spectra were collected in the range of 20-150 atomic mass units (amu). A dwell time of 0.2 s/mass unit was used, resulting in a cycle time just under 30 s.

Sample analyses were carried out in triplicate. For each replicate, five full mass scans were recorded, but the first and last cycle were discarded for calculations. The second, third and fourth scans were averaged and the data were background and transmission corrected, yielding a mean mass spectrum/replicate. Then, the three averaged mass spectrums of the three replicates of each sample were averaged to obtain a mean mass spectrum/sample. In this manner, a dataset containing mean mass spectra/sample analysed could be compiled. Mass 32 (O_2^+) and 37 (water cluster ion) which are associated with the PTR-MS ion source were removed from the data set.

2.3. Chemometric analysis

Since the spectrum was composed of 128 masses (variables), the application of multivariate statistics is needed to exploit the information in these fingerprints. PTR-MS raw count-rate data were converted to volume

mixing ratios (VMRs) for statistical analysis, using a typical PTR-MS sensitivity value observed for oxygenated VOCs.

The data set was composed by as many rows as samples analysed and as many columns as the entire VOC fingerprint recorded during the cycles time. The whole set of data was imported from the PTR-MS system. Chemometric treatments were performed using PLS Toolbox v.6.2 (Eigenvector Research Inc., West Eaglerock Drive, Wenatchee, WA) for Matlab® software (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA) (Wise et al., 2006).

Partial least-square-discriminant analysis (PLS-DA) was conducted on the autoscaled PTR-MS spectral data (128 masses for each sample) to develop a classification model to verify the identity of the olive oil variety (Arbequina, Cornicabra, Frantoio, Hojiblanca and Picual). PLS-DA performs a reduction on the independent dimension of variables by combining them to obtain new variables (called factors) that provide the maximum correlation with the dependent variable (olive oil varieties), and they thus find the maximum separation between classes. By using the adequate (reduced) number of factors, noise is eliminated and the relevant information emerging from the ion concentrations is used to classify the samples.

Firstly, the model was developed with all the samples (calibration set). Several data pre-processing techniques were assayed to investigate which one was providing the most robust classification model, being autoscale preprocessing the one offering more successful results. This is an approach to correct for different variable scaling and units when the predominant source of variance in each variable is signal rather than noise. It uses mean-centering followed by dividing each column (variable) by the standard deviation of the column. The model was evaluated by using the root-mean-squared error of calibration (RMSEC).

The validation of the fitted model was evaluated by two different ways. (I) By internal validation of the calibration set (30 samples), using cross-validation from random subsets. Cross validation involves a series of experiments, hereby called sub-validation experiments, each of which involves the removal of a subset of objects from a dataset (the test set),

construction of a model using the remaining objects in the dataset (the model building set), and subsequent application of the resulting model to the removed objects. This way, each sub-validation experiment involves testing a model with objects that were not used to build the model. The number of correct predictions and the root-mean-squared error of cross-validation (RMSECV) were used to evaluate the model. (II) By external validation, where 30% of the samples (external validation set) were removed at random from the complete dataset. The remaining, 70% of samples were then used to fit a model, which was subsequently validated with the removed samples (external validation set) to predict class membership. This procedure was repeated fifteen times to ensure that a prediction was available for all samples. External validation of the model was quantified by the root-mean-squared error of prediction (RMSEP).

3. Results and discussion

3.1. VOC fingerprint of EVOO

The whole PTR-MS mass spectrum (128 masses and their intensities) was used together with multivariate statistics to develop a classification model (each olive oil variety vs the rest), thus, the identification of the compounds yielding each mass was not needed. This reduces tremendously the time to be spent in the data analysis of new samples, which together with the fact that each PTR-MS spectra can be measured in less than one minute, makes PTR-MS a promising technique for the routine analysis of olive oil samples.

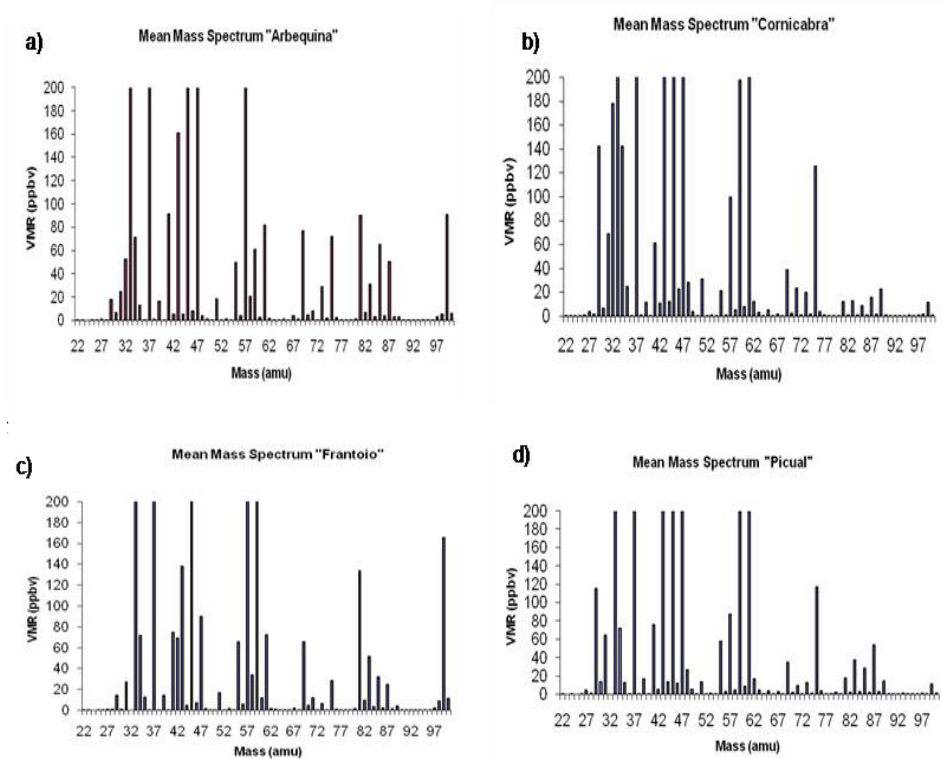


Figure 1. Mean mass spectra of EVOO volatile fingerprint of a) "Arbequina", b) "Cornicabra", c) "Frantoio", and d) "Picual" varieties obtained by PTR-MS. Note the scale on the y-axis and x-axis have been reduced in order to see the major differences between masses.

All the samples showed signals on most masses in the defined measurement range (m/z 20-150) indicating the complex VOC composition of olive oils. Four examples of the mean sample mass spectra for (a) "Arbequina", (b) "Cornicabra", (c) "Frantoio", and (d) "Picual" EVOO are shown in Figure 1. For the X axis only are shown the interval of measure from m/z 20-100 due to this range was the more representative in the mass spectra.

As it is shown, the VOC with higher volatility (lower mass) dominate the spectra in terms of signal intensity. In addition some of the lower masses may have been also originated from some fragmentation of larger

CAPÍTULO III

compounds, although in PTR-MS fragmentation is very much reduced (Luykx & van Ruth, 2008). PTR-MS is a one-dimensional technique that characterises compounds only via their mass, which is not sufficient for a positive identification of the individual VOCs. Nonetheless, as commented above, peak identification is not necessary for the development of the classification model. However, based on previous studies found in literature, some of them can be very cautiously attributed to certain compounds. The dominant signals are listed in Table 1, along with tentative compound assignments. For instance, the spectra showed high signal on mass 57, particularly in "Arbequina" and "Frantoio" samples. This ion is not specific for any VOC, because it could have been originated from the fragmentation of several compounds such as trans-2-hexenal or hexanol, among others, (Aprea et al., 2006; Buhr et al., 2002), being the most abundant fragment of trans-2-hexenal according to previous PTR-MS studies, (Aprea et al., 2006). These results are in agreement with previous studies, in which the amount of trans-2-hexenal in Arbequina and Frantoio samples was higher than in Hojiblanca, Picual and Cornicabra samples (Aparicio & Luna, 2002; Luna et al., 2006). Trans-2-hexenal is among the C6 volatile compounds formed from linoleic and linolenic acids by the LOX pathway. The differences in the concentration of C6 volatiles have been mostly related to the olive variety, as it was shown in studies in which there were no other external variables that could unequally affect their formation (e.g. climatic conditions, ripeness and extraction conditions)(Angerosa et al., 2004; Luna, Morales & Aparicio, 2006).

Table 1. The predominant masses for each EVOO variety with corresponding VMRS for all samples and tentative assignments.

Protonated specie mass	Arbequina	Cornicabra	Frantoio	Hojiblanca	Picual	Tentative assignment
31	39	645	37	73	65	-
33	7980	9933	6393	9878	7249	fragment of larger compounds
34	98	207	77	127	88	-
35	17	22	14	22	15	-
39	15	19	17	16	15	Hexenyl acetate ^{a,f}
41	86	83	82	91	82	Hexanol, fragment ^{a,e,f,h,k}
43	347	468	159	470	513	Acetic acid ^{a,b,l} , Hexanol (1-, 2-) ^{a,e,h,k,m} , hexyl acetate ^{a,h,k}
45	476	2815	639	1046	1206	Acetaldehyde ^{a,f,g,i,l}
47	501	1263	334	1523	1457	Ethanol ^{a,b,f,g}
51	29	34	17	26	20	Dehydrated metanol ^a
55	56	35	67	41	38	Butanal, butadiene ^f
57	264	92	829	90	60	Hexanal, hexenal ^{a,c,f,h,j,k} , butyl formate, octyl acetate ^d , octanol (1-, 2-, 3-) ^f , hexano ^{m,f,k} , isobutyl butyrate ^f
59	153	305	425	322	336	Propanal ^{f,i,m,n,o} , propanediol ^l , hexenol ^{a,f}
61	337	310	95	563	627	Acetic acid / acetates ^{a,c,f,g} , variety of esters, unspecific for acetates ^{d,f,i}
69	51	40	59	36	37	Pentanal ^{a,f,n} , octenol ^e
73	34	20	9	29	30	Iso-butanal, 2-butanone ^{a,f,i}
75	146	87	21	90	86	Methyl acetate ^{a,g} , propyl propanoate, butyl propanoate ^d , ethyl propionate ^f
81	38	10	113	10	7	Hexanal, fragment ^{a,m}
83	44	25	55	32	28	Hexanal ^{a,f,m} , hexenol ^{a,f} , hexenyl acetate ^a
85	26	21	34	20	16	Hexanol ^a
87	49	21	21	28	26	Penatanal ^{a,g} , 2-pentanone ^{a,g,n}
89	9	15	4	17	18	Butyrate esters (fragment of ethyl, propyl, butyl butyrate), butanoic acid ^{a,m} , methyl propanoate ^d
99	38	10	131	9	5	Hexenal ^a , decane ⁿ

^a Araghypour et al. (2008), Food chem., 108, 374-383

^b Angerosa et al. (2004), J. Chromatogr. A, 1054, 17-31

^c Aprea (2006), J. Agric. Food Chem., 54, 7635-7640

^d Aprea (2007), Int. J. Mass Spectrom., 262, 114-121

^e Boscaini (2003), J. Agric. Food Chem., 51, 1782-1790

^f Buhr et al. (2002), Int. J. Mass Spectrom., 221, 1-7

^g Galle et al. (2011), J. Agric. Food Chem., 59, 2554-63

^h Kalua et al. (2007), Food Chem., 100, 273-286

ⁱ Macatelli et al. (2009), J. Food Comp. Anal., 22, 169-175

^j Morales et al. (1997), J. Agric. Food Chem., 45, 2666-2673

^k Morales et al. (1998), J. Chromatogr. A, 819, 267-275

^l Stashenko et al. (1996), J. Chromatogr. A, 752, 209-216

^m van Ruth et al. (2008), Eur. Food Res. Technol., 227, 307-317

ⁿ Warneke et al. (2003), Environ. Sci. Technol., 37, 2494-2501

^o Yerezian (2003), J. Mass spectrum., 223, 115-139.

Indeed, the trans-2-hexenal concentration has been used to differentiate monovarietal oils from different cultivars (Angerosa et al., 2004; Angerosa, Basti & Vito, 1999). Other large signals were observed on mass 33 (and 51), which is usually associated with methanol (and hydrated methanol); however, there were no reports found in the literature of olive oil containing this alcohol, thus it is more likely that the signals on these masses arise from the fragmentation of one or more larger molecules (Araghipour et al., 2008). Additionally, high signals are seen on masses 43 and 61, for the samples of "Picual" which are likely to be acetic acid which could be a defect, mainly produced by *Acetobacter* bacteria during storage of olives (Angerosa et al., 2004). It also might be possible to be either acetates, or fragments of other larger compounds such as hexyl acetate or hexenyl acetate, but as commented above, the identification is not necessary for the development of the classification model.

3.2. Classification of monovarietal EVOO by PLS-DA

PLS-DA was applied on the autoescaled data of the PTR-MS measurements (128 masses for each sample) to develop a classification model to verify the identity of the olive oil varieties (Arbequina, Cornicabra, Frantoio, Hojiblanca and Picual). All of them were successfully fitted (100%). The RMSEC was lower than 0.2. The calibration model is shown in Figure 2. The probability prediction (y-axis) for all the sample was >0.95.

After calibration of the model, the quality of the classification model has been considered on the basis of the validation results. Firstly, cross-validation from random subsets, was performed with five splits and this procedure was repeated 15 times to ensure that a prediction was available for all samples. The RMSECV was lower than 0.5. The fitted model with six components provided a 79.4% success rate in classifying the samples into their variety.

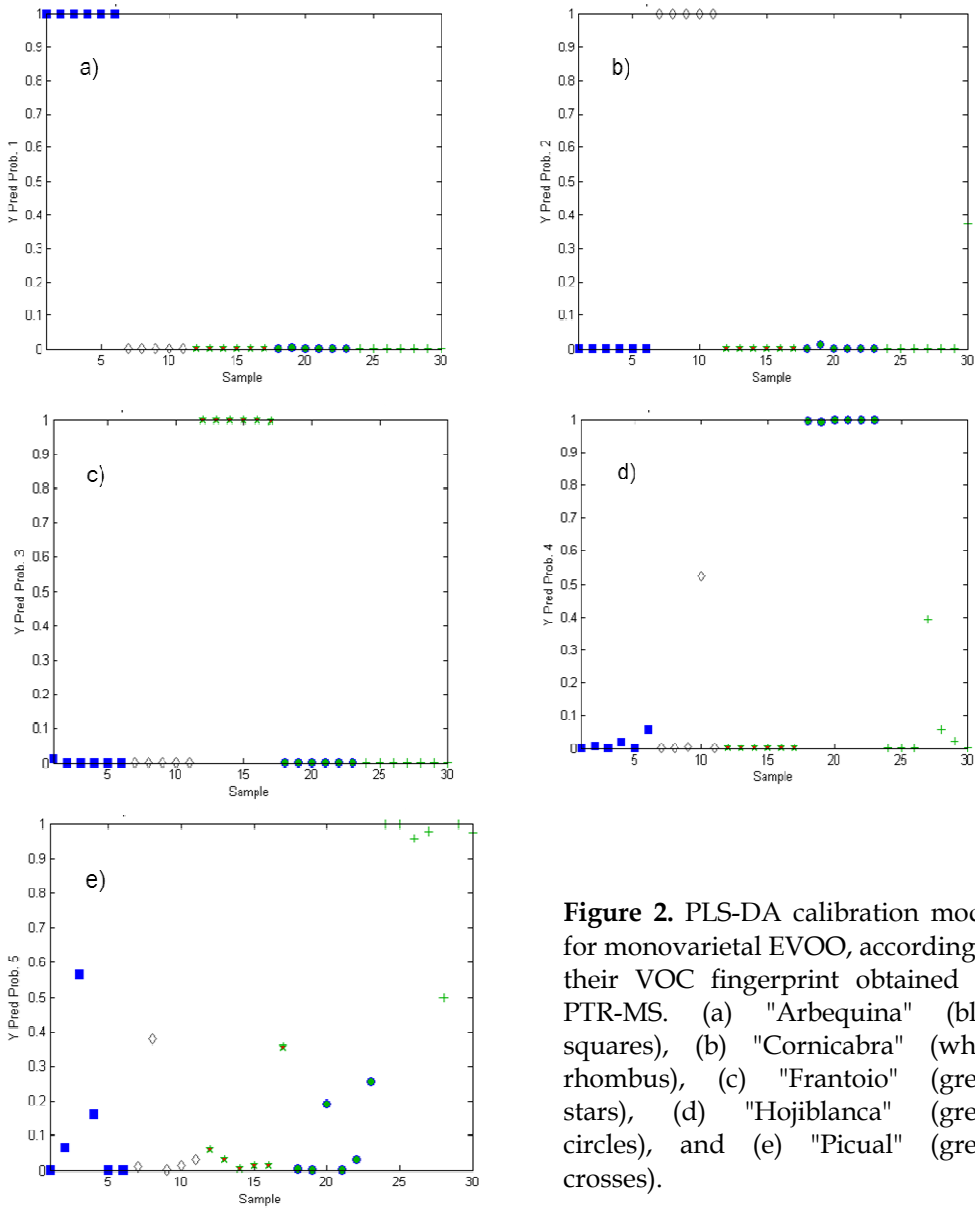


Figure 2. PLS-DA calibration model for monovarietal EVOO, according to their VOC fingerprint obtained by PTR-MS. (a) "Arbequina" (blue squares), (b) "Cornicabra" (white rhombus), (c) "Frantoio" (green stars), (d) "Hojiblanca" (green circles), and (e) "Picual" (green crosses).

CAPÍTULO III

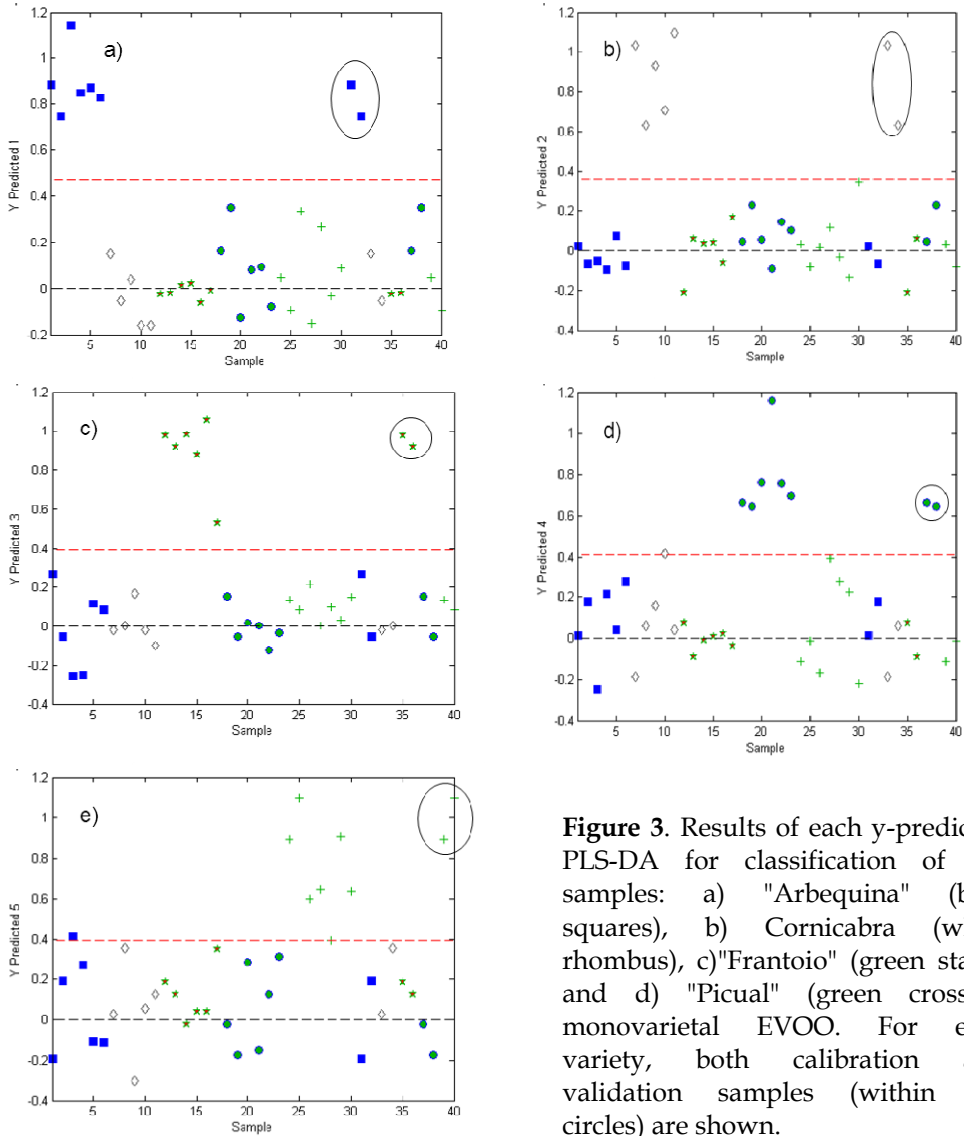


Figure 3. Results of each y-predicted PLS-DA for classification of the samples: a) "Arbequina" (blue squares), b) Cornicabra (white rhombus), c) "Frantoio" (green stars), and d) "Picual" (green crosses), monovarietal EVOO. For each variety, both calibration and validation samples (within the circles) are shown.

Secondly, the classification model was externally validated by predicting the identity of the samples with the external validation set which corresponded to the 30% of the samples of the calibration set. The external validation of the model was quantified by the root mean squared error of prediction RMSEP and was lower than 0.2. The predicted values of the PLS-

DA model on the validation set of the five varieties (a) "Arbequina", (b) "Cornicabra", (c) "Frantoio", (d) "Hojiblanca" and (e) "Picual" olive oil are presented in Figure 3. The calculated threshold is shown as the horizontal red dashed line at approximately 0.35. The threshold is estimated using Bayes' theorem and the available data in order to minimise errors. The Bayesian threshold calculation assumes that the predicted y values follow a distribution similar to what will be observed for future samples. As it is shown in the Fig. 3, all samples were correctly classified. The samples inside the circles were the ones to be predicted for each class in the model.

4. Conclusion

The present PTR-MS method exhibits a fast response (less than one minute per replicate) and it does not need a sample preparation. Furthermore, it showed a very high sensitivity. The successfulness of PTR-MS in authentication purposes is supported by: (i) its high sensitivity (ng/g levels); (ii) the low fragmentation of the molecules in the mass spectrometric detection compared to that in conventional ionisation techniques, which makes spectra of multicomponent analytes easier to interpret; and (iii) the fact that it does not require sample pretreatment, thus allowing on-line analysis (Roberts, Pollien, Yeretian & Lindinger, 2004). These characteristics allow a rapid and sensitive detection of the VOC, which together with multivariate pattern recognition methods, provides a characteristic fingerprinting of each olive oil variety, even if the mass profiles are very similar and the mass concentrations are ppb levels.

The amount of VOCs in olive oil is often connected both with their intrinsic properties (e.g., ripening degree, defects, shelf life evolution, effect of processing technology) and with the quality perceived by the consumer. Due to this fact, the evaluation of VOC fingerprint is helpful both in the assessment of the overall quality of the product, and to authenticate quality-differentiated oils such as the monovarietal extra virgin olive oils. Quality control, variety selection, product development, etc., are typical areas of oil production chain in which it is important to compare samples under study

with previously identified references (authentic oils) in order to monitor whether differences exist with the authentic standard, in order to take on site corresponding decisions. The assessment of VOC fingerprint by PTR-MS provides a promising tool to verify the authenticity of extra virgin olive oils because this method could serve as a future screening technique for the authentication of monovarietal extra virgin olive oil due to the promising obtained results in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank to the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, project P07-FQN-02667, and Consejería de Agricultura y Pesca) for financial assistance. This work has also been partially supported by European Regional Development Funds (ERDF). The authors are also grateful to the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa) for the personal postgraduate grant awarded to CRS, to the European Union Seventh Framework Programme (FR7/2007-2013) for the Marie Curie IEF awarded to AT from under grant agreement (n° PIEF-GA-2009-251972) and to the "Fundación Alfonso Martín Escudero" (Madrid, Spain). Furthermore authors gratefully acknowledge financial support of the Dutch Ministry of Economic Affairs, Agriculture and Innovation.

References

- Angerosa, F. (2002). Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 639-660.
- Angerosa, F., Basti, C., Vito, R. (1999). Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some Italian cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 836-839.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054, 17-31.
- Aparicio R., Aparicio-Ruíz, R. (2000). Authentication of vegetable OOs by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 881, 93-104.

Aparicio, R., Luna G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 614-627.

Aprea, E., Biasioli, F., Sani, G., Cantini, C., Märk, T.D. Gasperi, F. (2006). Proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS) headspace analysis for rapid detection of oxidative alteration of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7635-7640.

Araghipour, N., Colineau, J., Koot, A., Akkermans, W., Moreno Rojas, J.M., Beauchamp, J., Wisthaler, A., Märk, T.D., Downey, G., Guillou, C., Mannina, L., van Ruth, S. (2008). Geographical origin classification of olive oils by PTR-MS. *Food Chemistry*, 108, 374-383.

Aranda, F., Gómez Alonso, S., Rivera del Álamo, R.M., Salvador, M.D., Fregapane, G. (2004). Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. *Food Chemistry*, 86, 485-492.

Biasioli F., Gasperi, F., Aprea, E., Mott, D., Boscaini, E., Mayr, D., Märk, T.D. (2003). Coupling proton transfer reaction-mass spectrometry with linear discriminant analysis: a case study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7227-7233.

Biasioli G., Gasperi, F., Aprea, E., Colato, L., Boscaini, E., Märk, T.D. (2003). Fingerprinting mass spectrometry by PTR-MS: Heat treatment vs. pressure treatment of red orange juice - A case study. *International Journal of Mass Spectrometry* 223-224, 343-353.

Boskou D. (2006). *Olive oil: Chemistry and Technology*. (2nd ed.), (pp. 85-127). Champaign, IL: AOCS Press.

Bucci, R., Magri, A. D., Magri, A. L., Marini, D., Marini, F. (2002). Chemical authentication of extra virgin olive oil varieties by supervised chemometric procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 413-418.

Buhr, K., van Ruth, S., Delahunty, C. (2002) Analysis of volatile flavour compounds by Proton-Transfer Reaction-Mass Spectrometry: fragmentation patterns and discrimination between isobaric and isomeric compounds. *International Journal of Mass Spectrometry*, 221, 1-7.

Cichelli, A., Pertesana, G.P. (2004). High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: Chemometric approach to variety. *Journal of Chromatography A*, 1046, 141-146.

CODEX STAN 33-1981 (Rev. 2-2003), *Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils*. Commission of the Codex Alimentarius.

CAPÍTULO III

COI/T.15/NC no.3/Rev. 1-2003, *Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive-Pomace Oils*. International Olive Oil Council (IOOC).

Di Giovacchino, L., Sestili, S., Di Vincenzo, D. (2002) Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 587-601

Escuderos, M.E. (2011) Olive oil aroma evaluation by gas chromatographic method: a critical review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 41, 70-80.

García González, D. L., Aparicio, R. (2003). Virgin olive oil quality classification combining neural network and MOS sensors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3515-3519.

González Martín, I., Pérez Pavón, J., Corder, B.M., Pinto, C.G. (1999). Classification of vegetable oils by linear discriminant analysis of electronic nose data. *Analytica Chimica Acta*, 384, 83-94.

Kalua C.M., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review. *Food Chemistry*, 100, 273-286.

Koprivnjak, O., Moret, S., Populin, T., Lagazio, C., Conte, L. S. (2005). Variety differentiation of virgin olive oil based on n- alkane profile. *Food Chemistry*, 90, 603-608.

López Feria, S., Cárdenas, S., García Mesa, J.A., Valcárcel, M. (2008). Classification of extra virgin olive oils according to the protected designation of origin, olive variety and geographical origin. *Talanta*, 75, 937-94.

López Feria, S., Cárdenas, S., Valcárcel, M. (2008). Simplifying chromatographic analysis of the volatile fraction of foods. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27,9, 794-803.

Luna, G., Morales, M. T., Aparicio, R. (2006). Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, 98, 243-252.

Luykx, D., Van Ruth, S. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107, 897-911.

Macatelli, M., Akkermans, W., Koot, A., Buchgraber, M., Paterson, A., Van Ruth, S. (2009). Verification of the geographical origin of European butters using PTR-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 169-175.

Mildner-Szkudlarz, S., Jelén, H.H. (2008). The potential of different techniques for volatile compounds analysis coupled with PCA for the detection of the adulteration of olive oil with hazelnut oil. *Food Chemistry*, 110, 751-761.

Roberts, D.D., Pollien, P., Yeretizian, C., Lindinger, C. (2004). Nosespace Analysis with PTR-MS. In Deibler, K.D., Delwiche, J. (eds). *Handbook of flavor characterization: sensory analysis, chemistry and physiology* (pp151-162). Marcel Dekker, Inc. New York, USA.

Ruiz Samblás, C., Cuadros Rodríguez, L., González Casado, A., Rodríguez García F.P., de la Mata Espinosa, P., Bosque Sendra, J.M. (2011). Multivariate analysis of HT/GC-(IT)MS chromatographic profiles of triacylglycerol for classification of olive oil varieties. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 2093-2103.

Vichi, S., Castellote, A.I., Pizzale, L., Conte, L.S., Buxaderas S., Lopez-Tamames, E. (2003) Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 983, 19-33.

Sabatini, N., Marsilio, V. (2008). Volatile compounds in table olives (*Olea Europaea* L., Nocellara del Belice cultivar). *Food Chemistry*, 107, 1522-1528.

Trichopoulou, A. (2001). Mediterranean diet: the past and the present. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 11, 1-4.

Vezzaro, A., Boschetti, A., Dell'Anna, R., Canteri, R., Dimauro, M., Ramina, A., Ferasin, M., Giulivo, C., Ruperti, B. (2011). Influence of olive (cv Grignano) fruit ripening and oil extraction under different nitrogen regimes on volatile organic compound emissions studied by PTR-MS technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 2571-2582.

Wise, B. M., Shaver, J. M., Gallagher, N. B., Windig, W., Bro, R., & Koch, R. S. (2006). *Chemometric tutorial for PLS_Toolbox and Solo*. Wenatchee, WA, USA: Eigenvector Research Inc.

6. Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos y presentados en este capítulo, se demuestra que las variedades de aceite de oliva virgen extra, así como las categorías de éste, presentan características diferentes entre sí en relación con el perfil composicional de triglicéridos o compuestos volátiles, las cuales son detectables mediante la cromatografía de gases, espectrometría de masas y la quimiometría.

Aspectos importantes a destacar en los estudios presentados, son la metodología utilizada, donde se propone el uso de los cromatogramas completos en lugar de una colección de aéreas/alturas de pico como se realiza normalmente según los trabajos encontrados en bibliografía. El análisis de estos datos cromatográficos reporta ventajas con respecto a estudios previos, ya que no se necesita cuantificar el contenido de los TAGs, a través de un proceso previo de calibración.

Esto, además da lugar a un mejor agrupamiento y clasificación de los resultados finales, debidos también al preprocesado previo de los datos que se ha realizado, donde se ha eliminado las posibles fuentes de interferencia para obtener así resultados fiables.

Para finalizar, resaltar la importancia de estas metodologías que permitirían la detección de algunos tipos de fraude, como la declaración de categorías más elevadas en el aceite de oliva (virgen extra) cuando en realidad no se cumplan.

A partir de los resultados obtenidos, en el siguiente capítulo se proponen los estudios de autenticación, pero aumentando el grado de dificultad, mediante la intención de cuantificar el aceite de oliva presente en mezclas con otros aceites vegetales.

Comunicaciones a congresos derivadas de este capítulo

- ◆ C Ruiz-Samblás, A Tres, A Koot, S M van Ruth, L Cuadros-Rodríguez, A González-Casado. *Extra virgin olive oil authentication by PTR-MS*. World Conference on Oliseed Processing, Fats & Oils Processing, Biofuels & Applications, 2011. Póster.
- ◆ C Ruiz-Samblás, A Tres, A Koot, S M van Ruth, L Cuadros-Rodríguez, A González-Casado. *Proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS) analysis for authentication of monovarietal extra virgin olive oils*. XV Simposium Científico-Técnico. Foro de la Industria Oleícola, Tecnología y Calidad. XV Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines (EXPOLIVA, 2011). Comunicación oral.
- ◆ C. Ruiz-Samblás, P. de la Mata Espinosa, L. Cuadros-Rodríguez, A. González-Casado, F.P. Rodríguez García. *Exploratory data analysis of chromatographic profiles of TAGs in varieties of olive oil by using HT/GC-(IT)MS*. VII Colloquium Chemiometricum Mediterraneum (CCM VII - 2010). Póster.

Otras Comunicaciones a congresos relacionadas

- ◆ A Tres, C Ruiz-Samblás, A Koot, S M van Ruth. *Assessment of the Geographical Origin of Palm Oil using Chemometrics*. World Conference on Oliseed Processing, Fats & Oils Processing, Biofuels & Applications, 2011. Póster.
- ◆ A. Tres, G. van der Veer, C Ruiz-Samblás, S M van Ruth. *Verification of the geographical origin of palm oil using fingerprints and chemometrics*. 9th Euro Fed Lipid Congress, 2011. Póster.

Capítulo IV

Índice

1. Presentación.....	323
2. Introducción.....	325
3. Análisis DAFO.....	341
4. Artículo N° 7.....	343
Abstract.....	344
1. Introduction.....	346
1.1. Chemometrics merging chromatography.....	347
1.2. Exploratory data analysis and pattern recognition.....	351
1.3. Chromatography of triacylglycerols (or triglycerides).....	353
2. Characterization and authentication of fat and oils.....	356
2.1. Olive oil.....	358
2.2. Other vegetable and marine oils, and animal fats.....	364
2.3. Milk and dairy products.....	367
2.4. Cocoa and coffee.....	369
2.5. Other fats.....	371
3. Conclusions.....	372
References.....	373
5. Artículo N° 8.....	379
Abstract.....	380
1. Introduction.....	381
2. Materials and methods.....	383
2.1. Samples.....	383
2.2. Chromatographic conditions.....	385
2.3. Chemometrics.....	387
3. Results and discussion.....	391

CAPÍTULO IV

References	399
6. Discusión	401
Comunicaciones a Congresos derivadas de este capítulo	402

1. Presentación

En los capítulos anteriores, se ha descrito el desarrollo de un método analítico mediante cromatografía de gases a alta temperatura para la identificación y caracterización del perfil de triglicéridos de aceites vegetales. Además, con ayuda de herramientas quimiométricas, se han propuesto modelos para autenticar el aceite de oliva. El siguiente paso correspondía ahora, a intentar abordar la última parte de la hipótesis planteada inicialmente, donde se proponía la utilización de las huellas cromatográficas de triglicéridos para la cuantificación de la proporción de aceite de oliva cuando se encuentra formando parte de una mezcla de aceites vegetales comestibles. Estas mezclas, como ya se dijo anteriormente, pueden ser legales, en aquellos países donde están permitidas o, si no es el caso, fraudulentas.

Por tanto, el objetivo de este capítulo, cuyos resultados se recogen aquí y que forma parte de los objetivos marcados por el Proyecto QuOLEO descrito en el capítulo α , se expone a continuación.

- ✓ Desarrollar una metodología, que, mediante cromatografía y quimiometría, nos permitan la cuantificación del aceite de oliva cuando se encuentra mezclado con otros aceites vegetales.

La parte de este capítulo correspondiente a la aplicación de la quimiometría, se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Federico Marini, gracias a la realización de una estancia de investigación en la Universidad de "La Sapienza" en Roma, (Italia) bajo su supervisión.

Para la realización de este objetivo, se prepararon en el laboratorio mezclas de aceite de oliva y aceites vegetales en el intervalo comprendido entre 10-90%. Conjuntamente, se han aplicado métodos quimiométricos de reconocimiento de pautas (SIMCA) y de calibración multivariante (PLS), así mismo, se ha probado a reducir el número de variables de trabajo, mediante la aplicación de algoritmos genéticos, con el objetivo de comprobar los resultados obtenidos.

Previamente a la descripción del estudio experimental sobre las mezclas de aceite de oliva, también se presenta una revisión bibliográfica donde se ha examinado de forma crítica la literatura científica existente sobre la aplicación del análisis exploratorio de datos, así como las técnicas de reconocimiento de pautas, en datos cromatográficos de triglicéridos, con el objetivo de caracterizar y autenticar aceite de oliva y otros aceites vegetales, grasas animales, aceites de pescado, productos lácteos, etc.

En la introducción de dicho artículo de revisión, se hace una discusión sobre las relaciones entre la cromatografía y la quimiometría, así como sobre la utilización de "huellas dactilares cromatográficas" como conjunto de datos característicos de cada objeto a fin de desarrollar modelos quimimétricos de reconocimiento de pautas. Paralelamente se comentan también otras estrategias más habituales para conformar la matriz de datos previa al tratamiento quimimétrico

2. Introducción

Aceites vegetales

En esta introducción se abordará la descripción del resto de aceites vegetales, aparte del aceite de oliva, que se han utilizado en los estudios que se presentan en este capítulo.

Los aceites vegetales comestibles se obtienen generalmente a partir de las semillas o frutos. Entre las semillas de plantas cultivadas por su aceite, las más conocidas son: el cacahuete, la colza, el ricino, la soja, la uva, el maíz y el girasol. A estas se deben agregar las plantas cultivadas para la producción de fibras textiles y en segundo lugar aceite: algodón y lino principalmente. En cuanto a los frutos oleaginosos, estos provienen principalmente del cocotero (copra), del nogal, de la palma de aceite (palma y palmito) y del olivo (aceitunas). En realidad, todas las semillas y frutos contienen aceite, pero sólo los llamados oleaginosos sirven para la producción industrial de aceite. Los aceites vegetales más comunes, aparte del aceite de oliva, son los extraídos de semillas, como girasol, soja, etc. y de los gérmenes de las semillas como es el caso del maíz o trigo. En las semillas se pueden encontrar unos contenidos en aceite que varían entre el 25 % y el 65% [1].

La elección del método de extracción es muy importante ya que va a actuar sobre la cantidad de aceite que pueda ser extraída. Además, las semillas maduras son mucho más ricas en aceite que las semillas verdes. Esta es la única dificultad encontrada durante la cosecha ya que las semillas no maduran todas al mismo tiempo.

En la figura 1 se presenta el porcentaje medio de TAGs habitualmente encontrados en los aceites vegetales de maíz, soja, girasol y sésamo, los cuales han sido utilizados en este capítulo. Se observa como predominan en

1 F.D. Gunstone, in: F.D. Gunstone, *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*, Blackwell Publishing, 2002, pp 1-18.

concentraciones mayores los TAG que contienen en su estructura ácidos grasos insaturados o poliinsaturados.

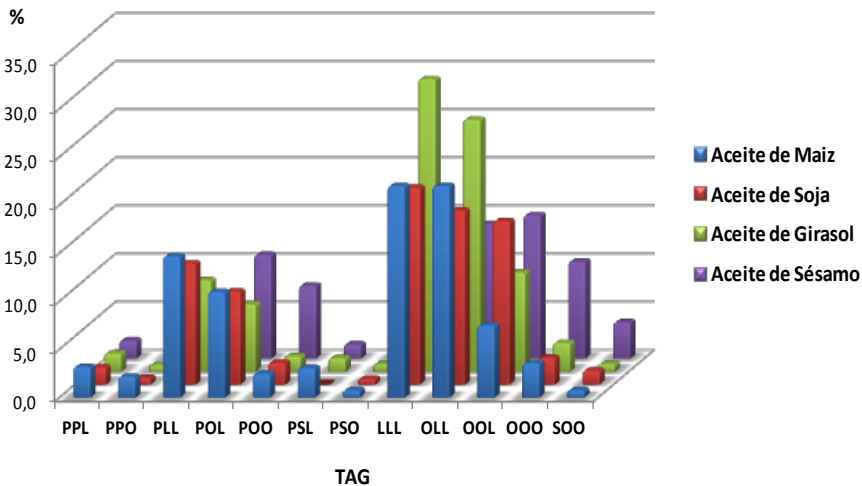


Figura 1. Gráfica comparativa del contenido medio en TAG de algunos aceites vegetales [2].

Gracias a la gran diversidad de frutos y semillas oleaginosas que existen actualmente en el mercado, se tienen una amplia lista de aceites vegetales comestibles, a continuación se explican brevemente los que se han utilizado en este estudio [3]:

- *Aceite de Girasol:* es la cuarta fuente de aceite vegetal en el mundo, con una producción mayor en Rusia. Se obtiene por extracción mecánica y por disolventes de la semilla de girasol (*helianthus annus*). El aceite crudo contiene un alto porcentaje de ceras que deben eliminarse del

2 N.K. Andrikopoulos, Triglyceride species compositions of common edible vegetable oils and methods used for their identification and quantification, *Food Reviews International*, 2002, 18(1), 71-102.

3 R. D. O'Brien, *Fats and Oils, Formulating and Processing for Applications*, 3rd ed, Taylor & Francis Group, CRC Press, 2009, pp 1-66.

CAPÍTULO IV

aceite en un proceso de desencerado. El aceite refinado deodorizado tiene una apariencia cristalina y un color amarillo pálido. El aceite de girasol ha sido valorado por su alto contenido en ácido polinsaturado linoleico y ausencia de linolénico. Respecto al consumo, compite con el aceite de maíz y el aceite de soja, debido a que su perfil de ácidos grasos son similares.

- *Aceite de Maíz*: es originario del Norte y Sur de América, el aceite solo representa una pequeña fracción, 3.1% a 5.7%, del peso del grano y esta contenido principalmente en el germen. El aceite crudo del germen del maíz se obtiene por extracción mecánica y/o disolventes, refinado, blanqueado, deodorización y ocasionalmente se desencera. Pertenece al grupo de aceites con altos niveles de ácidos linoleico y oleico. El aceite terminado tiene una apariencia cristalina y color amarillo rojizo, con un sabor muy bien aceptado por el consumidor.

- *Aceite de Soja*: es el aceite que se obtiene de la semilla de la soja (*glycine max*), que son originarias del este asiático. El aceite crudo contiene entre 2.5-3.0% de fosfolípidos que tienen que eliminarse del aceite por procesos de desgomado y refinación química. La estructura de triglicéridos está caracterizada por una ausencia casi total de ácidos grasos



Figura 2. Semillas de soja

saturados en la posición sn-2, una distribución aleatoria de ácidos grasos oleico y linoleico en todas las posiciones del glicerol y una elevada proporción de linoleico en la posición sn-2. El aceite de soja se ha convertido en un aceite vegetal muy popular para uso alimentario debido a propiedades nutricionales y funcionalidad

- *Aceite de sésamo*: derivado de estas semillas y de uso muy común en Asia para la cocina y la medicina. Las semillas están protegidas por



Figura 3. Semillas de sésamo

una capsula la cual no se abre hasta que la semilla está completamente madura. Se pueden encontrar en diferentes gamas de color dependiendo de donde proceda y si las semillas fueron tostadas antes de ser prensadas para la extracción del aceite. Contiene cantidades saludables de ácidos grasos poliinsaturados. Los triglicéridos más abundantes son OLL, OOL, POL y OOO, variando su proporción en función del origen geográfico de la semilla.

Mezclas legales y no tan legales...

Teniendo en cuenta el expansivo mercado de los aceites vegetales, su autenticación y cuantificación se ha convertido en un objetivo importante tanto desde una perspectiva económica como de la salud.

Como expusimos anteriormente, existen mezclas de aceite de oliva y aceites vegetales de muchos tipos. Por ejemplo, existen aquellas que se comercializan de forma legal en algunos países. También aquellas que están surgiendo en el mercado debido al creciente interés, por parte de las industrias alimentarias, así como por parte de las empresas oleícolas, en comercializar mezclas de aceites con objeto de ofrecer productos con una composición lipídica nutricionalmente óptima, o de utilizar el aceite de oliva como un ingrediente alimenticio con objeto de dotar al alimento que lo contiene de un valor añadido.

Por otro lado, existen también mezclas en el mercado que no son tan legales como las comentadas anteriormente. Así, la diferencia de precio entre el aceite de oliva y otros aceites vegetales, por ejemplo, puede traducirse en

CAPÍTULO IV

grandes cantidades de dinero que podrían conseguirse, añadiendo aceites más baratos a aceites de oliva virgen [4].

Los casos de fraude en el aceite de oliva virgen extra tanto en España como fuera de ella, han sido numerosos a lo largo de la historia. A continuación se nombrarán algunos de los casos más conocidos aunque es difícil obtener una información clara y contrastada sobre los mismos.

Recientemente (febrero 2012), han descubierto un fraude en el sector del aceite de oliva que se cometió entre los años 2001 y 2002, por la mezcla engañosa de aceite lampante. Se llevó a cabo en las provincias de Jaén y Córdoba, donde una organización se dedicaba a comercializar mezclas fraudulentas de aceites de muy baja calidad como si se tratase de aceite de oliva. Los aceites con los que "engañaban" a sus clientes se hacían a base de aceites de palma, avellana o girasol.

Otro ejemplo, en 2010 se da la noticia de que la filial de hipermercados Alcampo, etiqueta aceite de oliva refinado como aceite de oliva virgen extra.

Se detectaron garrafas de 3 y 5 litros de aceite de la marca Auchan (Alcampo) con la descriptiva aceite de oliva virgen extra, curiosamente en la misma etiqueta ofrecía información sobre el contenido indicando que el aceite procedía de un tratamiento de refinado y de aceites obtenidos a partir de la primera prensada de las aceitunas, o sea, aceite de oliva "a secas", ¿error o intencionalidad de confundir al consumidor?



Figura 4. Etiqueta del presunto "aceite de oliva virgen extra" [5]

4 R. Aparicio, R. Aparicio-Ruíz, Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques, *Journal of Chromatography A*, 881, 2000, 93-104.

5 <http://www.gastronomiaycia.com/2010/02/15/alcampo-etiqueta-aceite-de-oliva-refinado-como-aceite-de-oliva-virgen-extra/>

Uno de los casos más serios fue en 1981, cuando miles personas se vieron afectadas por la ingesta de aceite de colza presuntamente desnaturalizado con anilina, para ser utilizado en aplicaciones industriales, y que había sido vendido como aceite de oliva [6].

Fuera de España, también han ocurrido este tipo de fraudes, por ejemplo en Italia [7], por el presunto fraude de "agromafias" italianas que venderían al mundo falsos vírgenes con el sello "made in Italy". En concreto, sus envasadores comercializaban en el exterior aceite de oliva etiquetado como virgen y producido en ese país, cuando en realidad eran importados de otras procedencias o mezclas de inferior calidad [8].

Aquí, se han mostrado sólo algunos ejemplos, sin embargo existen cientos de casos continuamente en todo el mundo. Por esto, queda expuesta la importancia de disponer de metodologías que nos permitan responder y controlar de forma eficaz a la aparición de estas mezclas de aceite de oliva en el mercado. Así queda justificada la importancia del estudio que se ha llevado a cabo en esta última parte de la tesis.

A continuación, y como ampliación de la introducción del capítulo III, sobre técnicas de reconocimiento de pautas, se expondrán las explicaciones teóricas de las herramientas quimiométricas que se han utilizado en este capítulo.

6 I. Abaitua, M. Posada (Ed.), *Toxic Oil Syndrome: Current Knowledge and Future Perspectives*, European Series No. 42, WHO Regional Publication, Copenhagen, 1992, p. 27.

7 www.guardian.co.uk/lifeandstyle/wordofmouth/2012/jan/04/olive-oil-food-fraud

8 www.newyorker.com/reporting/2007/08/13/070813fa_fact_mueller?currentPage=all

Herramientas quimiométricas

Las herramientas quimiométricas aplicadas para el desarrollo de los modelos de cuantificación de aceite de oliva han sido: *Modelado Independiente Flexible por Analogía de Clases*, SIMCA, *Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales*, PLS, y *Algoritmos Genéticos*, GA.

Modelado independiente flexible por analogías de clases, SIMCA

Anteriormente, cuando se ha hablado de los métodos de reconocimiento de pautas supervisadas, se hacía una distinción entre las técnicas discriminantes y las técnicas de modelado. Estas últimas técnicas de clasificación, que modelan cada categoría por separado, están especialmente indicadas para aquellos casos donde no hay suficientes muestras para todas las clases que están implicadas en el problema, o para aquellos casos de autenticación por ejemplo, donde nuevas categorías son introducidas continuamente.

SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogies*) es la técnica de modelado de clases usada más frecuentemente, además fue la primera utilizada en la literatura de quimiometría [9], junto con UNEQ (*Unequal Class-Modeling*). Sin embargo, esta última puede ser aplicada únicamente cuando se consideran pocas variables y está basada en la distancia de Mahalanobis desde el centro de cada clase [10]. Cuando la distancia excede una distancia crítica, el objeto se declara como anómalo.

En SIMCA cada modelo de clase está definido en la base de un modelo de componentes principales de la dimensionalidad oportuna. Por ejemplo el

-
- 9 S. Wold, M. Sjöström, SIMCA: a method for analysing chemical data in terms of similarity and analogy, in Kowalski, B.R. (Ed.): *Chemometrics, Theory and Application*. ACS Symposium Series No. 52, American Chemical Society, Washington, 1977, 243-282.
 - 10 M.P. Derde, D.L. Massart, UNEQ: a disjoint modelling technique for pattern recognition based on normal distribution. *Analytical Chimica Acta*, 1986, 184, 33-51.

modelo de la clase 1 se asume que es descrito por un componente principal según:

$$X_1 = T_A P_A^T + E$$

donde X_1 es la submatrix del conjunto de datos originales y seleccionando sólo las muestras de la categoría 1, T_A y P_A , son las matrices que contienen los *scores* y *loadings* respectivamente, y E son los residuales. Una vez que el modelo de componente principal está definido, el espacio de la clase se define de acuerdo a criterios estadísticos para la detección de espurios.

Actualmente SIMCA suele ser aplicado utilizando un criterio de distancia al modelo. En particular, la matriz de *score*, T_A , y de residuales, E , son usadas para calcular las distribuciones de probabilidad para las distancias dentro de los espacios del modelo (estadístico T^2) y para la distancia ortogonal al espacio del modelo (estadístico Q) respectivamente. En concordancia, se elige un nivel de confianza, para ambos estadísticos (usualmente 95%), así el espacio de clase es definido como:

$$\sqrt{\left(\frac{T^2}{T_{0.95}^2}\right)^2 + \left(\frac{Q}{Q_{0.95}}\right)^2} \leq \sqrt{2}$$

donde T^2 y Q son los valores de los estadísticos calculados de la muestra, mientras que $T_{0.95}^2$ y $Q_{0.95}$ son sus valores correspondientes al 95% de confianza [11].

Este criterio puede ser representado gráficamente del modo T^2 vs Q , como el que aparece a continuación, en la figura 5.

Las muestras que caigan dentro de la región definida por la ecuación anterior, son aceptadas por el modelo de esa clase, las que salgan fuera son descartadas. De la misma forma las muestras de otra clase (por ejemplo "o")

11 R.G. Brereton Chemometrics for Pattern Recognition, John Wiley & Sons, 2009, pp 241-248.

CAPÍTULO IV

en la figura 5), que caigan dentro del modelo son aceptadas por ese modelo de clase "x", aunque pertenezcan a otro grupo.

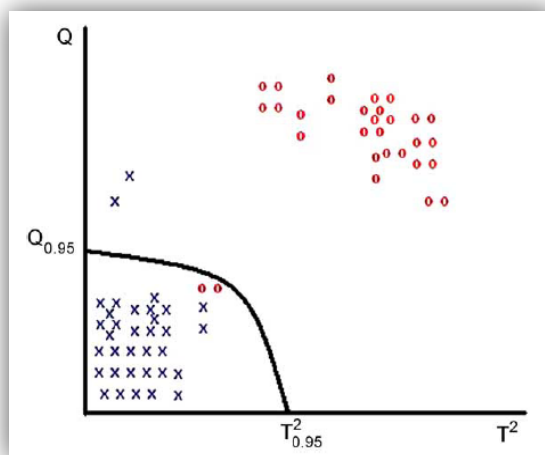


Figura 5. Espacio del modelo SIMCA para la clase "x" [12].

En los estudios de cuantificación, SIMCA fue aplicado primeramente para ver como se comportaban los modelos de clasificación de las mezclas individualmente, definiendo como cada clase, a cada una de las mezclas de aceite de oliva con un aceite vegetal. Este modelo fue validado con un conjunto de muestras externas, que no se utilizaron para la construcción del modelo.

12 F. Marini, Classification methods in chemometrics, Current Analytical Chemistry, 2010, 6, 72-79.

Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

De forma general se puede decir que, la calibración es el uso de datos empíricos y conocimiento previo para determinar cómo predecir información cuantitativa desconocida, Y , de medidas disponibles, X , mediante alguna función matemática.

Este método, de mínimos cuadrados parciales, es una técnica de regresión, la cual hace uso de factores derivados del conjunto de variables independientes. Estos factores aquí reciben el nombre de variables latentes, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$y = a_1LV_1 + a_2LV_2 + \dots a_pLV_p$$

donde y es una variable dependiente y a_1 - a_p son los coeficientes de regresión ajustados por el procedimiento PLS. Cada variable latente es una combinación lineal del conjunto de variables independientes [13].

$$LV_1 = b_{1,1}x_1 + b_{1,2}x_2 + \dots b_{1,p}x_p$$

$$LV_2 = b_{2,1}x_1 + b_{2,2}x_2 + \dots b_{2,p}x_p$$

.....

$$LV_q = b_{q,1}x_1 + b_{q,2}x_2 + \dots b_{q,p}x_p$$

PLS calcula las variables latentes y los coeficientes de regresión al mismo tiempo. La primera variable latente (LV_1) explicará la mayor varianza en el conjunto independiente, LV_2 , la siguiente mayor y así sucesivamente. Es importante elegir el número apropiado de variables latentes para incluir en el modelo.

La regresión por mínimos cuadrados parciales usa combinaciones lineales de las variables predictivas, en lugar de las variables originales. La forma en que

13 D. Livingstone, A Practical Guide to Scientific Data Analysis, Wiley, 2010, pp 206-211.

CAPÍTULO IV

estas combinaciones lineales se llevan a cabo es de tal manera que las variables que muestran mayor correlación con las variables respuesta se les dan un peso extra, porque serán más efectivas prediciendo. Se espera que solo con unas pocas combinaciones de las variables predictivas, se explique la mayoría de la varianza.

PLS está relacionado con otros modelos de regresión como la regresión lineal múltiple (*multiple linear regression*, MLR) o la regresión por componentes principales, (*principal component regression*, PCR) y ocupa un lugar intermedio entre ellos. PCR encuentra factores (componentes principales) que son seleccionados basados únicamente en la cantidad de varianza que explican en X. MLR intenta encontrar un único factor que correlacione mejor las variables predictoras (X) con las predichas (Y). PLS, en cambio, intenta encontrar variables latentes que maximicen la cantidad de variación explicada en X que es relevante para predecir Y, esto es que capturen varianza y consigan correlación a la vez. Se dice comúnmente que PLS intenta *maximizar covarianza*.

Por lo dicho anteriormente, PLS parece ofrecer una aproximación superior para la construcción de modelos de regresión lineales.

Hay diversas maneras de calcular los parámetros de un modelo PLS. Quizás el más intuitivo es conocido como NIPALS (*Non-Iterative Partial Least Square*). NIPALS calcula *scores* y *loadings* (similares a los usados en PCR) y un set adicional de vectores conocido como pesos (de la misma dimensión que los *loadings*). La adición de pesos en PLS requiere mantener *scores* ortogonales. Otro algoritmo para modelos PLS es conocido como SIMPLS, que da los mismos resultados que el anterior para calibración univariante pero difiere ligeramente para calibración multivariante, ya que maximiza el criterio de la covarianza mientras que NIPALS no lo hace [14].

14 B.M. Wise, N.B. Garragher, R. Bro, J.M. Shaver, W. Winding, R.S. Koch, Chemometrics Tutorial for PLS_Toolbox and Solo, Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, USA, 2006.

PLS (con la utilización del algoritmo SIMPLS) se ha aplicado para crear modelos de regresión para la cuantificación de aceite de oliva en las mezclas con otros aceites vegetales. La elección del número de variables latentes en los modelos, se ha hecho atendiendo a los criterios que se exponen a continuación.

Evaluación de los resultados

Antes de comparar la habilidad predictiva de un modelo es útil revisar algunos parámetros de calidad. Así, el "error medio cuadrático de calibración" (*root-mean-square error of calibration, RMSEC*), nos informa sobre el ajuste del modelo a los datos de calibración. Se define como:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}}$$

donde \hat{y}_i , son los valores de la variable predicha cuando todas las variables se incluyen en la información del modelo y n es el número de muestras de calibración. RMSEC describe el grado de acuerdo entre los valores de concentraciones estimadas por el modelo de calibración para las muestras de calibración y los valores verdaderos usados para obtener los parámetros del modelo [15].

Normalmente, RMSEC proporciona resultados optimistas de las habilidades predictivas de los modelos de calibración para muestras medidas en un futuro. Esto es debido a que una porción del ruido, en las muestras de calibración, es modelada por los parámetros estimados para el modelo. Una mejor habilidad predictiva del modelo se puede obtener mediante validación cruzada, con las muestras de calibración o de un conjunto de muestras de validación. De esta forma aparece el "error medio cuadrático de validación cruzada" (*root-mean-square error of cross-validation, RMSECV*), el cual se define

15 P. Gemperline, Practical Guide to Chemometrics, 2nd ed., in: J.H. Kalivas and P.J. Gemperline, Taylor and Francis, 2006, pp 105-165.

de la misma manera que el anterior, pero corresponde a las predicciones para las muestras que no se incluyen en la formulación del modelo.

Es muy común calcular el RMSECV mediante validación cruzada (*leave-one-out cross validation*). Se estiman n modelos de calibración, cada uno de ellos utilizando sólo $n-1$ muestras, ya que en cada uno se deja fuera del modelo una muestra diferente. Los modelos de calibración resultantes son usados para predecir la muestra dejada fuera, que actúa como una muestra de validación externa y proporciona una predicción independiente. Otra forma de hacerlo es que el conjunto de datos de calibración existente sea dividido en diferentes conjuntos de entrenamiento, de aproximadamente el mismo número de muestras, y se deja un grupo fuera en cada ciclo para que actúe como conjunto de validación independiente para valorar como el modelo se comporta en predecir los nuevos datos.

Alternativamente, se puede designar un conjunto de predicción de muestras completamente independiente, que tenga valores de Y conocidos, así la evaluación se puede hacer directamente. En este caso se calcularía el "error medio cuadrático de predicción" (*root-mean-square of prediction*, RMSEP), cuando el modelo es aplicado a datos nuevos. El RMSEP se calcularía del mismo modo que antes, con la ecuación mostrada en la página anterior, pero ahora se refiere a las muestras en el conjunto de predicción independiente y n es el número de muestras en éste.

Algoritmos genéticos, GA

Para comprobar cómo influía el número de variables utilizadas en los estudios de cuantificación (cromatograma completo), se probó a reducir el número de variables mediante algoritmos genéticos.

La selección de variables es un problema de optimización. Los algoritmos genéticos son un método de optimización que combina la aleatoriedad con una estrategia prestada de la biología. A continuación se dará una breve introducción a GA, pero sólo desde el punto de vista de selección de variables.

Como ejemplo, una selección particular de variables se puede indicar como un vector consistiendo en componentes binarios; un "1" indica que la variable es seleccionada, un "0", no es seleccionada. Este vector de longitud, "m" (número total de variables) define uno de los posibles subconjuntos de variables. En la inspirada notación biológica, este vector es denominado *cromosoma* que contienen *m genes*. Un conjunto de cromosomas diferentes (cada uno representando los posibles subconjuntos de variables), se llama *población*. Normalmente se empieza con cromosomas definidos aleatoriamente, restringidos mayoritariamente por un número máximo de "1" (variables seleccionadas) en un cromosoma. El número de cromosomas -el tamaño de la población- es normalmente de 30-200 [16].

Para cada cromosoma (subconjunto de variables), una respuesta, función objetivo (*fitness*), tiene que ser determinada, la cual para el caso de selección de variables es una medida en el modelo creado.

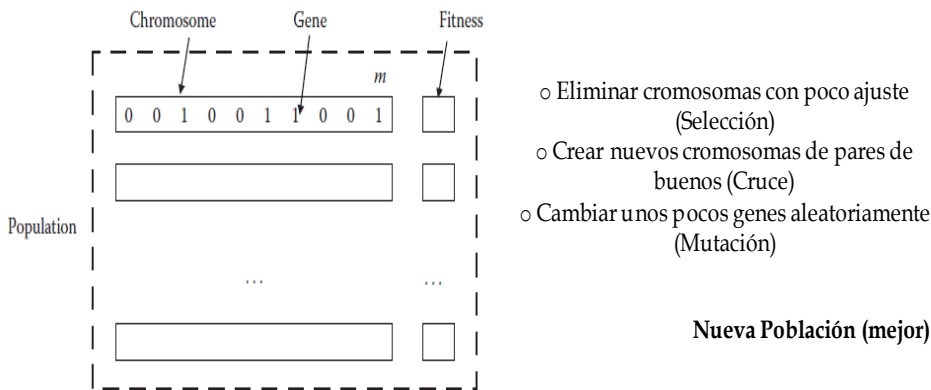


Figura 6. Esquema de GA aplicado a selección de variables [17].

16 R. Leardi, Genetic algorithms in chemometrics and chemistry: a review, *Journal of Chemometrics*, 2001, 15(7), 559-569.
 17 K. Varmuza, P. Filzmoser, *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*, CRC Press, 2008, pp 158-160.

CAPÍTULO IV

La figura 6 muestra, a continuación, como el primer cromosoma define un subconjunto de variables, con 4 variables seleccionadas de $m=10$ variables.

El *fitness* es una medida del modelo correspondiente. La población de cromosomas es modificada por acciones genéticamente inspiradas (selección, cruce y mutación) con el objetivo de incrementar los valores de ajustes.

En general la población contendrá cromosomas con ajustes diferentes, y la estrategia GA es producir poblaciones mejores. A continuación se muestra el esquema que sigue:

- ⊗ Algunos de los cromosomas peores son eliminados y reemplazados por nuevos cromosomas (competición).
- ⊗ Aparecen nuevos cromosomas derivados de pares de buenos, mediante "cruces". La idea es que la combinación de dos cromosomas buenos puede producir uno mejor.
- ⊗ Un porcentaje pequeño de genes son alterados aleatoriamente mediante mutación. Esto significa que unos pocos "0" son cambiados a "1" y viceversa. El ratio de mutación puede ir disminuyendo durante el cálculo para alcanzar una convergencia mejor.

Este proceso se repite hasta que se alcanza algunos de los criterios de terminación. Parámetros como tamaño de la población, modo de selección, parámetros para el cruce, mutación etc., deben seleccionarse y todos influirán en el resultado final.

La aproximación GA es muy útil para set de datos entre 30 y 200 variables y para seleccionar entre 5 y 20 variables. Para números elevados de variables, la oportunidad de encontrar una solución más adecuada es más difícil, por eso se suele llevar a cabo una preselección de variables por otros métodos.

GA-PLS

Hasta hace no muchos años, PLS era considerado ser casi insensible al ruido, por lo que se pensaba que no se requería ningún tipo de selección de variables. Sin embargo, esta actitud ha cambiado en los últimos años, y se ha reconocido que una selección puede ser altamente beneficiosa ya que se

puede alcanzar el doble objetivo de que por un lado se mejore la habilidad predictiva del modelo y además simplificando su complejidad [18].

En GA-PLS el cromosoma correspondería al set de variables, y sería usado como entrada al modelo de regresión PLS. En la literatura podemos encontrar como el análisis GA-PLS se ha aplicado en numerosos datos espectrales con resultados satisfactorios [19].

El desarrollo de GA se mide comparando el error medio cuadrático en predicción (RMSEP) del modelo propuesto mediante algoritmos genéticos con el RMSEP del modelo que contienen todas las variables.

-
- 18 R. Leardi, A. Lupiáñez, Genetic algorithms applied to feature selection in PLS regression: how and when to use them, *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, 1998, 41, 195-207.
 - 19 R. Leardi, Application of genetic algorithm-PLS for feature selection in spectral data sets, *Journal of Chemometrics*, 2000, 14, 643-655.

3. Análisis DAFO

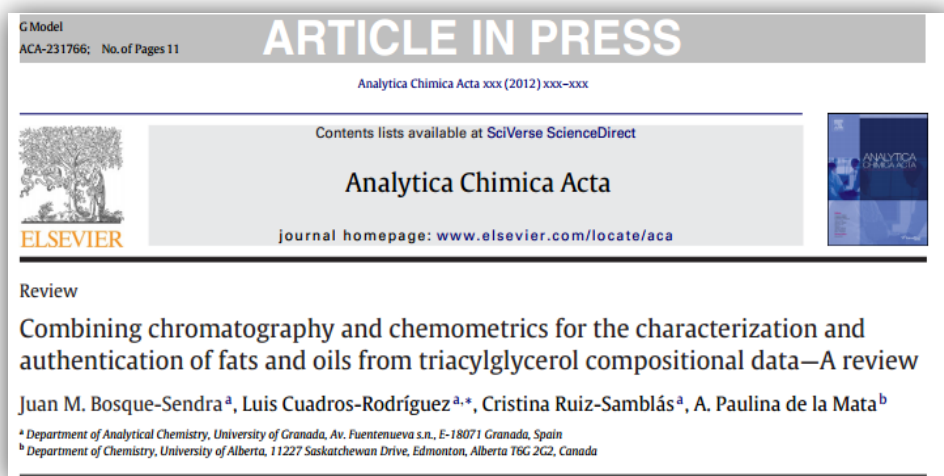
<i>DEBILIDADES</i>	<i>AMENAZAS</i>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nuevo entorno de trabajo y muy poco tiempo. ✓ Necesidad de obtener buenos resultados para finalizar la Tesis. ✓ Utilización por primera vez de algunas herramientas quimiométricas. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Dificultades en el alineamiento de los cromatogramas. ✓ Demasiada variabilidad debido los aceites tan diferentes considerados. ✓ Posibilidad de no obtener los resultados esperados.
<i>FORTALEZAS</i>	<i>OPORTUNIDADES</i>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Buenos resultados en estudios previos. ✓ Realización de otra estancia de investigación ✓ Aprender bajo la dirección de un experto en quimiometría. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estudios de gran interés científico. ✓ Colaboraciones con grupos de prestigio internacional. ✓ Disfrutar de la ciudad eterna.

4. Artículo N° 7

"Combinando Cromatografía y Quimiometría para la caracterización y autenticación de grasas y aceites a partir de datos composicionales de triglicéridos - revisión"

Publicado en: Analytica Chimica Acta (2012)

Doi: 10.1016/j.aca.2012.02.041



Abstract

The characterization and authentication of fats and oils is a subject of great importance for market and health aspects. Identification and quantification of triacylglycerols in fats and oils can be excellent tools for detecting changes in their composition due to the mixtures of these products. Most of the triacylglycerol species present in either fats or oils could be analyzed and identified by chromatographic methods.

However, the natural variability of these samples and the possible presence of adulterants require the application of chemometric pattern recognition methods to facilitate the interpretation of the obtained data. In view of the growing interest in this topic, this paper reviews the literature of the application of exploratory and unsupervised/supervised chemometric methods on chromatographic data, using triacylglycerol composition for the characterization and authentication of several foodstuffs such as olive oil, vegetable oils, animal fats, fish oils, milk and dairy products, cocoa and coffee.

Keywords – Authentication, Triacylglycerols, High temperature gas chromatography, Liquid chromatography, Multivariate data analysis.

Contents

Acronyms list

1. Introduction

- 1.1. Chemometrics merging chromatography
- 1.2. Exploratory data analysis and pattern recognition
- 1.3. Chromatography of triacylglycerols (or triglycerides)

2. Characterization and authentication of fat and oils

- 2.1. Olive oils
- 2.2. Other vegetable and marine oils, and animal fats
- 2.3. Milk and dairy products
- 2.4. Cocoa and coffee
- 2.5. Other fats

3. Conclusion

Acknowledgments

Abbreviations: ANN, artificial neural network; ANOVA, analysis of variance; APCI, atmospheric-pressure chemical ionization; CAD, charged aerosol detector; CART, classification and regression tree; CB, cocoa butter; CBE, cocoa butter equivalent; CDA, canonical discriminant analysis; CN, carbon number; DA, discriminant analysis; DAG, diacylglycerols; ECN, equivalent carbon number; EDA, exploratory data analysis; EI, electron impact ionization; ELSD, evaporative light scattering detector; ESI, electrospray ionization; FA, fatty acid; FAME, fatty acid methyl ester; FD, fluorescence detector; FID, flame ionization detector; GC, gas chromatography; HCA, hierarchical cluster analysis; HPLC, high performance liquid chromatography; HRGC, high resolution gas chromatography; HTGC, high temperature gas chromatography; iPLS, interval partial least squares; IT, ionic trap; KNN, K-nearest neighbor classification; LDA, linear discriminant analysis; LLL, trilinolein; LLLn, 1,2-linolein-3-linolenin; LLP, 1,2-linolein-3-palmitin; LnPP, 1-linolenin-2-palmitin-3-palmitin; LOO, 1-linolein-2,3-olein; LOP, 1-linolein-2-olein-3-palmitin; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization; MANOVA, multivariate analysis of variance; MCR, multivariate curve resolution; MLR, multiple linear regressions; MS, mass spectrometry; NP, normal phase; OLA, 1-olein-2-linolein-3-arachidin; OLL, 1-olein-2,3-linolein; OLO, 1,3-olein-2-linolein; OOL, 1,2-olein-3-linolein; OOO, triolein; PCA, principal component analysis; PLL, 1-palmitin-2,3-linolein; PLO, 1-palmitin-2-linolein-3-olein; PLS, partial least squares; PLS-DA, partial least squares-discriminant analysis; POO, 1-palmitin-2,3-olein; PoOO, 1-palmitolein-2,3-olein; RID, refractive index detector; RMSEC, root mean square error of calibration; RMSECV, root mean square error of cross-validation; RMSEP, root mean square error of prediction; RP, reverse phase; SDA, stepwise discriminant analysis; SFC, supercritical

fluid chromatography; SFDA, stepwise factorial discriminant analysis; SIMCA, soft independent modeling classanalysis; SLS, 1,3-stearin-2-linolein; SOL, 1-stearin-2-olein-3-linolein; SOO, 1-stearin-2,3-olein; SPL, 1-stearin-2-palmitin-3-linolein; TAG, triacylglycerol; TCD, thermalconductivity detector; TIC, total ion current; TLC, thin-layer chromatography; TMS, total mass spectral.

1. Introduction

Dietary lipids include all plant and animal tissues that are ingested as food. Dietary lipids provide energy, transport fat-soluble vitamins (A, D, E, K), and they are a source of antioxidants and bioactive compounds. Furthermore, they are also the structural components of brain cell membranes. Fats (solid) or oils (liquid) are mostly composed of a mixture of triacylglycerols (or triglycerides) (TAGs), characteristic of each one, with minor amounts of other lipids. The fatty acids, which are in various lipid molecules, constitute the lipids of more nutritional interest.

The molecular structure of each individual TAG species can be described by a few basic attributes; (1) the total carbon number (CN), which is the sum of the alkyl chain lengths of each of the three fatty acids (FA), (2) the degree of unsaturation in each FA, and (3) the position and configuration of the double bonds in each FA. Moreover, the biosynthesis and the metabolism of TAG are stereo and regiospecific reactions, and the positional distribution of the three FA in TAG affects their biological and physical properties such as crystal structure, solubility, viscosity and melting point [1]. As a result, the analysis of TAG is very challenging; moreover there are an enormous number of individual TAG species due to the large number of possible combinations of FA.

Traditionally, the characterization of fats and oils has been based on FA composition, which was determined after a previous process of saponification (hydrolysis of TAG and other minor FA derivatives). This saponification produces a FA "soup". The identity and the total quantity of each FA (FA compositional profile) is well established for fats or oils, and their average values can be easily found in the literature [2]. However, this information is not enough about the fat or oil composition because different TAG blends in the right proportion could lead to similar FA

profiles. For this reason, recent studies tend to directly use the TAG as compositional markers in order to characterize fats and oils [3]. This information is then used to solve problems related to authenticity issues, especially when they are used for food stuffs. Food (and other commercial products) authentication is the process by which a food product is verified as complying with its label description. There are many different and indeed issues concerning labelling which may be checked by performing chemical tests; however many of them can be gathered in a few categories such as: species or varieties (botanical or animal) identification, geographical origin recognition, treatments for differentiated quality categorization, or adulterants detection.

Since its beginning, chemometrics has played an important role in resolving food chemistry problems. Nowadays food problems represent one of the largest fields of application of chemometrics, and food chemical data are often used for the development and evaluation of new chemometric tools and strategies [4].

This review is focussed on the application of exploratory and pattern recognition chemometric methods (unsupervised and supervised) on chromatographic data. It describes and discusses the use of TAG composition for the characterisation of fat and oils, applied to the authentication of several samples such as vegetable oils, marine oils, milk and dairy products, cocoa and coffee products. It emphasizes how the data have been obtained, and what strategy has been used for building the data matrix for chemometric analysis.

1.1. Chemometrics merging chromatography

Chemometric methods are tools of great potential for the treatment of multivariate chemical data such as that obtained from chromatography. Among the many applied chemometric features, which are also commons for other techniques (NIR, F-TIR, imaging, UV, etc.), the authors would like to highlight:

1. Estimating behavioral models of the chemical data and providing either explicit models (patterns recognition, mathematical functions, etc.) or implicit models (behavioral rules).
2. Providing criteria and parameters for assessing the quality of the models obtained.
3. Models can be validated either with external samples or through cross-validation.
4. If the size of sample is suitable, the models obtained are robust and they can provide objective and verifiable conclusions.
5. Establishing relationships between the chemical variables and the characteristic parameters of chemometric methods and explaining the patterns from the chemical point of view.

Sometimes chemometrics methods have been used by analytical chemists as a tool to solve problems resulting from the lack of selectivity [5,6,7] in analytical signals, including the chromatographic signals, as well as in other analytical parameters of interest. In order to apply a proper chemometric treatment, a (multivariate) data matrix is needed, either from the analytical instrument or from independent analytical results (i.e. analytical parameters).

However, sometimes analytical signals have a low degree of selectivity. This is due to the interferences of individual components (interferents) and/or matrix effect. In this case, it is necessary to apply multivariate chemometric analysis [8] in order to differentiate and/or extract useful information related to the analytical problem and discard information which is not relevant (qualitative methods). In this context, different multivariate chemometric methods could be applied as exploratory data analysis (EDA) and pattern recognition analysis [9,10]. A multivariate calibration must be applied if it is necessary to predict a value from a certain analytical quantity (quantitative methods) [11,12].

In a very simple approach, the analytical data matrices used in chemometrics can come from two sources: 1) signals coming directly from the chromatographic instrument (i.e. fingerprinting); or 2) data from

derived information such as measured intensity signal or composition/concentration results (i.e. profiling). Figure 1 shows graphically the described cases

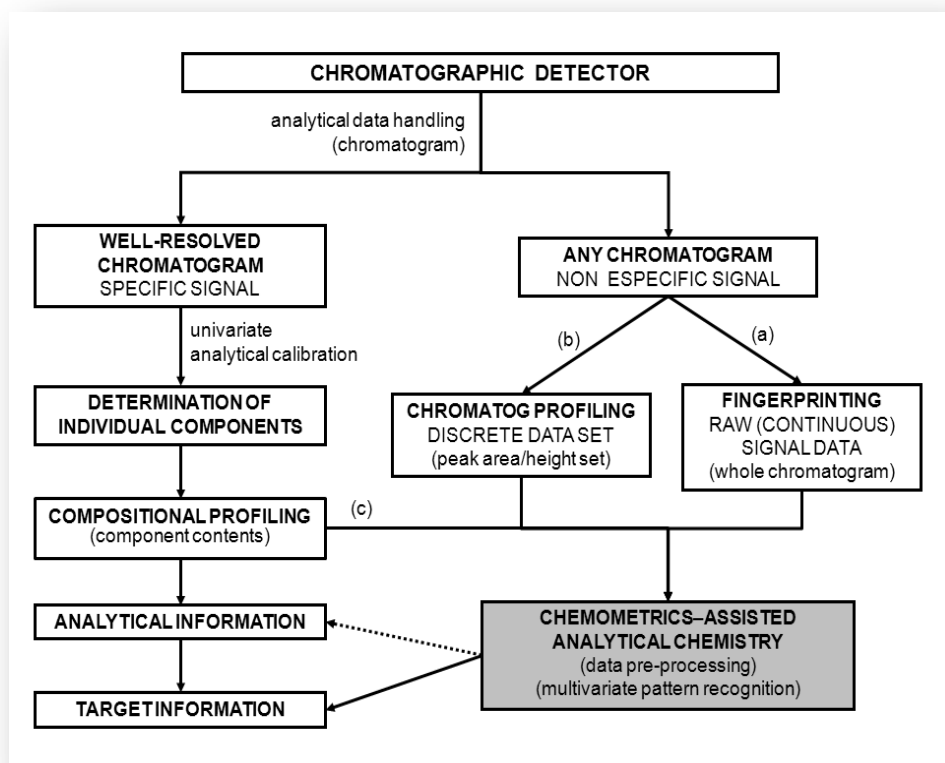


Fig. 1. Different strategies for obtaining multivariate data matrices for chemometrics application on chromatography.

In the first case (a), the data matrix is constituted by the whole chromatogram handled as a continuous signal. However, in most occasions (b) a discrete data set, previously selected by the analyst, is used. Habitually this data set is an analytical profile of a compound family with similar properties, for example, a food volatile compound profile. The aforementioned profile could correspond to peak areas or heights (chromatographic profile). The most commonly used is case (c) which is

constituted by content values (concentrations or percentages) of every single one of the components of interest (compositional profile), obtained after a previous analyte identification-calibration-quantification process. As a complement, the data matrix could be enlarged by adding experimental data obtained from independent measurements [13].

One of the advantages of chromatography is that it is a powerful separation technique. Chromatograms could be considered a selective signal with a good choice of chromatographic conditions. A choice of an appropriate detector could increase the selectivity signal in an instrumental way [14]. Taking as reference a chromatographic analysis of a mixture of chemical compounds, if the separation method is well-optimized, each chromatographic peak would provide information of a single compound which is the ideal aim of the chromatographers. For a long time there was the idea that chromatography and chemometrics were not "compatible" when a well-resolved chromatogram was achieved; chromatographers thought that chemometrics was only useful to hide bad chromatographic developments. Nowadays the combination of chemometrics and chromatography is fully supported. Chemometrics can have many other functions besides improving the chromatograms; chemometrics seeks for greater quality and reliability of the information that can be obtained by combining both techniques. The power of chemometrics allows the chromatographer to spend less time obtaining a perfect separation. The power and versatility of chemometric tools makes it possible to have low resolution in exchange for improving other analysis conditions such as time, cost, simplicity.

However both techniques could be applied in a synergistic way. In the first approach, chemometrics could improve the results of the chromatograms since extraneous components of the chromatographic signal could be corrected, such as noise or baseline [15]. Furthermore, in view of the fact that chromatography carries out the analyte separation in quasi-equilibrium conditions, the chemical environment affects the chromatographic features of each peak, this is, different analytes could co-vary with respect to another. The role of chemometrics could be crucial in lessening the undesirable effects of this circumstance. It is important to

keep in mind that even if only pre-processing tools are applied, analytical results will be much more reliable.

There are a lot of problems in separation science which require the use of chemometrics, such as the evaluation of chromatographic separation quality [16,17] or the optimization of chromatographic systems by design of experiments [18,19]. In addition, the use of multivariate pattern recognition methods combined with chromatography is significant for monitoring quality control, calibration, and discrimination of analytical data [20,21]. However, the application of chemometric tools on raw chromatographic data (i.e. chromatographic fingerprint) is not free of problems, as shown in two recently published tutorials [22,23]. Furthermore specific data pre-processing techniques are nearly always required [21]. In fact, overcoming problems related to the peak alignment [21,22,23,24,25] or the variable selection [21,26] are particularly critical when a chromatographic fingerprint is used as a data set. In special, to solve alignment troubles of all chromatograms in a dataset, icoshift algorithm has shown recently to be a powerful tool [25]. These problems (baseline and misalignment) might be the reason why in the literature there are more studies using the area/height of peaks (peak profile) or concentration data (concentration or compositional profiles) rather than using raw data (strategy (c) in Fig. 1).

1.2. Exploratory data analysis and pattern recognition

Exploratory data analysis and pattern recognition are chemometric tools which are designed to identify similarities or ways of behavior of the analyzed samples or measured variables on a data matrix. Depending on the type of information to be analyzed, two types of analysis could be considered: (1) exploratory data analysis or (2) pattern recognition, which could also be separated into supervised or unsupervised analysis.

EDA is used to highlight the information contained in a data matrix, in order to visualize the possible relationships between samples and variables. The group assignment between samples and/or variables is not the end of this type of analysis. Moreover, the objectives are: (1) to extract variables or important related information, (2) to identify possible clusters, (3) to detect outliers and (4) to identify trends between samples and/or variables.

PCA and factor analysis are two methods widely used in EDA. This type of analysis is used as a first step in a process of classification, which is usually done by pattern recognition methods.

On pattern recognition methods, the objective is the behavior between samples and variables. Depending on the starting point, two types of methods could be established:

- 1) *Unsupervised pattern recognition methods.* They try to establish the existence of groups of samples in the data matrix taking into account similarities between them, without prior information of such an existence. One of the most commonly used is hierarchical cluster analysis (HCA).
- 2) *Supervised pattern recognition methods.* In these methods, samples belonging to a particular class or group are known and the aim is to establish implicit or explicit classification models. Therefore, using a set of samples, called a training set, the classification model is established. This classification model is then used to predict membership in one sample which was not included in the training set. To validate the classification model, a sample set that is independent of the training set, called the validation set, is used, the classes of the samples are known. The best or worst classification for each one of the samples from the validation set, measure the quality of the model (recognition capability, predictability, robustness). When the existence of a limited number of samples makes it difficult to construct a set of independent validation data from the training set, a cross-validation technique is used, which allows one to study the quality of the model by using the training set as a validation set. However this strategy can generate

overestimated results. The supervised pattern recognition methods most commonly used are: discriminant analysis (DA), soft independent modeling class analogy (SIMCA) and partial least square-discriminant analysis (PLS-DA).

Extensive information on the aspects previously mentioned can be found in textbooks dedicated to this topic [4,9].

1.3. Chromatography of triacylglycerols (or triglycerides)

A variety of chromatographic techniques have been successfully used for the qualitative and quantitative determination of TAG, including gas chromatography (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC) in both normal (NP) and reversed phase (RP) modes, thin-layer chromatography (TLC), and super critical fluid chromatography (SFC) [27,28,29]. RP-HPLC is the most commonly employed chromatographic technique for separating mixtures of TAG. The parameter which is used to explain the separation of TAG, and to identify them in RP-HPLC is the "equivalent carbon number" (ECN), first introduced in 1977 [30], defined as $ECN = CN - 2n$, where CN is the number of carbons of the fatty chains, and n is the total number of the double bonds present in the three FAs. The mechanism for separating TAG in RP-HPLC involves chain length and the degree of unsaturation of the FA. Separations are obtained by partition between relatively non-polar stationary phases of the C₁₈ type and polar mobile phases, mostly mixtures of acetonitrile with acetone or chlorinated solvents [31]. Typically combinations of acetonitrile/2-propanol [32,33], are used. Finally, relatively apolar solvents are usually used for the analysis of the TAG because of their insolubility in water.

The quantitation of TAG using detectors, of which the response is almost independent of the analyte structure, allows simpler and faster quantitation without the need of response factors. RP-HPLC combined with flame ionization detection (FID) and with refractive index detection (RID), have been used for the quantitation of TAG in plant oils [34]. Thus, the IUPAC standard method for TAG determination in vegetable oils

involves an isocratic non-aqueous RP-HPLC with RI detection [35]. However, aerosol-based detectors such as the evaporative light scattering detector (ELSD) [36] and the charged aerosol detector (CAD) [37], are gaining interest as they are almost universal detectors which can be used in combination with gradient analysis. Thus, numerous practical applications of RP-HPLC for TAG separations using these classical detectors have been described in the literature [28,29]. Finally, mass spectrometry coupled to LC has proved to be a very suitable analytical technique for direct elucidation of regioisomer composition of TAG in fats and oils [38].

In addition, GC is also extensively used for the analysis of TAG [28,29]. However, the most common approach to the indirect knowledge of TAG, was to release FA composition and perform GC after methylation. Additional information on this topic could be found in a specific textbook [39].

For direct analysis of TAG in GC, each TAG is chemically characterized by its total number of carbons, the degree of unsaturation of each FA and the position and configuration of double bonds of each FA. For instance, the official EC method for the determination of the purity of milk fat is based on TAG analysis by packed column GC [40]. However, due to the rapid progress of capillary column technology for GC, packed columns are rarely used any longer. The progress in separation efficiency of TAG has been achieved by using capillary columns coated with more polar polysiloxane phases containing a higher proportion of phenyl groups (50-65%) and low blending at high-temperature (as far as 370-400°C). These thermo-resistant polar columns have been a powerful tool [41,42] in combination with the high-temperature GC to solve the main problem of separating TAG according to the degree of unsaturation and its CN.

Additionally, a large number of detectors operating on different principles have been developed for use in GC, but only a few of these continue to be used to a significant extent. Mass spectrometry (MS) has become an invaluable tool for the identification of TAG separated by GC.

In general, GC-MS utilizing electron impact ionization (EI) is the simplest and most widely used chromatography-MS combination [43]. In contrast, analyses of highly unsaturated TAG, such as fish oils and seed oils, by GC-MS cannot be recommended due to thermal degradation and polymerization of highly unsaturated molecules at high elution temperatures although some improvements may already be found in literature [44]. In addition, the occurrence of certain TAG species in some oils in high amounts has been used for the detection of adulteration of other higher priced oils, in which these TAG species are absent or present only at trace levels [45,46,47].

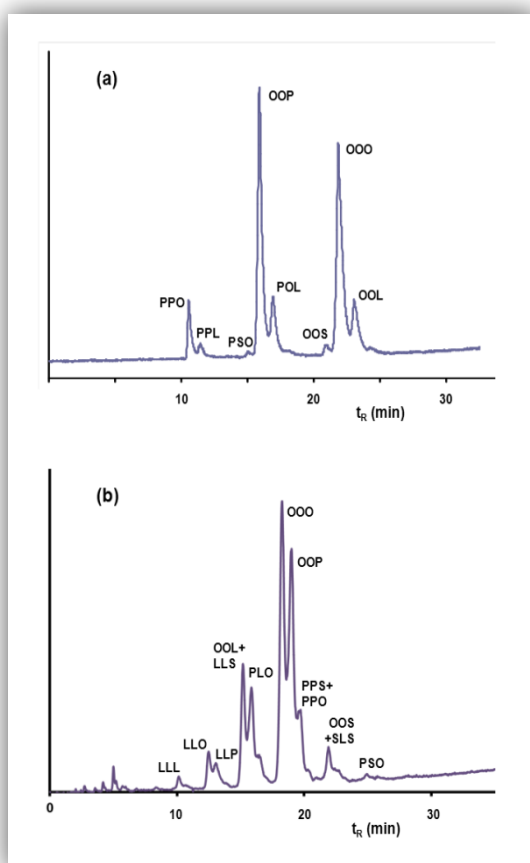


Fig. 2. Chromatograms of the same sample of an extra virgin olive oil, variety "arbequina", obtained in our laboratory using HTGC-MS (a) and HPLC-CAD (b).

From an operative point of view, GC and HPLC methods are equivalent since the fat or oil samples do not need more previous treatment, only the dissolution in an appropriate solvent. These solutions are directly introduced into the chromatograph. Furthermore, as it can be seen in Fig. 2, the chromatographic times are similar. However, GC and HPLC together could provide additional information on the TAG composition of fats or oils as the mechanisms governing the separation achieved with these techniques are different (see explanation in previous text, from this section) and they elute in altered order. For this reason, TAG chromatographic fingerprints from both types of chromatography are never equal. See Fig. 2.

2. Characterization and authentication of fat and oils

Papers about the reviewed topic published in the last twenty-five years (1987-2011) have been included in this section. Authors have not found papers published prior to 1987.

In all cases, the selected papers have a common feature: the data set was obtained from chromatographic techniques (LC or GC). Another common feature is that TAG profiles or fingerprints, alone or combined with more data related to other authenticity markers (FA, sterols, phenols, tocopherols, or other quality and composition general characteristics of fats and oils), have been used for the chemometric treatment. It is surprising that in the 89% of the papers compositional profiles have been used as the data matrix and just a few examples of chromatographic fingerprints (raw data), 11% of the papers, have been found. This is possibly due to the difficulty in handling such a large collection of chromatographic data, and to the lack of knowledge of many chromatographers on how it could be performed [22].

There are a relatively high number of papers devoted to characterization of fat and oils using TAG compositional data and chemometric methods.

Exploratory methods and pattern recognition are the chemometric methods used. However, the methods used vary according to the type of analyzed sample. For the characterization of olive oils and vegetable oils, the most commonly used method is PCA, which is used in 69% of the articles, either by itself (25% of articles) or in conjunction with pattern recognition methods. Among the pattern recognition methods, the most widely used are the supervised one, 58% of the articles, while unsupervised methods such as HCA are used only in 17% of the articles, always associated with PCA. However, one of the articles about the characterization of vegetable oils is using only this method.

On the other hand, in the characterization of milks, cocoa and coffee, in all the papers were employed one or more of the supervised method, while PCA was only used in one of the articles as an exploratory method.

From the point of view of the strategy, the approaches developed in the papers are usually correct, however during implementation, some of them show some problems that lead to results and/or conclusions that are quite debatable. These problems include: (1) PCA as exploratory method is used in a partial way and incomplete information is extracted from the data set; (2) PCA is used, inappropriately, as a method of classification in a high percentage (25%) of the articles associated to the characterization of olive oils and vegetable oils; (3) the small number of samples usually used to build the data set is an important limitation of these papers; (4) the data set only collect a small part of the variability that can be found in the characterization of fats and oils; (5) when supervised methods are used, no explicit models were estimated in those cases where this option is possible, and (6) the estimated models were not validated and characteristic quality parameters of the proposed models were not calculated.

In recent papers, DA and SIMCA have been substituted by PLS-DA due to its great potential as a classification method. PLS has been the method used for the quantification of the samples. The subsections have been structured according to the type of analyzed sample. And within

these sections the papers have been collected in two sub-sections on the basis of the chemometric techniques used according to Section 1.2.

A brief descriptive remark is carried out about each paper. In addition, when this is pertinent, a critical comment is added.

2.1. Olive oil

Olive oil is obtained from the fruit of the olive tree as edible oil. The properties of olive oil can be affected by different aspects such as: cultivation, harvesting and technological processing. Characterization of olive oil according to its variety and/or geographical origin is of great importance for obtaining the product of quality which is demanded by producers and consumers. Olive oil is sometime adulterated with other less expensive vegetable oils such as olive pomace oil, corn oil, hazelnut oil and peanut oil among others. Chromatographic techniques have been used successfully to establish different types of compositional profiles in olive oils, including TAG profiles. These profiles, associated with different chemometric techniques, have been extensively used for the characterization and authentication of olive oils.

2.1.1. Exploratory and unsupervised methods

PCA has been used to establish the authenticity and adulteration of olive oils from different origins. Tsimidou et al. [48] analyzed forty-five Greek virgin olive oils. Blends of olive oil with 10-20 % of maize, cottonseed, sunflower, soybean or rapeseed oils were analyzed by the same authors [49]. The adulteration of olive oil with eleven vegetable oils, such as soybean, sesame, apricot, peanut and olive oils were investigated using PCA [47]. The characterization of eleven virgin olive oil samples obtained from seven olive cultivars in Sardinia (Italy) and one in Corsica (France) were carried out using PCA [50]. The characterization of two monovarietal virgin olive oils from Tunisia and three olive oils from Sicily (Italy) were studied using PCA [51]. The authentication of olive oils in blends with different contents of sunflower oil was performed using PCA [52]. An interesting study of characterization and adulteration of olive oils

were based on the use of mass spectra data and PCA. However, only seven extra virgin olive oils from Spain, Portugal, Italy, Greece and Argentina, a Brazilian soybean and a commercial oil blend of olive oil in soybean oil were analyzed [53].

The main problem with these previous papers is the use of PCA as a classification method rather than as an exploratory method. In general, the number of samples used is too small to ensure that all the variability of the problem is included. Furthermore, the models have not been validated and they do not provide some parameter to estimate the quality of the results.

In another paper, PCA is used in a prior stage as an exploratory method and HCA is employed to characterize virgin olive oil, of the "oueslati" variety, from seven different zones of Tunisia. However the obtained results are arguable because the number of samples used is very small and the models were not validated [54].

2.1.2. Supervised methods

In this section it has been included mainly applications where supervised pattern recognition methods have been used, independently or jointly with another ones, as the main procedure to establish the characterization of olive oils. PCA and canonical discriminant analysis (CDA) were used for the classification of Cretan olive oils according to cultivar and geographic origin. In fact, it only used two varieties of oil from olives grown in five geographic areas and collected in three different maturity periods [55].

DA was used to characterize hazelnut and olive oil samples and their blends (70-30%, 50-50% and 30-70% of hazelnut oil with olive oil). Two groups were obtained for hazelnut oil and olive oil samples but the blends did not clearly separate. The number of samples used is small (three replicates of two types of olive oils and blends in three different proportions) and it does not take into account the different either varieties or categories of olive oils [56].

Different methods such as HCA, SIMCA, KNN and PCA were used to characterize seven major Italian olive varieties in three kinds of olive fruit oils (pulp, seed and whole fruit). The two discriminant chemometric methods have been used properly, but they attributed erroneously a classification ability of the oil varieties to the PCA. In addition, a small number of samples were used and the models were not validated [57].

PCA, HCA and DA were used to analyze both the compositional data (FA, TAG and sterols). A classification of thirty-seven samples of olive oils from the southern of Italy according to four cultivars (seven samples of Coratina, ten of Leccino, seven of Peranzana, and thirteen of Oliarola) was obtained. DA was applied to the data set with twenty-five samples in the training set and twelve in the validation set [58].

Stepwise discriminant analysis (SDA) was used to classify virgin olive oil of different varieties from Extremadura (Spain). The model obtained with a training set containing two hundred and seventy-three samples of a total of three hundred and fifteen samples of olive oil explained more than the 88% of the variance with the two first functions. The fitted model was evaluated using external validation, for this, forty-two samples were removed at random from the complete dataset. The validated model discriminate completely only three ("cacereña", "cornice" and "picual") of the seven varieties. On the contrary, the percentage of classification of the variety "carrasqueña" was just 33.3% [59].

The origin differentiation of French virgin olive oils was obtained applying linear discriminant analysis (LDA). Four main French cultivars (Aglandau, Cailletier, Picholine, and Salonenque) and two French protected designations of origin of olive oil were classified in six groups. Five hundred and sixty-four samples analyzed were obtained as industrial samples from different crops (1997-2000) [60]. In another paper, the same authors have classified five hundred and thirty-nine samples containing two or more varieties of French olive oils according to five predetermined

classes [61]. In both cases, the quality of the LDA model was estimated by the leave-one-out cross-validation.

LDA was also used to classifying different vegetable oils, and olive oils, in six groups according to their botanical origin. A training set of 24 objects (6 groups of 4 samples) was used to estimate a LDA model and a validation set of 12 objects (6 groups of 2 samples) was used to validate the estimated model [62].

PCA and SDA were used to classify commercial olive oils. Two hundred and twenty-four samples of "cornicabra", "arbequina", "hojiblanca" and "picual" monovarietal virgin olive oils from industrial oil mills covering the crop seasons from 1995 to 2000 were analyzed. Neither has an explicit discriminant function has been estimated nor have the proposed models have been validated [63].

The characterization of extra virgin olive oils according to its varieties was studied using PCA and LDA. Only seventeen oil samples from different cultivars, most of them from Sicily, were analyzed. Samples were separated in three classes corresponding to Nocellara, Cerasuola and Biancolilla cultivars, using LDA and a selection of only six variables. The LDA model was validated by means of cross-validation using the leave-one-out method [64].

PCA and SIMCA were used to analyze the TAG and sterol profiles of eighty samples of monovarietal olive oils obtained in the crop seasons from 1999 to 2001. The samples were classified in two categories: "manzanilla cacereña" (44 samples) and "non-manzanilla cacereña" (36 samples). The number of principal components was chosen by means of cross validation and the relationships between these principal components, sterols and TAG contents were established [65].

The characterization of nine Corsican olive oils was carried out by means of ANOVA and stepwise factorial discriminant analysis (SFDA). Oils are completely discriminated on the basis of variety (four categories)

and this discrimination is based on the proportions of four TAG and one fatty acid. The discriminant model proposed was not validated [66].

MANOVA, PCA and DA were used to distinguish among two varieties of olive oils ("manzanilla" and "hojiblanca"). A small number of samples were analyzed and models were not validated [67].

Chromatographic fingerprints were used in the next three papers, published in 2011. In them, the icoshift algorithm was used as pre-processing of the chromatogram for solving signal alignment problems. PCA, PLS-DA, and multiple curve resolution (MCR) in combination with suitable pre-processing were used for the differentiation of samples of different categories and varieties of olive oils and different types of edible oils. Two clusters (olive and non-olive oils) were obtained considering one hundred and twenty-six samples of olive oils and edible oils, including corn, sunflower, peanut, soybean, rapeseed, canola, seed, sesame, grape seed, and some mixed oils. The PLS-DA model was validated using a validation set of twenty-five samples of non-olive and olive oils. Both non-olive and olive oils were classified in their respective group to 100% [68].

HCA, PCA and PLS-DA were used to study the variations in the raw chromatographic data sets of fifty-six samples from four different categories and different varieties of olive oil. The PLS-DA classification model was able to predict monovarietal virgin olive oils and the blends of different varieties of olive oils. The performance of the fitted model was evaluated with external validation, for this 25% of the samples were removed at random from the complete dataset [43].

PLS was used for the quantification of olive oil in edible vegetable oil blends. Different categories of olive oils and various vegetable oils such as, sunflower, rapeseed, corn, soybean, canola, seed and grape seed were used at different concentrations. The iPLS approach provides a slight improvement in RMSECV but revealed chemical information important in the chromatogram to quantify olive oil in vegetable oil blends. The

CAPÍTULO IV

prediction capability of the regression models was assessed by cross-validation by removing one sample at a time [69].

Main features of the methods used to characterize olive oils and mentioned above are shortened in Table 1.

Table 1. Characterization and authentication of olive oils

Data Matrix	Chromatography	Chemometrics	Samples	References
Chromatographic fingerprint of TAG	HT/GC-(IT)MS	PCA, PLS-DA	Olive oils	[43]
TAG profile	HT/GC	PCA	Olive and vegetable oils	[47]
TAG and FA profiles	HPLC-MS GLC	PCA	Olive oil	[48]
TAG and FA profiles	HPLC-MS GLC	PCA	Olive and vegetable oils	[49]
TAG profile	HPLC-RID	ANOVA, PCA, CDA	Cretan olive oils	[49]
TAG, tocopherols and sterols profiles	HPLC-(APCI)MS GC-FID	ANOVA, DA	Hazelnut and olive oils	[56]
TAG and FA profiles	HPLC-ELSD GC-FID	HCA, SIMCA, KNN, PCA	Italian olive oils and olive fruit	[57]
TAG profile	HPLC-RID	ANOVA, LDA	Spanish monovarietal virgin olive oils	[59]
TAG, FA and sterols profiles	GC-FID HPLC-RID	ANOVA, PCA, HCA, DA	Italian olive oils	[58]
TAG and FA profiles	HPLC-RID GC-FID	LDA	French virgin olive oils	[60]
TAG and FA profiles	HPLC-RID GC-FID	ANOVA, PCA, SDA	Spanish monovarietal virgin olive oils	[63]
TAG profile	HPLC-MS	PCA, DA	Extra virgin olive oils	[64]
TAG and sterols profiles	HPLC-RID GC-FID	PCA, SIMCA	Spanish virgin olive oils	[65]
TAG and FA profiles	HPLC-RID GC-FID	ANOVA, PCA	Virgin olive oils from Sardinia	[50]
Sensory attributes, FA and TAG profiles	HPLC-RID	LDA	French virgin olive oils	[61]

CAPÍTULO IV

Phenols and TAG and FA profiles	HPLC-ELSD GC-FID	ANOVA, PCA	Tunisian monovarietal virgin olive oils	[51]
TAG and FA profiles	HPLC-ELSD GC-FID	FDA	Corsican olive oils	[66]
TAG profile	(RP)HPLC-(APCI)MS	PCA	Plants oils and olive oils	[52]
TAG profile	HPLC-(APCI)MS ²	PCA	Olive and soybean oils	[53]
K270, K232, TAG and FA profiles	HPLC-ELSD GC-FID	MANOVA, PCA, DA	Olive oils	[67]
TAG and sterols profiles	HPLC-RID CG-FID	ANOVA, PCA, HCA	Tunesia olive oils	[54]
TAG profile	HPLC-UV-Vis	LDA	Olive and vegetable oils	[62]
Chromatographic fingerprint of TAG	HPLC-CAD	PCA, PLS-DA, MCR	Olive and vegetable oils	[68]
Chromatographic fingerprint of TAG	HPLC-CAD	PLS, iPLS	Olive and vegetable oils	[69]

2.2. Other vegetable and marine oils, and animal fats

2.2.1. Exploratory and unsupervised methods

Classification, according to the authors, of the different vegetable oils and the detection of adulteration of argan oil were established using HCA. However, only twelve samples (one of each vegetable oil) and one sample of adulterated argan oil were used [70].

PCA has been used to characterize fifty-two samples of vegetable oils, such as sunflower (10), corn (8), peanut (10), soybean (6), hazelnut (4), walnut (6), sesame (4) and virgin olive oils (4). According to the authors, vegetable oils were clustered in eight different classes based on PCA results. This classification that is attributed to the PCA is at least arguable. Logically, olive and hazelnut oils groups were very close but can be differentiated from the other vegetable oils due to its high levels of OOO [71].

PCA was used for the evaluation of the genuineness of the pumpkin seed oil from northeastern Slovenia. TAG composition was qualitatively related with the different samples and with the two principal components estimated from PCA. As indicated by the authors a larger number of samples is needed to obtain a valid reference [72].

The changes in the distribution of TAG and FA in soybean oil due to thermal oxidation at 180 °C and methylene blue photosensitized oxidation were studied using PCA. Six samples for each treatment (control, thermal and photooxidation) were used. According to PCA results, authors noticed the presence of two classes, thermally oxidized samples and photosensitized samples [73]. Again, PCA is unusually used as a classification method.

In the next two papers, total ion current (TIC) and total mass spectral (TMS) fingerprints were used to building the dataset for PCA study. In the first one, a complete study of the structural elucidation of TAG molecules present in cod liver oil was estimated using LC-(ESI)MS². PCA results were used to discriminate between genuine and adulterated cod liver oils [74]. Different approaches to differentiate marine oils were presented. For distinguishing several marine oils (seal, whale, cod liver and salmon) and plant oils (soy, rapeseed and linseed) TAG composition and different profiles including TIC and TMS were used [75]. The results obtained in the discrimination study of marine oils in both papers are arguable as PCA is improperly used again as a classification method.

2.2.2. Supervised methods

Next, papers, where mainly supervised pattern recognition methods are applied, are reviewed. For instance, authentic and adulterated sesame oil with perilla oil can be characterized using PCA and DA. Only twenty samples of authentic sesame oils from different origin and ten samples of adulterated oils were used. It is attributed erroneously to a discrimination ability with PCA because the samples are clustered in two classes, authentic and adulterated sesame oils, using PCA. DA was

employed to assign unknown sesame samples into one of the two previous groups [76].

DA was used for the characterization of walnut oil [77] and to estimate a discrimination model between four Portuguese chestnut cultivars [78]. A relatively small number of samples were used, twenty-six samples of walnut oil from nine cultivars and forty samples of chestnut oil, respectively. Explicit discriminant functions were not proposed and the estimated models were not validated.

ANOVA and CDA were used for distinguishing the adulteration of vegetable oils, palm oil, palm kernel oil and canola oil, with lard from those samples adulterated with other animal fats, beef tallow, mutton tallow and chicken fat. However, the number of samples used was small, the method was not validated and there were no parameters to estimate the quality of the results [79].

PCA, HCA and LDA were used for the characterization of different almond in the next two papers. Nineteen cultivars (three samples in duplicate by cultivars) [80] and one hundred and nine samples (91 samples as training set and 18 samples as validation set) from ten cultivars of different countries [81] were analyzed. TAG compositional profiles were related with the different cultivars and with the two principal components estimated from PCA. Different clusters according to the cultivars were obtained using HCA. DA provided appropriate functions for the discrimination of the five different groups. External samples were used to validate discriminant models.

In Table 2 the different methods used in the characterization of vegetable and marine oils and animal fats are compiled.

CAPÍTULO IV

Table 2. Characterization and authentication of vegetable and marine oils and animal fats

Data Matrix	Chromatography	Chemometrics	Samples	References
TAG profile	GC-FID	HCA	Vegetable edible oils	[70]
TAG profile	HPLC-RID	PCA, DA	Adulterated sesame oils with perilla oil	[76]
TAG profile	(RP)HPLC-ELSD	ANOVA, MANOVA, DA	Walnut oils	[77]
TAG profile	HPLC-RID	ANOVA, CDA	Animal fats and vegetable oils	[79]
TAG profile	HPLC-ELSD	ANOVA, PCA	Vegetable oils	[71]
Nutritional parameters, TAG and FA profiles	HPLC-ELSD GC-FID	DA	Portuguese chestnut	[78]
TAG profile	HPLC-RID	ANOVA, PCA	Pumpkin seed oils	[72]
TAG and FA profiles	HPLC-ELSD GC-FID	ANOVA, PCA	Soy bean oils	[73]
TAG profile	HPLC-RID	ANOVA, PCA, HCA, DA	Almond kernel oils	[80]
TAG profile	HPLC-RID	PCA, HCA, LDA	Almond kernel oils	[81]
TIC fingerprint from TAG composition	LC-ESI-MS ²	PCA	Cod liver oil	[74]
TAG profile and TIC and TMS fingerprints	LC-(ESI)MS LC-(ESI)MS ²	PCA	Marine and plant oils	[75]

2.3. Milk and dairy products

Characterization of samples of milk and dairy products was carried out only using supervised methods.

In order to study the adulteration of milk fat with vegetable fat, fifty six butter samples (19 from Germany, four from Belgium, fifteen from Italy, ten from France, five from Switzerland and two from Denmark) were used to prepare mixtures of butter samples with sunflower oil (n=7),

soy oil (n=6), maize oil (n=5) and lard (n=15). A training set of forty-four butter samples and twelve mixtures and a validation set of twenty four butter samples and four mixtures were used to estimate and validate PLS and artificial neural network (ANN) models. The PLS model was better than the ANN model for predicting the quantity of foreign fat in mixtures [82].

In two different papers, multiple linear regressions (MLR) and LDA were used to estimate the presence of foreign fat in milk. In the first one, two hundred and sixteen samples of milk fat from different geographical zones of Mexico and ten samples of non-milk fat, such as, fish oil, canola and sunflower oils, pork lard and bovine tallow (two samples of each type), were analyzed using MLR. Three multiple regression equations were obtained for the percentage of non-milk fat in function of the type of adulterant oil [83]. In the second one, two hundred and sixteen samples of milk fat from different geographical zones of Mexico, thirty-six samples of commercial UHT milk and fourteen samples of NMF (fish, peanut, corn, olive and soy oils and pork lard and bovine tallow, two samples each type), were analyzed using PCA and LDA. The PCA was used for the selection of variables in order to reduce its number and getting a better measurement of the total variance associated to the TAG. Five fat groups (pure MF and four different percentage of adulteration) and four discriminant functions were established. But the first function was chosen due to its greatest power of classification [84]. In both papers, explicit discriminant functions were not proposed and the models were not validated with an external validation set.

The detection of cow milk in donkey milk may be achieved using LDA and ANN. Twenty-five samples of milk from cow and donkey and mixtures of both, from different Italian farms were used in this study. A chemical enzymatic chromatographic analytical method was used to obtain the total and intrapositional FA profile of the TAG fraction of cow and donkey pure milks. The proposed models permitted the characterization of donkey milk and the discrimination of the samples containing small quantities (1, 3 and 5%) of cow milk added to donkey

milk. The prediction of the ANN model is a little better when the total FA compositions of TAG fraction and the intrapositional FA compositions of TAG fraction are used as variables. These models were not validated with an external validation set [85].

Three of the four previous papers used GC-FID as the chromatographic technique in the characterization of milk and dairy products (Table 3).

Table 3. Characterization and authentication of milk and derivatives

Data Matrix	Chromatography	Chemometrics	Samples	References
TAG profile	GC-FID	PLS, ANN	Pure butters and mixtures of butter fat and vegetable oils	[82]
TAG profile	GC-FID	MLR	Milk fat and not-milk fat (vegetable and fish oils and lard and tallow)	[83]
TAG profile	GC-FID	ANOVA, PCA, LDA	Milk fat and not-milk fat (vegetable and fish oils and lard and tallow)	[84]
FA profile	HRGC-FID	LDA, ANN	Cow milk, donkey milk and mixtures of them	[85]

2.4. Cocoa and coffee

CB is the major fat component in chocolate products. However, in the European Union, these products may contain vegetable fats other than cocoa butter up to 5% of the total weight. In this case, chocolate products should be labeled with the statement, "contains vegetable fats in addition to cocoa butter". Then, some vegetable fats (so-called cocoa butter equivalent, CBE) can be used.

PLS and ANN were used to prove the authenticity of cocoa butter. The PLS analysis of eighteen cocoa butter samples and mixtures with several vegetable oils provides a calibration model with a root mean

squared error of calibration (RMSEC) of 1.4%. No explicit PLS model was proposed but a validation set of thirteen pure cocoa butters and mixtures were used to test the model. ANN can classify the samples in two cluster, pure cocoa butter and mixtures of cocoa butter and vegetable oils. A validation set of fourteen samples was used to evaluate the model and twelve of these samples were correctly identified. The presence of 2-3% of vegetable oil can be detected using both PLS and ANN [86].

A new PLS model to quantify CBE in CB blends was proposed. Twenty-four mixtures containing different proportions of six different CBE and CB fat at three percentage levels: 5, 15 and 20% were used to estimate a regression model that represents the percentage of CBE added to CB in function of the percentages of different TAG. Mixtures of CBE/CB were produced according to a Plackett-Burman experimental design. The value of root mean-square error of prediction (RMSEP) was used as a criterion to test the quality of the model. In 98% of the tested samples, the RMSEP value was of 1.6%. The PLS model allows the quantification of CBE in mixtures with an uncertainty of 2% [87].

HCA was used to classify CB and CBE samples in order to assess the purity and the origin of the CB samples. CB samples (n = 74) from three main producing cocoa regions and CBE samples (n =75) from industry sources were used in the study [88].

A PLS model for the detection and quantification of CBE in milk chocolate was proposed. In the proposed model was included the variability due to milk fat (310 samples), CB (75 samples), CBE (74 samples) and mixtures of them (947 samples). The prediction model was estimated using a training set (n=363) and this model was validated using an external validation set (n=362) [89].

PCA and LDA were used to confirm the authentication of coffee varieties. Thirty-two coffee samples (eight of "robusta" variety and twenty four of "arabica" variety) from different geographical zones were used in the study. Sixteen samples were green coffee beans and the other sixteen

samples were processed to obtain roasted coffee. Using PCA and considering separately TAG and tocopherols as descriptor variables, the first principal component showed two well separated groups, "arabica" and "robusta". An explicit discriminant function to separate "arabica" and "robusta" varieties was obtained. But discrimination of green and roasted coffees was not obtained. LDA models were not validated [90].

Cocoa and coffee methods used for authentication are summarized in Table 4.

Table 4. Characterization and authentication of cocoa and coffee

Data Matrix	Chromatography	Chemometrics	Samples	References
TAG profile	HPLC-ELSD	PLS, ANN	Cocoa butter, vegetable fats and mixtures of them	[86]
TAG profile	HRGC	PLS	Cocoa butter and cocoa butter equivalents	[87]
TAG profile	HRGC-FID	HCA	Cocoa butter and cocoa butter equivalents	[88]
TAG profile	HRGC-FID	PLS	Cocoa butter equivalents and milk chocolate	[89]
TAG and tocopherols profiles	(RP)HPLC-RID (NP)HPLC-FD	PCA, LDA	"Arabica" and "robusta" coffee varieties	[90]

2.5. Other fats

PCA, HCA and DA were used to classify fat bodies of males in eleven bumblebee species. Using PCA the number of descriptive variables was reduced. A cluster tree of the samples analyzed by two different analytical techniques was obtained using HCA. Classification of the samples into groups was similar for those samples analyzed by both techniques. DA using the factors extracted from PCA proved the discrimination of the different species. However, an explicit discriminate function was not provided and DA model was not validated. According to

the results TAG profile in the fat bodies of bumblebee males are species-specific [91].

3. Conclusions

Chemometrics is a very useful tool for the characterization and authentication of edible fats and oils with suitable chromatographic data, it is able to explore, classify and predict geographical origin, types, varieties, adulterations, etc.

In the revised literature PCA (an exploratory method) was the method more commonly used, even though in some cases it has been erroneously used as a classification method. However PCA was used in combination with either unsupervised (clustering) or supervised (classification and discrimination) pattern recognition methods. More recently PLS-DA (a discrimination method) has become the more commonly used classification method due to its potential and versatility.

However, going more deeply into the use which some authors make of these powerful tools, it would be desirable a better knowledge about which type of chemometric method, depending on the target problem, is fitted for purpose. For instance, PCA has been used several times to classify, or validation of the proposed models is not carried out very often.

On the other hand, related to the preparation of the data set, the transformation of chromatographic signal into compositional data (profiling) shows some inconvenience because valuable information could be lost. On the other hand using the entire chromatogram (fingerprinting) could keep the complete information, however this methodology is rarely used. Finally, it is important to express that chemometric tools can help obtain valuable results in case where well-resolved chromatograms cannot be obtained.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, project P07-FQM-02667, and Consejería de Agricultura y Pesca) for financial assistance. This work has also been partially supported by European Regional Development Funds (ERDF). Two of the authors, C.R.S. and A.P.M.E., are also grateful to the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa), and the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT), respectively, for personal postgraduate grants.

References

- [1] F.D. Gunstone, in: F.D. Gunstone (Ed.), *Food Technology: Composition, Properties and Uses*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2002, p. 1.
- [2] F Shahidi (ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 3rd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2005.
- [3] C. Montealegre, M.L. Marina Alegre, C. García Ruiz, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 28.
- [4] M. Forina, M. Casale, and P. Oliveri, in: S. D. Brown, R. Tauler and B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis. Vol. 4: Applications*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2008, p. 75.
- [5] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782A.
- [6] H. Y. Aboul-Enein, *Accred. Qual. Assur.* 5, (2000) 180.
- [7] J. Vessman, R.I. Stephan, J.F. Van Staden, K. Danzer, W. Lindner, D. Thorburn, A. Fajgels, H. Muller, *IUPAC Recommendations 2001, Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1381.
- [8] K. Varmuza, P. Filzmoser, *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2009.
- [9] R.G. Brereton, *Chemometrics for Pattern Recognition*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2009.
- [10] L.A. Berrueta, R.M. Alonso Salces, K. Héberger, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 196.
- [11] R. Bro, *Anal. Chim. Acta*, 500 (2003) 185.
- [12] J. Gabriëlsson, T. Trygg, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 36 (2006) 243.
- [13] F. Marini, F. Balestrieri, R. Bucci, A.D. Magri, A.L. Magri, D. Marini, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 73 (2004) 85.
- [14] H.Y. Aboul-Enein, *Accred. Qua. Assur.*, 5 (2000) 180.
- [15] M. Daszykowski, B. Walczak, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 1081.

- [16] L. Xu, L.-J. Tang, C.-B. Cai, H.-L. Wu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, J.-H. Jiang, *Anal. Chim. Acta.* 613 (2008) 121.
- [17] T. Cserháti, *Multivariate Methods in Chromatography: A Practical Guide*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2008.
- [18] S.L. Costa Ferreira, R.E. Bruns, E.G. Paranhos da Silva, W.N. Lopes dos Santos, C.M. Quintella, J.M. David, J. Bittencourt de Andrade, M.C. Bretkreitz, I.C. Sales Fontes Jardim, B. Barros Neto, *J. Chromatogr. A*, 1158 (2007) 2.
- [19] A.C. Atkinson, R.D. Tobias, *J. Chromatogr. A*, 1177 (2008) 1.
- [20] A.C. Duarte, S. Capelo, *J. Liq. Chrom. Rel. Tech.* 29 (2006) 1143.
- [21] J. Harynuk, A.P. de la Mata and N. Sinkov, in: K. Varmuza (ed.), *Application of Chemometrics to the Interpretation of Analytical Separations Data. Chemometrics*, InTech – Open Acces Publishers, Rijeka, Croatia, 2012.
- [22] T. Skov, R. Bro, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 281.
- [23] J.M. Amigo, T. Skov, R. Bro, *Chem. Rev.* 110 (2010) 4582.
- [24] S. Peters, E. van Velzen, H.G. Janssen, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1273.
- [25] F. Savorani, G. Tomasi, S.B. Engelsen, *J. Magn. Reson.* 202 (2010) 190.
- [26] C.M. Andersen, R. Bro, *J. Chemometr.* 24 (2010) 728.
- [27] P. Laakso, *Food Rev. Int.* 12 (1996) 199.
- [28] N.K. Andrikopoulos, *Crit. Rev. Food Sci.* 42 (2002) 473.
- [29] M. Buchgraber, F. Ulberth, H. Emons, E. Anklam, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106 (2006) 621.
- [30] R.D. Plattner, G.F. Spenser, R. Kleiman, *J. AOCS* 54 (1977) 511.
- [31] W.W. Christie, *Lipid Technol.* 8 (1996) 140.
- [32] J.D.J. van den Berg, N.D. Vermist, L. Carlyle, M. Holcapek, J.J. Boon, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 181.
- [33] M. Lisa, M. Holcapek, T. Řezanka, N. Kabátová, *J. Chromatogr. A* 1146 (2007) 67.
- [34] G.N. Jham, B. Nikolova Damyavova, M. Viera, R. Natalino, A.C. Rodrigues, *Phytochem. Anal.* 14 (2003) 310.
- [35] Method 2.323, in: C. Paquot, A. Hautfenne (Eds), *Standard Methods for the Analysis of Oils and Derivatives*, Blackwell Publishing, Oxford, 7th ed., 1987.
- [36] S. Héron, M.G. Maloumbi, M. Dreux, E. Verette, A. Tchaplá, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 152.
- [37] P. de la Mata Espinosa, J.M. Bosque Sendra, L. Cuadros Rodríguez, *Food Anal. Meth.* 4 (2011) 574.
- [38] W.C. Byrdwell (Ed.), *Modern Methods for Lipid Analysis by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Related Techniques*, AOCS Press, Champaign, 2005.
- [39] W.W. Christie, X. Han, *Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*, 3rd ed., The Oily Press, Bridgwater, 2010.

- [40] Commission Regulation (EC) No 2771/1999 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards intervention on the market in butter and cream. *Official Journal L* 333, (1999), pp. 11.
- [41] N.R.A. Filho, E. Carrilho, E.M. Langas, *J. AOCS*, 70 (1993) 1051.
- [42] M.T. Rodríguez Estrada, N. Frega, E. Lercker, *Grasas Aceites* 53 (2002) 76.
- [43] C. Ruiz Samblás, A. González Casado, L. Cuadros Rodríguez, F.P. Rodríguez García, *Talanta* 82 (2010) 255.
- [44] C. Ruiz Samblás, L. Cuadros Rodríguez, A. González Casado, F.P. Rodríguez García, P. de la Mata Espinosa, J.M. Bosque-Sendra, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2093.
- [45] R. Aparicio, R. Aparicio Ruiz, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 93.
- [46] E. Christopoulou, M. Lazarakia, M. Komaitis, K. Kaselimis, *Food Chem.* 84 (2004) 463.
- [47] J.R. Park, D.S. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* 24 (2003) 527.
- [48] M. Tsimidou, R. Macrae, I. Wilson, *Food Chem.* 25 (1987) 227.
- [49] M. Tsimidou, R. Macrae, I. Wilson, *Food Chem.* 25 (1987) 251.
- [50] L. Cerretani, A. Bendini, A. del Caro, A. Piga, V. Vacca, M. F. Caboni, T.G. Toschi, *Eur. Food Res. Technol.* 222 (2006) 354.
- [51] O. Baccouri, L. Cerretani, A. Bendini, M. F. Caboni, M. Zarrouk, L. Pirrone, D. D. Ben Miled, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109 (2007) 1208.
- [52] M. Lisa, M. Holcapek, M. Bohac, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 6888.
- [53] M. Fasciotti, A. D. Pereira Netto, *Talanta* 81 (2010) 1116.
- [54] Y. Ouni, G. Flamini, N. Ben Youssef, M. Guerfel, M. Zarrouk, *Intern. J. Food Sci. Technol.* 46 (2011) 1747.
- [55] E. Stefanoudaki, F. Kotsifaki, A. Koutsaftakis, *Food Chem.* 60 (1997) 425.
- [56] J. Parcerisa, I. Casals, J. Botella, R. Codony, M. Rafecas, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 149.
- [57] A. Ranalli, L. Pollastri, S. Contento, G. di Loreto, E. Iannucci, L. Lucera, F. Russi, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3775.
- [58] M. A. Brescia, G. Alviti, V. Liuzzi, A. Sacco, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80 (2003) 945.
- [59] E. Osorio Bueno, J.J. Sánchez Casas, M. Martínez Cano, A.M. Montaña García, *Grasas Aceites* 54 (2003) 1.
- [60] D. Ollivier, J. Artaud, C. Pinatel, J.P. Durbec, M. Guérère, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 5723.
- [61] D. Ollivier, J. Artaud, C. Pinatel, J.P. Durbec, M. Guérère, *Food Chem.* 97 (2006) 382.
- [62] M.J. Lerma García, R. Lusardi, E. Chiavaro, L. Cerretani, A. Bendini, G. Ramis Ramos, E.F. Simó Alfonso, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7521.
- [63] F. Aranda, S. Gómez Alonso, R.M. Rivera del Álamo, M.D. Salvador, G. Fregapane, *Food Chem.* 86 (2004) 485.

- [64] K. Nagy, D. Bongiorno, G. Avellone, P. Agozzino, L. Ceraulo, K. Vekey, J. Chromatogr. A 1078 (2005) 90.
- [65] T. Galeano Díaz, I. Duran Meras, J. Sánchez Casas, M. F. Alexandre Franco, Food Control 16 (2005) 339.
- [66] V.B. de Caraffa, C. Gambotti, J. Giannettini, J. Maury, L. Berti, G. Gandemer, Eur. J. LipidSci. Technol. 110 (2008) 40.
- [67] A. López López, F. Rodríguez Gómez, A. Cortés Delgado, A. Montañó, A. Garrido Fernández, J. Agric. FoodChem. 57 (2009) 8973.
- [68] P. de la Mata Espinosa, J.M. Bosque Sendra, R. Bro, L. Cuadros Rodríguez, Anal. Bioanal. Chem. 399 (2011) 2083.
- [69] P. de la Mata Espinosa, J.M. Bosque Sendra, R. Bro, L. Cuadros Rodríguez, Talanta 85 (2011) 177.
- [70] T. Řezanka, H. Řezanková, Anal. Chim. Acta 398 (1999) 253.
- [71] S.C. Cunha, M.B.P.P. Oliveira, Food Chem. 95 (2006) 518.
- [72] B. Butinar, M. Bucar Miklavcic, V. Valencic, P. Raspor, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 5227.
- [73] Y.W. Park, M.K. Jeong, C. Park, J. Lee, J. Am. Oil Chem. Soc. 88 (2011) 373.
- [74] Y.X. Zeng, P. Araujo, Z.Y. Du, T.T. Nguyen, L. Frøyland, B. Grung, Talanta 82 (2010) 1261.
- [75] Y. X. Zeng, P. Araujo, B. Grung, L.X. Zhang, Analyst 136 (2011) 1507.
- [76] D.S. Lee, E.S. Lee, H. J. Kim, S.O. Kim, K. Kim, Anal. Chim. Acta 429 (2001) 321.
- [77] J.S. Amaral, S.C. Cunha, M. RuiAlves, J.A. Pereira, R.M. Seabra, B.P.P. Oliveira, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 7964.
- [78] J.C.M. Barreira, S. Casal, I.C.F.R. Ferreira, M.B.P.P. Oliveira, J.A. Pereira, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 2836.
- [79] J.M.N. Marikkar, H.M. Ghazali, Y.B. Che Man, T.S.G. Peiris, O.M. Lai, Food Chem. 91 (2005) 5.
- [80] M.L. Martín Carratala, C. Llorens Jorda, V. Berenguer Navarro, N. Grane Teruel, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 3688.
- [81] M.S. Prats Moya, N. Grane Teruel, V. Berenguer Navarro, M.L. Martín Carratala, J. Am. Oil Chem. Soc. 76 (1999) 267.
- [82] M. Lipp, Food Chem. 55 (1996), 389.
- [83] R. Gutiérrez Tolentino, S.V. León, G. Diaz González, H.J. Delgadillo Gutiérrez, G. Urban Carrillo, A. Ramírez Ayala, C. González Cabrera, I. Méndez Ramírez, Agrociencia 41 (2007) 733.
- [84] R. Gutiérrez, S. Vega, G. Díaz, J. Sánchez, M. Coronado, A. Ramírez, J. Pérez, M. González, B. Schettino, J. DairySci. 92 (2009) 1846.
- [85] L. Cossignani, F. Blasi, A. Bosi, G. D'Arco, S. Maurelli, M.S. Simonetti, P. Damiani, J. DairyRes. 78 (2011) 335.
- [86] E. Anklam, M. Lipp, B. Wagner, Lipid / Fett 98 (1996) 55.

CAPÍTULO IV

- [87] F. Guyon, S. Destouesse, J. Moustirats, M. Esclapez, M.H. Salagoity, B. Medina, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2770.
- [88] M. Buchgraber, F. Ulberth, E. Anklam, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3855.
- [89] M. Buchgraber, S. Androni, E. Anklam, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3284.
- [90] A.G. González, F. Pablos, M.J. Martín, M. León Camacho, M.S. Valdenebro, *FoodChem.* 73 (2001) 93.
- [91] E. Kofroňová, J. Cvačka, V. Vrkoslava, R. Hanusa, P. Jiroša, J. Kindl, O. Hovorka, I. Valterová. *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 3878.

5. Artículo N° 8

"Cuantificación de mezclas de aceite de oliva y aceites vegetales mediante la huella cromatográfica de triglicéridos y herramientas quimiométricas"

Publicado en: Journal of Chromatography B (2012)

Doi: 10.1016/j.jchromb.2012.01.026



Abstract

A reliable procedure for the identification and quantification of the adulteration of olive oils in terms of blending with other vegetable oils (sunflower, corn, seeds, sesame and soya) has been developed. From the analytical viewpoint, the whole procedure relies only on the results of the determination of the triacylglycerol profile of the oils by high temperature gas chromatography–mass spectrometry. The chromatographic profiles were pre-treated (baseline correction, peak alignment using iCoshift algorithm and mean centering) before building the models. At first, a class-modeling approach, Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) was used to identify the vegetable oil used blending. Successively, a separate calibration model for each kind of blending was built using Partial Least Square (PLS). The correlation coefficients of actual versus predicted concentrations resulting from multivariate calibration models were between 0.95 and 0.99. In addition, Genetic algorithms (GA-PLS), were used, as variable selection method, to improve the models which yielded R² values higher than 0.90 for calibration set. This model had a better predictive ability than the PLS without feature selection. The results obtained showed the potential of this method and allowed quantification of blends of olive oil in the vegetable oils tested containing at least 10% of olive oil.

Keywords: Olive oil Vegetable oil Blends Genetic algorithm PLS GC–MS

1. Introduction

Edible vegetable oils are a valuable component of a fully mature seed. They are mainly the mixtures of triacylglycerols (TAGs), with different concentration levels. The remaining nonglyceridic fraction consists of different compound classes such as hydrocarbons, tocopherols, phytosterols and sterol esters [1]. The vegetable seed or fruit from which the oil is extracted determine most of its characteristics and composition that also depends on several factors such as soil, climate, processing, harvesting and chemical process occurring during storage [2].

Among edible oils, olive oil (OO) shows important and outstanding characteristics due to its differentiated sensorial qualities (taste and flavor) and higher nutritional value which have been acknowledged internationally. Several health benefits associated with its consumption were initially observed among Mediterranean people and its dietary consumption is nowadays considered to provide many benefits to human health [3].

TAGs represent up to 95–98% (weight to weight - w/w) of vegetable oil composition and show a characteristic distribution. As a consequence, the addition of other edible vegetable oils to olive oils modifies TAG distribution and because of that, they are considered to be good fingerprints for adulteration detection purposes [4].

Companies have been taking advantage of selling OO blends at the same price as pure OO, obtaining important economic benefits. The adulterants used in blends are the ones with similar physical and chemical properties and usually they are cheaper and easy to obtain. In the case of OO this usually implies the dilution with less expensive oils or other inferior quality olive oils [5,6]. Moreover, a lot of methods and limits were introduced into the International Olive Oil Council (IOOC) trade standard, into EC Regulation 2568/91 and into the Codex Alimentarius Standard for controlling product authenticity and quality. In addition, in the EU, requirements have being established in Regulation (EC) No.

29/2012, concerning commercialization and labeling of products which contain olive oil, blends of olive and other edible vegetable oils. The presence of olive oil higher than 50% has to be indicated on the label, but if the percentage is lower than 50% the name of olive oil cannot be used in the label [7].

However, the reasons for mixing olive oil with others are not only economical, but also nutritional. It is clear from the composition of vegetable oils, that no single oil, even olive oil, meet all the oil nutritional requirements of essential fatty acids and vitamins [8].

The interest of researchers in the authentication of vegetable oils has led to an improvement in the control of adulteration and to the development of analytical methods to establish compositional differences in olive oils blends [9]. An extensive literature, discussing the suitability of a wide assortment of analytical methods aimed at evaluating the authenticity and the presence of adulterants in OO, has been published [10,11]. When such methods are applied in conjunction of chemometric tools, spectroscopic analytical techniques as NIR, MIR, Raman, NMR or MS, and sensor-based analytical techniques as electronic nose, have been frequently used. This techniques share as common feature that yield low selective instrumental signals (instrumental fingerprints) which are very suitable for developing valid chemometric models for pattern recognition. However, there are not many studies about vegetable oils authentication, which use directly the raw analytical signal which come from the chromatographic instrument (chromatographic fingerprint) with multivariate statistical methods [12,13]. In most cases, the chromatographic applications use derived information from the raw analytical signal provided by the instrument, such as peak areas or concentration profiles for the classification of edible vegetable oils and detection of their adulterations. Chemometric tools have been commonly applied for matching and discrimination, classification and prediction in assessing authenticity of vegetable oils [14,15,16]. Thus, GC and LC methods in combination with multivariate statistical techniques such as principal component analysis (PCA), discriminant analysis (DA), cluster

analysis (CA), K-nearest neighbour, genetic algorithm (GA), partial least squares (PLS)[17] and artificial neural networks (ANN) have been applied successfully to classify and discriminate the oils [18,19].

The official method of the International Olive Council (IOC) is based on the use of the reverse phase-liquid chromatography with a refractive index detector (HPLC-RID), to establish the difference between actual and theoretical content of TAGs with Equivalent Carbon Number 42 (ECN42)[20]. In the literature, the contribution in chromatography to the authentication of vegetable oils by quantifying different major and minor compounds have been reviewed by Aparicio and Aparicio-Ruiz [21]. Detection of adulterated oils based on TAG compositions by high temperature gas chromatography (HT)-GC was studied previously by Park and Lee [1].

This study focuses on the quantification of olive oil in blends with vegetable oils using multivariate calibration. The TAGs profiles, measured by HTGC-MS systems, have been applied for the quantification of olive oils in blends with vegetable oils (sunflower, corn, seeds, sesame and soya) and considering the different categories of olive oil (extra virgin olive oil, virgin, olive oil and pomace) and varieties (picual, hojiblanca and arbequina) at several percentages (10–90%). Multivariate statistical analyses, such as SIMCA, PLS and GA-PLS were applied to achieve this purpose.

2. Materials and methods

2.1. Samples

The olive oil samples, to build the blends, were fourteen, including four categories [22]: extra virgin (EVOO), virgin (VOO), olive oil (OO, blend of virgin and refined) and pomace oil (POO), and three Spanish olive fruit varieties named "arbequina" (ARB), "hojiblanca" (HOJ) and "picual" (PIC).

In addition, eleven vegetable oils samples were used: two sunflowers oils (SUN), one high-oleic sunflower oil (OSUN), two corn oils (COR), one sesame oil (SES), three soya oils (SOY), and two vegetable seeds oils (SEE), where the label did not specified what kind of seeds were used.

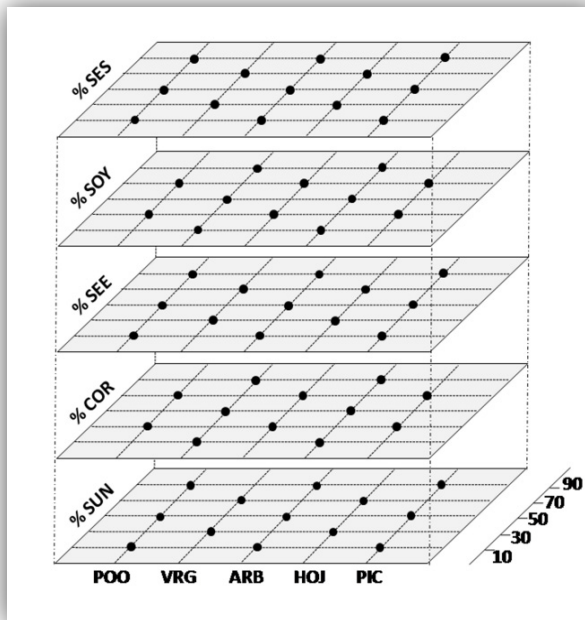


Fig. 1. Calibration Building Blocks with the percentage of each kind of olive oil and each vegetable oil in the blends for the training set (Note: acronym VRG includes the three categories, extra virgin (EVOO), virgin (VOO) and olive oil (OO), which is a blend of virgin and refined olive oil.).

All the vegetable oils samples were purchased in Spain and France and were stored in dark bottles, at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until their analysis. A pure sample of each edible vegetable oil was also analyzed. Seventy-eight blend samples were prepared by mixing one olive oil with one vegetable oil in different percentages obtaining five different levels of concentration from 10 to 90% (w/w).

The prepared blends were used as calibration or prediction samples, as needed and they covered all the possible combinations of vegetable oils with the different categories and varieties of olive oils. *The Calibration Building Block*, for the training set of samples, is shown in Fig. 1. This methodology of preparation was followed in order to cover all the possibilities of blending and to avoid any lack of information. Table 1 shows, more specifically, the composition of each blend which were used as calibration set.

For analysis, olive oil was dissolved in chloroform (99%, reagent grade) to a final concentration of 0.2% (w/w). The diluted olive oil sample was directly injected into the system, without any preliminary chemical derivatization or purification step prior to chromatographic analysis.

2.2. Chromatographic conditions

All separations were performed with a VARIAN GC 3800 gas chromatograph (PA, USA) equipped with a split/splitless injector coupled to a VARIAN 4000 ion trap mass spectrometer (PA, USA) equipped with an electron impact source. A split injection with a ratio of 1:50 was used. The samples were introduced using a robotized autosampler module (Combipal, CTC ANALYTICS, Switzerland). Scan control, data acquisition, and processing were performed by a MS Workstation software (VARIAN, PA, USA) data system. The sample volume injected was 2 μ L.

A capillary column coated with 65% diphenyl-35% dimethyl polysiloxane stationary phase (Restek Rtx-65TG; 30 m \times 0.32 mm i.d. \times 0.1 μ m; maximum temperature 370 $^{\circ}$ C; Restek Corp., Bellefonte, PA, USA) was used.

Table 1. Percentage of the olive oil and vegetable oil in the oil blend samples for the calibration set.

Sample	Composition	Sample	Composition
1	POO 10% + SUN 90%	32	ARB 90%+ SEE 10%
2	POO 50% + SUN 50%	33	HOJ 30%+ SEE 70%
3	POO 90% + SUN 10%	34	HOJ 70%+ SEE 30%
4	EVOO 30%+ SUN 70%	35	PIC 10% + SEE 90%
5	ARB 50%+ SUN 50%	36	PIC 50%+ SEE 50%
6	ARB 90%+ SUN 10%	37	PIC 90%+ SEE 10%
7	HOJ 30%+ SUN 70%	38	POO 10% + SES 90%
8	HOJ 70%+ SUN 30%	39	POO 50% + SES 50%
9	PIC 10% + SUN 90%	40	POO 90% + SES 10%
10	PIC 50%+ SUN 50%	41	EVOO 30%+ SES 70%
11	PIC 90%+ SUN 10%	42	VOO 70%+ SES 30%
12	EVOO 70%+ SUN 30%	43	ARB 10% + SES 90%
13	POO 30% + COR 70%	44	ARB 50%+ SES 50%
14	POO 70% + COR 30%	45	ARB 90%+ SES 10%
15	EVOO 10%+ COR 90%	46	HOJ 30%+ SES 70%
16	VOO 50%+ COR 50%	47	HOJ 70%+ SES 30%
17	EVOO 90%+ COR 10%	48	PIC 10% + SES 90%
18	ARB 30%+ COR 70%	49	PIC 50%+ SES 50%
19	ARB 70%+ COR 30%	50	PIC 90%+ SES 10%
20	HOJ 10% + COR 90%	51	POO 30% + SOY 70%
21	HOJ 50%+ COR 50%	52	POO 70% + SOY 30%
22	HOJ 90%+ COR 10%	53	EVOO 10%+ SOY 90%
23	PIC 30%+ COR 70%	54	VOO 50%+ SOY 50%
24	PIC 70%+ COR 30%	55	EVOO 90%+ SOY 10%
25	POO 10% + SEE 90%	56	ARB 30%+ SOY 70%
26	POO 50% + SEE 50%	57	ARB 70%+ SOY 30%
27	POO90% + SEE 10%	58	HOJ 10% + SOY 90%
28	VOO 30%+ SEE 70%	59	HOJ 50%+ SOY 50%
29	EVOO 70%+ SEE 30%	60	HOJ 90%+ SOY 10%
30	ARB 10% + SEE 90%	61	PIC 30%+ SOY 70%
31	ARB 50%+ SEE 50%	62	PIC 70%+ SOY 30%

The GC oven temperature was programmed from 315 to 350 °C at 1 °C/min. The injection port was held isothermally at 370 °C. Helium (99.995%) was used as the carrier gas and its flow rate was 1.5 mL/min. The mass spectrometric conditions were as follows. The ion source temperature was held at 250 °C during the GC/MS runs [23].

The transfer-line temperature was maintained at 350 °C throughout the analyses. The electron energy was 70 eV and the emission current 10 μ A. Chromatograms were recorded in full-scan mode. Average spectra were acquired in the m/z range of 200–1000 m/z and were recorded at a scan speed of 1.20 s. Scan control, data acquisition, and processing were performed by a MS Workstation software (VARIAN, PA, USA) data system.

2.3. Chemometrics

The analytical data were arranged in two matrixes to perform the statistical analysis. The calibration data set (62 samples) was made of as many rows as samples analysed and as many columns (1724 elements) as the entire chromatogram data points recorded during the acquisition time. Obviously, the signal maxima are the heights from the different chromatographic peaks. The validation set was composed of 16 samples.

All chemometric treatments were performed by using the PLS Toolbox (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA), for Matlab® software (Mathworks Inc., Natick, MA, USA).

2.3.1. Pre-processing of the data

Preprocessing is, in general, the ensemble of mathematical treatments performed on the data before the model building step. Aim of preprocessing is to make the data suitable for statistical analysis, by removing the extraneous sources of variation (variance) which are not related to the information sought. These sources of variance can increase the difficulty in modeling. Interfering variance appears in almost all real

data because of systematic errors present in experiments. This unwanted variance will require the model to work harder to isolate the variance of interest from the interfering one. Because of this the whole data set of samples was preprocessed before building any model [24].

First of all, a baseline correction algorithm (Penalized Asymmetric Least Squares) was applied for automatically removing baseline contributions from the data. It subtracts a baseline from a chromatogram (or a signal in general) using an iterative asymmetric least squares procedure. Points with residuals <0 are up-weighted at each iteration of the least squares fitting. This results in a robust "non-negative" residual fit when residuals of significant amplitude (e.g. signals on a background) are present [25]. Secondly, after baseline correction, peak shifting was corrected with interval correlation optimized shifting, *icoshift* [26], which splits the chromatogram into intervals and "coshifts" each vector to get the maximum correlation toward a target signal in that interval (when no reference chromatogram is available, average or maximum signals can be used).

Finally, the chromatograms were mean centered by subtracting from each signal the mean chromatogram, in order to remove the variability related to this overall offset term.

2.3.2. Soft Independent Modeling of Class Analogies (SIMCA)

Firstly, a class-modeling approach using SIMCA was applied to identify the nature of blending. In class-modeling, a separate model space is built for each of the investigated categories: samples falling within the model space are accepted by that category, while samples falling outside are considered as outliers for the specific class [27]. In particular, SIMCA describes the similarities among the samples of a category using a principal component approach, so that the distance from the class models is a combination of the distance within the PC space (T^2 or leverage) and the residuals (Q). Accordingly, class space is defined by imposing a threshold to this distance value: samples for which the distance to the model is less than the threshold are accepted, while others are rejected as

outliers. The optimal number of PC for each category has to be optimized during the calibration phase. In this study, a separate model for each category of blend (different categories and varieties of olive oils with SUN, COR, SEE, SES and SOY) was built.

2.3.3. Partial Least Square (PLS)

Once the nature of blending was established by SIMCA classification, quantification of the percentage of OO was carried out by building separate calibration models for each kind of blending. PLS was used to build the regression models relating the chromatographic profiles to the quantity of OO. PLS is a well-known bilinear multivariate method for building regression models when the number of variables exceeds the number of samples and/or when the variables themselves are highly correlated. PLS modeling includes the dependent and independent variables in the data compression and decomposition operations, i.e. both y and x data are actively used in the data analysis. In particular, data points are projected onto a subspace whose axes have maximum covariance with the dependent vector. The optimum dimensionality of this subspace, i.e. the optimum number of latent vectors used to describe the data should be selected during the training phase: choice of the proper dimensionality is crucial as including too few components can result in poor modeling ability while overfitting can occur when too many latent vectors are retained. Because the model has to be used for the prediction of new samples, all possible sources of variation that can be encountered later should be included in the training set. Usually, a second independent set of samples (validation or test set) has to be used to check the generalization ability of the optimized model and to compute an error score for prediction.

In order to predict the percentage of the different OOs in the blends with other vegetable oils, a specific PLS model was prepared for each class of vegetable oil. Due to the limited amount of training samples, the optimal complexity of the PLS models was chosen on the basis of the minimum error in leave-one-out cross validation, a procedure where each

sample is in turn removed from the calibration set, the model is constructed using the remaining $n-1$ samples and used to predict the y value for the sample left out. This process is repeated n times, until each one of n calibration samples has been left out once. In a successive stage, a PLS model for all the blends together was built for the sake of comparison. In this case, selection of the optimal complexity was made based on a seven-fold cross-validation procedure: training data were divided into 7 cancellation groups and in turn each of them was used as internal validation set. All models were also externally validated with a set of 16 samples which were not used to build the calibration model.

2.3.4. Variable selection: genetic algorithm (GA)

The selection of variables for multivariate calibration can be considered an optimization problem. GA is an optimization method based on the principles of genetics and natural selection in the theory of evolution. The algorithm starts with a randomly selected population. Each individual of the population, represented by a chromosome of binary values, represents a subset of descriptors. The number of the genes at each chromosome is equal to the number of the descriptors. A gene is given the value of one, if its corresponding descriptor is included in the subset; otherwise, it is given the value of zero. Each chromosome is evaluated for its performance through an objective function called fitness function. A high fitness value of a chromosome corresponds to a higher chance to be selected for the next generation. Then the genetic information is exchanged between chromosomes by crossover and perturbed by mutation. The result is a new generation with better fitness. This process is repeated until the stopping criterion is reached [28].

GA-PLS is a sophisticated hybrid approach that combines GA as a powerful multivariate variable selection with PLS as calibration method [29]. In GA-PLS, the chromosome is corresponding to a set of variables, to be used as inputs for the PLS regression model. The coupling of GA with PLS has been successfully applied to many spectral data sets and have been shown to provide better results than full-spectrum approaches [30].

GA-PLS analysis has been carried out using Leardi's Genetic Algorithm Toolbox freely available on Internet [31]. The GA-PLS approach was adopted both for the vegetable oil-specific calibration and for building a regression model for all the blends together.

3. Results and discussion

Fig. 2 shows the baseline corrected chromatograms of the whole data set before and after icoshift. By inspecting the figure, one can see the large difference between the two plots and how the peak shifting was perfectly corrected with this algorithm. In a first stage, icoshift was applied separately to the different kinds of blends and successively to the whole data set with all the samples of blends together.

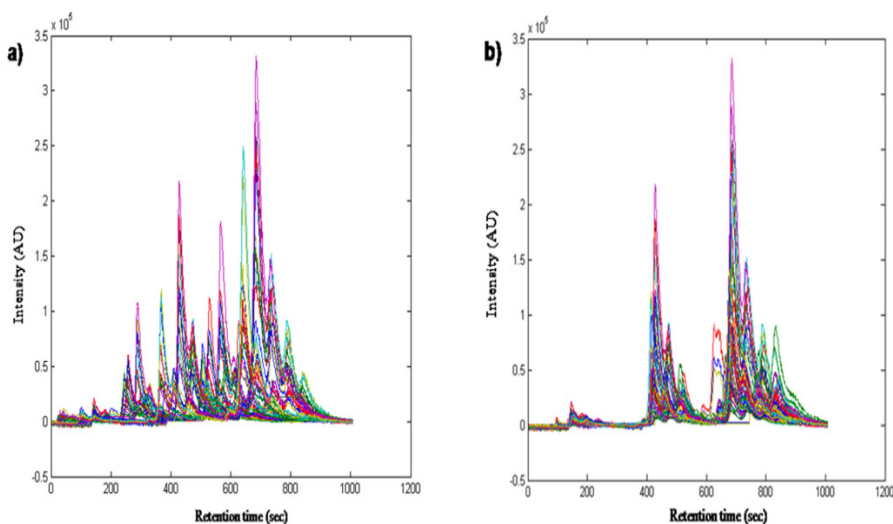


Fig. 2. GC-MS chromatograms of vegetable oil blends samples (all type of oils analyzed in the study) before peak shifting pretreatment (iCoshift) (a) and after (b).

The first 500 data points of each chromatogram were eliminated due to the lack of information. As described in the previous section, identification and quantification of the oil blends was carried out in two successive stages: at first, a classification approach was used to identify the vegetable oil used for blending and then separate calibration models were built for each of the different blends. In particular, classification of the oil samples according to vegetable oil used for blending was carried out using a modeling approach based on the SIMCA algorithm. Accordingly, 5 independent models, one for each of the investigated categories (OO blending with SUN, COR, SEE, SES and SOY) were built on mean centered data. Leave-one-out cross-validation was used to assess the model complexity and 2 principal components were selected for all the category models, corresponding to an explained variance of more than 94.5% for each class.

It must be stressed that none of the training samples was identified as outlying for all the category models. Moreover, all samples are nearest to their respective class, so there was no misclassification either in modeling or in cross-validation. When considering the other figures of merit, it was observed that sensitivity (percentage of samples from the modeled category that are accepted by the class model) and the specificity (the percentage of samples from other categories which are rejected by the class model) [27] were both 100% for all the five classes.

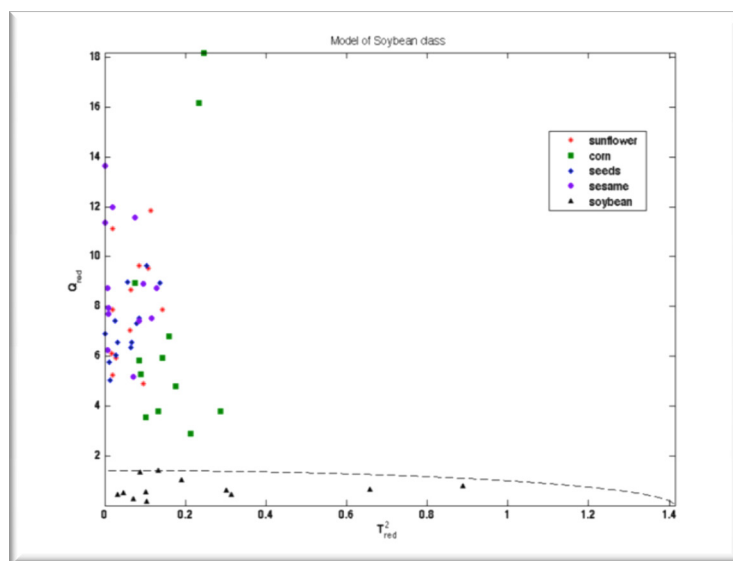


Fig. 3. SIMCA modeling. Projection of the samples (cross-validation results) onto the T^2/Q model space of soybean category.

These results can be observed in Fig. 3, where the projection of the samples onto the model of soybean category (chosen as example) is reported. It can be observed that all the samples belonging to the modeled class (in this case, soybean) lie within the model space delimited by the threshold, while all the samples from other origins are recognized as outlier by the category model, so that sensitivity and specificity are 100%, as already mentioned.

The next step, in order to quantify the percentage of OO in the blends, was to build separate multivariate calibration models by the PLS algorithm, using the chromatographic data of the training set in order to observe how each class behaved.

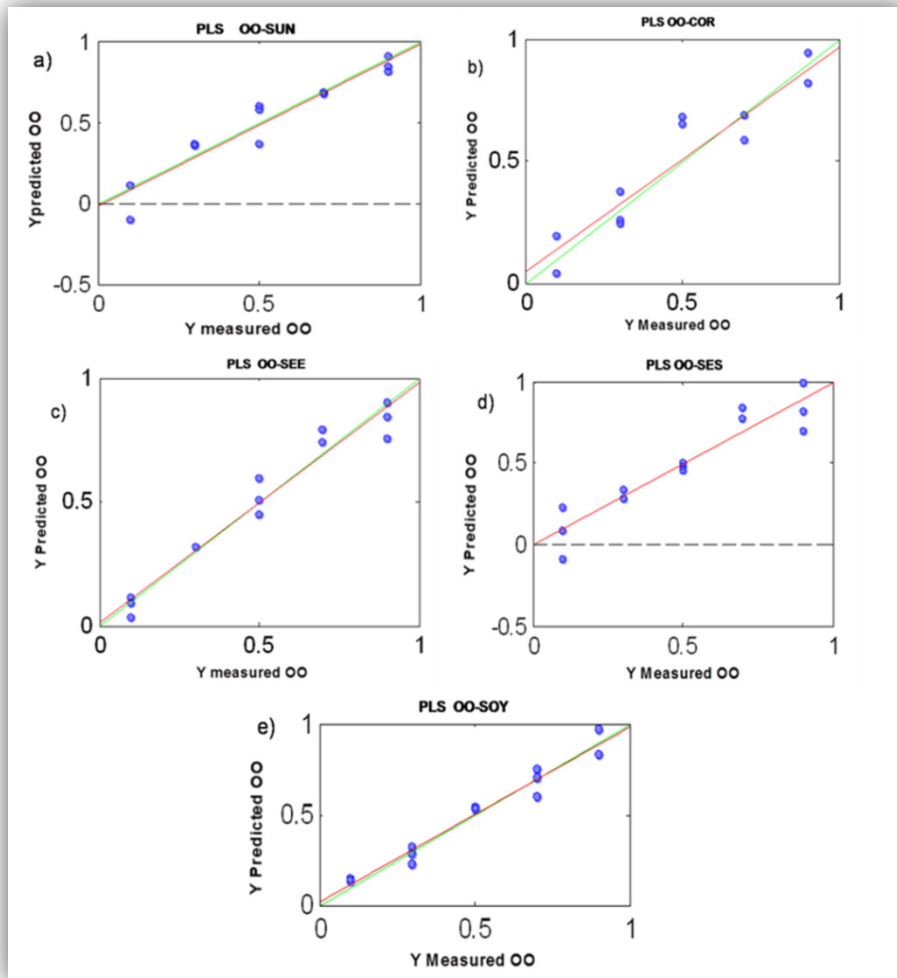


Fig. 4. Predicted percentage of olive oil in the different vegetable oil blends (a) olive oil-sunflower olive oil, (b) olive oil-corn oil, (c) olive oil-seed oil, (d) olive oil-sesame oil and (e) olive oil-soya oil. See Fig. 1 for more detail of composition. See Table 1 for the calibration parameters of the models.

Because of this, a specific PLS model was prepared for each kind of blend of vegetable oil (olive oil-sunflower olive oil, olive oil-corn oil, olive oil-seed oil, olive oil-sesame oil and olive oil-soya oil). The

CAPÍTULO IV

performance of models was evaluated in terms of the root mean squared error of calibration/prediction (RMSEC/P) and of the determination coefficient R^2 . Leave-one-out cross validation was used to choose the optimal model complexity.

Fig. 4 shows the plot of predicted versus actual concentrations of olive oil in the vegetable oil blends. Mean centering chromatographic pretreatment was used in all the calibration models. These models were built previously for each vegetable oil blend in order to see the behaviour of each model by itself. Table 2 shows the statistical results obtained for the calibration step, including statistical parameters such as PLS factors, RMSECV and R^2 .

Table 2. Calibration parameters and statistical data of the PLS calibration models for the individual classes.

	LVs	R^2	RMSEC	RMSECV	CV Bias
OO-SUN	6	0.999478	0.00641991	0.0895547	-0.0149237
OO-COR	2	0.955166	0.0573394	0.0960388	0.00643143
OO-SEE	6	0.999075	0.00892755	0.0625305	-0.00335554
OO-SES	6	0.998651	0.0107803	0.103153	-0.00644528
OO-SOY	2	0.980184	0.0381209	0.0529116	0.00185313

As it is shown, the correlation coefficients of actual versus predicted concentrations resulting from multivariate calibration models for the different oils were between 0.95 and 0.99. The model of the blend of olive oil and sunflower oil had the highest R^2 (0.9995) and all of them have a RMSECV < 0.1 ; the model of olive oil and corn oil had the lowest R^2 (0.9552). According to these criteria all types of vegetable oils could be quantified with excellent results. The optimum number of factors was selected in order to avoid overfitting when using PLS.

In order to evaluate the performances of the proposed approach, involving a first classification of unknown samples and later the

application of the PLS model built on the samples of the nearest class, a further external validation stage was carried out. For this purpose, 16 test samples consisting in blends of olive oil with 4 of the 5 analyzed vegetable oils (sunflower, corn, seeds and soybean) in different proportions, were processed by SIMCA and PLS. SIMCA model was able to correct assign all the validation samples to the class corresponding to their true origin. Then, for each sample, the PLS model corresponding to its predicted category was used for quantification and an RMSEP lower than 0.1 was obtained, thus confirming the validity of the proposed approach also for external samples.

However, there can be cases -for instance when blends are produced mixing EVO with more than one kind of other vegetable oils, or when an oil from a category not considered in this study is used - where a sample is recognized as outlier by all the class models in the preliminary SIMCA step. In those cases, none of the individual PLS models could be perfectly suitable for quantifying the blending ratio, or in general assessing EVO purity.

To overcome these drawbacks, based on the promising results of the modeling performed on each category separately, in a further stage the possibility of building an overall model, able to quantify the percentage of EVO in the samples, irrespectively of the kind of oil used for blending, was studied. Accordingly, a calibration set was built on all the 62 training samples and therefore including a wider variability (four categories of olive oil, EVOO, VO, OO and pomace, from three varieties of olive fruit, arbequina, picual and hojiblanca and five different vegetable oils sunflower, corn, seed, sesame and soya oil). The calibration set for the quantification of OO was constituted of 62 samples, including mixtures containing 10%, 30%, 50%, 70% and 90% of olive oil in the different vegetable oils tested. The optimal complexity of the model was assessed by sevenfold cross-validation. Successively, in order to evaluate the predictive ability of the model on unknown samples, it was applied to an external test set composed of 16 samples which were not employed in the calibration phase. This validation data set was also baseline corrected and

aligned. Validation results were evaluated in terms of root-mean-squared error of prediction (RMSEP) and R^2 .

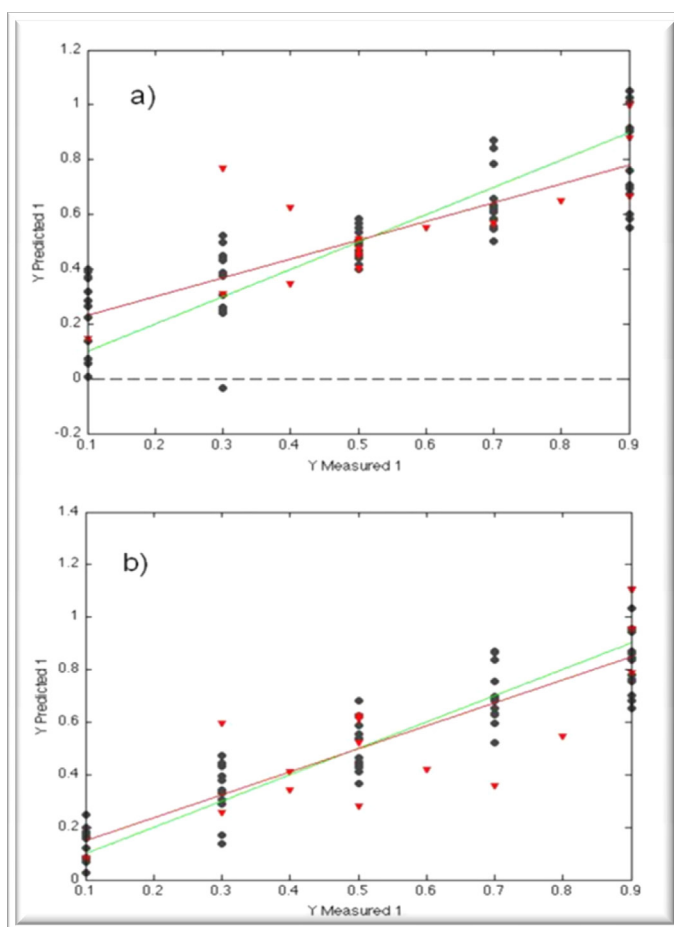


Fig. 5. PLS model using all the blends of oils together as well as external validation (●, training set; ▼, validation set). (a) All the chromatographic data were used to build the model. (b) Variable selection was applied with genetic algorithm.

In order to check whether it was possible to obtain accurate result with a reduced set of variables, a GA-PLS was adopted on the same set of samples. As the number of original variables (i.e. all the data points in the chromatogram) exceeded 1000, GA was applied in two stages in order to

avoid overfitting, at first considering the mean of 5 adjacent points and then on the intervals selected in the previous stage. Eventually, 18 variables were selected as input for the final PLS model (in this case autoscaling was chosen as pretreatment).

Fig. 5 compares the PLS model without variable reduction (a) with the GA-PLS model (b), where the genetic algorithms approach was used to reduce the big amount of variables. The results obtained in terms of calibration and prediction abilities for both models are summarized in Table 3. As it is shown, reduction in the number of variables does not lead to a significant worsening of the modeling and predictive ability. Alternatively, on one hand the complexity of the models in terms of the number of latent variables remains the same (2 LVs), on the other, the error in modeling and cross-validation is significantly lowered (0.1046 and 0.1139, respectively, with GAPLS versus 0.1562 and 0.1642 without variable reduction), while the RMSE in prediction is only slightly worse (0.1737 versus 0.1675).

Table 3. Calibration and prediction parameters of the PLS model for all the olive oil and vegetable oil blends.

	LVs	R ²	RMSEC	RMSECV	RMSEP	CV Bias	PredBias
PLS	2	0.695	0.1562	0.1642	0.1675	0.0014	-0.0114
GA-PLS	2	0.863	0.1046	0.1139	0.1737	0.0012	-0.0129

As a result, variable reduction results in a model having a lower complexity in terms of retained experimental variables and comparable predictive ability.

In conclusion the high temperature gas chromatographic proposed method and the chemometric class-modeling techniques such SIMCA and quantification techniques PLS and GA-PLS with feature selection, appear to be appropriate tools to verify the percentage of olive oil in blends with vegetable oils and could become an important instrument to verify the

CAPÍTULO IV

labeling compliance and for quality control in the detection of adulterations. Indeed, the reliability of the proposed qualification model is very high as the kind of vegetable oils used for blending was correctly identified for all samples. Moreover, reliable quantification models were built for each of the different kinds of blending. Lastly, when the possibility of quantifying the purity of oil samples irrespectively of the adulterating vegetable oil, promising results were obtained by applying PLS (on the entire chromatogram or with GA variable selection) to the whole data set without preliminary classification of the oils. Thus, this study is especially interesting since olive oils are frequently adulterated with other vegetable oils.

Acknowledgments

The authors would like to thank to the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Project P07-FQN-02667, and Consejería de Agricultura y Pesca) for financial assistance. This work has also been partially supported by European Regional Development Funds (ERDF). The authors are grateful to the Andalusia Regional Government (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa) for the personal postgraduate grant awarded to CRS.

References

- [1] J.R. Park, D. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* 24 (4) (2003) 527.
- [2] J.M. Dyer, S. Stymne, A.G. Green, A.S. Carlsson, *Plant J.* 54 (2008) 640.
- [3] F. Angerosa, C. Campestre, L. Glasante, in: D. Boskou (Ed.), *Olive Oil, Chemistry and Technology*, 2nd ed., AOCS Press, Champaign, IL, 2006, p. 113.
- [4] R. Aparicio, R. Aparicio-Ruiz, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 93.
- [5] A.K. Kiritsakis, K. Kanavouras, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104 (2002) 628.
- [6] A. Cert, W. Moreda, M.C. Pérez-Camino, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 131.
- [7] Commission Regulation (EC) No. 29/2012, on marketing standards for olive oil, *Off. J. Eur. Commun.* L12 (2012) 14.
- [8] N. Darmon, M. Darmon, E. Ferguson, *J. Hum. Nutr. Diet.* 19 (2006) 59.
- [9] E. Christopoulou, M. Lazaraki, M. Komaitis, K. Kaselimis, *Food Chem.* 84 (2004) 463.
- [10] I.S. Arvanitoyannis, A. Vlachos, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47 (2007) 441.
- [11] E.N. Frankel, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5991.

- [12] C. Ruiz-Samblás, L. Cuadros Rodríguez, A. González Casado, F.P. Rodríguez García, P. de la Mata Espinosa, J.M. Bosque Sendra, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2093.
- [13] P. de la Mata Espinosa, J.M. Bosque Sendra, R. Bro, L. Cuadros Rodríguez, *Talanta* 85 (2011) 177.
- [14] V.G. Dourtoglou, Th. Dourtoglou, A. Antonopoulos, E. Stefanou, S. Lalas, C. Poulos, *J. AOCS* 80 (3) (2003) 203.
- [15] D. Brodnjak-Voncina, Z.C. Kodbab, M. Novic, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 75 (2005) 31.
- [16] F. Peña, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcarcel, *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 215.
- [17] R.M. Maggio, L. Cerretani, E. Chiavaro, T.S. Kaufman, A. Bendini, *Food Control* 21 (2010) 890.
- [18] F. Priego Capote, J. Ruiz Jiménez, M.D. Luque de Castro, *Anal Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1859.
- [19] B. Öztürk, A. Yalcyn, D. Özdemir, *J. Near Infrared Spectrosc.* 18 (2010) 191.
- [20] International Olive Council, Madrid (COI/T.20/Doc. No 20/Rev. 2), 2008.
- [21] R. Aparicio, R. Aparicio-Ruiz, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 93.
- [22] European Community, Commission Regulation No. 1513/2001 amending Regulations No. 136/66/EEC and No. 1638/98 as regards the extension of the period of validity of the aid scheme and the quality strategy for olive oil. *Off. J. Eur. Commun.*, L201/4.
- [23] C. Ruiz-Samblás, A. González-Casado, L. Cuadros-Rodríguez, et al., *Talanta* 82 (2010) 255.
- [24] B.M. Wise, N.B. Gallagher, R. Bro, J.M. Shaver, W. Windig, R.S. Koch, *PLS Toolbox 4. 0 Manual for use with MATLAB™*, Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, WA, USA, 2006.
- [25] D.L. Massart, B.G.M. Vaneginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J.J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [26] F. Savorani, G. Tomasi, S.B. Engelsen, *J. Magn. Reson.* 202 (2010) 190.
- [27] F. Marini, A.L. Magri, R. Bucci, F. Balestrieri, D. Marini, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 80 (2006) 140.
- [28] R. Leardi, A. Lupiáñez, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 41 (1998) 195.
- [29] R. Leardi, *J. Chemometr.* 14 (2000) 643.
- [30] Z. Xiaobo, Z. Jiewen, M.J.W. Povey, M. Holmes, M. Hanpin, *Anal. Chim. Acta* 667 (2010) 14.
- [31] R. Leardi, *The PLS-Genetic Algorithm Toolbox for Matlab*. Downloaded from: www.models.life.ku.dk/GAPLS.

6. Discusión

Para finalizar, destacar, que gracias a los resultados obtenidos se ha conseguido la última parte de la hipótesis planteada inicialmente, donde se pretendía proponer un método que fuera capaz de cuantificar el aceite de oliva cuando se encuentra mezclado con otros aceite vegetales, para así, conseguir controlar el cumplimiento de los requisitos especificados en el Reglamento de Ejecución (UE) N° 29/2012.

Como en el capítulo anterior, se pone otra vez en evidencia, los buenos resultados en el uso de los cromatogramas completos de triglicéridos como huellas dactilares, en este caso de cada una de las mezclas; las cuales han permitido el establecimiento de modelos de cuantificación mediante herramientas quimiométricas.

Para confirmar este modo de trabajo, en este capítulo se ha puesto también de manifiesto que no hay una mejora sustancial de los resultados si se hace una reducción de variables en los cromatogramas, aunque sí es cierto que la complejidad de los modelos disminuye, haciéndolos más manejables.

Por último, para tener en cuenta la variabilidad de aceites y/o mezclas que se pueden encontrar en el mercado, los modelos de cuantificación que se han establecido, contemplan todos los aceites vegetales en su conjunto, no encontrando en bibliografía resultados similares.

Comunicaciones a Congresos derivadas de este capítulo

- ◆ C. Ruiz Samblás, F. Marini, L. Cuadros Rodríguez, A. González Casado. *Cromatografía y quimiometría de mezclas de aceite de oliva y otros aceites vegetales*. IV Workshop de Quimiometría para Jóvenes Investigadores. Comunicación oral.
- ◆ C. Ruiz Samblás, F. Marini, L. Cuadros Rodríguez, A. González Casado. *Application of genetic algorithms in variable selection for PLS quantification of olive oil in blends with vegetable oils*. XIII Chemometrics in Analytical Chemistry. (CAC, 2012). Poster.

Capítulo ω

Conclusiones finales

En este *capítulo* ω se exponen las conclusiones derivadas de las aplicaciones presentadas en la Tesis Doctoral. Las conclusiones específicas de cada objetivo se han establecido en los correspondientes artículos científicos y en un breve apartado de discusión al final de cada uno de los capítulos:

- I. Se ha desarrollado e implementado un procedimiento analítico para la extracción de grasa/aceite en productos alimenticios mediante extracción con líquidos presurizados, el cual puede ser utilizado por laboratorios de análisis de rutina para cuantificar el extracto graso en alimentos.
 - I.a. Se ha verificado y validado el extractor con líquidos presurizados, atendiendo a los requerimientos específicos.
 - I.b. Los parámetros implicados en el proceso de extracción fueron optimizados mediante diseño de experimentos.
 - I.c. El procedimiento se ha validado mediante la elaboración de un material de referencia "casero".
 - I.d. Se ha llevado a cabo la estimación de la incertidumbre de todos los componentes implicados en el proceso.

- II. Se ha efectuado una revisión bibliográfica sobre la determinación de triglicéridos mediante cromatografía de gases a alta temperatura (HTGC) en alimentos y aceites vegetales.
 - II.a. El desarrollo de la cromatografía de gases a alta temperatura ha estado muy ligado a lo largo de los años a la evolución de las fases estacionarias en las columnas cromatográficas. Este desarrollo ha favorecido el uso de la cromatografía de gases frente a la cromatografía líquida en el análisis de TAGs, proporcionando resultados satisfactorios.

- III. Se ha desarrollado una metodología de identificación de triglicéridos en aceite de oliva mediante HTGC-MS, en modo de "monitorización con un único ión" (SIM).

- III.a. Se ha observado que los iones $[M-OCOR]^+$, $[RCO+128]^+$ and $[RCO+74]^+$, son útiles para la identificación de TAGs que contengan grupos de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y diinsaturados. Sin embargo no es un método apropiado para TAGs con ácidos grasos con más de dos insaturaciones.
 - III.b. Este método de asignación de picos está especialmente indicado para condiciones con mucho ruido de fondo o sangrado de columna, ya que sólo detecta iones con un m/z característico.
- IV. Se ha propuesto un nuevo método sencillo y fácil de aplicar para la cuantificación de TAGs en aceite de oliva utilizando HTGC-MS.
- IV.a. Para la cuantificación se utilizó un patrón multianalito, el cual estaba formado por todos los analitos en concentración similar a la que se encuentran en el aceite de oliva. Los factores de calibración establecidos de cada uno de los analitos en dicho patrón han sido posteriormente utilizados para la cuantificación en las muestras.
 - IV.b. A partir del contenido en TAGs en el aceite de oliva, se ha propuesto una metodología sencilla para el cálculo de ácidos grasos, alternativa a la derivatización previa y GC. Esta aproximación fue validada, con resultados apropiados, utilizando diferentes aceites de oliva cuya composición en ácidos grasos era previamente conocida como materiales de referencia.
- V. Mediante el uso de las huellas dactilares cromatográficas de TAGs se han obtenido resultados satisfactorios de agrupación y clasificación de aceite de oliva atendiendo a variedades de aceite de oliva virgen extra y categorías, lo que demuestra la singularidad del aceite de oliva atendiendo a su perfil cromatográfico.
- V.a. Se suprime la necesidad de procedimientos tradicionales de calibración-cuantificación para obtener estos modelos.

CAPÍTULO ω

- V.b. Se aplicaron técnicas de preprocesado de los cromatogramas (corrección de línea base, alineamiento de picos, centrado en la media) para obtener resultados coherentes.
 - V.c. Para la elaboración de los modelos, se han utilizado técnicas quimiométricas de análisis exploratorio de datos, PCA y de reconocimiento de pautas, análisis de agrupamientos y PLS-DA.
- VI. Aplicando huellas dactilares de espectrometría de masas, de compuestos volátiles en el aceite de oliva virgen extra, obtenidas mediante PTR-MS, se ha desarrollado un modelo de clasificación atendiendo a la variedad del fruto.
- VI.a. No es necesaria una identificación de los compuestos volátiles y únicamente fue necesario aplicar un autoescalado como preprocesado previo a la construcción de los modelos.
 - VI.b. El modelo fue validado mediante un conjunto de muestras externas que no se había utilizado para la construcción del mismo.
 - VI.c. La metodología propuesta puede ser utilizada con garantía como técnica de "screening" que permite una detección rápida y sensible de volátiles para autenticar aceite de oliva virgen extra.
- VII. Se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica, sobre el uso conjunto, de cromatografía y quimiometría para el análisis de TAGs en grasas y aceites.
- VII.a. Atendiendo a los resultados encontrados, se observa que esta combinación es usada para caracterizar y autenticar, esto es, caracterización de tipos, variedades y/o orígenes geográficos, detección de adulteraciones, etc., de grasas comestibles y aceites.
 - VII.b. La metodología más extendida requiere la transformación de las señales cromatográficas en datos composicionales, y sólo algunas excepciones son encontradas donde se usa el

cromatograma completo ("huellas dactilares"). En el primer caso, en esa transformación puede perderse algún tipo de información característica a cada muestra.

- VII.c. De acuerdo a la bibliografía encontrada, a pesar de que la quimiometría es una herramienta ya bien establecida, es común encontrar estudios en los que se hace un mal uso de la terminología, ya que es frecuente aplicar técnicas exploratorias como clasificatorias.

- VIII. Se ha desarrollado un procedimiento para la identificación y cuantificación de aceite de oliva, cuando este se encuentra mezclado con otros aceites vegetales (girasol, maíz, soja, semillas, sésamo y soja). Los buenos resultados demuestran que es apropiado para verificados de etiquetado, control de calidad y detección de fraudes.
 - VIII.a. Se hace atendiendo a la determinación de TAGs mediante HTGC-MS y con el preprocesado comentado anteriormente; se ha encontrado una mayor dificultad a la hora de la alineación de los cromatogramas, debido a la gran variedad de todos los aceites vegetales usados.
 - VIII.b. Se prepararon mezclas mediante la mezcla de aceite de oliva y aceite vegetal a diferentes porcentajes (10-90% en aceite de oliva), favoreciendo las combinaciones que cubrieran el mayor rango de información posible.
 - VIII.c. Una técnica de modelado de clases previa como SIMCA, nos permite identificar primeramente el aceite vegetal usado en cada mezcla.
 - VIII.d. El modelo de cuantificación, PLS, fue validado mediante un conjunto de muestras externo que no fueron utilizados en la construcción del modelo.
 - VIII.e. El uso de algoritmos genéticos para la reducción de variables utilizadas en el modelo de cuantificación, GA-PLS, proporcionó un modelo con el mismo número de variables latentes y una habilidad predictiva comparable. Sin embargo

los errores en calibración y validación cruzada fueron un poco menores.

- IX. Por último, el aceite de oliva es un producto muy valioso en el mercado, por su valor añadido, ya que presenta características que lo diferencian del resto de aceites vegetales, tanto composicionales como nutricionales. Por esto, está sujeto a modificaciones y alteraciones para obtener así mayores beneficios. Por tanto es necesario protegerlo y buscar metodologías que nos permitan autentificarlo y cuantificarlo para proporcionar así un mayor control del mismo.

Principales Aportaciones

Las principales contribuciones de esta Tesis Doctoral, atendiendo a las aportaciones de interés para la comunidad científica se exponen a continuación.

- ☉ Un procedimiento analítico alternativo de extracción, con disolventes presurizados, de grasa y/o aceite en alimentos que contiene aceite de oliva en su composición.
- ☺ Un método analítico sencillo de cromatografía de gases a alta temperatura acoplada a espectrometría de masas para identificar y caracterizar el perfil de triglicéridos de aceites vegetales.
- ☺ Un modelo de caracterización de variedades y categorías de aceite de oliva mediante el uso de perfiles cromatográficos de triglicéridos y herramientas quimiométricas.
- ☺ Un modelo de caracterización de variedades de aceite de oliva virgen extra mediante el perfil de volátiles y herramientas quimiométricas.

- ☉ Un modelo de cuantificación del porcentaje de aceite de oliva en mezclas con otros aceites vegetales mediante el uso de perfiles cromatográficos de triglicéridos y herramientas quimiométricas.

Unificando todas las aportaciones expuestas anteriormente junto con las conclusiones, se podría decir que la conclusión más importante del trabajo presentado aquí es que:

- ➔ *el análisis de huellas dactilares cromatográficas de triglicéridos, junto con el uso de herramientas quimiométricas permite el desarrollo de modelos multivariantes apropiados para la detección, discriminación, clasificación y cuantificación del aceite de oliva.*

Valoración personal

La cromatografía de gases a alta temperatura comenzó con el desarrollo de las columnas capilares alrededor de los años ochenta y se podría decir que la quimiometría alrededor de los setenta. Hoy en día las dos ramas han estado dando resultados muy novedosos.

Esta tesis pretende ser una contribución a la maduración de estos campos en conjunto. Los resultados expuestos a lo largo de los capítulos han demostrado que este binomio, cromatografía-quimiometría, es capaz de dar buenos resultados, que son fáciles en uso e interpretación, para desarrollar métodos de caracterización, clasificación y cuantificación de aceite de oliva. Tales métodos además reducen el coste y el uso de adicionales químicos proporcionando estimaciones más precisas y robustas.

Bien es cierto, que el desarrollo de estos métodos requiere la adquisición de habilidades analíticas y competencias matemático-estadísticas e instrumentales. Sin embargo, una vez adquiridas, permiten un campo muy amplio de aplicación y desarrollo.

CAPÍTULO ω

Un aspecto importante a resaltar, a lo largo de la Tesis, es el uso de las huellas dactilares (cromatogramas completos, o espectros de masas en el caso de los volátiles) en lugar de perfiles de áreas/alturas de pico o de concentración. Sin embargo, para esto es crucial un buen preprocesado (corrección de la línea base, alineamiento de picos, etc.) de los cromatogramas, previo a la construcción de los modelos, para así obtener resultados verdaderos, fiables y óptimos para cada situación.

Atendiendo al aprendizaje adquirido, aparte del trabajo específico en cada caso, subrayar la importancia de la realización de las revisiones bibliográficas (*reviews*), tanto de las aplicaciones de cromatografía de gases a alta temperatura en el análisis de TAGs, como el uso de la cromatografía junto con la quimiometría para el análisis de estos; ambos han servido para proporcionar una visión general y formación amplia de cómo ha ido evolucionando el tema, que hay hecho hasta el momento, y que se puede aportar a la comunidad científica.

Conjuntamente, los procedimientos de trabajo que se han presentado tanto en el capítulo I, sobre el uso del extractor con disolventes líquidos presurizados, y en el capítulo II, sobre el uso de cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas, han favorecido también este aprendizaje. La realización y puesta a punto de estos procedimientos, tanto de verificación, como de mantenimiento del equipo, confiere una mayor fiabilidad a los resultados obtenidos, así como favorece el aprendizaje previo del usuario, antes del análisis de las muestras correspondientes en cada caso.

Por otro lado, mencionar que algunos de los resultados más fructíferos de esta Tesis, (capítulo III y IV) resultan de colaboraciones con Institutos y Universidades de prestigio como el "RIKILT-Institute of Food Safety" en Wageningen (Holanda) y "La Sapienza" en Roma (Italia). Estos trabajos co-disciplinarios aportan la oportunidad de intercambiar conocimientos y aprender nuevas formas de trabajo que facilitan el enriquecimiento personal y profesional del doctorando, así como el desarrollo científico.

Por último, haciendo referencia a las competencias básicas que se mencionaron en el capítulo y que, según el Real Decreto 99/2011, como mínimo deben adquirirse en los estudios de doctorado, se podría concluir que éstas se han alcanzado con éxito. Así:

- Se ha demostrado la capacidad y competencia para desarrollar una investigación sistemática sobre una nueva metodología cromatográfica de análisis de triglicéridos en aceite de oliva, así como de extracción de grasa en alimentos, estableciendo sus antecedentes y desarrollando nuevos métodos para mejorar sus posibilidades y aplicaciones.
- Con la propuesta de utilización de herramientas quimiométricas para el desarrollo de modelos de optimización, autenticación y cuantificación, se ha puesto de manifiesto la capacidad de realizar un análisis crítico y evaluación de los nuevos conocimientos para formular nuevas propuestas que den solución a problemas en el campo de estudio.
- Además, con la divulgación científica expuesta a lo largo de la Tesis, mediante diversas comunicaciones a congresos y artículos científicos, se ha puesto de manifiesto la capacidad de exponer e informar a la comunidad científica de las aportaciones realizadas.

Atendiendo a las capacidades y destrezas personales, que se establecen en el artículo 6 del citado Real Decreto, la adquisición de las competencias anteriores, conlleva la adquisición de algunas de estas capacidades. Asimismo, la realización de los estudios dentro de un grupo de investigación favorece tanto el trabajo en equipo y como de forma autónoma, y las estancias realizadas han contribuido al aprendizaje en un contexto internacional y multidisciplinar.

Por último la defensa pública, ante un tribunal especializado en el campo de estudio, favorecerá a desarrollar la crítica y defensa intelectual de soluciones por parte de la doctoranda.

Perspectivas Futuras

El trabajo presentado aquí hace referencia a estudios que, aunque si bien es cierto que se han obtenido los resultados propuestos inicialmente, aún algunos aspectos podrían ser considerados en mayor detalle. Así a continuación, se hacen algunas sugerencias con respecto a posibles investigaciones futuras.

Se han propuesto metodologías de trabajo, pero es necesario que estas sean de aplicación y útiles a otros usuarios. Por ejemplo, sin duda, se han desarrollado modelos de cuantificación de aceite de oliva mezclado con otros aceites vegetales, pero queda la posibilidad de aplicarlos a mezclas reales de aceites encontradas en el mercado o a alimentos que contengan mezclas de aceite de oliva con aceites vegetales y extraídas mediante el método propuesto en el capítulo I, lo cual podría formar parte de un trabajo posterior.

Por otro lado, futuras colaboraciones con RIKILT-*Institute of FoodSafety*, están previstas para el análisis de aceite de palma, el cual ya se comenzó a estudiar, durante la estancia realizada, su perfil de volátiles y ácidos grasos y queda pendiente el análisis de TAGs mediante el método cromatográfico propuesto en esta Tesis y el desarrollo de modelos quimiométricos que permitan autenticar sus orígenes geográficos.

También aparece la posibilidad de agregar datos cromatográficos y de espectros de masas, para obtener así conjuntos de datos a 3-vías que podrían ser trabajados mediante quimiometría. Algunos de estos estudios se probaron ya durante la estancia realizada en "La Sapienza" junto al Dr. Federico Marini.

Por último, la realización de una formación Post-Doctoral, podría ser la continuación perfecta para seguir aprendiendo y experimentando.

¿Cuál eres tú?

Una hija se lamentaba con el papa por las dificultades experimentadas en la vida. Estaba cansada de luchar. Se daba cuenta de que, una vez resuelto el problema, se presentaba rápidamente otro.

El padre, chef de profesión, decidió llevarla a la cocina: lleno tres ollas de agua y las puso a calentar. Al poco tiempo el agua de las tres ollas empezó a hervir.

En la primera olla depositó zanahorias, en la segunda huevos y en la tercera granos de café. La hija, impaciente, se preguntaba qué estaba haciendo. Después de veinte minutos el padre apagó el fuego y tomando las zanahorias, las arregló en una bandeja, los huevos los depositó en un plato y el café en una taza.

Después se dirigió a la hija y le dijo: "¿Qué ves?", "Zanahorias, huevos y café", fue la respuesta inmediata. El padre la invitó a acercarse y le dijo que tocara las zanahorias, haciéndole notar que estaban blandas; después le pidió que tomara un huevo y lo rompiera, haciéndole notar que una vez retirada la cáscara, el huevo era duro. Y finalmente le pidió que saboreara el café, ella sonrió mientras sentía su aroma delicioso. La hija le preguntó: "¿qué significado tiene todo esto?"

El padre le explicó que los tres elementos habían afrontado la misma adversidad, el agua hirviendo, pero cada uno lo había sumido de forma diversa.

La zanahoria era fuerte y dura pero al contacto con el agua se había ablandado y se había vuelto frágil; el huevo era frágil, y su cáscara servía para proteger el líquido que tenía en su interior. Una vez expuesto al agua caliente, en su interior se había hecho sólido y duro; y los granos de café, al contacto con el agua caliente, habían cambiado el color del agua.

"¿Cuál es tu manera de asumir la adversidad?" –preguntó el padre a la hija. "¿Eres una zanahoria, un huevo o un grano de café?"

¿Eres como una zanahoria que parece fuerte, pero cuando la adversidad y el dolor tocan a la puerta te vuelves débil y pierdes tu fuerza?

¿Eres como un huevo que al comienzo tienen el corazón suave y adaptable, pero después frente a un problema te vuelves dura y rígida?

¿O eres como un grano de café que cambia el color del agua caliente, el elemento que le produce dolor?

Es justamente cuando el agua llega a su punto de ebullición que el café produce su transformación. Si eres como el café, cuando la adversidad te pone a prueba, tú reaccionas bien y sacas la mejor ventaja de la situación.

Anónimo

