



DETERMINACIÓN DE LOS BIOFENOLES DE LOS ACEITES DE OLIVA MEDIANTE HPLC

1

OBJETO

El presente método describe un procedimiento para la extracción y la cuantificación de los componentes menores polares de naturaleza biofenólica (BMP), como los derivados naturales u oxidados de la oleuropeína y del ligustrósido, los lignanos, los flavonoides y los ácidos fenólicos presentes en el aceite de oliva, utilizando la técnica HPLC. El campo de medición va de 30 mg/kg a 800 mg/kg.

ADVERTENCIA: La aplicación del presente método puede requerir el uso de aparatos y sustancias peligrosos o la ejecución de operaciones que conlleven un cierto riesgo. No especifica todos los problemas de seguridad relacionados con su aplicación, por lo cual será el usuario el responsable de adoptar previamente las medidas de seguridad pertinentes y de cumplir la legislación vigente.

2

PRINCIPIO

El método se basa en la extracción de los componentes menores polares de naturaleza biofenólica directamente a partir del aceite de oliva mediante una solución metanólica y su posterior cuantificación mediante HPLC con revelador UV a 280 nm, utilizando ácido siríngico como patrón interno.

El contenido en derivados naturales u oxidados de la oleuropeína y del ligustrósido, en lignanos, en flavonoides y en ácidos fenólicos se expresa en mg/kg de tirosol

3

APARATOS

3.1

Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) con gradiente ternario, provisto de columna (4,6 mm x 25 cm) de fase inversa C18, de tipo Spherisorb ODS-2 de 5 µm, 100 Å°, equipado con revelador espectrofotométrico UV a 280 nm e integrador. Temperatura ambiente.

El registro de los espectros con vistas a su identificación se realiza con ayuda de un revelador de fotodiodos con intervalos de adquisición entre 200 nm y 400 nm.

3.2

Matraces de 10 ml y 100 ml de clase A.

3.3

Pipetas de 100 µl, 1.000 µl y 5.000 µl.

3.4

Probetas con tapón roscado de 10 ml.

3.5

Agitador para probetas¹.

3.6

Baño de ultrasonidos.

¹ Tipo Vortex.

- 3.7 **Filtros de jeringa** Ø13 mm tipo PVDF de 0,45 µm.
- 3.8 **Centrífuga** con velocidad de centrifugación de 5.000 r.p.m.
- 3.9 **Balanza** con precisión de ± 0,001 g.
- 3.10 **Jeringas de plástico** de 5 ml.
- 3.11 Cristalería normal de laboratorio.

4 **REACTIVOS**

Reactivos puros para análisis cromatográfico HPLC.

- 4.1 **Ácido ortofosfórico 85% (V/V).**
- 4.2 **Metanol** para cromatografía.
- 4.3 **Acetonitrilo** para cromatografía.
- 4.4 **Agua** para cromatografía.
- 4.5 **Gradiente ternario lineal de elución:** agua 0,2 % H₃PO₄ (V/V) (A), metanol (B), acetonitrilo (C). Los solventes de elución han de desgasarse.
La elución en gradiente será la del siguiente esquema:

Gradiente de elución

Tiempo min	Flujo ml/min	A %	B %	C %
0	1,00	96	2	2
40	1,00	50	25	25
45	1,00	40	30	30
60	1,00	0	50	50
70	1,00	0	50	50
72	1,00	96	2	2
82	1,00	96	2	2

- 4.6 **2- (4 - hidroxifenil) etanol (tirosol) ≥ 98%.**

Ácido 3,5 dimetoxi 4-hidroxi benzoico (ácido siríngico) ≥ 97%.

- 4.8 **Solución para la extracción:** metanol/agua 80/20 (V/V).

- 4.9 **Solución de los patrones externos de calibrado (tirosol y ácido siríngico).** Pesar exactamente 0,030 g de tirosol (4.6) y 0,015 g de ácido siríngico (4.7) en un matraz aforado de 10 ml (3.2). Diluir a volumen con la solución de metanol/agua 80/20 (V/V) (4.8). Tomar 100 µl (3.3) de la solución y transferirla a un matraz aforado de 10 ml. Diluir a volumen con la solución de metanol/agua 80/20 (V/V) (4.8). Las concentraciones de solución de calibrado externa son las siguientes: tirosol 0,030 mg/ml, ácido siríngico 0,015 mg/ml. Dicha solución se mantiene estable durante 3 meses en el frigorífico a +4 °C.

- 4.10 Preparación de la solución de patrón interno (ácido siríngico).** Pesar exactamente 0,015 g de ácido siríngico (4.7) en un matraz aforado de 10 ml y llevar a volumen con la solución de metanol/agua 80/20 (V/V) (4.8). Tomar 1 ml (3.3) de la solución y transferirla a un matraz aforado de 100 ml (3.2). Diluir a volumen con la solución de metanol/agua 80/20 (V/V) (4.8). La concentración final es de 0,015 mg/ml.
Dicha solución se mantiene estable durante 3 meses en el frigorífico a +4 °C.

5 PROCEDIMIENTO

5.1 Preparación de la muestra

Pesar exactamente 2,0 g de aceite de oliva en una probeta con tapón roscado de 10 ml (3.4).

Transferir 1 ml de la solución de patrón interno (4.10) a la muestra previamente pesada.

Cerrar con el tapón roscado y agitar durante 30 segundos exactos (3.5).

Añadir 5 ml (3.3) de la solución de extracción constituida por metanol/agua 80/20 (V/V) (4.8).

Agitar (3.5) durante 1 minuto exacto.

Extraer en el baño de ultrasonidos (3.6) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 5.000 r.p.m. durante 25 minutos (3.8).

Tomar una parte alícuota del sobrenadante y filtrar en jeringa de plástico de 5 ml (3.10), con filtro de PVDF de 0,45 µm (3.7).

5.2 Análisis HPLC

El espectrofotómetro UV se ha de encender al menos 1 hora antes del análisis.

La columna cromatográfica debe acondicionarse durante al menos 15 minutos con el solvente de elución de composición inicial (agua 0,2% H₃PO₄ [V/V] /metanol/acetonitrilo 96/2/2 [V/V/V]) (gradiente de elución).

Es preciso hacer una primera prueba cromatográfica sin gradiente (para asegurarse de que no se producen picos de interferencia por coelución), consistente en la inyección de 20 µl de metanol/agua 80/20 (V/V) (4.8) en el sistema HPLC.

Inyectar 20 µl de la solución de patrones externos de calibrado (4.9), registrando el cromatograma a 280 nm. Calcular los valores de los factores de respuesta RF correspondientes a 1 µg de tirosol y 1 µg de ácido siríngico (6.1).

Calcular la relación entre el factor de respuesta del ácido siríngico y el tirosol, denominado $RRF_{sir/tir}$. Apuntar los valores (6.2).

Inyectar 20 µl de la solución final de la muestra en el sistema HPLC, registrando el cromatograma a 280 nm.

Efectuar dos determinaciones independientes con la misma muestra y comprobar que los resultados estén dentro de los parámetros de precisión del método.

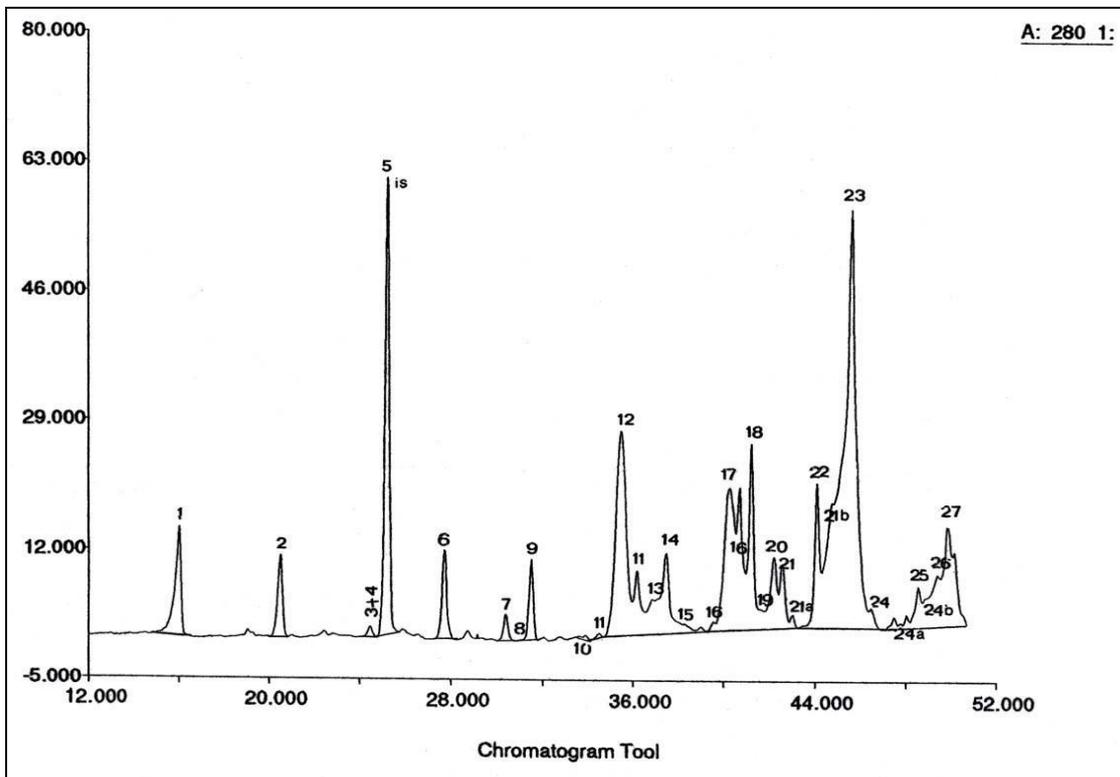
En la figura 1 se presenta un trazado cromatográfico típico de los biofenoles de un aceite de oliva virgen extra desglosado por componentes.

Para determinar el contenido total han de sumarse las áreas de los distintos picos.

Al final de la jornada, inyectar en la columna cromatográfica metanol/acetonitrilo 1/1 (V/V) con flujo de 1,0 ml/min durante un mínimo de 15 minutos y conservar la columna en metanol/acetonitrilo 1/1 (V/V).

Figura 1

Cromatograma HPLC registrado a 280 nm correspondiente al perfil de los biofenoles presentes en un aceite de oliva virgen extra



6 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1 Cálculo de los factores de respuesta de los patrones externos de calibrado (RF)

$RF_{1\mu g}$ (ácido siríngico) = área de ácido siríngico/ μg de ácido siríngico inyectado

$RF_{1\mu g}$ (tiroso) = área de tiroso/ μg de tiroso inyectado

6.2 Cálculo de la relación entre dos factores de respuesta (RRF)

$RRF_{sir/tir} = RF_{1\mu g}$ (ácido siríngico)/ $RF_{1\mu g}$ (tiroso)

El valor de $RRF_{sir/tir}$ ha de ser constante y estar comprendido en el intervalo $5,1 \pm 0,4$. Deberá permitir expresar el resultado final en tiroso, utilizando ácido siríngico como patrón interno.

6.3 Cálculo del contenido en biofenoles del aceite de oliva virgen

El contenido en biofenoles (derivados naturales u oxidados de la oleuropeína y del ligustrósido, lignanos, flavonoides y ácidos fenólicos), expresado en mg/kg, se calcula sumando las áreas de los distintos picos cromatográficos (como se muestra en el cuadro 1), mediante la siguiente fórmula, expresando el resultado sin decimales.

$$(\text{mg/kg}) = \frac{(\Sigma A) \times 1.000 \times RRF_{sir/tir} \times (P \text{ \acute{a}c.sir.})}{(A \text{ \acute{a}c.sir.}) \times (P)}$$

siendo:

(ΣA) la suma de las áreas de los picos de los biofenoles (hidroxitiroso, tiroso, derivados naturales y oxidados de la oleuropeína y del ligustrósido, lignanos, flavonoides y ácidos fenólicos) registrados a 280 nm;

A $\acute{a}c.sir.$ el área del patrón interno ácido siríngico registrada a 280 nm;

1.000 el factor utilizado para expresar el resultado en mg/kg;

P el peso en gramos de aceite utilizado;

$RRF_{sir/tir}$ el coeficiente de multiplicación para expresar los resultados finales en tiroso;

P $\acute{a}c.sir.$ el peso en miligramos de ácido siríngico utilizado como patrón interno en 1 ml de la solución añadida a la muestra.

Cuadro 1

Identificación de los picos de los biofenoles

Valores máximos de absorción (máx. UV abs.) y los correspondientes tiempos de retención (RRT)*

Pico n.º	Biofenoles	RRT*	Máx. UV abs. nm
1	Hidroxitirosol	0,62	230-280
2	Tirosol	0,80	230-275
3	Ácido vainílico	0,96	260
4	Ácido cafeico	0,99	325
5	Ácido siríngico (patrón interno)	1,00	280
6	Vainillina	1,10	310
7	Ácido para-cumárico	1,12	310
8	Acetato de hidroxitirosol	1,20	232-285
9	Ácido ferúlico	1,26	325
10	Ácido orto-cumárico	1,31	325
11; 11a	Decarboximetil aglucona de la oleuropeína, forma dialdehídica oxidada	-	235-280
12	Decarboximetil aglucona de la oleuropeína, forma dialdehídica	1,45	235-280
13	Oleuropeína	1,48	230-280
14	Aglucona de la oleuropeína, forma dialdehídica	1,52	235-280
15	Acetato de tirosil	1,54	230-280
16; 16a	Decarboximetil aglucona del ligustrósido, forma dialdehídica oxidada	1,63	235-275
17	Decarboximetil aglucona del ligustrósido, forma dialdehídica	1,65	235-275
18	Pinorresinol, 1acetoxi-pinorresinol	1,69	232-280
19	Ácido cinámico	1,73	270
20	Aglucona del ligustrósido, forma dialdehídica	1,74	235-275
21; 21a; 21b	Aglucona de la oleuropeína, forma aldehídica e hidroxílica oxidada	-	235-280
22	Luteolina	1,79	255-350
23	Aglucona de la oleuropeína, forma aldehídica e hidroxílica	1,87	235-280
24; 24a; 24b	Aglucona del ligustrósido, forma aldehídica e hidroxílica oxidada	-	235-275
25	Apigenina	1,98	230-270-340
26	Metil-luteolina	-	255-350
27	Aglucona del ligustrósido forma aldehídica e hidroxílica	2,03	235-275

(*) El valor del tiempo de retención se calcula respecto al tiempo de retención del ácido siríngico. La identificación se ha realizado mediante HPLC-MS.

7 INFORME DE ENSAYO

En el informe del ensayo deberá constar la siguiente información:

- Referencia al presente método.
- Resultados de ensayo expresados en mg/kg de aceite (sin decimales).
- Valor de RRF utilizado para el cálculo.
- Toda desviación respecto del presente método resultante de un acuerdo entre las partes o por otras circunstancias.
- Datos de reconocimiento del laboratorio, fecha de realización del ensayo y firma del responsable.

MÁRGENES DE PRECISIÓN

1. Análisis de los resultados del ensayo colaborativo

Los márgenes de precisión del método se presentan en el cuadro que se adjunta.

El ensayo colaborativo propuesto por la Secretaría Ejecutiva en 2008 fue realizado por 17 laboratorios con acreditación del Consejo Oleícola Internacional de 8 países.

Muestra A: aceite de oliva virgen extra (Italia)

Muestra B: aceite de oliva virgen extra (España)

Muestra C: aceite de oliva virgen extra (Túnez)

Muestra D: aceite de oliva virgen extra (Eslovenia)

Muestra E: aceite de oliva virgen extra (Grecia)

Muestra R: aceite de oliva virgen extra (Italia)

El análisis estadístico de los resultados del ensayo colaborativo organizado por la Secretaría Ejecutiva del Consejo Oleícola Internacional se efectuó conforme a lo estipulado en la norma ISO 5725.

Exactitud (veracidad y precisión) de los resultados y métodos de medición.

Los valores aberrantes se examinaron aplicando el test de Cochran y el test de Grubbs a los resultados de los laboratorios para todas las determinaciones (replicados a y b).

El cuadro presenta la siguiente información:

N	Número de laboratorios participantes en el ensayo
Res. aberr.	Número de laboratorios con resultados aberrantes
Media	Media de los resultados aceptados
r	Valor por debajo del cual se sitúa, con una probabilidad del 95%, el valor absoluto de la diferencia entre dos resultados de ensayo individuales independientes, obtenidos aplicando el mismo método a una muestra idéntica, en el mismo laboratorio con el mismo operador, utilizando los mismos aparatos y durante un corto intervalo de tiempo
Sr	Desviación estándar de repetibilidad
RSDr	Coficiente (%) de variación de repetibilidad ($S_r \times 100 / \text{media}$)
R	Valor por debajo del cual se sitúa, con una probabilidad del 95%, el valor absoluto de la diferencia entre dos resultados de ensayo individuales obtenidos aplicando el mismo método a una muestra idéntica, en laboratorios diferentes, con operadores diferentes y utilizando aparatos diferentes
S _R	Desviación estándar de reproducibilidad
RSD _R	Coficiente (%) de variación de la reproducibilidad ($S_R \times 100 / \text{media}$)
Ho _R	Valor de HORRAT para la reproducibilidad, $[RSD_{R \text{ real}} / RSD_{R \text{ teór.}}] = 2^{(1-0,5 \log C)}$, siendo C la Concentración del compuesto expresada en potencia de 10 (ecuación de Horwitz).

Márgenes de precisión del contenido total en biofenoles (mg/1.000 g)

	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA
	A	B	C	D	E	R
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Media	694	573	153	343	297	301
N	17	17	17	17	17	17
Res. aberr.	3	3	1	2	2	2
Sin res.aberr.	14	14	16	15	15	15
N.º ensayo	28	28	32	30	30	30
r	29	36	18	24	22	17
S_r	10,4	12,7	6,4	8,7	7,7	6,2
RSD_r(%)	2	2	4	3	3	2
R	101	84	60	63	77	32
S_R	36,0	29,9	21,3	22,4	27,5	11,5
RSD_R(%)	5	5	14	7	9	4
HO_R	0.9	0.8	1.9	1.0	1.4	0.6

2. Referencias

- ISO 5725-1:1994 Exactitud (veracidad y precisión) de los resultados y métodos de medición. Parte 1: principios generales y definiciones.
- ISO 5725-2:1994 Exactitud (veracidad y precisión) de los resultados y métodos de medición. Parte 2: método básico para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad de un método de medición normalizado.
- ISO 5725:5:1998 Exactitud (veracidad y precisión) de los resultados y métodos de medición. Parte 5: métodos alternativos para determinar la precisión de un método de medición normalizado.
- ISO 5725:6:1994 Exactitud (veracidad y precisión) de los resultados y métodos de medición. Parte 6: utilización en la práctica de los valores de exactitud.