

# Memoria de prácticas en empresa /institución

## QORTEBA INTERNACIONAL S.L.

Control de calidad. Desarrollo y optimización de  
métodos off-line para el análisis de Mosh-Moah en el  
aceite de oliva

Curso 2019/2020

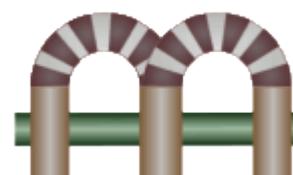
Alumno:

# Ana Torralba Moreno

Del 02/03/2020 al 16/03/20 y del 15/06/20 al 31/08/2020

Tutor Docente: Prof. Dr. Rafael Gómez Díaz

Tutor Laboral: María Victoria Girón Fernández



## Contenido

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
ÍNDICE DE TABLAS .....	3
QORTEBA INTERNACIONAL S.L. / Ana Torralba Moreno.....	4
Antecedentes .....	4
Objetivos generales.....	6
Descripción de la actividad realizada .....	6
Valoración personal de la utilidad de la estancia.....	8
Desarrollo y optimización de métodos off-line para el análisis de MOSH-MOAH en el aceite de oliva .....	8
Resumen.....	8
Abstract .....	9
Introducción .....	9
Objetivos .....	10
Material y métodos .....	11
Resultados y discusión .....	16
Conclusiones.....	22
Propuestas.....	22
Bibliografía .....	23
Conclusiones / corolario.....	24
Agradecimientos .....	24
Bibliografía .....	24
Anexo I.....	25
Anexo II.....	33

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Diagrama de flujo del proceso de refinado del aceite de oliva. Fuente: Qorteba Internacional, S.L.....	5
Ilustración 2. GC-FID Perkin Elmer Autosystem XL. Fuente: Propia (2020) .....	14

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema procedimiento de la 1ª etapa del método 1. Fuente: Propia y COI [13]. ....	12
Figura 2. Esquema procedimiento de la 2ª etapa del método 1. Fuente: Propia y COI [13]. ....	13
Figura 3. Esquema procedimiento del método 2. Fuente: Propia y Sulpasso (2016) [14]. ....	13
Figura 4. Esquema procedimiento del método 3. Fuente: Propia y Qorteba. ....	13
Figura 5. Cromatograma del multipatrón MOSH/MOAH inyectado directamente en el cromatógrafo. ....	16
Figura 6. Cromatogramas de las fracciones separadas. A: MOSH. B: MOAH. ....	16
Figura 7. Cromatogramas del método 1 sin optimizar. A: elución MOSH. B: elución MOAH.....	16
Figura 8. A: cromatograma de la Muestra Trabajo con elución de 40 ml n-hex. B: cromatograma de la Muestra Trabajo con elución de 60 ml n-hex. ....	17
Figura 9. A: cromatograma de la Muestra Trabajo con elución de 40 ml n-hexano. B: cromatograma de la Muestra trabajo con elución de 2.5 ml n-hexano, 25 ml solución binaria y 10 ml solución terciaria. ....	17
Figura 10. Cromatogramas del método 2. A y B: sin optimizar. C y D: optimizados. Izquierda: MOSH. Derecha: MOAH. ....	18
Figura 11. Cromatogramas del método 3. A y B: sin optimizar. C y D: optimizados. Izquierda: MOSH. Derecha: MOAH. ....	18
Figura 12. Cromatogramas AOVE.....	19
Figura 13. Cromatogramas AOV.....	20
Figura 14. Cromatogramas REF .....	21

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cronograma de tareas realizadas durante el tiempo de la estancia de prácticas.....	7
Tabla 2. Condiciones programa de temperatura del cromatógrafo de gases. ....	14
Tabla 3. Relación pesos moleculares y tiempos de retención en Mosh y Moah, según muestra, y denominaciones. ....	15
Tabla 4. Resultados de los análisis realizados a la muestra 1. ....	19
Tabla 5. Resultados de los análisis realizados a la muestra 2. ....	20
Tabla 6. Resultados de los análisis realizados a la muestra 3. ....	21

## QORTEBA INTERNACIONAL S.L. / Ana Torralba Moreno

### Antecedentes

La empresa agroalimentaria Qorteba Internacional S.L. está ubicada en el kilómetro 389 de la Carretera N-IV, en Alcolea (Córdoba), siendo su código postal 14610. Anteriormente era conocida como “Refinería Andaluza S.A.”, filial de Aceites Toledo, pero en 2013 se creó esta sociedad por la unión de dos grandes empresas: Aceites Toledo y DCOOP. Actualmente trabajan alrededor de cuarenta y un empleados, gestionando unos 300.000 kg de aceite al día, llegando, en el ejercicio anterior, a gestionar alrededor de 49 millones de kg de aceite.

Sus instalaciones constan de múltiples áreas, siendo las tres primeras zonas claves para la actividad productora de la empresa:

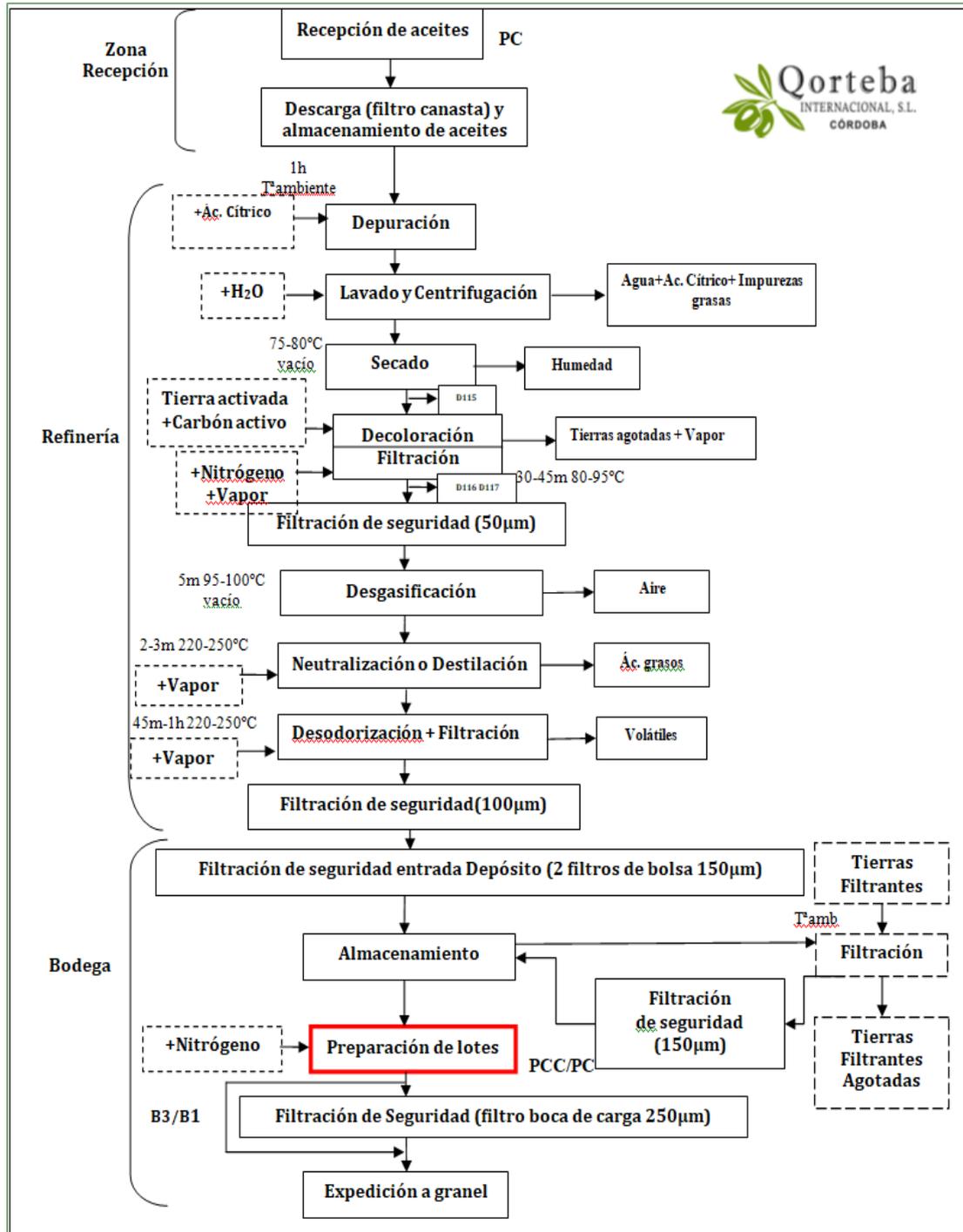
- Patio, con básculas para camión cisterna y tres puntos de carga/descarga con su propio sistema de bomba.
- Refinería.
- Bodegas. Hay tres en el exterior y una en el subsuelo de la fábrica. Están formadas por tanques de acero inoxidable donde se guarda el aceite pretratamiento, postratamiento y almacenamiento solamente. Los tanques pulmón se emplean para abastecer a la refinería de aceite de oliva lampante. Los depósitos para los aceites de oliva virgen extra y los refinados tienen menor capacidad, mientras que los de lampante son los de mayor capacidad.
- Almacenes de coadyuvantes tecnológicos, como tierra filtrante o carbón activo.
- Taller de mantenimiento.
- Zona de oficinas, donde se encuentra el director y la administración.
- Edificio del laboratorio, donde se ubica el mismo y también otras oficinas, como la del departamento de calidad y jefa de laboratorio, zona de los trabajadores, comedor y vestuario. Este edificio se encuentra adyacente a la refinería
- Aparcamientos, tanto para automóviles como para los camiones cisterna que descargan y cargan productos.
- Garita de seguridad, justo a la entrada con barrera para controlar entrada y salida.

Las actividades principales de la empresa son el refinado, almacenamiento y distribución de aceites vegetales de oliva a granel, así como la elaboración de aceites de oliva. Además, obtienen ácidos grasos libres como subproducto directo del proceso de refinado, los cuales también se comercializan, siendo la mayoría de sus clientes del sector cosmético.

Este proceso de **refinado**, su actividad más relevante, según el Consejo Oleícola Internacional (2006,) consiste en corregir defectos no deseados como la acidez, el color, el olor o el sabor con el objetivo de mejorar u homogeneizar las cualidades de los aceites, pudiendo ser un refinado químico o físico. Ambos tipos de refinado comparten las mismas etapas y procesos, excepto que la eliminación de ácidos grasos libres se lleva a cabo de diferente manera: en el refinado químico se ejecuta la neutralización, para eliminar los ácidos grasos libres con sosa al formar jabones y, además, desechar sustancias alcalinas procedentes de trazas metálicas,

fosfolípidos y otras impurezas, mientras que el refinado físico se realiza la destilación neutralizante por arrastre de vapor directo (COI, 2006). En el caso de Qorteba, se lleva a cabo el **refinado físico**, cuyo proceso queda reflejado en el diagrama de flujo siguiente (Ilustración 1).

Ilustración 1. Diagrama de flujo del proceso de refinado del aceite de oliva. Fuente: Qorteba Internacional, S.L



## Objetivos generales

El principal objetivo es la realización de análisis fisicoquímicos del aceite de oliva sirviendo de apoyo al laboratorio de Qorteba Internacional S.L., así como cualquier tarea relacionada con el buen funcionamiento del departamento.

## Descripción de la actividad realizada

La actividad realizada ha consistido en desempeñar la función de “Analista de laboratorio”, aprendiendo diferentes análisis que se realizan a los diferentes aceites vegetales, especialmente a los de oliva y girasol, así como cualquier actividad necesaria para el buen funcionamiento del laboratorio. A continuación, se recogen estos análisis a modo de lista de tareas:

- *TAREA 1:* Determinación de la humedad.
- *TAREA 2:* Determinación de impurezas no volátiles.
- *TAREA 3:* Determinación de triglicéridos.
- *TAREA 4:* Revisión de fichas de seguridad de productos químicos.
- *TAREA 5:* Determinación del porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo por cromatografía de gases.
- *TAREA 6:* Determinación del Coeficiente de Extinción Molar (K) por Espectrofotometría en Ultravioleta (UV).
- *TAREA 7:* Reconocimiento de jabones en aceites refinados.
- *TAREA 8:* Determinación de hidrocarburos alifáticos saturados por cromatografía de gases.
- *TAREA 9:* Determinación de benzopirenos (Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos, HAPs).
- *TAREA 10:* Determinación de ácidos grasos en frío para refinados.
- *TAREA 11:* Determinación de ceras por cromatografía de gases.
- *TAREA 12:* Determinación de ácidos grasos en caliente para aceites de oliva virgen extra y lampante.
- *TAREA 13:* Determinación de escualeno en muestras de ácidos grasos.
- *TAREA 14:* Desarrollo y optimización de método off-line para el análisis de Mosh-Moah.

Los protocolos de estos análisis se encuentran detallados en Anexo I. El procedimiento de aprendizaje de estas tareas consiste en: 1) Leer el protocolo; 2) Un trabajador del laboratorio lo explica a la vez que desarrolla el análisis (pormenorizando cada detalle que sea relevante para su correcta ejecución); 3) Desarrollar el análisis individualmente con el analista observando y corrigiendo posibles errores. Normalmente, el primer análisis que se realiza también lo ejecuta en paralelo el analista de laboratorio para corroborar que se ejecuta correctamente, al comparar resultados.

Estas tareas se han desarrollado a lo largo del periodo de la estancia de prácticas, siendo este tiempo el comprendido entre el 2 de marzo al 13 de marzo y del 15 de junio al 31 de agosto. A continuación, se puede observar un cronograma de tiempo y tareas realizadas (Tabla 1); las tareas se nombran del 1 al 14 como se recogen en la lista descrita previamente.

Tabla 1. Cronograma de tareas realizadas durante el tiempo de la estancia de prácticas.

		TAREAS													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
INTERVALOS DE TIEMPO	2/3/20 - 5/3/20	X	X	X		X									
	9/3/20 - 12/3/20	X	X	X	X	X									X
	15/6/20 - 18/6/20	X	X	X			X	X	X	X					X
	22/6/20 - 25/6/20			X			X	X	X	X					X
	29/6/20 - 2/7/20			X			X	X	X	X					X
	6/7/20 - 9/7/20			X			X	X	X	X					X
	13/7/20 - 16/7/20			X				X	X	X					X
	20/7/20 - 23/7/20			X				X	X	X	X				X
	27/7/20 - 30/7/20			X				X	X	X	X			X	X
	3/8/20 - 6/8/20			X					X	X	X	X	X	X	X
	10/8/20 - 13/8/20			X					X	X	X	X	X	X	X
	17/8/20 - 20/8/20			X					X	X	X	X		X	X
	24/8/20 - 28/8/20			X					X	X	X	X		X	X
	31/8/20														X

Esta actividad como Analista de laboratorio está relacionada con los contenidos sobre caracterización de aceites, normativa, análisis agroalimentario, procesos y productos, así como trazabilidad.

Además, entre las competencias específicas de este máster, aquellas que se pueden relacionar con la actividad realizada durante la estancia son: 1) Comprender la importancia de la calidad en la agroalimentación, 2) Comprender la importancia de la seguridad alimentaria, 3) Valorar la incidencia actual en la economía global de las empresas agroalimentarias, 4) Adquirir experiencia agroalimentaria mediante estancia en empresas e instituciones o centro de investigación, 5) Saber elaborar, presentar y defender un plan de mejora o los resultados de la investigación como trabajo fin de máster.

### **Valoración personal de la utilidad de la estancia**

La estancia de prácticas en Qorteba Internacional ha sido una formación positiva y enriquecedora. Esto se ha debido a que, desde el inicio, el equipo de técnicos del laboratorio, junto a la tutora laboral, se han involucrado en la formación, compartiendo todos sus conocimientos y experiencias para hacerlo aún más productivo y completo, inculcando buenas prácticas de manejo del material de laboratorio y realización de procedimientos, ayudando así a ser más reproducibles y repetitivos en lo referente a la labor como analista.

Personalmente, siento que he aprovechado al máximo la estancia, para desarrollarme como analista y para conocer los distintos análisis que se realizan a los aceites de oliva y refinados. En definitiva, cual es la labor de un laboratorio de aceites en una Refinería. Además, he podido trabajar con un Cromatógrafo de Gases, lo cual creo que es sumamente positivo tras la pérdida de las sesiones prácticas de la asignatura del Máster “Avances en Análisis Agroalimentario”, por la situación excepcional de Estado de Alarma de este año 2020, dónde se iba a poder trabajar con estos equipos.

En cuanto a la utilidad de la actividad práctica en la empresa, considero que ha sido idónea a la formación del Máster, dado que, en esta experiencia, he podido relacionar con la formación proporcionada en el mismo en cuanto a Análisis Agroalimentario, Procesos y Productos, Calidad y Seguridad Alimentaria.

### **Desarrollo y optimización de métodos off-line para el análisis de MOSH-MOAH en el aceite de oliva**

#### **Resumen**

En los últimos años, la creciente preocupación por nuevos contaminantes presentes en los alimentos ha originado múltiples estudios. Entre estos contaminantes se encuentran los hidrocarburos de aceite mineral (MOH), en los que se pueden distinguir los hidrocarburos aromáticos de aceites minerales (MOSH) y los hidrocarburos aromáticos de aceites minerales (MOAH). La exposición alimentaria a estos compuestos ha aumentado en los niños y jóvenes, poniendo en peligro su salud, pues los MOH tienen efectos nocivos en el organismo. Dado que en algunos países ya se han establecido límites máximos, se busca un método off-line sencillo y rápido con los que identificar y cuantificar estos compuestos. Por ello, en este estudio se realiza una comparativa entre tres métodos off-line para establecer si alguno pudiera emplearse en los análisis rutinarios del laboratorio.

## Abstract

In recent years, the growing concern about new contaminants, which are in food, have originated multiple studies. These pollutants include Mineral Oil Hydrocarbons (MOH), distinguishing Mineral Oil Saturated Hydrocarbons (MOSH) and Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons (MOAH). MOH's food exposure has increased in children and youth, endangering their health, because these compounds have harmful effects on the body. Due to some countries have established maximum limits, the priority objective is to find a simple and quick off-line method to identify and quantify these compounds. Therefore, this study make a comparison between three off-line methods and decide if any method could be used in routine laboratory analysis.

## Introducción

En 2012 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [1], EFSA, publicó un informe relativo a posibles riesgos de nuevos contaminantes que podían estar presentes en diferentes productos alimenticios. Entre ellos se encuentran los hidrocarburos de aceite mineral (MOH, mineral oil hydrocarbons) a los que los consumidores podrían estar expuestos a través de la ingesta alimentaria y cuyas fuentes de contaminación son muy diversas, pudiendo ser por vía directa a través de materiales de embalaje, coadyuvantes tecnológicos y/o aditivos, envases alimentarios, lubricantes de maquinaria, etc., o por vía indirecta a través de la contaminación ambiental. [2]

Los hidrocarburos de aceite mineral (MOH) comprenden una mezcla muy compleja de compuestos químicos derivados principalmente del petróleo crudo o producidos de forma sintética de carbón, gas natural y biomasa [3]. Se pueden identificar dos familias: hidrocarburos saturados de aceite mineral (MOSH, *mineral oil saturated hydrocarbons*) e hidrocarburos aromáticos de aceite mineral (MOAH, *mineral oil aromatic hydrocarbons*) [4]. Los MOSH son parafinas, alcanos de cadena abierta, generalmente ramificadas, y naftenos, con al menos un anillo saturado y alquilados, mientras que los MOAH incluyen hidrocarburos policíclicos aromáticos alquilados casi en su totalidad [5]; esta es una diferencia con los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH, *polycyclic aromatic hydrocarbons*) [6].

La relación común de MOSH:MOAH es de aproximadamente 4:1, por lo que un resultado con valores de MOSH elevado que incumpla esta relación indica que hay presencia de otros compuestos análogos de MOSH [7]. Estos compuestos son los Poli-alfa olefinas (PAO, *Poly alpha Olefine*) y los Polímeros oligoméricos de hidrocarburos saturados (POSH, *Polyolefin oligomeric saturated hydrocarbons*) [8]. Los PAO son isoparafinas con cadenas principales cortas y cadenas laterales largas, que suelen formar parte de lubricantes, cuando son de bajo peso molecular, o en pegamentos, cuando son de alto peso molecular [8], mientras que los POSH son oligómeros de polietileno o polipropileno [7]. Ambos compuestos no se pueden distinguir analíticamente con los MOSH [7].

La exposición alimentaria a estos compuestos, según EFSA, es mayor entre consumidores jóvenes que entre adultos y ancianos, variando la exposición estimada de MOSH entre 0.03 a 0.3 mg/Kg de peso corporal por día, estando más expuestos los niños [1]. Estos compuestos pueden tener efectos adversos para la salud: los MOSH pueden acumularse en tejidos humanos, en cantidad inversamente proporcional a la longitud de la estructura de carbono, [9]

y dañar nocivamente el hígado, mientras que algunos MOAH pueden actuar como mutagénicos y cancerígenos [1], siendo la fracción MOAH la más tóxica [9].

Por estos motivos, la Unión Europea publicó una Recomendación en enero de 2017 [10] para vigilar el contenido de estos compuestos en los alimentos (especialmente en grasas y aceites, pan, pasta, cereales para el desayuno, cereales, nueces, salchichas, pescado, pescado enlatado, cacao, chocolate, confitería, hielo y postres) y materiales de embalaje en contacto con alimentos, monitorizando los resultados hasta octubre de 2019 al objeto de establecer un marco legislativo de referencia, creándose en 2019, a raíz de ello, una guía de orientación sobre instrucciones específicas para el muestreo y análisis de MOSH y MOAH en alimentos con el objetivo de dar orientaciones a los Estados Miembros con respecto a estas instrucciones, sin aportar procedimientos operativos estándar [11].

Además, esta recomendación impulsó a determinados países miembros a establecer límites muy bajos para estos compuestos y restringir así la comercialización de productos, al acatar de obligado cumplimiento dicha recomendación, a pesar de no existir límites legislados a nivel europeo. Un ejemplo de estos países es Alemania, que tras varios intentos de introducir medidas para minimizar la migración de MOH del papel y cartón reciclados a los alimentos, se ha establecido un límite de migración específico (LME) de 0.5 mg/kg para MOAH, mientras que, para MOSH, que era de 2 mg/kg, se eliminó de su última versión [12].

Desde Qorteba Internacional, S.L. se inició un proceso de estudio de la información bibliográfica existente sobre este asunto al objeto de planificar y desarrollar un proceso para el análisis de estos compuestos más sencillo y adaptado a las condiciones actuales del laboratorio puesto que, próximamente, estarán sujetos a un cumplimiento legislativo de niveles máximos, teniendo en cuenta que, actualmente, existe pocos laboratorios que realicen estos análisis que, además, requieren una tecnología muy avanzada y, por tanto, costosa económicamente.

### Objetivos

Dado que cualquier equipo de análisis automatizado (método on-line) está basado en técnicas analíticas el proceso podría reproducirse con técnicas convencionales (métodos off-line), por ello los objetivos son:

- Desarrollar un método cromatográfico, a partir de los medios y equipos actuales, ya que no todos disponen de la misma tecnología en instrumentación, para que los resultados obtenidos sean comparables, es decir, que permita ensayos interlaboratorio.
- Realizar un protocolo de análisis rutinario a partir de la bibliografía existente para la cuantificación de MOSH y MOAH en muestras de aceites de oliva, pudiendo así monitorizar rangos de concentraciones que permitan minimizar los riesgos para el consumidor.

## Material y métodos

### Materiales y aparatos [8] [13] [14]:

- Columnas de vidrio para cromatografía, color ámbar, de diámetro interno de 1 cm, 40 cm de longitud y con una llave de paso adecuada.
- Viales de vidrio ámbar para cromatografía con insertos de vidrio y tapón de rosca con septo.
- Matraces en forma de corazón, esmerilados, de 25 ml de color ámbar.
- Matraces en forma de corazón, esmerilados, de 100 ml.
- Matraz redondo de fondo plano.
- Tapones de vidrio (para los matraces).
- Vasos de precipitado graduados de diferentes volúmenes.
- Pipeta Pasteur de cristal.
- Pipetas graduadas de varios volúmenes.
- Algodón.
- Varilla de cristal.
- Papel de aluminio.
- Cromatógrafo de gases.
- Microjeringa para inyección en columna de 10  $\mu$ l.
- Jeringa de 300  $\mu$ l.
- Evaporador rotatorio.
- Horno mufla.
- Desecador.
- Cristalizador.
- Bote de vidrio de color ámbar.
- Balanza analítica con una precisión  $\pm 0.1$  mg.

### Reactivos [8] [13] [14]:

- Silica gel 60. 0,063-0,200 mm, 70-230 mesh (Merck Millipore).
- Nitrato de plata,  $\text{AgNO}_3$ , (Reag. USP Panreac) para análisis, ACS, ISO.
- n-Hexano para cromatografía (PanReac).
- Diclorometano estabilizado con amileno para análisis, ACS, ISO (PanReac).
- Tolueno para UV, IR, HPLC, GPC, ACS (PanReac).
- Sulfato de sodio anhidro para análisis (Panreac).
- Gases:  $\text{H}_2$  puro (gas portador, cromatografía) y aire.  $\text{N}_2$  puro. (Air liquid)
- Silica gel activada.
- Silica gel/nitrato de plata al 10%.
- Silica gel/nitrato de plata al 0.3%.
- Solución binaria de n-hexano: diclorometano (75:25 v/v).
- Solución terciaria de n-hexano: diclorometano: tolueno (75:20:5 v/v).
- Solución de nitrato de plata al 75% (p/v) en agua destilada (para la silica gel con nitrato de plata al 10%).

### Patrones:

- Mix de estándares MOSH/MOAH de Restek. Estándares para MOSH: n-Undecane (C11), n-Tridecane (C13), Bicyclohexyl (CYCY), Cholestane (CHO). Estándares para MOAH: n-Pentylbenzene (5B), 1-Methylnaphthalene (1MN), 2-Methylnaphthalene (2MN), 1,3,5-Tri-tert-butylbenzene (TBB) y Perylene (PER).

- Multipatrón de n-alcenos de C10-C40, de Sigma-Aldrich, para corroborar los tiempos de retención necesarios para la cuantificación.

### Muestras:

Se emplean tres muestras de aceite de oliva procedentes de diferentes productores, las cuales solo se han filtrado y no se le han adicionado ningún coadyuvante tecnológico ni producto químico. Las muestras se codificaron como:

- Muestra 1: AOVE, Aceite de oliva virgen extra.
- Muestra 2: AOV, Aceite de oliva virgen.
- Muestra 3: REF, Aceite de oliva refinado.

### Métodos de análisis:

Métodos para comparar (adicionados a Anexo II):

- Método 1:* Consejo Oleícola Internacional, COI [13].
- Método 2:* Udine (Chemiservice s.r.l.). [14]
- Método 3:* Qorteba Internacional, S.L., basado en “Determination of hydrocarbons from mineral oil (MOSH & MOAH) or plastics (POSH & PAO) in packaging materials and dry foodstuffs by solid phase extraction and GC-FID” de Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR [8].

### Procedimiento de los métodos:

*Método 1* [13]: consta de dos etapas en la que se emplean dos columnas cromatográficas con dos rellenos distintos. En la primera, se prepara una columna de sílice activada por la que se carga la muestra y se obtiene la denominada “muestra trabajo” (Figura 1). La cual, tras evaporación, se carga en la segunda columna, la cual se compone de dos capas: una, mezcla silica gel/nitrato de plata al 10% y la otra silica gel solamente, separadas por sulfato de sodio anhidro. La elución de las diferentes fracciones se produce primero con n-hexano para los MOSH, y a continuación con una solución binaria y otra terciaria para los MOAH. (Figura 2).

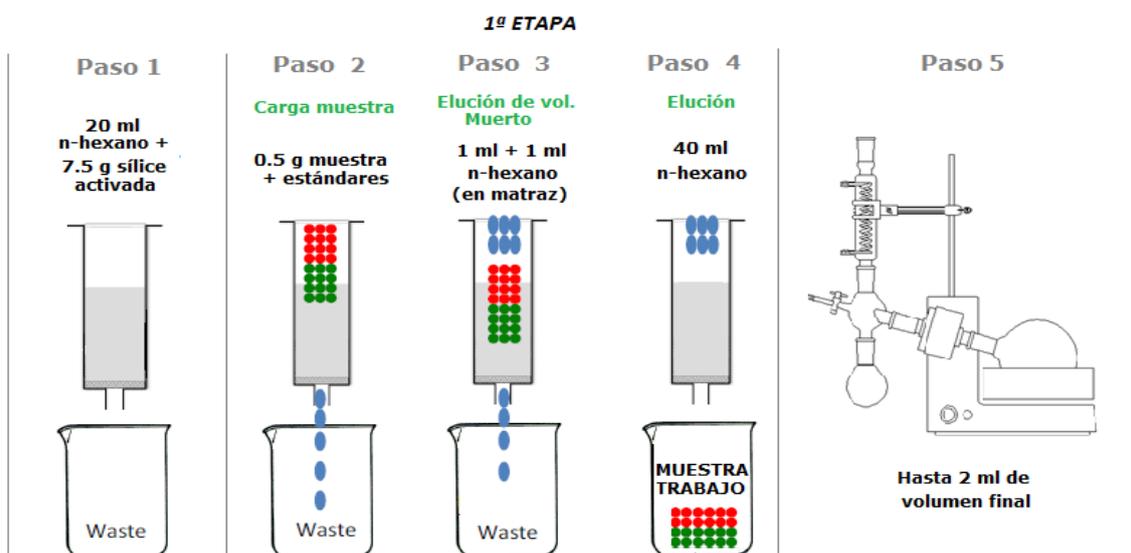


Figura 1. Esquema procedimiento de la 1ª etapa del método 1. Fuente: Propia y COI [13].

2ª ETAPA

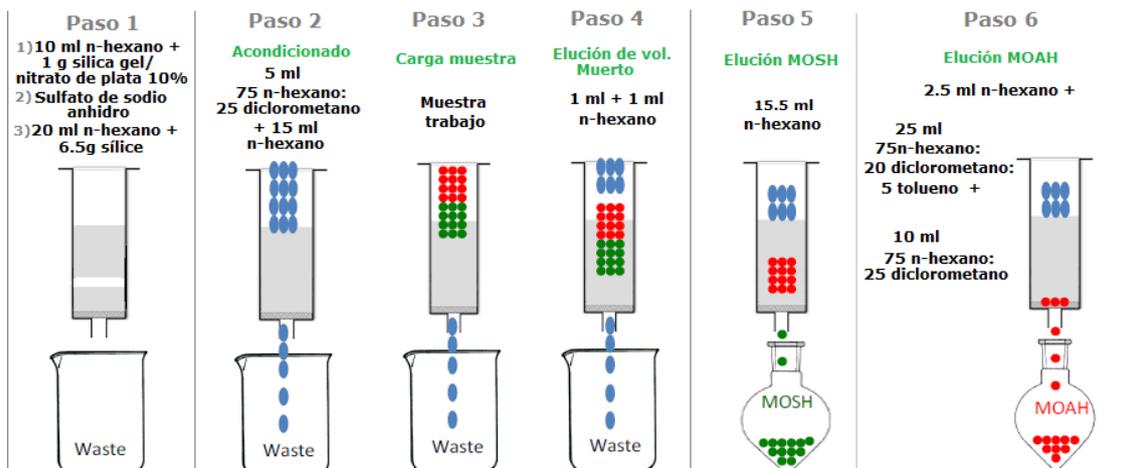


Figura 2. Esquema procedimiento de la 2ª etapa del método 1. Fuente: Propia y COI [13].

**Método 2** [14]: se prepara una columna de vidrio cromatográfica con dos fases: mezcla silica gel/nitrato de plata 10% y silica gel, separadas por sulfato de sodio anhidro. La elución de MOSH se hace con n-hexano y la de MOAH con una solución binaria (Figura 3).

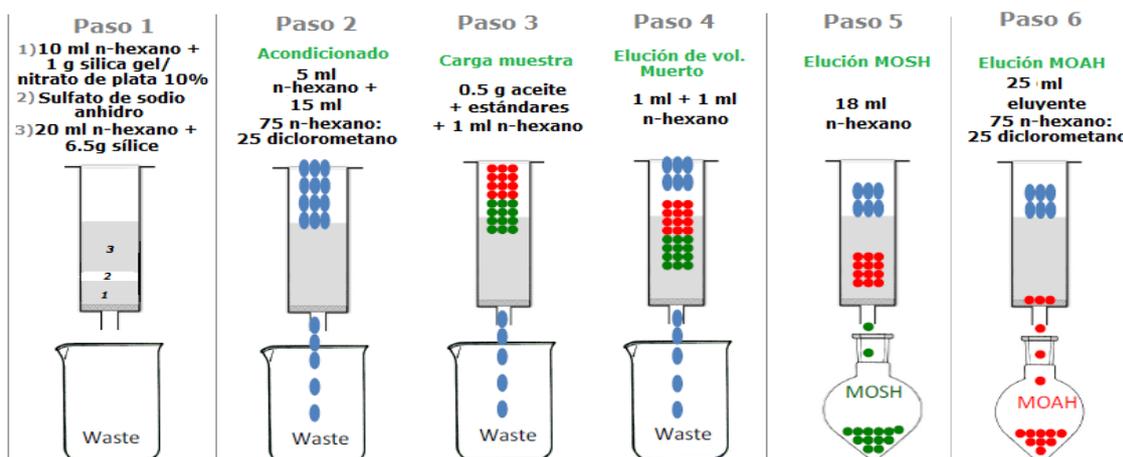


Figura 3. Esquema procedimiento del método 2. Fuente: Propia y Sulpasso (2016) [14].

**Método 3** [8]: se prepara una columna de vidrio cromatográfica con una fase mezcla de silica gel/nitrato de plata al 0.3%. La elución de MOSH es con n-hexano y solución ternaria y la de MOAH con solución ternaria (Figura 4).

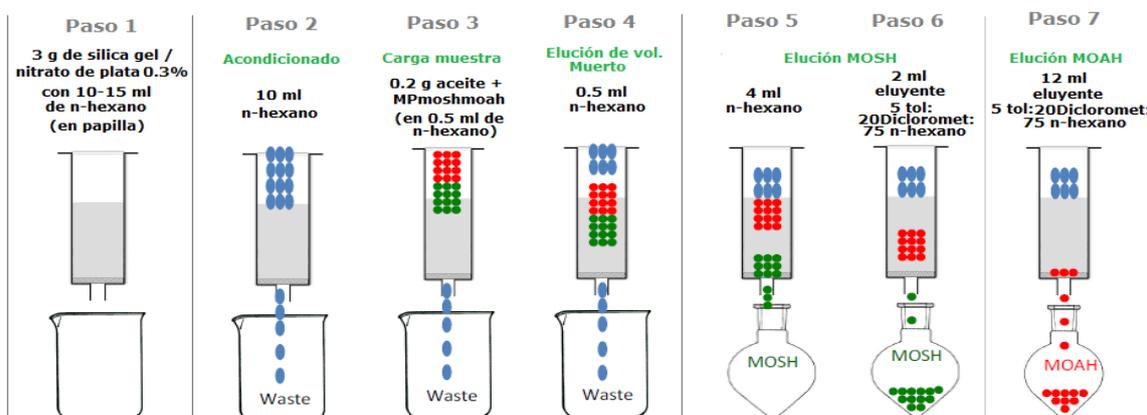


Figura 4. Esquema procedimiento del método 3. Fuente: Propia y Qorteba.

En los tres métodos, tras realizar la separación, se le adiciona 300 µl de tolueno a cada fracción, para evitar la evaporación de volátiles, y se evapora en el rotavapor durante 3-4 minutos entre 520-530 mbar y 3-4 minutos a 350-360 mbar a 55 °C hasta una cantidad aproximada de 300 µl. Se adiciona 30 µl de multipatrón MOSH/MOAH a las muestras.

**Análisis GC-FID:**

Cada fracción recolectada y evaporada, se inyecta manualmente, un volumen de 0.5 µl en el cromatógrafo de gases. El cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL está equipado con un inyector “on column” y un detector de ionización de llama (FID). La columna capilar empleada es de fase 100% dimetilpolisiloxano, fase entrecruzada y químicamente ligada, no polar, diseñada especialmente para análisis a altas temperaturas (Tª máx. 400°C). TRB-1HT (TR-610113, Teknokroma) de 15 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 0.10 µm de espesor. El Software empleado es TotalChrom.

Ilustración 2. GC-FID Perkin Elmer Autosystem XL. Fuente: Propia (2020)



Las condiciones instrumentales:

Tabla 2. Condiciones programa de temperatura del cromatógrafo de gases.

Oven Ramp / Rampa del horno	Rate / Velocidad °C / min	Temp / Temperatura °C	Hold / Mantenimiento °T (min)
Initial	0	75	9
1	22	240	0
2	30	350	12

- Tª máxima horno: 400 °C.
- Tª detector: 365°C.
- Carrier: H<sub>2</sub> a 2 Psi.
- Tiempo de análisis: 32 minutos.

**Optimización de los métodos:**

Las condiciones cromatográficas son similares para todos los métodos; seleccionamos las condiciones del método 2 por mejor estabilización de la línea base. La optimización de los métodos consiste en encontrar la fase o mezcla de fases adecuada, así como el volumen óptimo de las mismas que permitan separar completamente las dos fracciones.

**Métodos de validación:**

Las muestras son enviadas a laboratorios acreditados externos para comparar los resultados obtenidos en los métodos de análisis de este estudio con los de estos laboratorios. La muestra 1 ha sido enviada a Laboratorio Espejo, S.L., mientras que las muestras 2 y 3 han sido enviadas a Euroffins Scientific.

**Métodos actuales:**

Los resultados de los análisis de MOSH-MOAH son comparados con los obtenidos en los métodos actuales de análisis de determinación de hidrocarburos alifáticos (HA) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), siendo los primeros comparados con la fracción MOSH y los segundos con la fracción MOAH, por pertenecer a las mismas familias de compuestos. Se llevarán a cabo con los métodos descritos en ISO 17780:2015 [15] e ISO/CD 15302.2:2005 [16].

**Método de integración de los cromatogramas y cuantificación [8] [15]:**

Una parte del proceso de identificación de picos y posicionamiento de línea base se realiza manualmente.

Control de Calidad: Tras la separación de los compuestos en el cromatógrafo y la generación del cromatograma, se identifican los picos de los compuestos que forman el multipatrón MOSH/MOAH.

*Fracción MOSH:* CYCY es el patrón interno de cuantificación, mientras que los demás son de verificación del proceso y del método empleado. Las áreas de los estándares deben ser iguales para CYCY y C11, la mitad de estos para C13 y el doble para CHO.

*Fracción MOAH:* 1MN es el patrón interno de cuantificación, mientras que los demás son de verificación del proceso y del método empleado. Las áreas de los estándares deben ser iguales para 5B, 1MN, 2MN y TBB, siendo el doble para PER.

Estas relaciones deben cumplirse de acuerdo con las concentraciones iniciales añadidas para garantizar la buena recuperación y separación de nuestros compuestos.

Integración de los cromatogramas: Tras la inyección de un multipatrón de n-alcenos (C10-C40), se posicionan los tiempos de los carbonos. A partir de ellos, se fijan los rangos de tiempo que se deben analizar.

Tabla 3. Relación pesos moleculares y tiempos de retención en Mosh y Moah, según muestra, y denominaciones.

		AOVE		AOV		REF	
		Intervalos	Tiempos retención	Intervalos	Tiempos retención	Intervalos	Tiempos retención
MOSH	1	C10-C16	3.60-10.31	C10-C16	3.6-10.31	C10-C16	3.6-10.31
	2	C16-C20	10.31-13.14	C17-C24	11.01-15.51	C17-C24	11.01-15.51
	2'	C20-C25	13.14-16.03				
	3	C25-C35	16.03-20.51	C25-C35	16.02-20.51	C25-C35	16.02-20.51
	T	C10-C35	3.60-20.51	C10-C35	3.60-20.51	C10-C35	3.60-20.51
MOAH	1	-	-	C10-C16	3.60-10.31	C10-C16	3.60-10.31
	2	-	-	C16-35	10.31-20.51	C16-35	10.31-20.51
	T	-	-	C10-35	3.60-20.51	C10-35	3.60-20.51

Para calcular el contenido de hidrocarburos, primero se calcula en cada rango la fracción total de carbonos, manualmente, de base a base y posteriormente se vuelve a reintegrar manualmente para calcular la fracción de hidrocarburos de origen natural de valle a valle de cada pico. La resta de ambos corresponde al área de los compuestos de interés.

Cuantificación:

$$[MOSH/MOAH] (ppm) = \frac{(\text{Área total} - \text{Área de los picos individuales})}{\text{Estándar interno}_{(CYCY \text{ ó } 1MN)}} \times \frac{\text{masa patrón}}{\text{masa aceite}} \times 1000$$

$$[MOSH/MOAH](ppm) = \frac{(\text{Área total} - \text{Área de los picos individuales})}{\text{Estándar interno}_{(CYCY \text{ ó } 1MN)}} \times \text{Factor}$$

## Resultados y discusión

Antes de comenzar con la optimización de los métodos y análisis de las muestras, se inyecta el multipatrón directamente en el cromatógrafo para así identificar los compuestos y los tiempos de retención a los que aparecen (Figura 5).

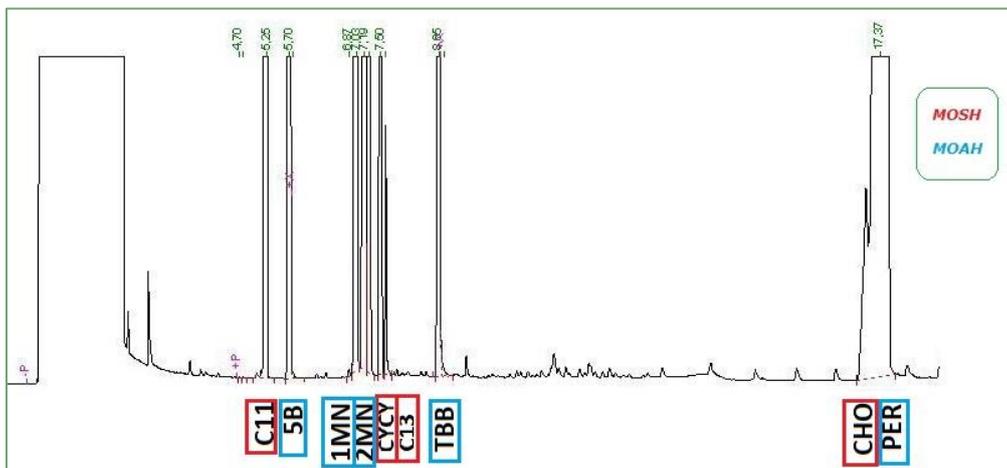


Figura 5. Cromatograma del multipatrón MOSH/MOAH inyectado directamente en el cromatógrafo.

Para seleccionar el método más adecuado, se comienzan los análisis sin muestra: se realiza todo el proceso “BLANCO” únicamente con el multipatrón. Para asegurar la eficacia del método, deben separarse claramente, cada familia de compuestos y cumplir con las relaciones de áreas anteriormente indicadas (Figura 6).

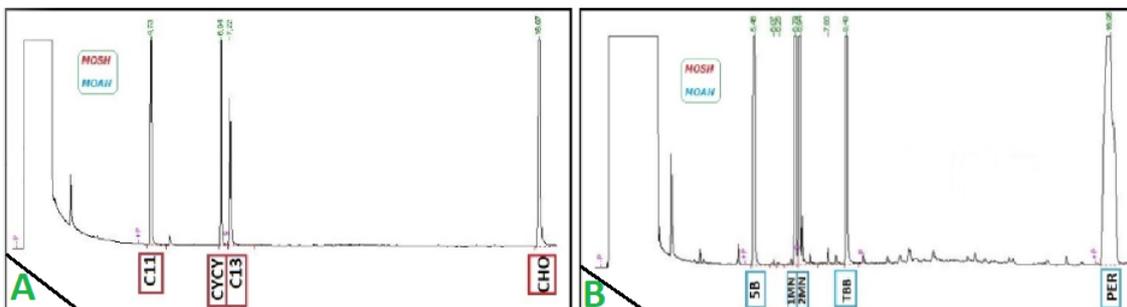


Figura 6. Cromatogramas de las fracciones separadas. A: MOSH. B: MOAH.

### Optimización de los métodos:

#### Método 1:

En este primer análisis se observa que faltan compuestos, tanto de MOSH (Figura 7. A) como de MOAH (Figura 7. B), y los que aparecen no se encuentran en la proporción que deberían, por lo que se sospecha que se han quedado retenidos en la columna de la primera etapa, por ello, se procede a analizar la “Muestra trabajo” obtenida en dicha primera etapa.

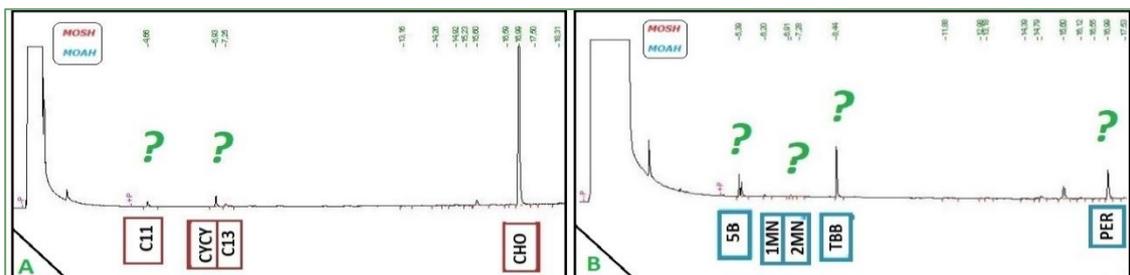


Figura 7. Cromatogramas del método 1 sin optimizar. A: elución MOSH. B: elución MOAH

En el análisis de la Muestra Trabajo deberían aparecer todos los compuestos, pero se observa que faltan 1MN y 2MN, que quedan retenidos en la primera columna, en la que se emplea n-hexano como eluyente (Figura 8. A). Tras esto, para confirmar que no se trata de volumen de eluyente sino de tipo de disolvente, se vuelve a analizar una “Muestra trabajo” recolectada con 60 ml de n-hexano (Figura 8. B): tras análisis se constata la ausencia de los compuestos 1MN y 2MN.

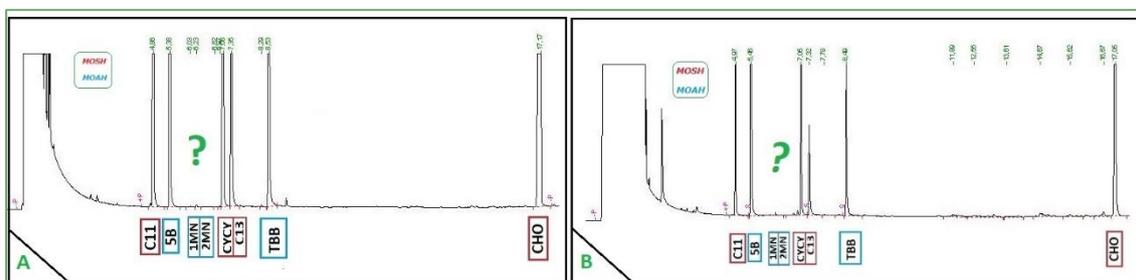


Figura 8. A: cromatograma de la Muestra Trabajo con elución de 40 ml n-hex. B: cromatograma de la Muestra Trabajo con elución de 60 ml n-hex.

Por ello se prueba otra elución, 2ª Muestra Trabajo, compuesta por la fase n-hexano (Figura 9. A) más la mezcla de solventes empleados para recolectar la fracción MOAH de la segunda etapa (2.5 ml n-hexano, 25 ml solución binaria y 10 ml solución terciaria), observándose que con esta mezcla de solventes si se recogen estos compuestos (Figura 9. B).

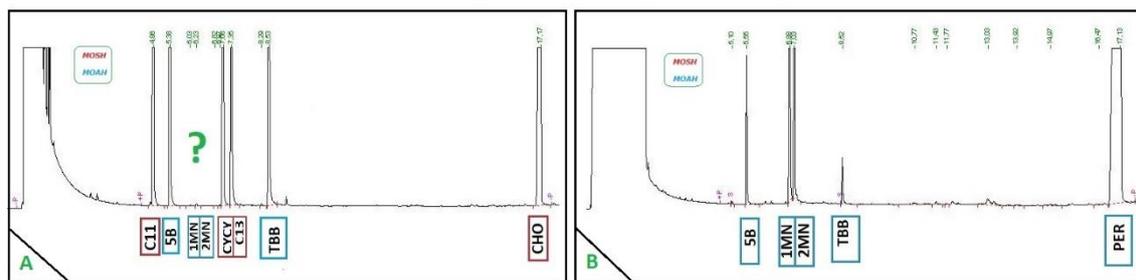


Figura 9. A: cromatograma de la Muestra Trabajo con elución de 40 ml n-hexano. B: cromatograma de la Muestra trabajo con elución de 2.5 ml n-hexano, 25 ml solución binaria y 10 ml solución terciaria.

Dado que se verifica que no se trata de volumen de disolvente sino de mezcla de estos y que este método comparte la misma columna de silica gel/nitrato de plata que el método 2, se decide descartar el método 1, pues la primera etapa de este no es optimizable en volumen de disolvente.

#### Método 2:

En el análisis del método sin optimizar, se encuentra que en la fracción de MOSH se ha recolectado también componentes de MOAH (5B, TBB y PER) (Figura 10. A), por lo que se debe reducir el volumen de eluyente. En la elución de MOAH, se recogen todos los estándares, pero en menor cantidad ya que han sido recolectados en la elución de MOSH (Figura 10. B). La optimización de los volúmenes finales del método son 12.5 ml de n-hexano para MOSH y 40 ml de solución binaria para MOAH (Figura 10. C y D).

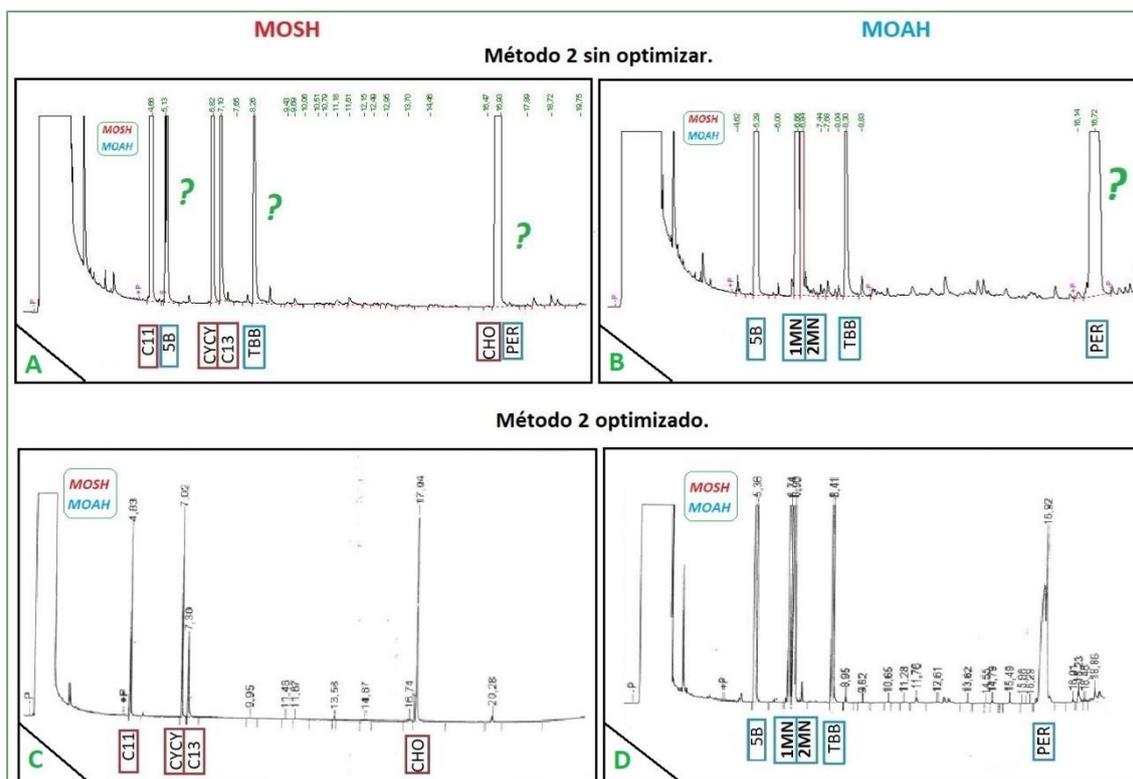


Figura 10. Cromatogramas del método 2. A y B: sin optimizar. C y D: optimizados. Izquierda: MOSH. Derecha: MOAH.

**Método 3:**

Tras la realización del método, se observa que en la elución de MOSH (Figura 11. A) se ha recolectado una pequeña cantidad de 5B, por lo que se debe disminuir el volumen para la OPTIMIZACIÓN. El análisis de elución de MOAH (Figura 11.B) revela, que, al comparar las áreas de los compuestos, hay una pequeña fracción de PER que se ha quedado retenida en la columna, por lo que la optimización de esta fracción consiste en aumentar el volumen de elución. La optimización de los volúmenes finales del método son 5.8 ml de elución para MOSH (3.8 ml n-hexano y 2 ml solución terciaria) y 12.5 ml solución terciaria de elución para MOAH (Figura 11. C y D).

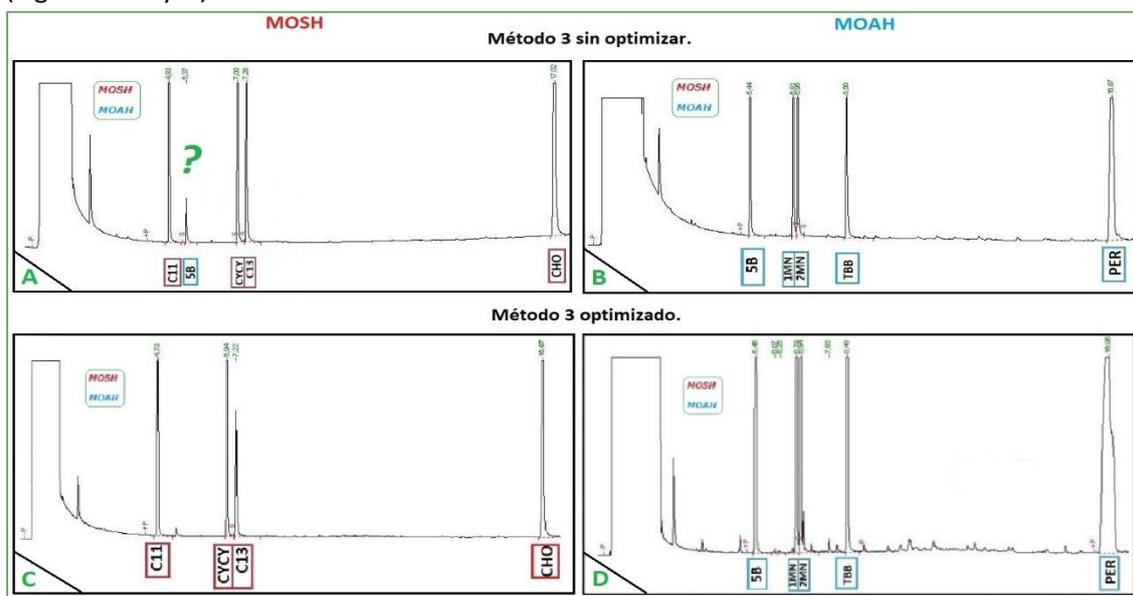


Figura 11. Cromatogramas del método 3. A y B: sin optimizar. C y D: optimizados. Izquierda: MOSH. Derecha: MOAH.

**Comparativa de los resultados de los distintos métodos de análisis:**

Los resultados de los análisis de las muestras objeto de estudio se recogen en las siguientes tablas (Tablas 4, 5 y 6) y en sus correspondientes cromatogramas (Figura 12, 13 y 14).

**Muestra 1:** En la tabla 4 y en la figura 12 se muestran los resultados correspondientes a la muestra de aceite de oliva virgen extra. Los resultados obtenidos en los métodos actuales (Figura 12. E y F) se encuentran dentro de los límites legislativos. Los resultados del método 2 y 3 son muy próximos entre sí, pero se obtiene mayor cantidad de MOSH con el método 2 (Figura 12. A), mientras que se obtiene mayor cantidad de MOAH con el método 3 (Figura 12. D); el método 2 estaría más próximo al método de validación en cuanto a valores.

Tabla 4. Resultados de los análisis realizados a la muestra 1.

AOVE				
INTERVALOS	MÉTODO VALIDACIÓN	MÉTODO 2	MÉTODO 3	MÉTODO ACTUAL
<b>MOSH (ppm)</b>				<b>HA (ppm)</b>
1	< 1	< 1	< 1	< 1
2	< 1	< 1	< 1	< 1
2'	6.60	< 1	< 1	< 1
3	22.10	4.43	< 1	14.37
TOTAL	25.20	-	2.20	15.37
<b>MOAH (ppm)</b>				<b>HAPs (ppb)</b>
TOTAL	< 1	< 1	3.16	2.82

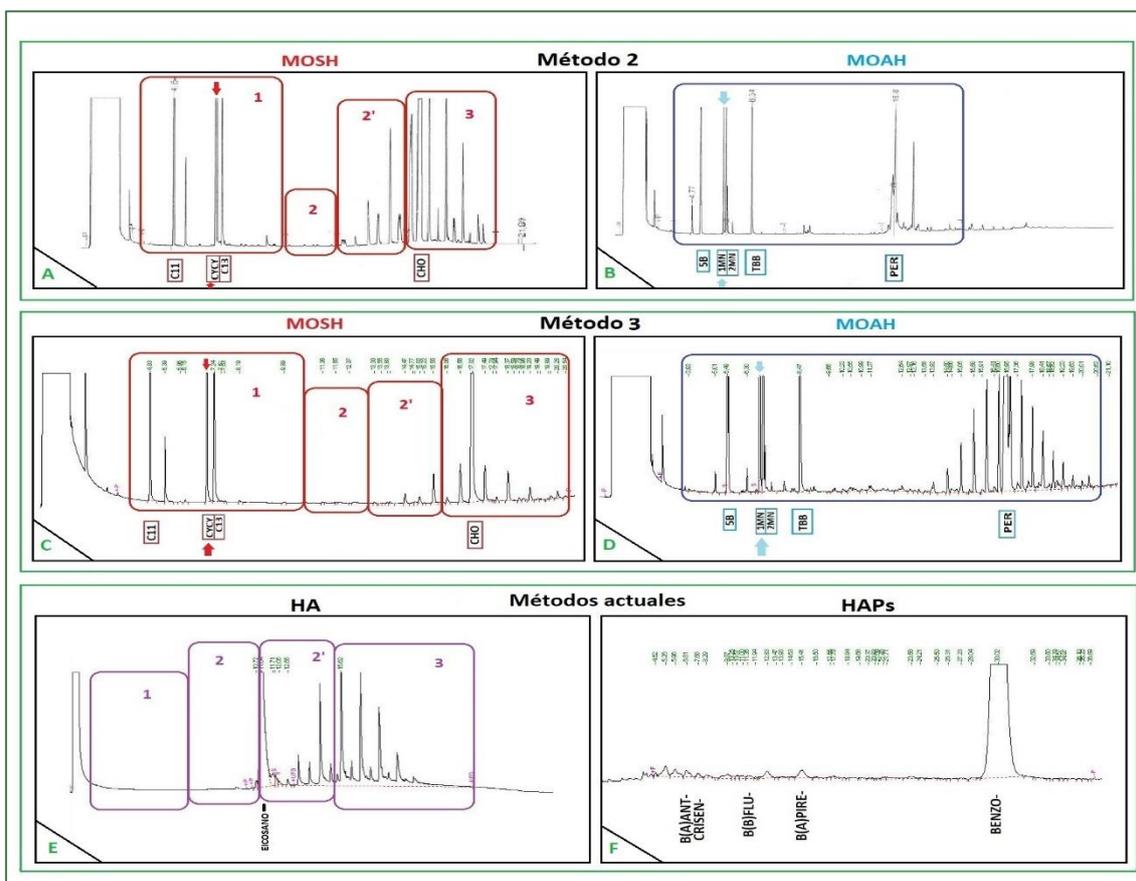


Figura 12. Cromatogramas AOVE.

**Muestra 2:** En la tabla 5 y en la figura 13 se muestran los resultados correspondientes a la muestra de aceite de oliva virgen. Los resultados obtenidos en los métodos actuales se encuentran dentro de los límites legislativos (Figura 13. E y F). Con el método 2 se obtienen valores menores para MOAH (Figura 13. B) y mayores para MOSH (Figura 13. A), mientras que se obtiene mayor cantidad de MOAH (Figura 13. D) y menor de MOSH (Figura 13. C) con el método 3; el método 2 estaría más próximo al método de validación en cuanto a valores.

Tabla 5. Resultados de los análisis realizados a la muestra 2.

AOV				
INTERVALOS	MÉTODO VALIDACIÓN	MÉTODO 2	MÉTODO 3	MÉTODO ACTUAL
<b>MOSH (ppm)</b>				<b>HA (ppm)</b>
1	< 1	< 1	1.39	2.32
2	< 1	< 1	< 1	4.41
3	6.30 ± 2.30	3.60	< 1	5.19
TOTAL	6.30	-	2.19	11.92
<b>MOAH (ppm)</b>				<b>HAPs (ppb)</b>
1	< 1	< 1	5.07	-
2	1.10 ± 0.53	< 1	2.19	-
TOTAL	-	< 1	7.26	1.28

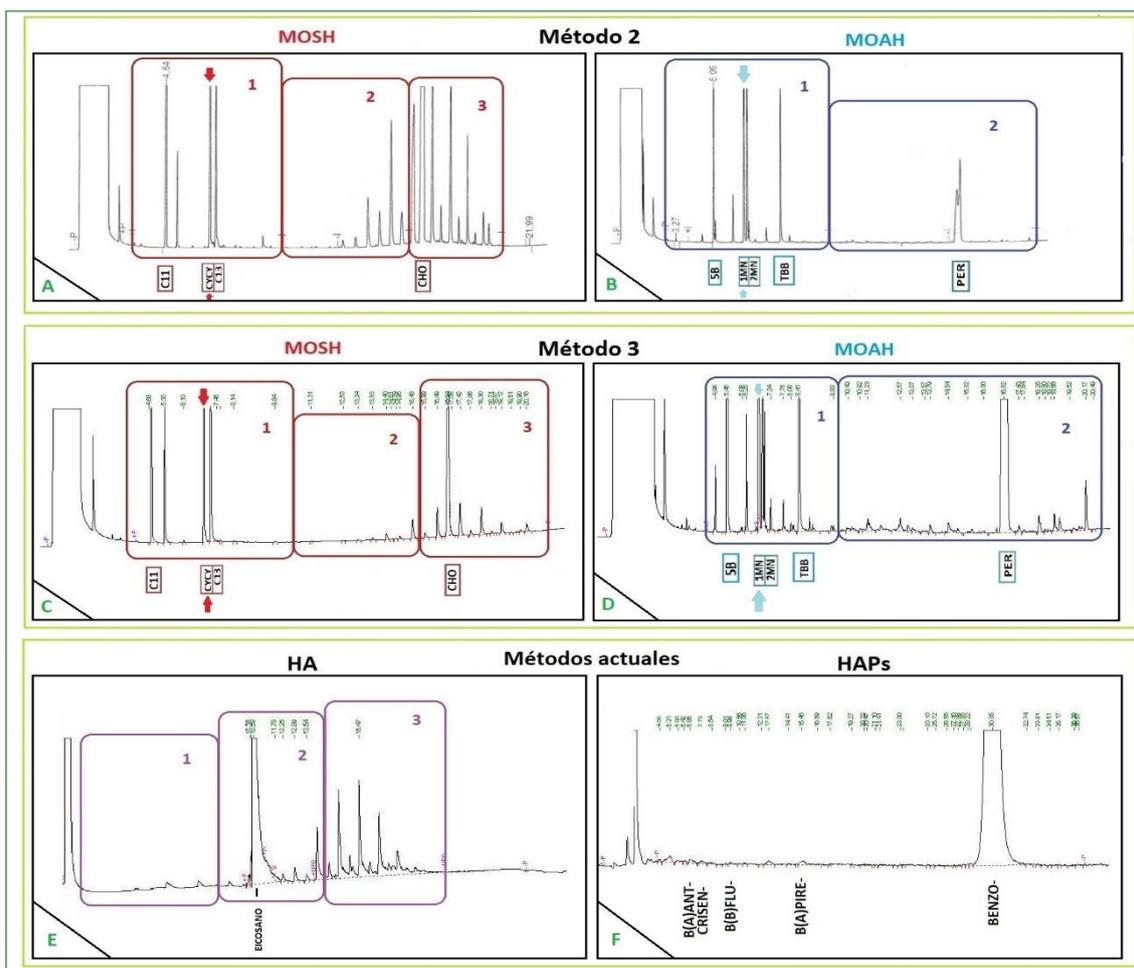


Figura 13. Cromatogramas AOV.

**Muestra 3:** En la tabla 6 y en la figura 14 se muestran los resultados correspondientes a la muestra de aceite de oliva refinado. Los resultados obtenidos en los métodos actuales se encuentran dentro de los límites legislativos (Figura 14. E y F). Con el método 2 se obtienen valores menores para MOAH (Figura 14. B) y mayores para MOSH (Figura 14. A), mientras que se obtiene mayor cantidad de MOAH (Figura 14. D) y menor de MOSH (Figura 14. C) con el método 3; el método 2 estaría más próximo al método de validación en cuanto a valores.

Tabla 6. Resultados de los análisis realizados a la muestra 3.

REF				
INTERVALOS	MÉTODO VALIDACIÓN	MÉTODO 2	MÉTODO 3	MÉTODO ACTUAL
<b>MOSH (ppm)</b>				<b>HA (ppm)</b>
1	< 1	< 1	< 1	< 1
2	< 1	< 1	1.59	3.55
3	7.50 ± 2.70	7.48	1.22	26.95
TOTAL	7.50	-	3.48	31.13
<b>MOAH (ppm)</b>				<b>HAPs (ppb)</b>
1	< 1	< 1	3.87	-
2	< 1	< 1	< 1	-
TOTAL	-	< 1	4.60	0.71

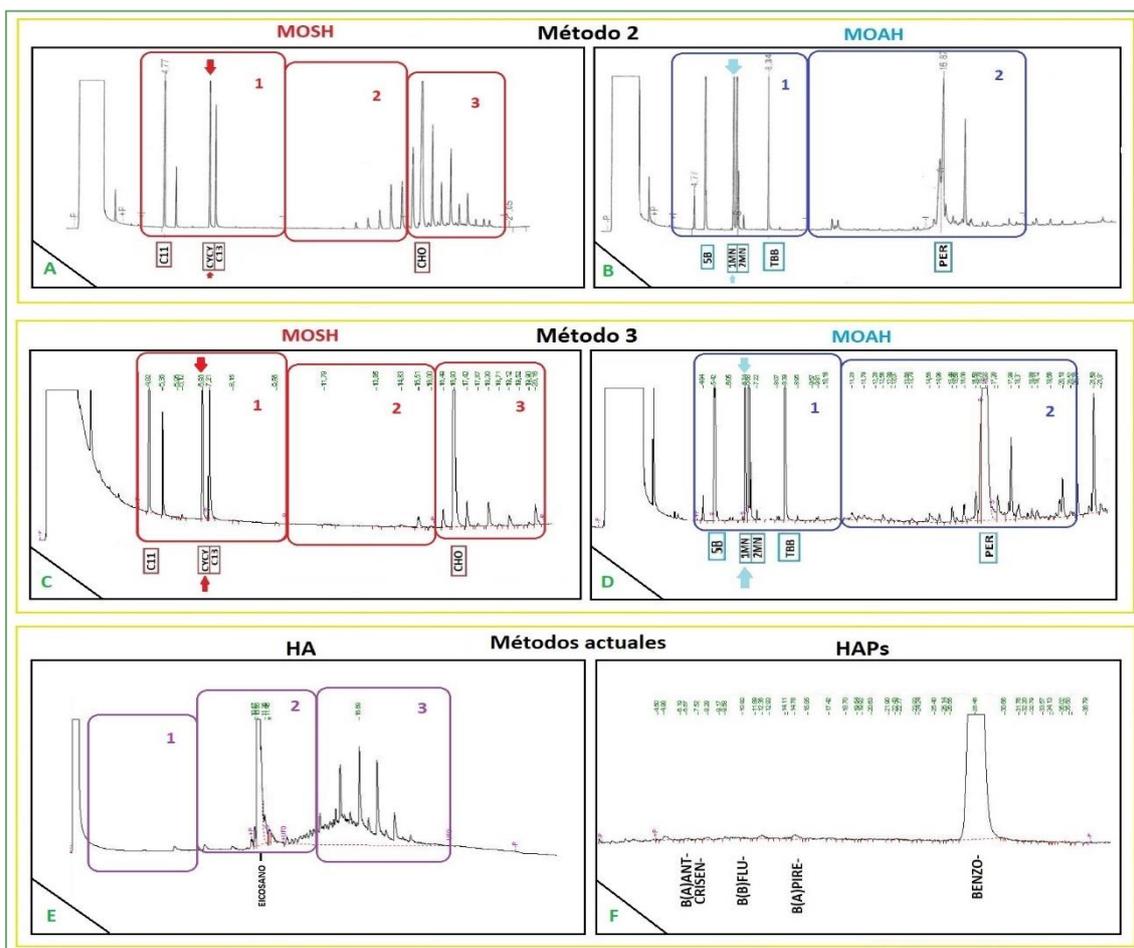


Figura 14. Cromatogramas REF.

De forma global, observando los datos de todas las muestras, se puede apreciar que los resultados del método 2 son más próximos a los del método de validación (Tablas 4, 5 y 6). Esto se puede deber a que, a mayor cantidad de plata, mayor sea la retención de interferencias. En un estudio de Moret et al. [17] donde se comparaba la sílica gel/nitrato de plata al 10% con sílica gel sin activar, la que tenía plata obtuvo mejor rendimiento en cuanto a retención de grasa y olefinas. En cuanto a la separación de MOSH y MOAH, en otro estudio de Moret et al. [18], se dedujo que el sílica gel/nitrato de plata al 10% retiene más a los aromáticos, pudiéndose llegar a comparar los resultados obtenidos con este tipo de relleno, junto a un programa rápido de temperatura del horno, con resultados obtenidos en el método on-line. Esto puede observarse también en los resultados del método 2. A pesar de esto, la preparación del método 3, tanto de la sílice como del procedimiento en sí, es más sencilla y no requiere de tanto tiempo como la del método 2, por lo que es un método más rápido.

Al comparar los datos obtenidos en los análisis de los métodos actuales con los datos de validación y los obtenidos en los de MOSH/MOAH se puede concluir que no se asemejan ni son comparables, aunque se encuentran dentro de los límites establecidos legislativamente. Esto quiere decir que se descarta la posibilidad de que los laboratorios externos, que han proporcionado los datos de validación, estén empleando estos métodos para la determinación de estos compuestos.

### Conclusiones

1. Se comparan tres métodos distintos en busca de una técnica analítica sencilla off-line que se pueda emplear en el laboratorio; uno de ellos (método 1) es descartado debido a que no se puede optimizar por volumen de disolvente, sino que habría que cambiar la mezcla de la elución en la primera columna, no siendo esta la optimización a desempeñar.
2. Aunque se validen estos dos métodos, porque se consiga la separación de los compuestos del multipatrón, la purificación de la muestra no es igual que con un método optimizado on-line, el cual está reconocido por EFSA (on-line HPLC-GC-FID) y cuyo coste es tremendamente elevado.
3. Tras observar los resultados se concluye que el método 2 ha obtenido resultados más próximos a los del método de validación. Aunque el método 3 es más rápido que el método 2 al necesitar menos tiempo en su realización. A pesar de ello, el método 2 sería un buen punto de partida para obtener un método rutinario para el laboratorio.
4. Los métodos actuales no se pueden asemejar ni comparar con los métodos de validación ni con los métodos para MOSH/MOAH, descartándose la posibilidad de que estos métodos hayan sido empleados para el análisis de estos compuestos.

### Propuestas

Una vía futura de investigación sería seguir evaluando el método 2 para corroborar con múltiples muestras que es un método óptimo para emplear rutinariamente, si se obtuviesen del mismo datos fiables. Además, estudiar la posibilidad de estudiar otro método off-line. Finalmente, esperar una reglamentación europea de niveles máximos permitidos.

## Bibliografía

- [1] EFSA (2012). Panel on Contaminants in the Food Chain (Contam). Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food. *EFSA Journal*, **10**, (6):2704. 185 pp. Doi: 10.2903/j.efsa.2012.2704
- [2] aesan.gob.es. Aceites minerales (Hidrocarburos alifáticos). Available from: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/laboratorios/subdetalle/Aceites\\_minerales\\_.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/laboratorios/subdetalle/Aceites_minerales_.htm)
- [3] ainia.es. Control de las contaminaciones por aceites minerales (MOH). José María Ferrer. Available from: <https://www.ainia.es/tecnoolimentalia/legislacion/recomendaciones-ue-para-un-mayor-control-de-las-contaminaciones-por-aceites-minerales-moh-en-alimentos-y-materiales-en-contacto-con-los-alimentos/>
- [4] Fiselier K, Grundböck F, Schön K, Kappenstein O, Pfaff K, Hutzler C, Luch A, Grob K. (2013). Development of a manual method for the determination of mineral oil in foods and paperboard. *Journal of Chromatography A*, **1271**, 192-200.
- [5] Lacoste, F. (2016). International validation of the determination of saturated hydrocarbon mineral oil in vegetable oils. *European Journal of Lipids Science*, **118**, 373-381. DOI: 10.1002/ejlt.201500134
- [6] Rovira M.M. (2019). Determinación de aceites minerales en aceite de oliva mediante extracción en fase sólida en combinación con cromatografía de gases-detector de ionización de la llama. Trabajo Fin de Grado en Química, Universidad de Almería.
- [7] Food Drink Europe. (2019). Caja de herramientas para prevenir la transferencia de Hidrocarburos de Aceites minerales no deseados en los alimentos.
- [8] Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR. Determination of hydrocarbons from mineral oil (MOSH & MOAH) or plastics (POSH & PAO) in packaging materials and dry foodstuffs by solid phase extraction and GC-FID.
- [9] Purcuso G, Barp L, Moret S. (2016). Determination of hydrocarbon contamination in food. A review. *Analytical Methods*, 2016, **8**, 5755-5772. DOI: 10.1039/c6ay00655h
- [10] Commission Recommendation (EU) 2017/84 of 16 January 2017 on the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and in materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Union, L 12/95-96 (17.1.2017).
- [11] Bratinova S, Hoekstra E (Editors). Guidance on sampling, analysis and data reporting for the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and food contact materials. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2019. ISBN: 978-92-76-00172-0. DOI: 10.2760/208879, JRC115694.
- [12] Bevan R, Harrison P.T.C., Jeffery B, Mitchell D. (2019). Evaluating the risk to humans from mineral oils in foods: Current state of the evidence. *Food and Chemical Toxicology*, **136** (2020) 110966, 1-14. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110966
- [13] Consejo Oleícola Internacional, COI. Determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH) in olive oils and olive pomace oils.
- [14] Sulpasso, M. (2016). Mosh and Moah Method: Separation on chromatographic column and injection into gas chromatograph (GC) with on-column injector and FID detector.
- [15] ISO (2015). ISO 17780:2015. Animal and vegetable fats and oils-Determination of aliphatic hydrocarbons in vegetable oils.
- [16] ISO (2005). ISO/CD 15302.2:2005. Animal and vegetable fats and oils-Determination of benzo[a]pyrene- Reversed-phase high performance liquid chromatography method.

[17] Moret S, Barp L, Grob K, Conte L, S. (2011). Optimised off-line SPE-GC-FID method for the determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) in vegetable oils. *Food Chemistry*, **129**, 1898-1903.

[18] Moret S, Barp L, Purcaro G, Conte L, S. (2012). Rapid and sensitive solid phase extraction-large volumen injection-gas chromatography for the análisis of mineral oil saturated and aromatic hydrocarbons in cardboard and dried foods. *Journal of Chromatography A*, **1243**, 1-5.

## Conclusiones / corolario

Lo más destacado de la estancia de prácticas se puede resumir en los siguientes ítems:

- Ejecutar análisis de caracterización de aceites.
- Instrucción como analista de laboratorio, donde prima la repetibilidad y la reproducibilidad.
- Relacionar diferentes contenidos de la formación académica en el ámbito laboral, pudiendo obtener una idea más amplia del sector.
- Completar los conocimientos adquiridos en la formación académica.
- Conocer una Refinería y sus labores dentro del Sector Agroalimentario.
- Favorecer la adquisición y mejora de competencias a nivel profesional.

## Agradecimientos

Al cerrar esta etapa, es inevitable no reflexionar sobre la misma, por ello agradecer a toda persona que me ha ayudado a afrontar esta formación. En primer lugar, y como tilda el dicho popular “*Es de bien nacidos, ser agradecidos*”, agradecer a mi familia y seres queridos por su apoyo, ayuda y amor en esta etapa, en especial a mis padres por tantas “idas y venidas” para que pudiera asistir tanto a clases como a la empresa donde he realizado mi estancia de prácticas. También a cada profesor que ha impartido clase en este Máster, por su dedicación y tiempo, especialmente al Prof. Dr. D. Rafael Gómez Díaz, mi Tutor Académico, por serlo desde el primer minuto. Finalmente dar las gracias al gran equipo del laboratorio de Qorteba, pues ha sido un placer conocerlos, tenerlos de maestros y de guías, por vuestra ayuda y paciencia, en especial a Victoria, por abrir, literalmente, las puertas de su casa para poder corregir y encaminar este trabajo.

## Bibliografía

COI (2006). Consejo Oleícola Internacional. Guía de gestión de la calidad de la industria del aceite de oliva: las refinerías. COI/T.33/Doc. N.º 2-2

DOCE (1991). Reglamento (CEE) N.º 2568/91 de la Comisión de 11 de julio de 1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. N.º L 248/1-83.

UE (2019). Reglamento de ejecución (UE) 2019/1604 de la Comisión de 27 de septiembre de 2019 por el que se modifica el Reglamento (CEE) N.º 2568/91 del relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. N.º L 250/1-222.

## Anexo I

### DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

(ISO 662:0216)

- Introducir placas de porcelana en la estufa a 105°C, con anterioridad y un tiempo mínimo de 12 horas.
- Sacar tantas cápsulas como sean necesarias y dejarlas enfriar 30 minutos en el desecador. Después, pesar cada cápsula vacía en la balanza de precisión y anotar el peso; este será “Peso vacío”.
- Añadir una cantidad de aceite a cada cápsula, entre 7-10 g, que le ocupe el fondo. Pesar y anotar; este será “Peso inicial”.
- Introducir de nuevo en la estufa 30 minutos y tras este tiempo, sacar al desecador para dejarla enfriar durante otros 30 minutos. Tras esto, pesar la cápsula y anotar el peso. Este proceso se realizará tantas veces como sea necesario hasta que la diferencia de peso entre una y otra pesada sea menor a 0,0008 g o hasta que en vez de disminuir, aumente el peso; cuando llegue este momento, anotar el “Peso final” y se acaba el análisis.

Es muy importante tener cuidado de no tocar la muestra, ya sea con las pinzas metálicas empleadas para extraer las cápsulas de la estufa o el guante o cualquier otro objeto.

El cálculo de la humedad se lleva a cabo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso Inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial} - \text{peso vacía}} \times 100 = \frac{\text{masa } H_2O}{\text{masa sólida}} \times 100$$

Además de este método, el oficial, se lleva a cabo el análisis de humedad de las muestras con un **Analizador Mettler Toledo**, siendo este proceso más rápido y con una manipulación cómoda de los resultados.

### DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS NO VOLÁTILES

(ISO 663:0217)

- Colocar un pesa sustancias de vidrio con tapa en la estufa, con un papel de filtro en su interior, al menos 6 horas, para eliminar totalmente la humedad.
- Pesar de 9-12 g de aceite en un vaso de precipitado y anotar dicho peso exactamente; este peso será “Peso aceite”.
- Agregar 100 ml de Éter de petróleo al vaso de precipitado con el aceite, agitar con una varilla de vidrio y dejar en reposo, tapado, durante 1 hora.
- Pesar el pesa sustancias con el papel de filtro y la tapa, tras sacarlo de la estufa y dejarlo enfriar en el desecador hasta que esté frío; anotar dicho peso, siendo este “Peso pesa sustancias inicial”.
- Pasada la hora de reposo, filtrar el contenido del vaso de precipitado, sin agitarlo, a través del papel de filtro que está colocado en un embudo de vidrio y éste en un Erlenmeyer. El vaso se enjuaga con éter y se vuelve a verter en el papel de filtro.

- Tras el filtrado, doblar el papel de filtro y lavarlo con pequeñas proporciones de éter hasta que quede exento de materia grasa, dejando evaporar al aire libre. Repetir el proceso hasta que se consiga dicho objetivo.
- Cuando el filtro esté completamente libre de materia grasa, terminar su evaporación en el interior del pesa sustancias junto con la tapa en la estufa a 100°C. Una vez pasados 30 minutos, sacar el conjunto y dejarlo enfriar en el desecador otros 30 minutos, para después pesarlo y anotar el peso. Repetir el proceso, de introducir en la estufa, dejar enfriar y pesar, hasta que la diferencia entre una pesada y la anterior sea menor que 0,008 gramos. El peso anota final será “Peso pesa sustancias final”.

El cálculo de las impurezas se lleva a cabo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Impurezas} = \frac{\text{Peso pesa sustancias final} - \text{Peso pesa sustancias inicial}}{\text{Peso aceite}} \times 100$$

Hay que tener presente que, si en el vaso de precipitado quedaran impurezas, se pesaría el vaso junto a las impurezas y posteriormente lavaríamos el vaso y volveríamos a pesar, calculando así las impurezas que quedan en el vaso; éstas habría que añadirselas al numerador de la ecuación.

Además, el éter de petróleo deja insolubles impurezas mecánicas (tierra, arena y residuos diversos), parte de ácidos oxidados libres y sus productos de polimerización, lactonas-jabones de cal, hidratos de carbono, materias nitrogenadas, determinadas resinas, materias minerales, y no disuelve más que parcialmente los jabones alcalinos, por lo que, según las impurezas consideradas, así se debe elegir el disolvente.

### **DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS**

*(Reglamento (CEE) N.º 2568/91.)*

- En un matraz redondo aforado de 10 ml, el cual se ha tarado, pesar 0,5 g de aceite.
- Llenar hasta el aforo con acetona, tapar el matraz y agitar vigorosamente.
- Verter un pequeño volumen en un vial de cromatografía e introducirlo en el Cromatógrafo de Líquidos para su análisis.

### **REVISIÓN DE FICHAS DE SEGURIDAD DE PRODUCTOS QUÍMICOS**

Revisión de la base de datos de la empresa sobre las fichas de seguridad de productos químicos, consistiendo la tarea en buscar las fichas en las diferentes empresas comercializadoras y constatar que están actualizadas en la base de datos. Si no fuera así, sustituirla por la más reciente, tanto de manera virtual como impresa

**DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MONOPALMITATO DE 2-GLICERILO POR  
CROMATOGRAFÍA DE GASES**

*(Reglamento (CEE) N.º 2568/91. COI/T.20/Doc. N.º 23)*

PREPARACIÓN DE LA COLUMNA:

- Poner en la columna unos 30 ml de disolvente. Pesar 25 g de gel de sílice 70-230 Mesh de Merck activada y formar una suspensión con aproximadamente 80 ml de disolvente e introducir en la columna. A continuación, agitar la columna.
- Abrir la llave de la columna hasta dejar 2 ml, desechando lo eluido.

CARGA DE MUESTRA:

- Pesar 1 g de aceite en un vasito y disolver en 10 ml de disolvente de desarrollo. Pasar por la columna, desechando hasta que llegue a la sílice.

ELUCIÓN:

- Eluir con 150 ml de mezcla de n-hexano: éter (87:13), ajustando el flujo a 2ml/min; debe tardar 60-70 minutos en eluirse todo el contenido. Recoger en un matraz.

EVAPORAR: Poner en el Rotavapor el matraz hasta obtener un residuo

HIDRÓLISIS CON LIPASA PANCREÁTICA:

- Pesar 0,1 g del residuo anterior y añadir por orden:
  - a) 2 ml de Tris-hidroxi-metilaminometano 1M (pH=8 con HCl).
  - b) 0,5 ml de solución de colato de sodio al 0,1%.
  - c) 0,2 ml de solución de cloruro de calcio al 22%.
  - Agitar bien tras cada adición y calentar levemente.
- Añadir 20 mg (0,02 g) de Lipasa pancreática de actividad 2-10 unidades / miligramos.
- Calentar 2 minutos exactos a 40°C y a continuación agitar enérgicamente en el Vórtex durante 1 minuto exacto.
- Añadir 1 ml de Éter dietílico, agitar y centrifugar (a 2600 rpm durante 5 minutos).

PREPARACIÓN DE LOS DERIVADOS SILIADOS:

- Tomar 100 µl de la solución de éter dietílico centrifugada (siendo ésta la fase superior que se encuentra por encima de la capa de lipasa) e introducirla en un matraz aforado en forma de corazón. Eliminar el disolvente, éter, con nitrógeno muy despacio.
- Añadir 200 µl de reactivo de sililación (Silan-Sterol-1), tapar inmediatamente y dejar en reposo durante 20 minutos.
- Adicionar n-hexano, siendo el volumen de 4 ml para aceites de oliva y 3 ml para aceites de girasol.

INYECCIÓN: Inyectar 1 µl de muestra en el Cromatógrafo de gases.

### **DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR (K) POR ESPECTROFOTOMETRÍA EN ULTRAVIOLETA (UV)**

*(Reglamento (CEE) N.º 2568/91. COI/T.20/Doc. N.º 19)*

- En un matraz aforado de 10 ml, previamente tarado, se pesa la muestra de aceite y se anota el peso, teniendo en cuenta que:

< 0,1 gramos en caso de OLIVA VIRGEN (aproximadamente 3 gotas).

< 0,03 gramos en caso de OLIVA REFINADO (aproximadamente 1 gota).

- Se enrasa con ciclohexano (por lo que se mide a  $\lambda = 232$  y  $270$  nm) y se agita. También puede usarse iso-octano; según el disolvente utilizado, se cambiaría la longitud de onda de medida.
- Se enciende el espectrofotómetro unos 20 minutos antes para que la lámpara se vaya calentando, llenando el interior de la cubeta de referencia de 1 cm con el disolvente.
- Se lava el tubo con disolvente y se comienza a medir, siendo primero el disolvente sólo para que nos reste su aportación (aunque sea mínima). A continuación, vamos introduciendo muestra a muestra. Cuando se termina, se vuelve a lavar con disolvente.
- El aparato nos mide la Absorbancia y calcula la K por la ley de BEER:

$$\Delta K = \frac{K_{270} - (K_{266} + K_{274})}{2}$$

### **RECONOCIMIENTO DE JABONES EN ACEITES REFINADOS**

*(UNE 55029:1959)*

Este análisis se lleva a cabo en aceites refinados cuya acidez sea inferior al 1%.

- Enjuagar cuidadosamente una probeta graduada de boca esmerilada de 25 ml con tapón, con agua destilada comercial varias veces y a continuación enjuagar (incluyendo el tapón también) con una disolución de acetona al 2% de agua.
- Añadir en la probeta unos 10 ml de la disolución de acetona al 2% y añadir 1 gota de disolución 0,1% de Azul de Bromofenol; la disolución debe quedar amarilla, si adquiere un matiz verdoso o azul repetir la operación.
- Añadir unos 10 ml de aceite, agitar y dejar decantar. La capa acetónica superior no debe presentar coloración azul, que revelaría la presencia de jabones.
- Preparación de la solución de Acetona al 2%: en una probeta de 1 litro, añadir 20 ml de agua destilada comercial y enrasar con acetona.
- Preparación de la disolución 0,1% de Azul de Bromofenol: pesar 0,1 g de Azul de Bromofenol y disolver en 100 ml de etanol.

### **DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS SATURADOS POR GC**

*(ISO 17780:2015. Animal and vegetable fats and oils-Determination of aliphatic hydrocarbons in vegetable oils)*

#### PREPARACIÓN DE LA COLUMNA:

- Pesar 18,5 g de gel de sílice 70-230 Mesh de Merck activada con nitrato de plata (al 10%) e introducir en la columna que previamente tiene 40 ml de n-Hexano, para, a continuación, agitar en el Vórtex muy despacio para eliminar todo el aire retenido en la sílice.
- Añadir 1 centímetro de arena de mar lavada.
- Abrir la llave de la columna para desechar disolvente.

LAVADO: Añadir 60 ml de n-hexano para eliminar impurezas y abrir la llave de la columna para desechar dicho disolvente.

#### CARGA DE MUESTRA:

- Pesar 1 g de aceite en un vasito y añadir 1 ml de Patrón interno (n-Eicosano) con una pipeta de doble aforo de 1 ml.
- Pasar por la columna y lavar el vasito con dos porciones de 1 ml de n-hexano cuando la muestra esté introducida en el relleno, desechando el contenido hasta que llegue a la sílice.

ELUCIÓN: Eluir con 55 ml de n-hexano y recoger en un matraz en forma de corazón.

EVAPORAR Y RECONSTITUIR: Evaporar en Rotavapor y reconstituir con 400 ml de n-heptano.

INYECCIÓN: En Cromatógrafo de gases.

#### PREPARACIÓN DE LA SÍLICE:

Por cada 30 g de sílice preparar una disolución acuosa de nitrato de plata para mezclar, añadiendo gota a gota, preparada con 3 g de nitrato de plata en 4 ml de agua, es decir, se prepara gel de sílice con nitrato de plata al 10%; es muy importante que, tras adicionar la disolución, se agite la sílice con un tiempo mínimo de 30 minutos y máximo de 2 horas, y se guarde en oscuridad por un periodo mínimo de 12 horas.

Dado que se requieren cerca de 20 g por cada columna, se prepara una cantidad mayor de sílice cada vez, por ejemplo, con una cantidad de 180 g, para la cual se requeriría una disolución de 24 ml de agua Millipore con 18 g de nitrato de plata.

**DETERMINACIÓN DE BENZOPIRENOS (Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos, HAPs)**  
(ISO/CD 15302.2:2005. *Animal and vegetable fats and oils-Determination of benzo[a]pyrene-Reversed-phase high performance liquid chromatography method*)

PREPARACIÓN DE LA COLUMNA:

- Pesar 22 g de óxido de alúmina activada de Merck activada en la columna llena de n-hexano más o menos  $\frac{3}{4}$  partes y añadir encima unos 3 centímetros de sulfato sódico anhidro.
- Abrir la llave de la columna, desechando el disolvente, hasta dejar 1 ml de n-hexano.

CARGA DE MUESTRA:

- Pesar 0,4 g de aceite en un vasito y disolver en 2 ml de n-hexano, para después adicionar 12 ml de Patrón interno (Benzoβcriseno).
- Pasar por la columna el contenido del vasito de precipitado y lavarlo con una porción de 1 ml de n-hexano, abriendo la columna y desechando el contenido.

LAVADO: Pasar 20 ml de n-hexano por la columna y desechar este disolvente.

ELUCIÓN: Eluir con 60 ml de n-hexano, abrir la llave de la columna y recoger todo en un matraz aforado con forma de corazón.

EVAPORAR Y RECONSTITUIR: Evaporar en el Rotavapor y reconstituir con 250 ml de THF:ACN (10:90 v/v).

INYECCIÓN: La inyección se lleva a cabo en Cromatógrafo de líquidos, cuyo bucle de inyección es de 20 ml y la fase móvil es ACN:H<sub>2</sub>O (95:5). La fase móvil puede variar en composición en función de la columna mejorada.

PREPARACIÓN DE LA SÍLICE: Pesar 180 g de óxido de alúmina y añadir 20 ml de agua Millipore, para después agitar durante 2 horas y reservar en la oscuridad 24 horas antes de usar. Hay que prestar atención, porque la sílice al entrar en contacto con la agua, se calienta, por lo que se debe introducir en un baño de agua al prepararla a modo de precaución.

**DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN FRÍO PARA REFINADOS**

(Reglamento (CEE) N.º 2568/91 . COI/T.20/Doc. Nº 34)

- En un vial de cristal con cierre de rosca, pesar 0,2 g de aceite, tras tararlo.
- Añadir 0,2 ml de KOH 2M en metanol al aceite y mover el contenido en el Vórtex (con el vial cerrado). Luego añadir 2 ml de n-heptano dentro del vial y volver a mover.
- Dejar reposar un poco hasta que se produzca la separación de las fases para coger un pequeño volumen de la fracción de arriba y depositarlo en el inserto de un vial para cromatografía, estando así preparado para la separación y cuantificación mediante un Cromatógrafo de gases.

### **DETERMINACIÓN DE CERAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES**

*(Reglamento (CEE) N.º 2568/91. COI/T.20/Doc. N.º 28)*

#### PREPARACIÓN DE LA COLUMNA

- Pesar 15 g de gel de sílice 70-230 Mesh de Merck y formar una suspensión con aproximadamente 40-50 ml de n-Hexano e introducir en la columna; AGITAR.
- Abrir la llave de la columna hasta dejar 1 mm de disolvente; DESECHAR.

#### CARGA DE MUESTRA

- Pesar 0,5 g de aceite en un vasito y disolver en 2 ml de n-hexano. Añadir 100 µl de Patrón interno (Laurilaraquadato o Araquadato de laurilo) y unas gotas de Sudán.
- Pasar por la columna y lavar el vasito con una porción de 2 ml de n-hexano; DESECHAR.

ELUCIÓN: Eluir con 180-200 ml de mezcla de n-hexano: éter (98:2) hasta que el indicador naranja llegue al final de la columna; RECOGER en un matraz.

EVAPORAR Y RECONSTITUIR: Con 2 ml de n-heptano.

INYECCIÓN: En Cromatógrafo de gases (1 µL).

PREPARACIÓN DE LA SÍLICE AL 2% DE HUMEDAD: Por ejemplo, pesar 210 g de sílice y mantener 4 horas en un horno a 500°C. Cuando esté fría pesar exactamente 196 g de sílice y añadir 4ml de agua Millipore; AGITAR (2h) y GUARDAR en oscuridad mínimo 12h.

PREPARACIÓN DEL INDICADOR DE SUDÁN AL 1%: Pesar 0,1 g de colorante y disolver en 100 ml de n-hexano (más fácil disolución).

PREPARACIÓN MEZCLA DE ELUCIÓN: En una probeta de litro mezclar 980 ml de n-hexano con 20 ml de Éter etílico.

### **DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN CALIENTE PARA ACEITES DE OLIVA VIRGEN EXTRA Y LAMPANTES**

*(Reglamento (CEE) N.º 2568/91.)*

- En matraz de 100 ml aforado, pesar 1 gramo de aceite, tras tararlo, y agregar 3-5 gránulos de piedra pómez.
- Añadir 25 ml de Metilato Sódico, llevar a ebullición y dejar hirviendo durante 15 minutos. Después añadir 30 ml de Metilato Ácido y contabilizar otros 15 minutos en ebullición. Pasado este tiempo, retirar y dejar enfriar.
- Una vez frío, añadir 5 ml de Éter de petróleo, agitar un poco y enrasar con salmuera.
- En un vial de cromatografía, añadir hasta cubrir la mitad con la fracción superior del matraz y añadir Éter de petróleo hasta llenarlo.
- Introducir la muestra en el Cromatógrafo.

**DETERMINACIÓN DE ESCUALENO EN MUESTRAS DE ÁCIDOS GRASOS**

*(Método interno)*

- Pesar  $0,2 \pm 0,001$  g de la muestra en un Matraz Erlenmeyer de 20 ml.
- Añadir 1 ml de patrón de escualeno al 10% con una pipeta de doble aforo.
- Añadir 10 ml de n-heptano, también con una pipeta de doble aforo.
- Tapar y agitar 30 segundos.
- Inyectar 1  $\mu$ L en el Cromatógrafo de Gases.

## Anexo II

### **DETERMINATION OF MINERAL OIL SATURATED HYDROCARBONS (MOSH) AND MINERAL OIL AROMATIC HYDROCARBONS (MOAH) IN OLIVE OILS AND OLIVE POMACE OILS. INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL, COI.**

#### **1. Scope**

This method enables the determination of the mineral oil saturated and aromatic hydrocarbon (MOSH and MOAH, respectively) content in olive oils and olive pomace oils. MOSH and MOAH are separated in two different fractions according to the presence/absence of unsaturation in the molecules. Within the MOSH fraction, n-alkanes will appear as sharp peaks sorted in increasing order of carbon-atom number, whereas paraffins, isoparaffins and naphthenes will elute forming a hump underneath. The MOAH fraction will appear (mainly) as a single hump within the same retention time rang as that of the MOSH portion. Peaks on top of it may indicate an excess of olefins and the need of epoxidation.

#### **2. Principle**

Addition of two groups of internal standards to the oil, then isolation of the fractions by column chromatography on deactivated silver-silica gel. Recovery of the fractions eluted under test conditions, and subsequent direct analysis by capillary column gas chromatography.

#### **3. Materials and Apparatus**

3.1 Usual laboratory glassware. Place the glassware in the muffle oven (3.8.) at 300 °C for 24 hours. Allow to cool and keep protected from any source of contamination prior to use.

3.2 Aluminum foil.

3.3 Glass columns for liquid chromatography, internal diameter 10.0 mm, length 40 cm, fitted with a suitable stop-cock.

3.4 Rubber rod.

3.5 Gas chromatograph for use with a capillary column. Equipped with a system for direct on-column injection comprising:

3.5.1 Thermostat-controlled oven with temperature programming.

3.5.2 Cold injector for on-column injection.

3.5.3 Flame-ionization detector (FID) and converter amplifier.

3.5.4 PC system through which gas chromatographic data are entered, to be utilized with the converter-amplifier.

3.5.5 Fused silica capillary column, 15 m length, 0.32 mm internal diameter, internally coated with liquid phase (e.g. DB1-TH) to a uniform thickness of 0.10 µm.

3.6 Micro-syringe for on-column injection, 10 µL, with a hardened needle.

3.7 Rotary evaporator.

3.8 Nitrogen concentrator.

3.9 Muffle oven.

3.10 Analytical balance,  $\pm 0.1$  mg accuracy.

3.11 Vortex.

3.12 Centrifuge.

#### 4. Reagents

4.1 Silica gel, 60-200  $\mu\text{g}$  (70-230 mesh)

4.2 Deactivated silica gel: Weigh 45 g silica gel in a 500-mL round-bottomed flask. Place the gel in the muffle oven (3.9) at 400  $^{\circ}\text{C}$  for 24 hours. Allow to cool.

4.3 Deactivated silver-silica gel, 60-200  $\mu\text{g}$  (70-230 mesh): Weigh 45 g deactivated silica gel in a 500-mL round-bottomed flask. Add 6 mL silver nitrate solution (4.10) dropping wisely with a Pasteur pipette. Shake vigorously. Cover the flask with aluminum foil (3.2) and put in a rotary evaporator (3.7) during 30 min at room temperature and atmospheric pressure, setting both the condenser and the evaporation flask horizontally. Let to stand during 12 h before use.

4.4 n-Hexane, for chromatography.

4.5 Dichloromethane (DCM), for chromatography.

4.6 Toluene, for chromatography.

4.7 Isooctane, for chromatography.

4.8 Anhydrous sodium sulfate.

4.9 Aqueous sodium carbonate solution at 10 %, w/w.

4.10 Silver nitrate solution, at 75 % (w/v) in distilled water.

4.11 Ternary mixture consisting of n-hexane:dichloromethane:toluene, at 75:20:5 (v/v/v)

4.12 Binary mixture consisting of n-hexane:dichloromethane, at 75:25 (v/v)

4.13 n-hexane:toluene mixture, at 50:50 (v/v)

4.14. Internal standard (IS) solutions for MOSH determination in n-hexane (4.4) in a way that the standard concentration in the sample is:

4.14.1 For n-decane (n-C10) standard, 50 ppm.

4.14.2 For cyclohexylcyclohexane (CyCy) standard, 50 ppm.

4.14.3 For n-tridecane (n-C13) standard, 25 ppm.

4.14.5 For n-tetracontane (n-C40) standard, 8 ppm.

4.15. IS solutions for MOAH determination in n-hexane:toluene, 50:50, v/v (4.13) in a way that the concentration of each of the standards in the sample is 10 ppm:

4.15.1 n-pentyl-benzene(5B) standard.

4.15.2 1-methylnaphtalene (1MN) standard.

4.15.3 2-methylnaphtalene (2MN) standard.

4.15.4 1,3,5-tri-tert-butyl benzene (TBB) standard.

4.15.5 Perylene (Per) standard.

4.16 Chloroperoxybenzoic acid (CPBA) solution in ethanol, at 20 %, w/w.

4.17 Gases: Carrier gas: hydrogen (or helium), pure, for gas chromatography.

Auxiliary gases: hydrogen, nitrogen, air, pure, for gas chromatography.

## 5. Procedure

### 5.1 Sample preparation.

Weigh exactly about 500 mg of the sample using the analytical balance (3.10) and add the suitable amount of internal standards (4.14. and 4.15.) depending on the expected hydrocarbon content, e.g. add the following quantities in the case of virgin olive oils: n-C10, n-C13, and CyCy around 300 µL each; Cho and n-C40 around 100 µL each; 5B, 1MN, 2MN, TBB, and Per around 50 µL each. Homogenize.

### 5.2. Epoxidation.

Sample preparation for matrices with high olefin content (refines olive pomace oil, refined olive oil, crude or refined oils other than olive oils)

In an Erlenmeyer flask prepare the sample as in 5.1. Add 600 µL n-hexane (4.4) and shake vigorously for 10 s. Add 500 µL of cool CPBA solution (4.16), and centrifuge at 1800 rpm for 15 minutes. Add 3 mL of the sodium carbonate solution, shake vigorously for 2 minutes, let at 4 °C for 5 min and centrifuge at 4000 rpm during 2 min (3.12). Keep the upper phase.

Evaporate the organic solvent under nitrogen (3.8) and use n-hexane (4.4) to get 1-2 mL final volume.

### 5.3 Preparation of the chromatography columns.

#### *5.3.1 Silica column.*

Suspend 7.5 g deactivated silica gel (4.2) in 20 mL n-hexane (4.4) and introduce it into a column (3.3) Allow to settle tapping the column gently with the aid of the rubber rod (3.4) and elute the excess of n-hexane.

#### *5.3.2 Silver-silica column.*

Suspend 1 g silver-silica gel (4.3) in n -hexane (4.4) and introduce it into the column (3.3) already containing n-hexane (4.4). Allow to settle spontaneously. Elute the solvent tapping the column gently with a rubber rod (3.4) to avoid bubble formation. Add 0.5 g anhydrous sodium sulfate (4.8). Suspend 6.5 g silica gel (4.2) in n-hexane (4.4) and introduce it into the same column (3.3) Allow to settle tapping the column gently with the aid of the rubber rod (3.4) and elute the excess of n-hexane. Wrap the lowest portion of the column (silver-silica gel packing) in the aluminum foil (3.2) to protect it from the light.

### 5.4 Sample cleaning and fractioning.

Transfer the prepared sample (5.1 or 5.2.) with the aid of two 1-mL portion of n-hexane (4.4) to the silica column (5.3.1)

Percolate 40 mL n-hexane (4.4) and collect it in a conical flask.

Evaporate the content of the conical flask in the rotary evaporator (3.7) till a final volume of 2 mL. This will constitute the working sample.

Percolate 5 mL of the binary mixture (4.12) through the prepared silver-silica chromatography column (5.3.2) Repeat with 15 mL n-hexane.

Transfer the above collected working sample with the aid of two 1-mL portion of n-hexane (4.4)

Allow the solvent to flow to 1 mm above the upper level of the silica gel and start the elution with a cadence of around 15 drops every 10 seconds:

Elute the saturated hydrocarbons (n-alkanes and MOSH) fraction by transferring 15.5 mL n-hexane (4.4)

Then elute the MOAH fraction using 2.5 mL hexane, 25 mL of the ternary mixture (4.11), and 10 mL of the binary blend (4.12), applied one after another. The retention time of perylene, which forms a yellow solution, is similar to that of the MOAH, therefore when

the colored stripe is at 1 cm from the bottom of the chromatographic column, elution has to be stopped.

Add 300  $\mu$ L isooctane (4.7) to each flask and evaporate them in a rotary evaporator (3.7) till the final volume is 300  $\mu$ L approximately. Transfer each residue to a gas chromatography vial.

#### 5.5 Operating conditions.

- Column: Oven temperature: initial at 40  $^{\circ}$ C (2 min) Rise at 5  $^{\circ}$ C/min till 50  $^{\circ}$ C (0 min) Rise at 15  $^{\circ}$ C/min till 350  $^{\circ}$ C (8 min)
- Hydrogen carrier gas: initial P at 67.8 kPa, 155 cm/sec. Constant flow at 9.7 mL/min.
- Amount injected: 2  $\mu$ L of the isooctane solution (5.4)
- Detector:
  - o Temperature: 350  $^{\circ}$ C.
  - o Hydrogen flow: 30 mL/min
  - o Air flow: 400 mL/min
  - o Constant column + make-up flow

These conditions may be modified to suit the characteristics of the column and the gas chromatograph in order to obtain satisfactory separations.

#### 5.6. Chromatogram integration.

- Draw the baseline as straight as possible; ideally, it will be horizontal up to the retention time of n-C35 (referred to MOSH fraction), fitting the lowest level to the lowest point of the chromatogram, i.e. approximately after the solvent front is eluted or just after the elution of the corresponding hump.
- Determine the vertical cuts (6) that limit the molecular mass fractions of interest and integrate them.
- Integrate the corresponding IS.

- Identify those compounds naturally occurring in food or migrated into it, but that do not belong to the mineral oil fraction. In the case of MOSH, this is determined by the area of the hump of the chromatogram, confined by the baseline and an upper contour line defined by the base line of the sharp peaks (n-alkanes from C12 to C35, centered at C25-C29, the odd numbered elements being the most abundant ones, and IS) standing on the hump.

The MOAH fraction is determined by the area of the hump of the chromatogram, confined by the baseline and an upper contour line defined by the base line of the sharp peaks (squalene and its isomerization products, carotenoids, etc., and internal standards) standing on the hump.

- Calculate the MOAH and MOAH fractions using the IS (application of response factors is not necessary)

### 5.7. Peak identification.

#### *5.7.1 n-alkanes and MOSH fraction*

n-C10 is added as a verification standard to check for volatile losses. The retention time of the n-C10 IS must be  $1.84 \pm 0.02$  min. CyCy is utilized as quantification standard. It must elute at  $5.74 \pm 0.02$  min.

n-C10 and CyCy areas must be similar. If n-C10 area is clearly smaller (more than 10 %) than that of CyCy, it will indicate n-C10 losses and/or CyCy coelution with a sample component.

All n-alkanes from n-C11 to n-C40 are sharp peaks easily identifiable by counting from a known one.

n-C13 is added as a second verification standard. It must elute at  $6.12 \pm 0.02$  min forming a characteristic and well resolved pair with CyCy. Only half amount of n-C13 is added to enhance the characteristics of the pair and make sure that the correct peak is taken for CyCy; n-C13 should have half the area of CyCy; a larger area may indicate that the sample already contained n-C13; a smaller area may suggest that something is coeluting with CyCy. n-C40 elutes almost at the end of the MOSH hump.

#### *5.7.2 MOAH fraction*

5B is utilized to check for volatile losses, specially MN; it elutes at  $3.83 \pm 0.03$  min. 1MN and 2MN form a closely eluted pair; they must show the same area, otherwise it will indicate that the largest one is coeluting with a component of the sample. In such case, the analysis should be repeated without these standards to check for coelutions. TBB indicates the beginning of the MOAH fraction, whereas Per elutes on top of it. TBB area should be similar to that of the 1- and 2-MN; a significant reduction may be the result of elution at the MOSH fraction.

The molecular mass distribution in the MOAH chromatogram correspond to that of the MOSH one. However, the MOAH eluted at the retention time of an n-alkane don not contain the same C-atom number. In this way:

- 15 C-atom methyl anthracenes are eluted near n-C21.
- The 16 C-atom pyrene elutes near n-C24.
- Chrysene (C18) elutes around n-C27.

## 6. Quantitative analysis and expression of results

MOSH concentrations are calculated on the basis of the area of CyCy.

From the toxicological point of view, the molecular mass fractions relevant for MOSH quantification are those outlined by the vertical cuts at n-C16 and n-C35. However, by means of the identification of the source of contaminations, the vertical cuts should be at n-C10, n-C17, n-C25, and n-C35 to end.

MOAH concentrations are calculated on the basis of the areas of 1- or 2-MN, whichever is smaller.

There is not relevant toxicological information on MOAH. The cuts are placed at n-C10, and at n-C17 to n-C35, at the same point as for the MOSH fraction.

The vertical cuts must always be positioned immediately after corresponding n-alkane (MOSH fraction)

## 7. Main critical points

- Precautions must be taken to avoid any contamination from the laboratory: operators should not wear any hand cream or makeup containing MOH. Glassware must be placed in the oven at 300 °C, over-night, before use. Solvents have to be concentrated and check for contaminations prior use.
- Evaporation of the volatile short chain hydrocarbons (in the C10–C50 range) is possible. It is recommended not to reach dryness during solvent evaporation.
- Lack of precision inherent to the double integrations necessary to subtract the upper-resolved peaks from the lower-unresolved humps is the main weakness of the method.

## 8. Supporting information

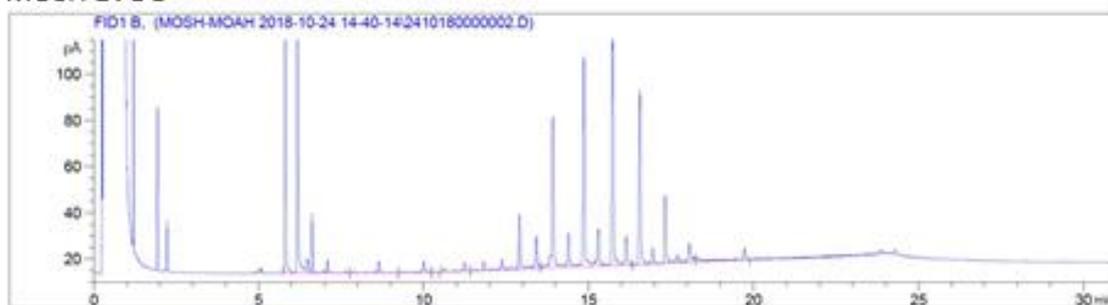
1) MOSH and MOAH mineral oils: validation of the method of analysis and occurrence on real samples. A. Luisi (Udine, June 2016)

2) Technical guidance on the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and food packaging materials (Ispra, October 2017)

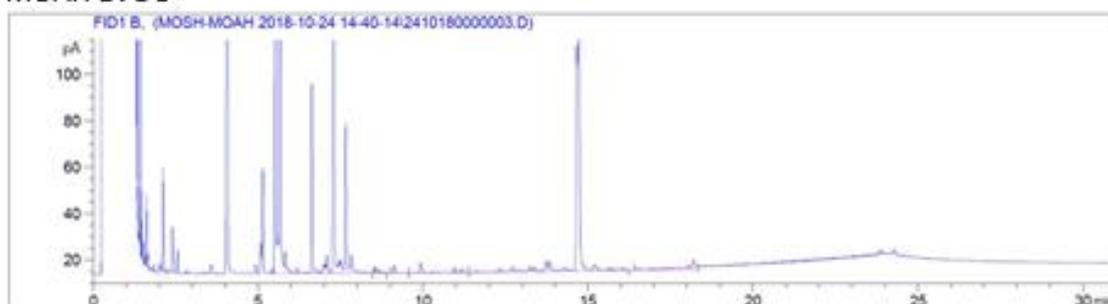
3) On-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 2: Migration from paperboard into dry foods: Interpretation of chromatograms. M. Biedermann, K. Grob, J. Chromatogr. A, 1255, 76-99, 2012.

## EXAMPLE CHROMATOGRAMS

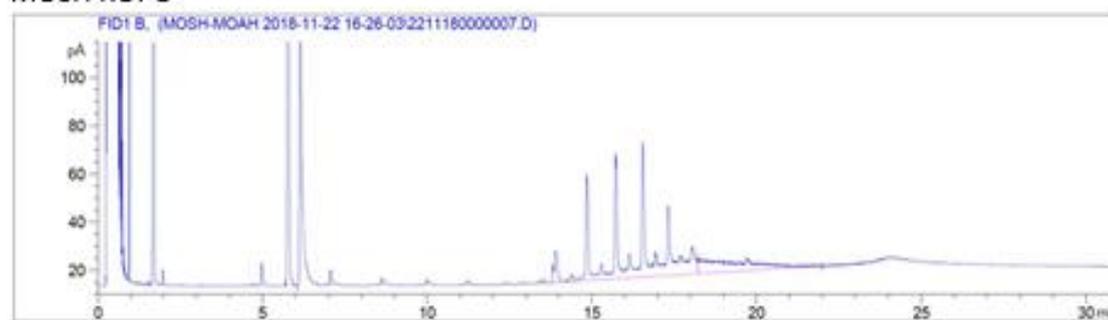
### MOSH EVOO



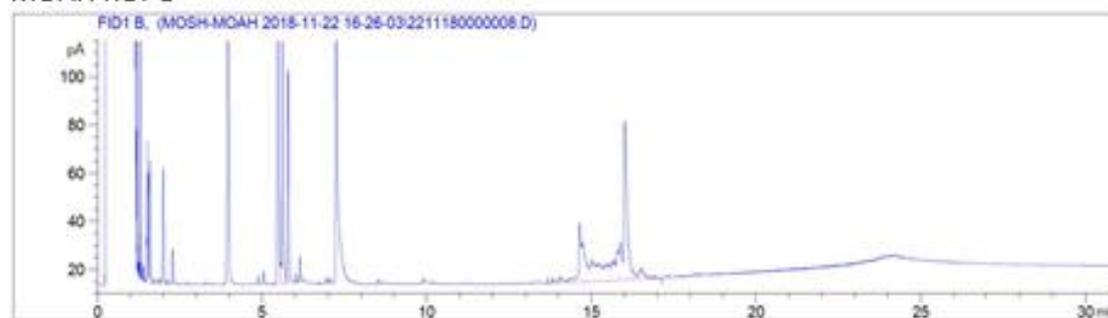
### MOAH EVOO



### MOSH ROPO



### MOAH ROPO



# MOSH AND MOAH METHOD

## SEPARATION ON CHROMATOGRAPHIC COLUMN AND INJECTION INTO GAS CHROMATOGRAPH (GC) WITH ON-COLUMN INJECTOR AND FID DETECTOR

UDINE – JUNE 7, 2016

Michele Sulpasso  
Chemiservice s.r.l.  
Monopoli (BA)  
Italy

UDINE June, 7 2016

6

In the preliminary stages, the method was applied and validated to analyze virgin olive oils. These oils have few interferences. Recently the application has been extended also to other vegetable oils, adding further purification stages.

The method uses a separation on chromatographic column (1 cm inner diameter) filled with 1 gram of silica gel with silver nitrate at 10% (in order to block squalene and carotenoids in MOAH fractions) + 6,5 grams of silica gel 60-200  $\mu\text{m}$  (70-230 mesh).

Insertion into column of 0,5 grams of oil after adding standards

Elution of MOSH with hexane

Elution of MOAH with a mix of hexane – dichloromethane (75%-25% v/v)

Concentration of the two fractions in rotavapor at controlled pressure and temperature until 300  $\mu\text{l}$

Injection on-column in GC-FID

UDINE June, 7 2016

7

### Chromatographic column

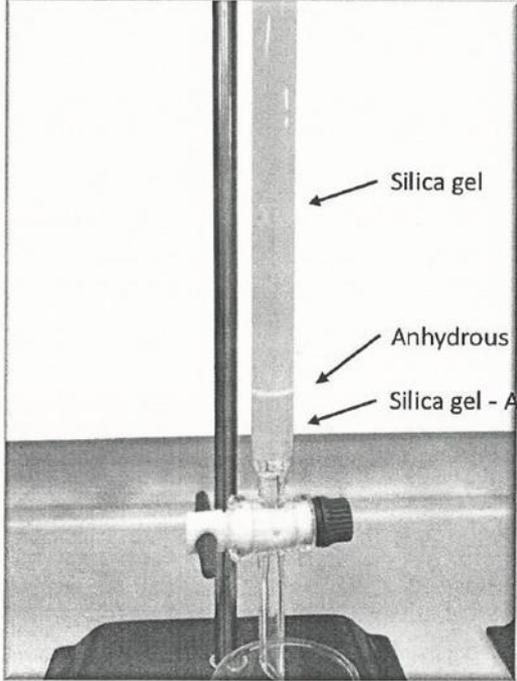
Inner diameter of the upper glass about 30 mm, height about 4 cm.

Column height about 400 mm.

Inner diameter 10 mm

Septum

Teflon tap



Silica gel

Anhydrous sodium sulfate

Silica gel - AgNO<sub>3</sub> 10%

UDINE June, 7 2016 9

### INTERNAL STANDARDS USED

M O S H	MIX 1	n-Decane ✗ Bicyclohexyl n-Tridecane	conc. 100 mg/L conc. 100 mg/L conc. 100 mg/L	in hexane
	MIX 2	<i>Elecano C20</i> 5-alpha-Cholestane n-Tetracontane ✗	conc. 40 mg/L conc. 40 mg/L	in hexane
M O A H	MIX 3	Pentylbenzene 1-Methyl-Naphthalene 2-Methyl-Naphthalene 1,3,5-Tri-tert-butylbenzene Perylene ✗	conc. 100 mg/L conc. 100 mg/L conc. 100 mg/L conc. 100 mg/L conc. 100 mg/L	in toluene-hexane 50-50 v/v

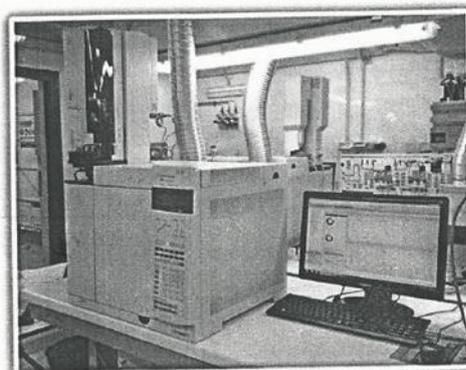
UDINE June, 7 2016 10

### Gas chromatography

For MOSH and MOAH analysis we used a GC Agilent 7890A with double column, 2 on-column injectors, 2 FID and 2 automatic injectors.

Columns used:  
J&W DB-1HT, length 15 m, diam. Int. 0,32 mm, film thickness 0,10  $\mu\text{m}$ .

Software: GC ChemStation Agilent



Instrumental conditions:

Carrier: Hydrogen (pressure 70 kPa, linear speed 150 cm/sec a 40°C)

T detectors: 350°C

Program of oven temperature:

Starting T = 40 °C, isotherm of 2 minutes, increase of 5 °C/min until 50 °C, isotherm of 0 min, increase of 15 °C/min until 350 °C, isotherm of 8 min, cooling at 40 °C.

11

### A PROCEDURE

### OILS WITHOUT BIG INTERFERENCES – ANALYSIS CARRYING OUT

In a 10 ml vial, weigh 0,5 grams of oil, add internal standards, 250  $\mu\text{l}$  of MIX 1 + 100  $\mu\text{l}$  of MIX 2 + 50  $\mu\text{l}$  of MIX 3, add 1 ml of hexane. Mix everything well

The quantity added of internal standard was equivalent to:

20 mg/kg for MOSH

10 mg/kg for MOAH

Prepare the chromatographic column inserting 1 gram of silica gel at silver nitrate (10%) using about 10 ml of hexane, pack and add 0,5 grams of hanydrous sodium sulfate. Insert 6,5 grams of silica gel using about 20 ml of hexane, pack well the stationary phase.

Wash the column: add 5 ml of mix hexane-dichloromethane (75-25 v/v) and elute, add 5 ml of hexane and elute, add 10 ml of hexane and elute, discard eluate every time.

UDINE June, 7 2016

12

Insert the oil with standards into column, discarding eluate.  
 Wash the vial with 1 ml of hexane, insert into column, elute discarding eluate.  
 Add 1 ml into column letting the oil flow on sides (to bring all oil into silica gel), elute discarding eluate.

Add 18 ml of hexane and recover the fraction of MOSH in a 50 ml flask with emery neck.

Add 25 ml of a mix hexane-dichloromethane (75%-25% v/v) and recover the fraction of MOAH in a 50 ml flask with emery neck. All MOAH are recovered if the yellow stripe due to the presence of the internal standard (Perylene) is completely eluted. *reapare*

Add 300 µl of isooctane (to avoid the evaporation of volatile compounds) to two eluted fractions and concentrate in Rotavapor at pressure  $\geq 260$  mbar and temperature  $\leq 40^\circ\text{C}$  until 300 µl. Insert with a syringe the concentrated fractions into two vials with conical insert. *cut here*

Inject 2 µl both for MOSH and MOAH in GC-FID.

13

### OBSERVATION

Since we do not use precolumn for Retention-gap in GC, we can inject 2 µl without having problems of separations.

This means that, the contents of MOSH and MOAH being equal, with this method a smaller quantity is injected than using online method; for example, for 1 mg/kg of MOSH or MOAH:

Online method-HPLC-GC-FID:	15 ng of MOSH or MOAH
Manual method:	2,5 ng of MOSH or MOAH

For this reason, the trend of the baseline due to the increase in temperature affects much the result of analysis.

We solved the problem and achieved very good results deducting the baseline obtained by injection of 2 µl of solvent (hexane) from the chromatogram obtained injecting the fractions of MOSH and MOAH. The found values are perfectly repeatable and in line with the results obtained using the online method-HPLC-GC.

UDINE June, 7 2016

14

## DETERMINACIÓN MOSH MOAH

**Introducción**

Los hidrocarburos minerales son unos de los principales contaminantes de los alimentos, consiste en una mezcla compleja de diferentes hidrocarburos, Mosh (parafinas=alcanos de cadena abierta y naftenos= hidrocarburos cíclicos con al menos un anillo saturado) y Moah (hidrocarburos aromáticos altamente alquilados con gran números de isómeros)

Los alcanos son apolares, por lo que se disuelven en disolventes orgánicos apolares o débilmente polares. Se dice que son hidrofóbicos (repelen el agua) ya que no se disuelven en agua. Los alcanos son casi totalmente insolubles en agua debido a su baja polaridad y a su incapacidad para formar enlaces con el hidrógeno.

Los hidrocarburos aromáticos sustituidos, debido a sus enlaces resonantes presentan cierta polaridad con respecto a los anteriores.

Para separar ambos compuestos necesitamos una sílice que retenga los Moah, mientras que los Mosh pasen. Cambiando la fase móvil recuperamos los Moah retenidos. Para ello la sílice debe tener cierta polaridad, lo más parecida posible a la de los Moah

**Procedimiento de limpieza del material de laboratorio:**

1er lavado: Acetona 9 :1 agua

2º lavado: Acetona

3er lavado: Hexano

Guardar el material en un recipiente cubierto con papel de aluminio.

**PREPARACIÓN SÍLICE MOSH-MOAH****PREPARACIÓN SÍLICE sílica gel/nitrato de plata 0.3%**

**Tomar 66.5g de sílice activada + 33.5g de sílice /nitrato de plata 1% preparadas previamente de la siguiente forma:**

- **Sílica gel 60 activada:**

300g sílice-----400°C -----24h en la mufla

- **Preparación de sílica gel / nitrato de plata 1%:**

Disolver 0.5g de nitrato de plata en 50ml agua, añadir la solución a 49.5g de sílice sin activar. En un matraz redondo opaco.

Paso 1:-----70°C-----1h

Paso 2:-----80°C-----1h

Paso 3:-----90°C-----12h

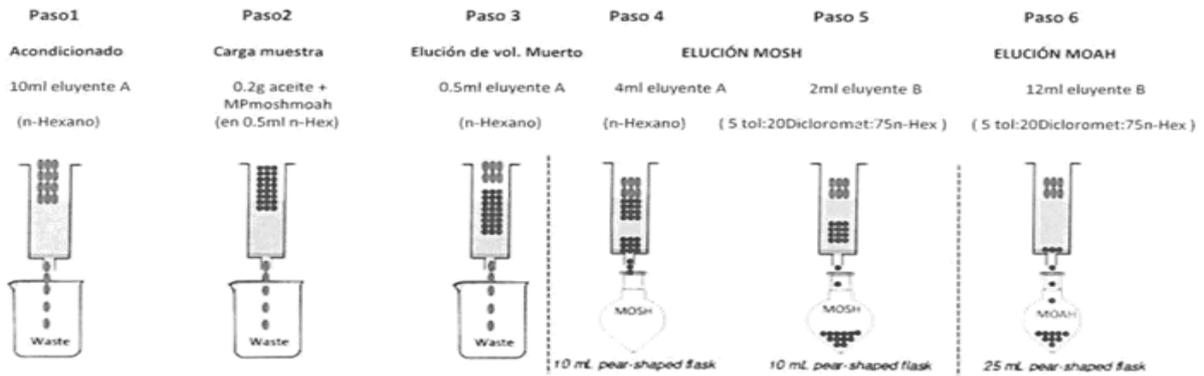
(La sílice puede durar almacenada durante 1 año sin problemas)

DETERMINACIÓN MOSH MOAH



**PREPARACIÓN COLUMNA**

Pasar a la columna de vidrio 3g de la mezcla de silica gel/nitrato de plata 0.3% en papilla con unos 10-15ml n-hex.



- Añadir a la fracción MOSH 270µl de Tolueno previamente purificado(pasado por columna de sílice)
- Rotaevaporar cada fracción a 55°C durante 3min entre 520-530mbar y de 3-4min a 350-360mbar

**MÉTODO:**

Oven Ramp RAMPA DEL HORNO	Rate VELOCIDAD °C/min	Temp TEMPERATURA °C	Hold MANTENIMIENTO °T(min)
Initial	0	75	9
1	22	240	0
2	30	350	12
3	0	0	0

COLUMNA: Columna capilar de vidrio o sílice fundida, de 10 a 15 m de longitud y de 0,32 mm de diámetro interior, recubierta interiormente de dimetil polisiloxano al 100 %, con un espesor de entre 0,10 µm, que pueda utilizarse a 400 °C.

Duración del análisis: 33.2min  
 Muestra inyectada: 50µl  
 T<sup>o</sup>máx: 400°C  
 Flujo: 2.8 ml/min - 3.5 Psi de H<sub>2</sub>  
 Hidrogeno: 40 ml/min  
 Aire: 450 ml/min  
 FID: 365°C