

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN DE FLUJO Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO OLEICO EN UN HIDROLIZADO DE MÚSCULO

Muñoz, R.¹, Vilaró, F.², Eras, J.³ Estany, J.¹ y Tor, M.¹

¹Departament de Producció Animal. ² Serveis Científico-tècnics. ³Departament de Química. Universitat de Lleida. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198. Lleida.

Rebeca@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

Tanto la cantidad como la calidad de la grasa son esenciales para una buena dieta (Williams, 2000). Se ha demostrado que los ácidos grasos monoinsaturados, y el ácido oleico en particular, tienen propiedades cardiosaludables, ya que aceleran la reducción del nivel de lipoproteínas de baja densidad tras las comidas (Jackson et al., 2005). Por ello, cada vez hay más interés por modificar la composición de los lípidos de los alimentos con fines nutritivos. En el caso de la carne de cerdo, además, dado que el contenido de ácido oleico se relaciona más estrechamente con la grasa intramuscular que con la grasa subcutánea (Reixach, 2008), el contenido de ácido oleico en músculo podría ser un buen criterio de selección para mejorar tanto la calidad como el contenido de grasa intramuscular. Ello sólo es posible si se dispone de un método de determinación del contenido de oleico en carne que sea de fácil uso. En este estudio se presentan los resultados preliminares para el desarrollo de un método de cuantificación del ácido oleico en músculo, con gran capacidad de trabajo, y que sea rápido y económico. El método utiliza un sistema de inyección de flujo (FIA) acoplado a un espectrómetro de masas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para desarrollar el nuevo método se utilizaron diez muestras de músculo *gluteus medius* de cerdos Duroc. Las muestras a 24 horas *postmortem* fueron envasadas al vacío y conservadas a -40° C. Después de eliminar el tejido graso y el tejido conectivo se picaron y homogeneizaron. Para la saponificación de los ácidos grasos se empleó KOH al 85% (Panreac, Spain) en metanol (Merck, Germany). Para la hidrólisis y extracción de los ácidos grasos se ha seguido el protocolo descrito por Aldai et al. (2006), utilizando como patrón interno 0.2 mg de tripentadecanoína. El sistema utilizado es un módulo de separación Waters Alliance 2690 acoplado a un espectrómetro de masas Micromass ZMD 2000MS. Se empleó un sistema de ionización por electrospray con registro en negativo, con voltaje capilar de 2KV, un voltaje de cono de 10 V, y un voltaje al extractor de 3V. El flujo de inyección fue de 0.3 mL/min, la temperatura de desolvatación de 250°C y el flujo del gas N₂ 400 L/h. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo y agua (92:8, v/v) con 0.01% de amoniaco. Para la caracterización de cada ácido graso se registró en modo scan en el intervalo 200-300 m/z. Para el desarrollo cuantitativo del método se utilizó el modo de registro SIR (Single Ion Recording) con un canal para el analito a determinar y un canal para el patrón interno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha comprobado que en un espectrómetro de masas y mediante la ionización por electrospray se produce la ionización de los ácidos grasos libres en su forma [M-H]⁻ (Figura 1). Tal como se puede ver en la Tabla 1, en el caso de la carne de cerdo y utilizando un canal de registro para cada ácido graso, es posible detectar por separado todos los ácidos grasos mayoritarios, sin que se produzcan solapamientos entre las señales de cada uno de ellos. Ello supone la posibilidad de analizar una mezcla, suprimiendo la fase de separación cromatográfica previa, que utilizan los métodos de análisis convencionales. Puesto que se envía directamente la mezcla al detector se logra un tiempo de análisis de menos de un minuto, lo que debería permitir el análisis

de grandes lotes de muestras en periodos cortos de tiempo. Se ha iniciado el desarrollo de un método cuantitativo para el ácido oleico mediante este sistema y se han establecido los límites de detección y cuantificación en 5,3 $\mu\text{g/mL}$ y 6,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Por otro lado se ha demostrado la linealidad de la curva de respuesta, en un rango que abarca sobradamente la variabilidad de la concentración del ácido oleico en el músculo (Figura 2). Se ha determinado la precisión de la metodología realizando tres repeticiones técnicas en 10 muestras de carne distintas, obteniéndose un coeficiente de variación medio del 4,4%. A la espera de realizar la validación cruzada del método con la técnica convencional de cromatografía de gases en columna capilar, se puede lanzar la hipótesis de que, con esta metodología, podría ser posible el análisis cuantitativo del ácido oleico en un hidrolizado de carne en menos de un minuto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldai, N., Osoro, K., Barrón, L.J.R y Nájera, A. 2006. J. Chroma. A 1110: 133-139. • Gosetti, G., Mazzucco, E., Gianotti, V., Polati, S. y Gennaro, M.C. 2007. J. Chroma. A 1149: 151-157. • Jackson, K.G., Wolstencroft, E.J., Bateman, P.A., Yaqoob, P., y Williams, C.M. 2005. Am. J. Clin. Nutr. 81: 25-34. • Reixach, J. 2008. Diploma de estudios avanzados. Universitat de Lleida. • Williams, C.M. 2000. Ann. Zootech. 49: 165-180.

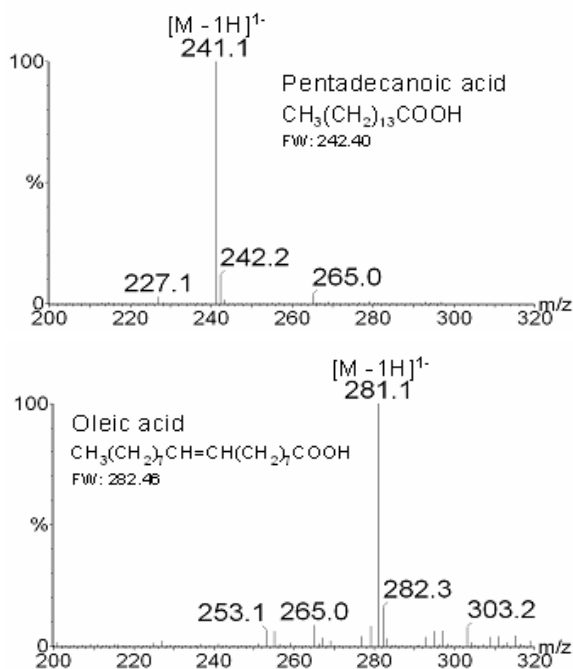


Figura 1. Espectro de masas de los ácidos grasos pentadecanoico y oleico, con un voltaje capilar de 2.7 KV y de cono de 30 V.

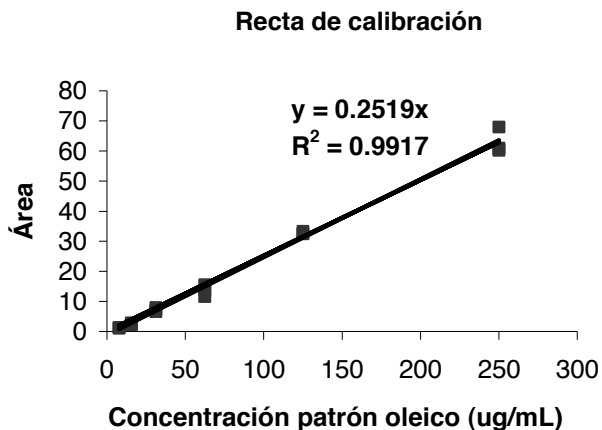


Figura 2. Recta de respuesta para el ácido oleico.

Tabla 1. Valores m/z registrados de los ácidos grasos mayoritarios en la carne de cerdo.

C14:0	C15:0	C16:0	C18:0	C16:1	C18:1	C20:0	C18:2	C20:4	C18:3
227.1	241.1	255.1	283.2	253.1	281.1	311.2	279.2	303.2	277.1

Agradecimientos: Trabajo financiado mediante el proyecto MEC AGL2006-01243. Agradecemos a Teresa Giró, Anna Naco su ayuda en los análisis de laboratorio.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINING OLEIC ACID CONTENT IN MEAT USING FLOW INJECTION ANALISYS/MASS SPECTROMETRY

ABSTRACT. This study aims at developing a new method for determining oleic acid content in fresh meat using flow injection and tandem mass spectrometry. Fat hydrolysis and fatty acid extraction was performed by hot saponification. Fatty acid characterization was made by full data acquisition over the range m/z 200-300. Quantitation was based on the most abundant ion of each fatty acid, which was quantified by Single Ion Recording (SIR) mode. The detection and quantitation limits for oleic acid were 5.3 and 6.5 $\mu\text{l/mL}$, respectively. The method proved to be linear within 0 and 259 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: oleic acid determination, FIA/MS method, intramuscular fat