

Comunicación Breve

Control de pigmentos clorofílicos y carotenoides por HPLC en el aceite de oliva virgen.

Por B. Gandul Rojas, L. Gallardo Guerrero, J. Garrido Fernández y M.I. Mínguez Mosquera.

Instituto de la Grasa y sus Derivados (C.S.I.C.)
Avda. Padre García Tejero, 4. 41012 - Sevilla.

RESUMEN

Control de pigmentos clorofílicos y carotenoides por HPLC en el aceite de oliva virgen.

El uso de columnas de extracción en fase sólida (EFS) de octadecyl (C_{18}) para obtener un extracto de pigmentos exento de materia grasa en combinación con la HPLC en fase reversa de pares iónicos, permite la separación de clorofilas y derivados, carotenos, xantofilas y complejos metaloclorofílicos en un tiempo máximo de una hora.

PALABRAS-CLAVE: Aceite de oliva virgen - Carotenoide (pigmento) - Clorofila (pigmento) - Complejo metaloclorofílico - Cromatografía líquida de alta eficacia.

SUMMARY

Control of chlorophyllic and carotenoid pigments by HPLC in virgin olive oil.

The use of solid phase extraction columns of octadecyl (C_{18}) to get a fat free pigment extract in combination with reversed phase ion pair HPLC permits the separation of chlorophylls and its derivatives, carotenoids, xanthophylls and metalochlorophyllic complexes in a maximum period of one hour.

KEY-WORDS: Carotenoid (pigment) - Chlorophyll (pigment) - High performance liquid chromatography - Metalochlorophyllic complex - Virgin olive Oil.

1. INTRODUCCION

Por estudios anteriores (1) (2) se conoce que la composición clorofílica y carotenoide del aceite de oliva virgen está mediatizada por el grado de madurez en que se recolectan los frutos, tiempo de permanencia en fábrica y condiciones más o menos drásticas del proceso de extracción. Los frutos maduros y sanos recién cogidos del árbol poseen cualitativamente los mismos pigmentos cloroplásticos que cuando están verdes. Al avanzar la maduración el contenido en pigmentos decrece, desapareciendo la fracción clorofílica más rápidamente que la carotenoide. Así mismo, durante el proceso de extracción se ha detectado una sensible pérdida de pigmentos que afecta mayoritariamente a componentes clorofílicos (3).

Al ser el aceite de oliva virgen, un producto natural cuyo color depende exclusivamente de compuestos biológicos como son los pigmentos clorofílicos y carotenoides, una vez identificados y valorados indi-

vidualmente surge la posibilidad de relacionar el color del aceite con el contenido y clase de pigmentos presentes en el mismo. Este control puede suministrar información acerca de la calidad del aceite en cuestión (4).

En el presente estudio se facilita un método rápido de control de pigmentos clorofílicos y carotenoides presentes normalmente en el aceite de oliva virgen así como la detección de los complejos metaloclorofílicos que suponen un color añadido y pueden inducir a error en la valoración de la calidad de un aceite virgen.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Obtención de patrones.

Clorofila "a" y clorofila "b" se aíslan de hojas frescas de espinacas mediante una extracción de los pigmentos con acetona y posterior separación de los mismos por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice (5) (6).

Feofitina "a" y feofitina "b" se preparan a partir de las respectivas soluciones puras de clorofilas en éter etílico, por acidificación con 2-3 gotas de HCl 0,1 M. Se agita la mezcla durante 5 minutos y transcurrido ese tiempo se elimina el ácido lavando con solución de Na_2SO_4 al 2%. La fase etérea se seca mediante filtración a través de Na_2SO_4 anhidro (5) (7) y finalmente se transfiere a acetona.

Patrones de β -caroteno, luteína, violaxanteno y neoxanteno se obtienen a partir de un extracto saponificado de aceitunas verdes.

Auroxanteno y neocromo se preparan en el laboratorio a partir de violaxanteno y neoxanteno por acidificación de sus respectivas soluciones en éter etílico.

Feofitina "a" y feofitina "b" de Cu se preparan adicionando Cl_2Cu 1 M a la solución de la feofitina correspondiente en acetona, según el método de Jones et al. (8).

Feofitina "a" y feofitina "b" de Zn se obtienen de forma similar a los complejos de cobre pero añadiendo directamente cristales de Cl_2Zn a la solución acetónica de feofitina "a" y feofitina "b" (8).

El proceso de quelación con Cu ó Zn se sigue por cromatografía en capa fina.

2.2. Obtención del extracto de pigmentos.

Para eliminar la materia grasa se sigue la técnica empleada por Gutiérrez et al. (9). Se parte de 1 g de aceite disuelto en 4 ml de hexano. Se utiliza una columna de extracción en fase sólida (6 ml) desechable de octadecyl (C_{18}) suministrada por J. T. Baker Chemical Company (Phillipsburg, N.J.). La forma operativa es la siguiente: Acondicionamiento de la fase estacionaria haciendo pasar metanol en un cantidad de dos a tres veces el volumen de la fase. Seguidamente se hace pasar por la columna unos 10 ml de hexano. A continuación se añaden los 4 ml de hexano con el aceite problema disuelto y se espera a que eluya toda la materia grasa, adicionando para mayor seguridad unos 3 ml más de hexano. En la fracción de hexano que arrastra la materia grasa, también va incluido el β -caroteno, que se recupera posteriormente por saponificación según el método de Mínguez et al. (1). Una vez comprobado que no quedan restos de lípidos se procede a la elución de los pigmentos con 5 ml de acetona.

La solución final de pigmentos, exenta de materia grasa, se lleva a sequedad y el residuo se disuelve en un volumen adecuado de acetona. El extracto se filtra a través de una membrana de nylon de $0,5 \mu\text{m}$ antes de la inyección en el cromatógrafo. Todas las operaciones se realizan en total oscuridad o bajo luz verde, al objeto de evitar la alteración de los pigmentos. El sistema de purificación empleado tiene una duración de unos 30 minutos.

2.3. Separación de pigmentos por HPLC

Se sigue el método puesto a punto para el análisis de estos pigmentos en aceitunas (10).

20 μl de las soluciones modelo previamente filtradas por una membrana de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ (Micron separations, Westboro, MA, USA) se inyectan en un cromatógrafo líquido. Las separaciones se realizan en una columna analítica C-18 Spherisorb ODS-2 de $5 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula y de dimensiones $25 \times 0,4 \text{ cm}$ (Supelco, Bellefonte, PA, USA), la cual se protege con una precolumna de $5 \times 0,4 \text{ cm}$ rellena con Pelliguard LC-18 ($40 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula, Supelco).

Los pigmentos se eluyen usando el gradiente esquematizado en la Tabla I, a una velocidad de flujo de 2 ml/min. La detección se efectúa midiendo la absorbancia a 430nm.

Tabla I

Esquema de gradiente usado para la separación de pigmentos.

Tiempo (min)	Fase móvil		Curva*
	% A	% B	
Inicial	75	25	-
8	25	75	Lineal (6)
10	25	75	Isocrático
18	10	90	Convexa (4)
23	0	100	Cóncava (10)
30	75	25	Cóncava (10)

* Los números entre paréntesis corresponden al tipo de curva incluidos en el programa de gradiente de elución del cromatógrafo.

2.4. Reactivos

Todos los reactivos empleados en la preparación de las muestras son de calidad analítica. Los disolventes orgánicos utilizados en TLC y HPLC son de calidad cromatográfica y se han empleado sin ninguna purificación adicional. En la HPLC se utilizan los siguientes disolventes:

Disolvente A: agua/solución P/metanol (1:1:8 V/V/V).

Disolvente B: acetona/metanol (1:1 V/V).

La solución P (reactivo de pares iónicos) se prepara disolviendo 1,5 g de acetato de tetrabutilamonio y 7,7 g de acetato de amonio en agua y enrasando a 100 ml.

Ambos disolventes se desgasifican mediante paso de una corriente de He en el mismo sistema cromatográfico. El agua utilizada, destilada y desionizada, se filtra por una membrana de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ (Supelco) antes de efectuar las disoluciones correspondientes.

2.5. Aparatos utilizados

Rotavapor Büchi, modelo R. 110; lámpara DESAGA-UVIS, provista de luz blanca y ultravioleta UV^{254,366}; aparato Southern, modelo Unoplan para la elaboración de placas cromatográficas; homogeneizador politron Ultra-Turrax, modelo T 25; HPLC Waters, modelo 600 E, equipado con un detector de fotodiodos array Waters 994 y un registrador-integrador Waters 5200.

3. RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra el cromatograma tipo de la mezcla de patrones correspondiente a los pigmentos clorofílicos y carotenoides que suelen estar presentes en un aceite de oliva virgen de principio de campaña (1). Estos pigmentos son clorofilas "a" y "b",

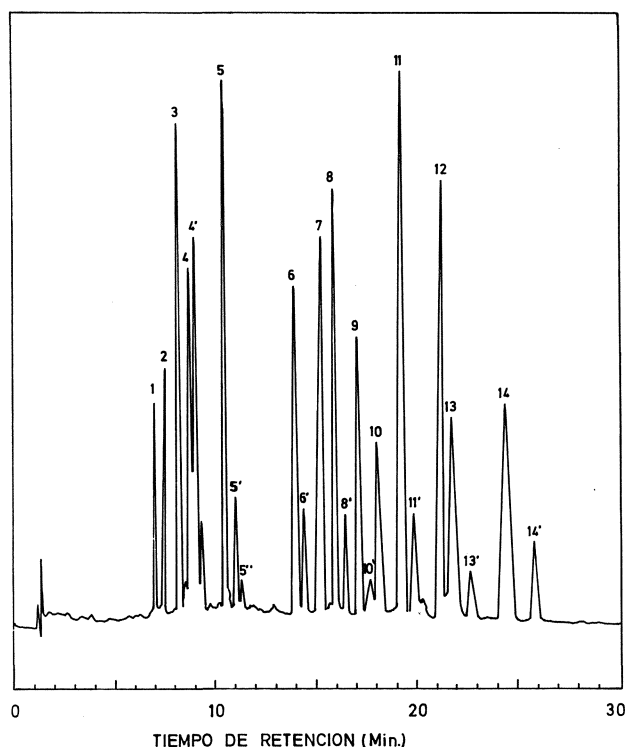


Figura 1

Cromatograma líquido de la mezcla de patrones separados en una columna Spherisorb ODS-2. Identificación de picos: Neoxanteno (1), neocromo (2), violaxanteno (3), auroxanteno (4), isómero de auroxanteno (4'), luteína (5), isómeros de luteína (5' y 5''), clorofila "b" (6), clorofila "b'" (6'), feofitina "b"-Zn (7), clorofila "a" (8), clorofila "a'" (8'), feofitina "a"-Zn (9), feofitina "b"-Cu (10), isómero de feofitina "b"-Cu (10'), feofitina "b" (11), feofitina "b'" (11'), β -caroteno (12), feofitina "a" (13), feofitina "a'" (13'), feofitina "a"-Cu (14), isómero de feofitina "a"-Cu (14').

β -caroteno, luteína, violaxanteno, neoxanteno, neocromo y auroxanteno. Se han incluido también los complejos de feofitinas "a" y "b" con cobre y cinc al objeto de destacar la posibilidad de su detección en la mezcla total de pigmentos considerada. El sistema de elución empleado permite separar con nitidez en 30 min los 14 componentes que se muestran en la Tabla II, en la cual también se incluyen los factores de capacidad y datos espectrales en el eluyente.

En la Figura 2 se ofrece el cromatograma correspondiente a un extracto de pigmentos procedente de un aceite de oliva virgen de final de campaña. Como se puede observar la luteína es el pigmento mayoritario, siguiendo en importancia el β -caroteno y feofitina "a". En el conjunto de carotenoides minoritarios se detectan neoxanteno y violaxanteno. También están presentes anteraxanteno, mutatoxanteno y luteoxanteno, que aunque no han sido incluidos en la mezcla patrón por su difícil obtención, se identifican a partir de sus datos espectrales (10). En la fracción cloro-

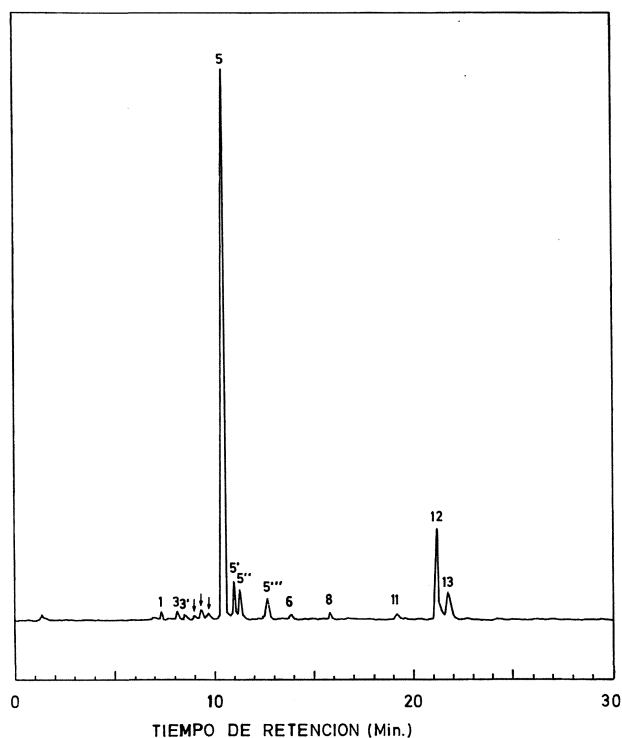


Figura 2

Cromatograma correspondiente a un extracto de pigmentos de un aceite de oliva virgen de final de campaña. Identificación de picos: Neoxanteno (1), violaxanteno (3), luteoxanteno (3'), luteína (5), isómeros de luteína (5', 5'' y 5'''), clorofila "b" (6), clorofila "a" (8), feofitina "b" (11), β -caroteno (12), feofitina "a" (13). Los picos señalados con flechas se corresponden con anteraxanteno, isómero del anteraxanteno y mutatoxanteno por orden de elución.

filica se detectan también feofitina "b", clorofila "a" y clorofila "b".

En la Figura 3 se muestra un cromatograma de un aceite adulterado con feofitina "a" y "b" de cobre. Luteína vuelve a ser el pigmento mayoritario como es normal en un aceite de final de campaña y el resto de carotenoides junto con β -caroteno se corresponden con los detectados en el aceite virgen. Asimismo se observa que además de los derivados clorofílicos normales en un aceite virgen como son feofitina "a" y feofitina "b", se diferencian claramente los complejos cúpricos de las correspondientes feofitinas. Aparece un nuevo pico, el n.º 14, que aunque su tiempo de retención no coincide con el de ningún patrón su espectro de absorción es idéntico al de feofitina "a" de cobre, lo que hace suponer se trate de un isómero de dicho complejo, en otro estado de degradación.

Como conclusión, puede determinarse que en un tiempo máximo de una hora puede completarse la analítica de pigmentos en un aceite de oliva.

Tabla II

Relación de patrones separados por HPLC. Identidad, factor de capacidad y datos espectrales. $K'_c = t_r - t_0 / t_0$, donde t_r = tiempo de retención de cada pico y t_0 = tiempo de retención del disolvente. La relación de picos se refiere al % III/II para carotenoides.

Pico nº	K'_c	Pigmento	Datos espectrales						Relación de picos
			Máximos en el eluyente						
			I	II	III	IV	V	VI	
1	4,04	Neoxanteno	414	438	466				90
2	4,34	Neocromo	398	422	448				78
3	4,88	Violaxanteno	416	440	470				94
4	5,30	Auroxanteno	380	400	424				103
4'	5,73	Isómero auroxanteno	380	400	424				103
5	6,52	Luteina	424	446	474				60
5'	6,93	Isómero luteina	418	440	468				42
5''	7,13	Isómero luteina	416	438	466				27
6	9,02	Clorofila "b"	466	600	650				3,30 (I/III)
6'	9,37	Clorofila "b'"	466	600	650				2,80 (I/III)
7	9,98	Feofitina "b"-Zn	456	590	640				3,08 (I/III)
8	10,45	Clorofila "a"	(384)	(412)	432	(580)	616	664	1,30 (III/VI)
8'	10,85	Clorofila "a'"	(384)	(412)	432	(580)	616	664	1,10 (III/VI)
9	11,25	Feofitina "a"-Zn	(376)	(410)	428	560	610	656	1,16 (III/VI)
10'	11,66	Isómero feofitina "b"-Cu	428	(564)	612				5,64 (I/III)
10	12,47	Feofitina "b"-Cu	428	(564)	612				5,64 (I/III)
11	12,86	Feofitina "b"	(412)	436	524	598	654		5,10 (II/V)
11'	13,30	Feofitina "b'"	(412)	436	524	598	654		5,10 (II/V)
12	14,11	β -caroteno	(490)	452	478				23
13	14,67	Feofitina "a"	410	(470)	506	534	608	666	1,80 (I/VI)
13'	15,33	Feofitina "a'"	410	(470)	506	534	608	666	1,80 (I/VI)
14	16,57	Feofitina "a"-Cu	402	424	548	604	655		1,08 (II/V)
14'	17,59	Isómero feofitina "a"-Cu	402	424	548	604	655		1,08 (II/V)

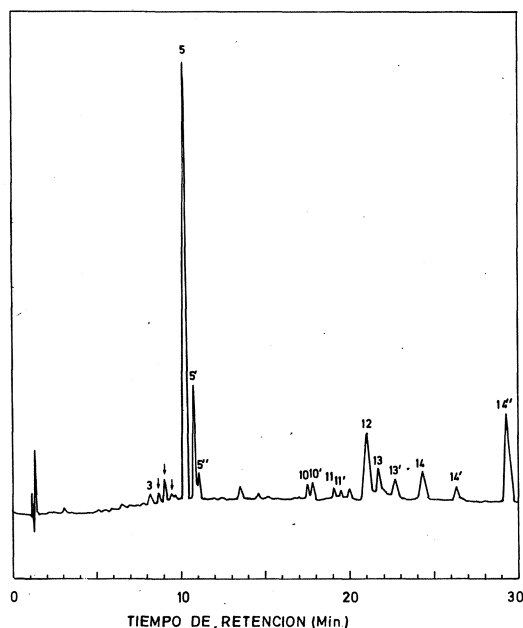


Figura 3

Cromatograma correspondiente al extracto de pigmentos de un aceite de oliva adulterado con feofitinas de cobre. Identificación de picos: Violaxanteno (3), luteina (5), isómeros de luteina (5' y 5''), feofitina "b"-Cu (10-10'), feofitina "b" (11), feofitina "b'" (11'), β -caroteno (12), feofitina "a" (13), feofitina "a'" (13'), feofitina "a"-Cu (14), isómeros de feofitina "a"-Cu (14' y 14''). Los picos señalados con flechas se corresponden con antheraxanteno, isómero del antheraxanteno y mutatoxanteno por orden de elución.

BIBLIOGRAFIA

1. Garrido Fernández, J.; Gandul Rojas, B.; Gallardo Guerrero, L. y Mínguez Mosquera, M.I. – "Pigmentos clorofílicos y carotenoides responsables del color en el aceite de oliva virgen". – *Grasas y Aceites* **41** (1990) 404-409.
2. Garrido Fernández, J.; Gandul Rojas, B.; Gallardo Guerrero, L.; Mínguez Mosquera, M.I. y Pereda Marín, J. – "Composición clorofílica y carotenoide del aceite de oliva virgen. Valor en pro-vitamina A". – *Grasas y Aceites* **41** (1990) 410-417.
3. Mínguez Mosquera, M.I.; Gandul Rojas, B.; Garrido Fernández, J. y Gallardo Guerrero, L. – "Pigments present in virgin olive oil". – *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **67** (1990) 192-196.
4. Mínguez Mosquera, M.I.; Rejano Navarro, L.; Gandul Rojas, B.; Sánchez Gómez, A.H. y Garrido Fernández, J. – "Color-pigments correlation in virgin olive oil". – *J. Am. Oil Chemists' Soc.* (En prensa).
5. Holden, M. – "Chlorophylls". En "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" Vol. 2, 2-38. – T. W. Goodwin (Ed.), Academic Press, London, New York y San Francisco, 1976.
6. Mínguez Mosquera, M.I. y Garrido Fernández, J. – "Eliminación de compuestos lipídicos durante la fase de extracción de pigmentos cloroplásticos en aceituna "Olea europaea". – *Grasas y Aceites* **36** (1985) 376-381.
7. Sievers, G. y Hynninen, P.H. – "Thin layer chromatography of chlorophylls and their derivatives on cellulose layers". – *J. Chromatogr.* **134** (1977) 359-364.
8. Jones, I.D.; White, R. C.; Gibbs, E. y Denard, C. D. – "Absorption spectra of copper and zinc complexes of pheophytins and pheophorbides". – *J. Agr. Food Chem.* **16** (1968) 80-83.
9. Gutiérrez Rosales, F.; Perdiguero, S.; Gutiérrez, F. y Ollas, J.M. – "Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil from measurement of absorbance at 225 nm". – *J. Am. Oil Chemists' Soc.* (En revisión).
10. Mínguez Mosquera, M.I.; Gandul Rojas, B.; Montaña Asquerino, A. y Garrido Fernández, J. – "Monitoring of chlorophylls and carotenoids quantification by HPLC during olive lactic fermentation". – *J. Chromatogr.* (En revisión).

(Recibido: Febrero 1991)