

P. LUCCI, D. PACETTI,  
E. BOSELLI, N.G. FREGA

## La gas-cromatografia multidimensionale nell'analisi dei lipidi alimentari

PROGRESS IN NUTRITION  
VOL. 11, N. 3, 143-148, 2009

### TITLE

Comprehensive multidimensional gas chromatography in the analysis of food lipids

### KEY WORDS

Comprehensive multidimensional gas chromatography, mass spectrometer, conjugated linolenic acids, furanic acids, sterols, terpenes

### PAROLE CHIAVE

Cromatografia multidimensionale, spettrometro di massa, acidi grassi coniugati del linolenico, acidi grassi furanici, steroli, terpeni

Dipartimento di Scienze degli Alimenti – Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italia

Indirizzo per corrispondenza:  
Dott.ssa Deborah Pacetti  
E-mail: d.pacetti@univpm.it

### Summary

The use of comprehensive gas chromatography (GCxGC) is a very useful approach in order to obtain a high resolution separation of complex samples. With comprehensive GCxGC (unlike “heart-cut” 2D GC) the whole sample injected into the system is subjected to two different stationary phases, resulting in a more effective separation than that obtained with conventional one-dimensional (1-D) GC. GCxGC is usually coupled on-line with mass spectrometry, since the resulting bidimensional chromatographic trace needs unambiguous peak identification. The main object of this study was the application of GCxGC/MS to the analysis of both saponifiable and unsaponifiable lipid fractions of different edible matrices. The fatty acids of pomegranate seed oil (*Punica granatum*), European anchovy's brain (*Sardina pilchardus*), Berberè (a mix of spices) and the not-saponifiable fraction of *Coffea* var. robusta were characterized by comprehensive multidimensional gas chromatography with a non-polar (5% phenyl polysiloxane)/medium polar (50% phenyl polysiloxane) column set equipped with a quadrupole mass-spectrometer.

### Riassunto

La cromatografia multidimensionale (GCxGC) è una tecnica analitica in grado di offrire un'elevata capacità di separazione di molecole costituenti campioni complessi, in quanto l'intero campione iniettato nel sistema, diversamente dalla tecnica dell' “heart-cut” 2D-GC, è soggetto a due differenti separazioni ad opera di due differenti fasi stazionarie. L'obiettivo del presente lavoro è stato la caratterizzazione dei lipidi di alcune matrici alimentari tramite l'utilizzo della tecnica GCxGC/MS. La frazione insaponificabile dei lipidi di *Coffea* var. robusta e gli acidi grassi dell'olio di semi di melograno (*Punica granatum*), del cervello delle alici (*Sardina pilchardus*) e del Berberè (mix di spezie) sono stati determinati analiticamente utilizzando un sistema cromatografico costituito da una prima colonna apolare (5% phenyl polysiloxane) e da una seconda mediamente polare (50% phenyl polysiloxane) ed equipaggiato con uno spettrometro di massa di tipo quadrupolo.

## Introduzione

La cromatografia multidimensionale è una tecnica in grado di offrire un'elevata capacità di separazione di molecole affini costituenti campioni complessi. Ogni componente, una volta eluito dalla prima colonna, viene bloccato, mediante flusso criogenico di CO<sub>2</sub>, per poi essere introdotto nella seconda colonna, dove subisce una seconda separazione su una fase stazionaria differente. Questa operazione avviene in continuo ed è controllata da un'interfaccia (modulatore), posizionato tra le due colonne. Tale sistema cromatografico è stato accoppiato ad uno spettrometro di massa di tipo quadrupolo ed utilizzato per la caratterizzazione della frazione lipidica di alcune matrici lipidiche sia vegetali (Berberè, olio di semi di melograno e caffè) che animali (cervello di alici). Le matrici selezionate risultano interessanti non solo dal lato prettamente analitico/compositivo (Berberè e caffè), ma anche salutistico. Circa l'80% dell'olio di semi di melograno è infatti costituito da isomeri coniugati dell'acido linolenico (CLNs) ed in particolare dall'acido punico (C18:3Δ<sup>9c,11c,13c</sup>), al quale molti studi attribuiscono la capacità di esercitare, insieme agli altri isomeri, un'azione citotossica nei confronti delle cellule tumorali (1, 2). La frazione acidica del cervello delle alici, oltre a risultare

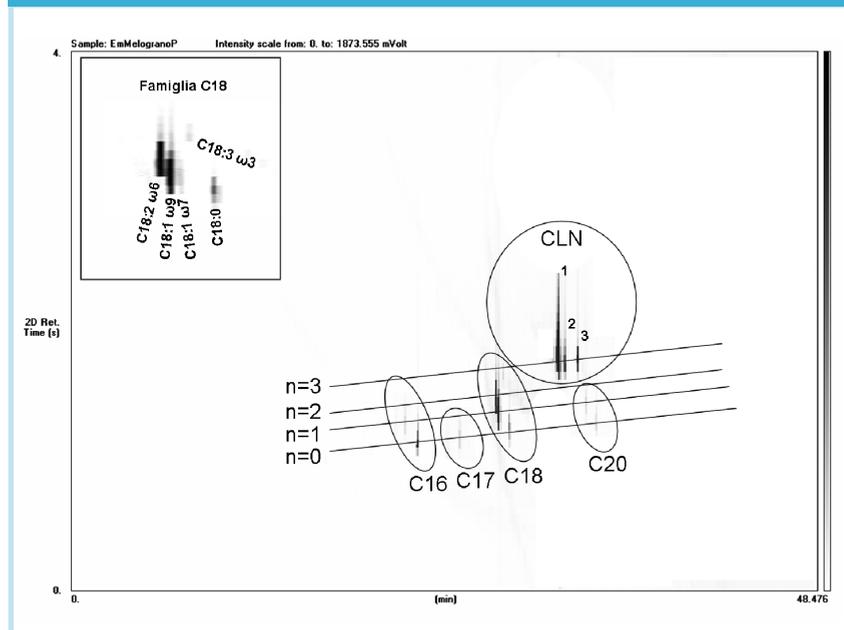
particolarmente ricca degli acidi grassi della serie ω3, presenta anche acidi grassi che contengono un nucleo furanico, cui recenti ricerche attribuiscono un'attività protettiva contro le malattie coronariche (3).

## Materiali e metodi

Il sistema cromatografico utilizzato era un Trace GCxGC (Thermo Scientific, Milano, Italia) equipaggiato con uno spettrometro di massa di tipo quadrupolo Thermo

DSQ e un set di colonne (Zebtron, USA) costituito da una prima colonna apolare ZB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e da una seconda mediamente polare ZB-50 (1 m x 0,1 mm x 0,1 μm). L'estrazione della frazione lipidica dai campioni vegetali è stata eseguita utilizzando il metodo di Bligh e Dyer (4, 5) mentre per quanto riguarda l'estrazione dal cervello delle alici è stata eseguita la metodica di Folch (6). La frazione insaponificabile del caffè è stata derivatizzata secondo Sweeley (7) mentre gli esteri metilici degli acidi grassi del

**Figura 1** - Cromatogramma GCxGCxMS dei metilesteri degli acidi grassi dell'olio di semi di melograno. 1) acido punico; 2) acido catalpico; 3) acido β-eleostearico. CLN=isomeri coniugati dell'acido linolenico; n=numero di insaturazioni. Cn=numero degli atomi di carbonio. Cn:m (n:numero degli atomi di carbonio m: numero dei doppi legami)

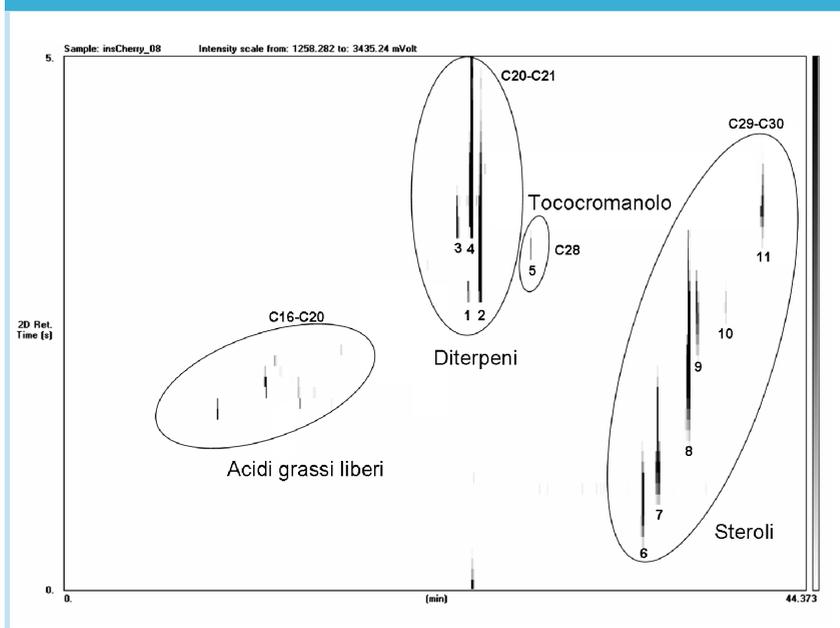


Berberè, del cervello delle alici e dell'olio dei semi del melograno sono stati ottenuti mediante transmetilazione basica (8). L'introduzione dei campioni avveniva mediante sistema split e il gas di trasporto, elio, aveva un flusso di  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Il programma di temperatura del forno per l'analisi degli esteri metilici degli acidi grassi partiva da  $150^\circ\text{C}$  e, con una velocità di  $3^\circ\text{C min}^{-1}$ , giungeva a  $260^\circ\text{C}$ ; quest'ultima era mantenuta per 25 min. La temperatura dell'iniettore era impostata a  $250^\circ\text{C}$ ; la frequenza di modulazione era 0.25 Hz. Il programma del forno per l'analisi della frazione insaponificabile partiva da  $200^\circ\text{C}$  e con una velocità di  $4^\circ\text{C min}^{-1}$  giungeva a  $300^\circ\text{C}$ ; quest'ultima era mantenuta per 20 min. La temperatura dell'iniettore era impostata a  $320^\circ\text{C}$  e la frequenza di modulazione era pari a 0.2 Hz. La velocità di acquisizione dello spettrometro di massa era di 9 scan/sec. La temperatura della sorgente ionica era  $250^\circ\text{C}$ . L'identificazione dei composti è stata effettuata confrontando gli spettri di massa ottenuti con quelli riportati in letteratura.

## Risultati e discussione

I campioni sono stati analizzati tramite un set di colonne contenenti due differenti fasi stazionarie.

**Figura 2** - Cromatogramma GCxGC/MS della frazione insaponificabile del chicco di caffè verde (*Coffea var. robusta*). 1) Caweolo; 2) Cafestolo; 3) 16-O-metilcaweolo; 4) 16-O-metilcafestolo; 5)  $\gamma$ -tocoferolo; 6) Campesterolo; 7) Stigmasterolo; 8)  $\beta$ -sitosterolo; 9)  $\Delta^5$ -avenasterolo; 10) Cicloartenolo; 11) Cistrostadienolo. Cn=numero degli atomi di carbonio



Nella prima dimensione i componenti venivano separati in funzione del loro punto di ebollizione, mentre nella seconda dimensione, data la natura mediamente polare della fase, la separazione è avvenuta sia in funzione del punto di ebollizione che della polarità della molecola. Come si nota nelle figure 1, 2 e 4, a parità di atomi di carbonio, sulla prima dimensione, gli acidi grassi saturi presentano tempi di ritenzione ( $^1t_R$ ) superiori rispetto ai corrispondenti insaturi. Per contro, quest'ultimi mostrano tempi di ri-

tenzione superiori sulla seconda dimensione ( $^2t_R$ ).

Inoltre, nella prima dimensione, la separazione degli acidi grassi è avvenuta anche in funzione della posizione dei doppi legami: a parità di numero di atomi di carbonio e di doppi legami, i tempi di ritenzione risultano inferiori per i composti con il più alto numero di serie  $\omega$  (es.  $C_{18:1\omega 9}$  e  $C_{18:1\omega 7}$  in figura 1 o  $C_{22:5\omega 6}$  e  $C_{22:5\omega 3}$  in figura 3B) mentre, negli esteri che presentano lo stesso numero di atomi di carbonio e serie  $\omega$ , ma un differente grado d'insaturazione, i tempi di

ritenzione diminuiscono all'aumentare del numero di doppi legami (es.  $C_{22:6\omega 3}$  e  $C_{22:5\omega 3}$  in figura 3B).

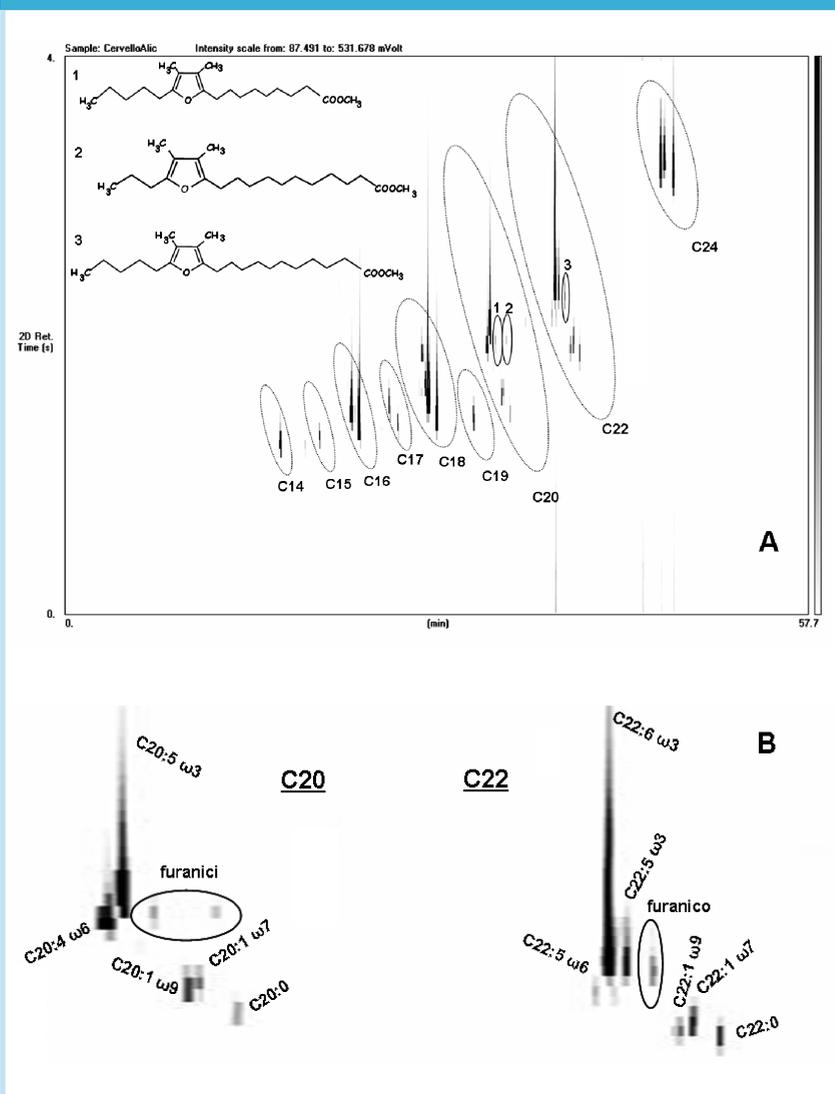
In figura 1 si nota che gli isomeri coniugati dell'acido linolenico (CLN) presentano  $^1t_R$  e  $^2t_R$  superiori rispetto all'acido linolenico e che l'ordine di eluizione dei vari isomeri CLN è: acido punico ( $C_{18:3\Delta^{9c,11t,13c}}$ ), acido catalpico ( $C_{18:3\Delta^{9t,11t,13c}}$ ) e acido  $\beta$ -eleostearico ( $C_{18:3\Delta^{9t,11t,13t}}$ ).

Gli acidi grassi furanici (Fig. 3) mostrano  $^1t_R$  inferiori ai tempi di ritenzione dei rispettivi omologhi lineari saturi e  $^2t_R$  comparabili agli acidi che contengono lo stesso numero di atomi di carbonio ma un maggior grado d'insaturazione, a causa della struttura ciclica (9).

## Conclusioni

Un aspetto estremamente interessante della cromatografia multidimensionale è l'ottenimento di una raffigurazione cromatografica su un piano cartesiano nel quale i componenti omogenei per caratteristiche chimico-fisiche risultano raggruppati. Le tracce in figura 1 e 4 mostrano che gli acidi grassi omologhi (stesso numero di atomi di carbonio) formano raggruppamenti ben precisi e che è possibile mettere in relazione il grado d'insaturazione con la posizione occu-

**Figura 3 - A)** Cromatogramma GCxGC/MS degli acidi grassi del cervello di alici. **B)** Dettaglio della famiglia acidica C20 e C22; Cn:m (n=numero degli atomi di carbonio m: numero dei doppi legami)



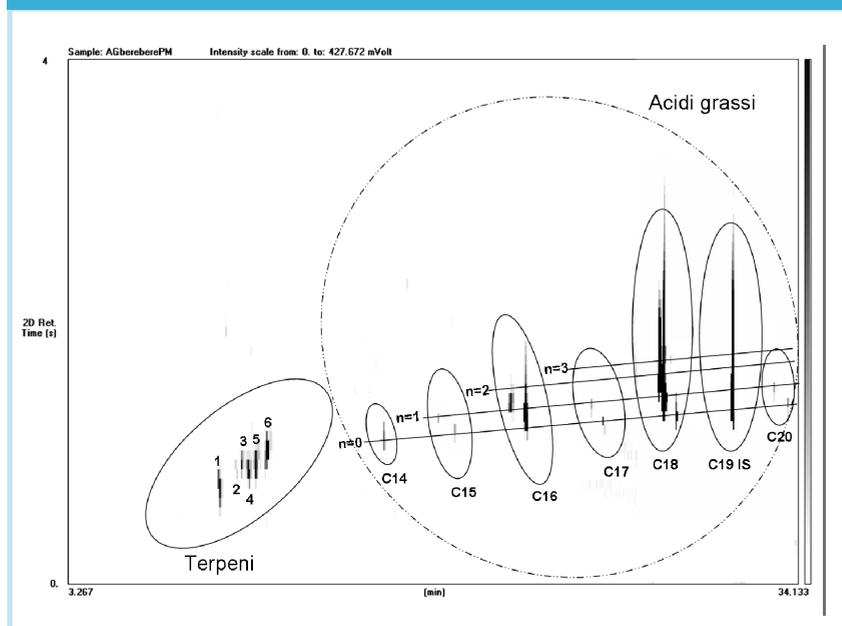
ata nello spazio bidimensionale (linee d'insaturazione). Basandoci su questo modello visivo è possibile identificare facilmente la struttura di un acido grasso in funzione

della posizione occupata nel piano 2D. Un altro esempio di cromatogramma 2D strutturato (*structured chromatogram*) è stato ottenuto dall'analisi della frazione insaponi-

ficabile del caffè (Fig. 2) dove gli acidi grassi liberi, gli alcoli diterpenici e gli steroli formano tre gruppi chiaramente distinguibili tra loro. Nel tracciato della frazione acidica della miscela di spezie Berberè (Fig. 4) i sesquiterpeni presenti nell'estratto formano un *cluster* ben distinto rispetto al *pattern* formato dagli esteri degli acidi grassi.

Nonostante la cromatografia monodimensionale convenzionale sia stata fino ad ora utilizzata con successo nell'analisi dei lipidi alimentari, la tecnica GCxGC offre sicuramente notevoli vantaggi, quali una maggiore risoluzione, l'aumento del rapporto segnale/rumore e la restituzione di traccianti cromatografici 2D in grado di fornire immediate indicazioni circa la struttura delle molecole. Tuttavia, nell'analisi di campioni molto complessi, la capacità analitica della tecnica può essere pienamente sfruttata solamente accoppiando il sistema con uno spettrometro di massa, in quanto la sola identificazione dei composti tramite l'utilizzo di standard risulterebbe estremamente laboriosa. A tale scopo, il sistema richiede un analizzatore in grado di acquisire a velocità molto elevate, poiché la separazione delle molecole nella seconda dimensione avviene in maniera molto rapida (ampiezza del picco < 500 msec). L'utilizzo di uno spettrometro di massa di tipo qua-

**Figura 4** - Cromatogramma GCxGC/MS degli acidi grassi della spezia Berberè. 1)  $\beta$ -caryophyllene; 2)  $\alpha$ -caryophyllene; 3)  $\alpha$ -curcumene; 4)  $\alpha$ -zingiberene; 5)  $\alpha$ -bisabolene; 6)  $\alpha$ -sesquiphellandrene. Cn=numero degli atomi di carbonio. n= numero di insaturazioni



drupolo offre sicuramente dei vantaggi (basso costo, stabilità ed affidabilità, semplicità di uso) ma presenta anche punti deboli: la velocità di acquisizione del quadrupolo, accoppiato ad un GCxGC diventa un fattore critico per ottenere spettri di massa che permettano una identificazione inequivocabile dei composti incogniti. Per un'analisi qualitativa possono infatti bastare circa 4 spettri di massa collezionati all'interno di un picco, mentre per l'analisi quantitativa è necessario operare in SIM (single ion monitoring) o ridurre notevolmente il range di acquisizione di

massa.

## Ringraziamenti

La borsa di studio di dottorato è stata cofinanziata dal gruppo Angelini, A.C.R.A.F., Ancona, Italy.

## Bibliografia

1. Yasui Y, Hosokawa M, Kohono H, Tanaka T, Myashita, K. Troglitazone and 9cis,11trans,13trans-conjugated linoleic acid: comparison of their antiproliferative and apoptosis-inducing effects on different colon cancer cell lines. *Chemotherapy* 2006; 52: 220-5.
2. Kohno H, Suzuki R, Yasui Y, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. Pome-

- granate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Sci* 2004; 95: 481-6.
3. Spiteller G. Furan fatty acids: occurrence, synthesis, and reactions. Are furan fatty acids responsible for the cardioprotective effect of a fish diet? *Lipids* 2005; 40: 775-1.
  4. Bligh EG, Dyer WJ. Can. A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem Physiol* 1959; 37: 911.
  5. Pacetti D, Boselli E, Lucci P, Frega, NG. Simultaneous analysis of glycolipids and phospholipids molecular species in avocado (*Persea americana* Mill) fruit. *Journal of Chromatography A*. 2007; 1150: 241-51.
  6. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 1957; 226: 497-509.
  7. Sweeley CC, Bentley R, Makita M, Wells WW. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugar and related substances. *Journal of the American Chemical Society* 1963; 85: 2497-507.
  8. Suter B, Konrad G, Pacciarelli B. Determination of fat content and fatty acids composition through 1-min transesterification in the food sample; principles. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1997; 204: 252-8.
  9. Pedulli GF. *Metodi fisici in chimica organica*. Edizioni Piccin, Padova, 1996: 327-8.

