

F. ALBERTI, P. LUCCI,
E. BOSELLI, N.G. FREGA

Identificazione degli acidi grassi furanici nei prodotti ittici

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 11, N. 3, 154-161, 2009

TITLE
Identification of furan fatty acids in seafood

KEY WORDS
Furan fatty acids, GC-MS, comprehensive bidimensional GC/GC-MS, fish products

PAROLE CHIAVE
Acidi grassi furanici, GC-MS, gascromatografia bidimensionale (GC/GC-MS), prodotti ittici

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

Indirizzo per corrispondenza:
Dr. Emanuele Boselli
Dipartimento di Scienze degli Alimenti,
Università Politecnica delle Marche,
Via Breccie Bianche
60131 Ancona, Italia
E-mail: e.boselli@univpm.it

Summary

Furan fatty acids (FFA) are characterized by a furan ring, which carries an unbranched fatty acid chain with 9, 11 or 13 carbon atoms in one α -position and a short straight-chain alkyl group with 3 or 5 carbon atoms in the other α -position. The β -positions of the furan ring can be substituted with two methyl residue or just with one methyl group in the β -position adjacent to the long aliphatic chain. The structure of furan fatty acids is similar to that of some prostaglandins (a five-membered ring with an alkyl chain and an alkyl carboxylic chain). The biological role of the FFA is still not clear, but it has been pointed out that FFA act as antioxidants as they prevent linoleic acid oxidation. The connection between consumption of fish rich in FFA and protection against coronary heart disease mortality has been confirmed in several research studies. In the present study, the fatty acid profile of six species of Adriatic fishes (european pilchard, european anchovy, european hake, horse mackerel, common sole, atlantic mackerel), three species of freshwater fish (perch, indigenous catfish, trout) and three molluscs (clam, mussel, oyster) were determined. The identification of different FFA obtained from muscle, liver, testes, ovaries, eyes and brain was carried out using comprehensive bidimensional gaschromatography coupled on-line with mass spectrometry. The identified FFA were both the saturated series 10,13-epoxy-11-methyloctadeca-10,12-dienoic acid [MonoMe(9,5)], 10,13-epoxy-11,12-dimethyloctadeca-10,12-dienoic acid [DiMe(9,5)], 12,15-epoxy-13,14-dimethyloctadeca-12,14-dienoic acid [DiMe(11,3)], 12,15-epoxy-13-methyleicosa-12,14-dienoic acid [MonoMe(11,5)], 12,15-epoxy-13,14-dimethyleicosa-12,14-dienoic acid [DiMe(11,5)], 14,17-epoxy-15,16-dimethyldocosa-14,16-dienoic acid [DiMe(13,5)], and the unsaturated series 12,15-epoxy-13,14-dimethyleicosa-12,15,16-trienoic acid [DiMe(11,5:1)], 12,15-epoxy-13,14-dimethyleicosa-10,12,14-trienoic acid [DiMe(11:1,5)]. The ubiquitary FFA were [MonoMe(9,5)], [DiMe(11,3)], [MonoMe(11,5)] and [DiMe(11,5)]. FFA were absent in the molluscs and in the indigenous catfish. The unsaturated FFA were absent in the testes and ovaries of european anchovy and european hake.

Riassunto

Gli acidi grassi furanici (FFA) sono lipidi naturali caratterizzati da un anello furanico che presenta in una posizione α un acido grasso lineare con 9, 11 o 13 atomi di carbonio e nell'altra posizione α una catena lineare corta con un gruppo alchilico con 3 o 5 atomi di carbonio. Nell'anello furanico, una delle due posizioni β o entrambe sono sostituite con un gruppo metile; la monosostituzione avviene sul lato della catena alchilcarbossilica. La struttura degli FFA è simile ad alcune prostaglandine (anello a cinque membri con una catena alchilica e una catena alchil-carbossilica). Il ruolo biologico degli FFA non è ancora univocamente chiaro, ma diversi studi hanno dimostrato la loro azione protettiva nei confronti dell'ossidazione dell'acido linoleico. Inoltre, in numerose ricerche, è stata appurata la relazione tra il consumo di pesci ricchi in FFA e la protezione contro le malattie coronariche. Nel presente lavoro sono stati analizzati i profili lipidici di sei specie di pesce del Mar Adriatico (sardina, alice, nasello, suro, sogliola, sgombro), tre specie di pesce di acqua dolce (persico, pangasio, trota) e tre molluschi (vongola, cozza, ostrica). L'identificazione dei differenti FFA ottenuti dal filetto, dal fegato, dalle gonadi maschili e femminili, dagli occhi e dal cervello delle diverse specie è stata effettuata utilizzando un sistema GC-MS e bidimensionale GC-GC/MS. Sono stati identificati i seguenti FFA saturi l'acido 10,13-epossi-11-metilottadeca-10,12-dienoico [MonoMe(9,5)], l'acido 10,13-epossi-11,12-dimetilottadeca-10,12-dienoico [DiMe(9,5)], l'acido 12,15-epossi-13,14-dimetilottadeca-12,14-dienoico [DiMe(11,3)], l'acido 12,15-epossi-13-metileicosa-12,14-dienoico [MonoMe(11,5)], l'acido 12,15-epossi-13,14-dimetileicosa-12,14-dienoico [DiMe(11,5)], l'acido 14,17-epossi-15,16-dimetildocosa-14,16-dienoico [DiMe(13,5)], ed insaturi, quali l'acido 12,15-epossi-13,14-dimetileicosa-12,15,16-trienoico [DiMe(11,5:1)] e l'acido 12,15-epossi-13,14-dimetileicosa-10,12,14-trienoico [DiMe(11:1,5)]. Gli FFA presenti in tutti i campioni erano il [MonoMe(9,5)], il [DiMe(11,3)], il [MonoMe(11,5)] e il [DiMe(11,5)]. Al contrario, nel caso dei molluschi e del pangasio, si è riscontrata l'assenza degli FFA. Gli FFA con la catena laterale insatura erano assenti nelle gonadi, sia maschili, che femminili dell'alice e del nasello.

Introduzione

Ricerche che interessano lo studio degli effetti biologici del pesce sul-

la salute umana iniziano sin dagli anni '70 quando per la prima volta vennero studiate le abitudini alimentari degli eschimesi della

Groenlandia al fine di indagare sul motivo per cui non soffrissero di malattie cardiovascolari, nonostante un'alimentazione ricca di

pesce grasso (1). La peculiarità fu attribuita al contenuto in acidi grassi della serie Omega-3, quali EPA e DHA, responsabili della funzionalità cellulare e della protezione dell'organismo nei confronti di malattie cardiovascolari (2, 3). Recenti studi hanno indagato sulla possibilità che anche componenti minori naturali presenti nei pesci potessero essere coinvolti nella protezione da malattie cardiovascolari. Tra questi, numerose ricerche si sono indirizzate nella valutazione del ruolo biologico degli acidi grassi furanici (FFA) che hanno dimostrato un'azione di prevenzione nei confronti dell'ossidazione dell'acido linoleico (4) e la protezione contro le malattie coronariche (5). Gli FFA sono stati identificati per la prima volta da Glass et al. (6) nel luccio (*Esox lucius*), pesce di acqua dolce. Successivamente, la loro presenza è stata determinata in diverse specie di pesce di acqua dolce (7, 8), in specie marine (8, 9); in piante (10, 11); in anfibi e rettili (12); in mammiferi (13) incluso l'uomo (14, 15). Sono stati, inoltre, identificati una serie di FFA con la catena laterale insatura, detti *olefinici*, in matrici alimentari grasse come il burro (16) e l'olio d'oliva (17). Gli FFA sono lipidi naturali caratterizzati da un anello furanico che presenta in una posizione α un acido grasso lineare con 9, 11 o 13 atomi di carbonio (catena alchil-

carbossilica) e nell'altra posizione α una catena alifatica a 3 o 5 atomi di carbonio. Nell'anello furanico, una delle due posizioni β o entrambe, sono sostituite con un gruppo metile; la monosostituzione avviene sul lato della catena alchilcarbossilica (Fig. 1). La struttura degli FFA è simile ad alcune prostaglandine (acido grasso a venti atomi di carbonio con un anello ciclopentanico, una catena laterale alchilica e una catena alchil-carbossilica).

Nel presente lavoro è stata studiata la composizione in acidi grassi di alcune specie di pesci e molluschi del Mar Adriatico e di alcune specie di pesce di acqua dolce. Delle alici e del nasello, in particolare, è stata studiata anche la composizione acidica di diversi organi interni. La finalità dell'indagine è stata quella di individuare acidi grassi

caratterizzanti le diverse specie ittiche, con particolare riferimento al pattern di acidi grassi furanici e alla loro distribuzione nei differenti organi. A tale scopo sono state impiegate tecniche cromatografiche ad alta risoluzione quali la gascromatografia/spettrometria di massa e la gascromatografia bidimensionale accoppiata ad un quadrupolo. Ogni specie di pesce presenta una composizione di congeneri di FFA peculiare, che può rivestire un ruolo considerevole nel determinare la qualità tecnologica e salutistica di questi alimenti.

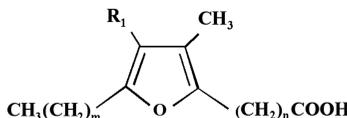
Materiali e metodi

Campioni

Sono stati studiate tre specie di acqua dolce (*Perca fluviatilis* - Per-

Figura 1 - Struttura degli acidi grassi furanici saturi

Struttura degli FFA saturi				
n.	FFA	m	n	R ₁
1	F ₁	2	8	CH ₃
2	F ₂	4	8	H
3	F ₃	4	8	CH ₃
4	F ₄	2	10	CH ₃
5	F ₅	4	10	H
6	F ₆	4	10	CH ₃
7	F ₇	4	12	H
8	F ₈	4	12	CH ₃



sico, *Salmo trutta* - Trota, *Pangasius hypophthalmus* - Pangasio), sei specie del Mar Adriatico (*Trachurus trachurus* - Suro, *Merluccius merluccius* - Nasello, *Solea vulgaris* - Sogliola, *Engraulis encrasicolus* - Alice, *Sardina pilchardus* - Sardina, *Scomber scombrus* - Sgombro) e tre molluschi del Mare Adriatico (*Venus gallina* - Vongola, *Mytilus galloprovincialis* - Cozza, *Ostrea edulis* - Ostrica) acquistati presso un mercato ittico locale.

Estrazione del grasso

Tre individui, per ogni tipo di pesce, privati delle parti non edibili (pinne, testa, interiora, conchiglie) compresa la pelle, nel caso dei pesci ossei, sono stati omogeneizzati e utilizzati per l'estrazione della frazione lipidica. Inoltre, dell'alice sono state isolate le gonadi, maschili

e femminili, il cervello e gli occhi mentre del merluzzo il fegato e le gonadi sia maschili che femminili. Per ogni campione, l'estrazione del grasso è stata effettuata seguendo il metodo descritto da Bligh e Dyer (8), previa addizione di metile nonadecanoato in soluzione benzenica, nell'ordine dell'1% del grasso del campione in esame, come standard interno. I metilesteri degli acidi grassi sono stati ottenuti mediante trasmetilazione basico-catalizzata (19, 20). Ai fini della determinazione della posizione dei doppi legami presenti negli acidi grassi insaturi, una parte del grasso estratto dai muscoli, è stata sottoposta alla derivatizzazione con 2-amino-2-metil-1-propanolo per l'ottenimento dei derivati dimetiloxazolinnici (DMOX) secondo il metodo descritto da Dobson e Christie (21).

Analisi GC-MS

L'identificazione degli acidi grassi furanici (FFA) è stata confermata con l'ausilio di un gascromatografo (Focus - Thermo Electron Corporation, West Palm Beach, FL) equipaggiato con una colonna capillare Supelcowax-10 (30 m, diametro interno 0.25 mm, spessore fase stazionaria 0.25 μm) e accoppiato ad uno spettrometro di massa (Focus DSO) a ionizzazione per impatto elettronico (Electron Impact, EI). Il flusso del gas di trasporto (elio) è stato impostato a 1 ml min⁻¹ e la temperatura dell'iniettore e della sorgente ionica a 250°C. La programmata di temperatura del forno partiva da 150°C, dove rimaneva per 5 min, per risalire a 220°C alla velocità di 2°C min⁻¹; a 220°C rimaneva stazionaria per 30 min. Gli spettri di

Tabella 1 - Identificazione degli FFA in 1) filetto di sarde; 2) filetto di alici; 3) filetto di nasello; 4) filetto di suro; 5) filetto di sogliola; 6) filetto di sgombro; 7) filetto di persico; 8) filetto di pangasio; 9) filetto di trota; 10) vongola; 11) cozza; 12) ostrica; 13) gonadi femminili di merluzzo; 14) gonadi maschili di merluzzo; 15) fegato di merluzzo; 16) gonadi femminili di alici; 17) gonadi maschili di alici; 18) cervello di alici; 19) occhi di alici

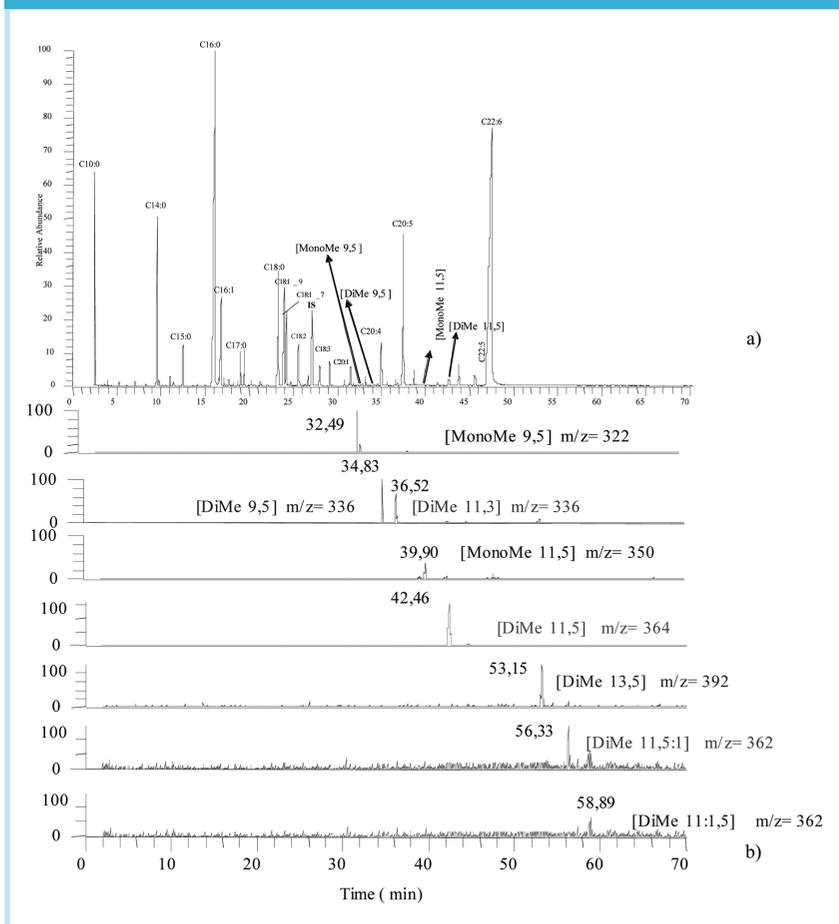
FFA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
MonoMe 9,5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
DiMe 9,5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
DiMe 11,3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MonoMe 11,5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
DiMe11,5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
DiMe 13,5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DiMe (11,5:1)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DiMe (11:1,5)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

massa sono stati acquisiti utilizzando il software *Xcalibur Data System*, Ver. 1.4. L'identificazione dei composti è avvenuta per confronto degli spettri ottenuti con quelli riportati in letteratura e nella libreria *NIST Mass Spectral Database*.

Analisi GC-GC-MS

L'analisi gascromatografica multidimensionale (GC-GC/MS) è stata effettuata con un Trace GCxGC gascromatografo equipaggiato con uno spettrometro di massa MS-DSQ (Thermo Electron Corporation, West Palm Beach, FL). La prima colonna, ZB-5 (30 m x 0,25 mm diametro interno, spessore fase stazionaria 0,25 μm , Phenomenex, Torrance, CA, USA), era rivestita di una fase apolare e la seconda, ZB-50 (1 m x 0,10 mm di diametro interno, spessore fase stazionaria 0,25 μm , Phenomenex), di una fase mediamente polare. I campioni sono stati iniettati con sistema di iniezione split/splitless (rapporto di splittaggio 12:1), il flusso del gas di trasporto (He) è stato impostato a 1.0 ml min⁻¹ e la temperatura dell'iniettore e del transfer line a 250°C. La temperatura del forno partiva da 150°C dove rimaneva per 1 min, per salire a 260°C alla velocità di 3°C min⁻¹, dove rimaneva per 25 min. Gli spettri sono stati acquisiti nel range di massa

Figura 2 - a) Tracciato totale GC/MS degli esteri metilici e degli FFA del grasso del filetto di alici; b) Tracciati dei singoli FFA del filetto di alici



compreso tra 50-600 Da, con velocità di scansione 9 scan s⁻¹ e utilizzando il software *Xcalibur Data System*, Ver. 1.4. L'identificazione dei composti è avvenuta per confronto degli spettri ottenuti con quelli riportati in letteratura e nella libreria *NIST Mass Spectral Database*.

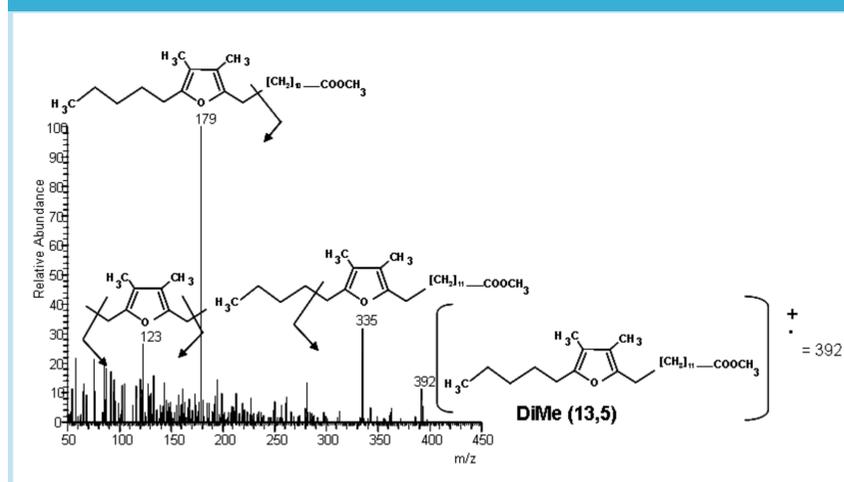
Risultati e discussione

Gli acidi grassi furanici identificati nei diversi campioni sono stati i seguenti: l'acido 10,13-epossi-11-metilottadeca-10,12-dienoico [MonoMe(9,5)], l'acido 10,13-epossi-11,12-dimetilottadeca-10,12-dienoico [DiMe(9,5)], acido 12,15-epossi-13,14-dimetilottadeca-12,

Tabella 2 - Frammentazioni degli FFA saturi e olefinici

FFA	M ⁺	picco base	A	B
Frammentazioni degli FFA saturi				
MonoMe 9,5	322	165	265	109
DiMe 9,5	336	179	279	123
DiMe 11,3	336	151	307	123
MonoMe 11,5	350	165	293	109
DiMe 11,5	364	179	307	123
DiMe 13,5	392	179	335	123
Frammentazioni degli FFA olefinici				
DiMe 11,5:1	362	177	135	333
DiMe 11:1,5	362	205	135	305

Figura 3 - Spettro di massa del DiMe (13,5) presente nel filetto dei pesci



14-dienoico [DiMe(11,3)], l'acido 12,15-epossi-13-metileicosa-12, 14-dienoico [MonoMe(11,5)], l'acido 12,15-epossi-13,14-dimetileicosa-12,14-dienoico [DiMe(11,5)], l'acido 14,17-epossi-15,16-dimetildocosa-14,16-dienoico [DiMe(13,5)], e tra gli insaturi l'acido 12,15-epossi-13,14-dimetileicosa-12,15,16-trienoico [DiMe(11,5:1)] e l'acido 12,15-epossi-13,14-dimetileicosa-10,12,14-trienoico [DiMe(11:1,5)] (Tab. 1).

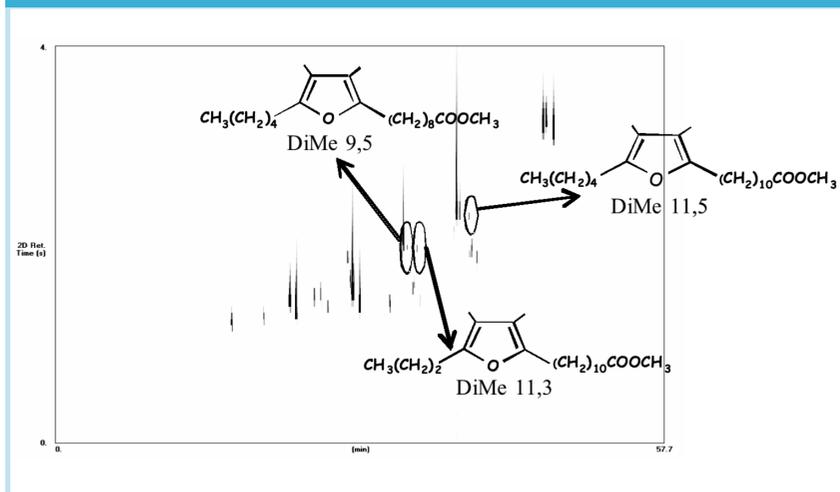
Gli FFA ubiquitari sono rappresentati dal: [MonoMe(9,5)], [DiMe(11,3)], [MonoMe(11,5)] e [DiMe(11,5)]. Nei molluschi e nel pangasio non è stata riscontrata la presenza degli FFA presenti nelle altre specie di pesce. Gli insaturi, ossia gli olefinici, non sono stati rilevati nelle gonadi maschili e femminili, sia delle alici che del nasello.

La figura 2 (a,b) mostra il tracciato GC-MS degli esteri metilici

presenti nella frazione lipidica totale del filetto, nel caso specifico del filetto di alici, e i tracciati GC-MS dei singoli FFA identificati. Dall'analisi del tracciato emerge che i differenti FFA sono perfettamente separati ed eluiscono in un range di tempo che va da 32 minuti a 59 minuti, con un tempo di ritenzione che aumenta all'aumentare del numero di massa molecolare: [MonoMe(9,5)] < [DiMe(9,5)] < [DiMe(11,3)] < [MonoMe(11,5)] < [DiMe(11,5)] < [DiMe(13,5)] < [DiMe(11,5:1)] < [DiMe(11:1,5)]. Nel caso dei due furanici isobari, [DiMe(9,5)] e [DiMe(11,3)], è probabile che la minore lunghezza della catena laterale alchilica provochi un effetto di maggiore polarità (viene meno schermato l'anello furanico), con conseguente aumento del tempo di ritenzione dell'isomero [DiMe(11,3)] rispetto al [DiMe(9,5)].

Lo spettro di massa degli ioni dei singoli FFA produce frammenti caratteristici che sono riassunti nella tabella 2. Il picco base deriva dalla perdita dell'acido grasso, ossia la catena alchilcarbossilica, con 9, 11 o 13 atomi di carbonio; il frammento A deriva dalla perdita della catena alifatica con 3 o 5 atomi di carbonio. Il frammento C deriva dalla perdita di entrambe le catene. A titolo di esempio, in figura 3 è riportato lo spettro del [DiMe(13,5)].

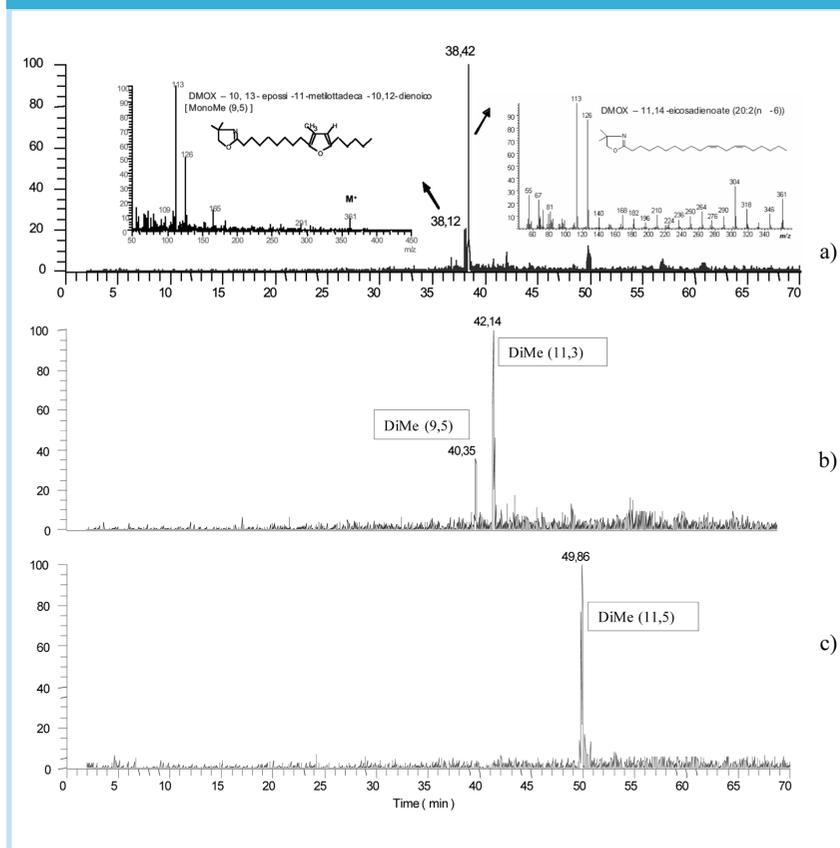
Figura 4 - Cromatogramma GCxGC –MS degli esteri metilici del grasso del filetto di alici



La caratterizzazione del profilo degli FFA in matrici naturali complesse richiedeva una fase di pre-separazione (7, 15, 17), determinando, di conseguenza, un allungamento dei tempi di analisi e la possibilità di formazione di artefatti. L'approccio della gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, ottimizzata per la caratterizzazione della frazione lipidica dei pesci, ha fornito ottimi risultati sia in termini di efficienza nella separazione dei diversi acidi grassi, ma soprattutto dei diversi FFA, che in termini di tempo. Gli esperimenti di spettrometria di massa GC-MS, hanno permesso l'identificazione inequivocabile delle specie molecolari degli FFA. Tramite la gascromatografia multidimensionale (GC-GC/MS) è stato possibile definire l'area del piano in cui cadono gli FFA (Fig. 4). Dall'immagine, si evidenzia come la zona del piano 2D in cui si identificano il [DiMe(9,5)] e il [DiMe(11,3)], entrambi con massa molecolare pari a 336 e con 20 di atomi di carbonio, cade nella stessa fascia della famiglia degli acidi grassi con 20 atomi di carbonio, mentre il [DiMe(11,5)], con massa molecolare pari a 364 e 22 atomi di carbonio, cade nella fascia della famiglia del C22.

Per ulteriore conferma delle specie molecolari e dell'eventuale presenza di doppi legami, sono stati identificati i derivati dimetiloxazolinici. Gli spettri di massa dei derivati del

Figura 5 - a) Spettro di massa dei derivati del DMOX del [MonoMe (9,5)] e del (20:2(n-6)); b) Spettro di massa del derivato DMOX del DiMe (9,5) e del DiMe (11,3); c) Spettro di massa del derivato DMOX del DiMe (11,5)



DMOX permettono la facile distinzione della posizione dei doppi legami sulla catena degli acidi grassi, come si evince nello spettro che si riferisce al derivato DMOX dell'acido eicosadienoico (C20:2), un acido grasso isobaro del furanico [MonoMe(9,5)], con massa molecolare pari a 361 (Fig. 5a). Nel caso del derivato DMOX dell'acido 10,13-epossi-11-metilotta-deca-10,12-dienoico [MonoMe(9,5)] (Fig. 5a), il tracciato evidenzia come i picchi caratteristici, il 165, il 109 e il 291, vengano mantenuti; la massa molecolare pari a 361 deriva dalla trasposizione del furanico in seguito alla derivatizzazione con 2-amino-2-metil-1-propanolo. Poichè, dai dati della letteratura, la caratterizzazione dei derivati dimetiloxazolinici degli FFA non è stata ancora effettuata, questo nuovo approccio potrebbe essere utile al fine di identificare nuovi congeneri degli FFA, soprattutto nel caso dei derivati olefinici.

Ringraziamenti

La borsa di dottorato è stata cofinanziata dalla Regione Marche.

Bibliografia

- Bang HO, Dyenberg J, Hjoorne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scand* 1976; 200: 69-73.
- Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial infarction: diet and re-infarction Trial (DART). *Lancet* 1989; 2: 757-61.
- GISSI-Prevenzione Investigators (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico), Dietary Supplementation with n-3 Polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione Trial. *Lancet* 1999; 354: 447-55.
- Okada Y, Okajima H, Konishi H, et al. Antioxidant effect of naturally occurring furan fatty acids on oxidation of linoleic acid in aqueous dispersion. *J Am. Oil Chem Soc* 1990; 67: 858-62.
- Spiteller G. Furan Fatty Acids: Occurrence, synthesis, and reactions. are furan fatty acids responsible for the cardioprotective effects of a fish diet? *Lipids* 2005; 40 (8): 755-71.
- Glass RL, Krick T, Eckhardt AE. New series of fatty acids in northern Pike (*Esox lucius*). *Lipids* 1974; 9: 1004-8.
- Glass RL, Krick TP, Olson DL, Thorson RL. The Occurrence and distribution of furan fatty acids in spawning male freshwater fish. *Lipids* 1977; 12: 828-36.
- Gunstone FD, Wijesundera RC, Scrimgeour CM. The component acids of lipids from marine and freshwater fish. *Lipids* 1978; 12: 828-36.
- Ota T, Takagi T. Furan Fatty Acids of Lipids from serum and sexual organs of chum salmon. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; 57: 1565-71.
- Hasma H, Subramaniam A. The occurrence of furan fatty acid in hevea brasiliensis latex. *Lipids* 1978; 13: 905-7.
- Scheinkönig J, Spiteller G. F-Säurehaltige phospholipidmoleküle in Zuckerrohrzellen. *Liebigs Ann Chem* 1993; 121-4.
- Ishii K, Okajima H, Koyamatsu T, Okada Y, Watanabe H. The composition of furan fatty acids in the crayfish. *Lipids* 1988; 23: 694-700.
- Schödel R, Spiteller G. Über das vorkommen von f-säuren in rinderleber und deren enzymatischen abbau bei geweberletzung. *Liebigs Ann Chem* 1987; 459-62.
- Wahl HG, Chrzanowski A, Müller C, Liebich HM, Hoffmann A. Identification of furan fatty acids in human blood cells and plasma by multi-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1995; 697: 453-9.
- Guth H, Grosch W. Furan fatty acids in butter and butter oil. *Lebensm. Unters: Forsch* 1992; 194: 360-2.
- Boselli E, Grob K, Lercker G. Determination of furan fatty acids in extra virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 2868-73.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-7.
- Suter B, Grob K, Pacciarelli B. Determination of fat content and fatty acid composition through 1-min transesterification in the food sample: principles. *Z. Lebensm. Unters. Forsch A* 1997a; 204: 252-8.
- Suter B, Grob K, Pacciarelli B, Novoselac A. Determination of fat content and fatty acid composition through 1-min transesterification in the food sample, ii. solubilization of the fat, results. *Mitt Gebiete Lebensm Hyg* 1997b; 88: 259-76.
- Dobson G, Christie WW. Structural analysis of fatty acids by mass spectrometry of picolinyl esters and dimethylloxazoline derivatives. *Trends Anal Chem* 1996; 15: 130-7.