

# Verifica dell' idoneità del sistema per l' analisi di FAME *cis-trans* con il metodo AOAC 2012.13 su un sistema gascromatografico Agilent 8890 con blocco del tempo di ritenzione

## Autore

Rachael Ciotti  
Agilent Technologies, Inc.

## Abstract

Il metodo AOAC 2012.13 si usa per determinare il contenuto di acidi grassi nei prodotti lattiero-caseari e nella formula per lattanti tramite gascromatografia capillare con rivelazione a ionizzazione di fiamma. Il metodo è stato implementato su un sistema GC Agilent 8890 con una colonna CP-Sil 88 da 100 m e, oltre a una serie comune di 37 metilesteri di acidi grassi, è stata indagata in maggiore dettaglio l'efficienza della separazione degli acidi oleico, linoleico e linolenico impiegando 19 isomeri *cis-trans* mono- e polinsaturi della famiglia C18. La risoluzione tra coppie critiche di FAME *cis* e *trans* fondamentali è stata valutata con uno standard qualitativo. Infine, è stato utilizzato anche il blocco del tempo di ritenzione (RTL) per evitare la necessità di riallineamento dopo la manutenzione della colonna.

## Introduzione

I grassi lattieri e vegetali contengono trigliceridi, ossia esteri del glicerolo accoppiati a tre catene di acidi grassi. Gli acidi grassi sono costituiti da un gruppo carbossilico terminale collegato a una catena idrocarburica che può essere di varia lunghezza, lineare o ramificata e satura, mono- o polinsatura. La configurazione e la posizione del doppio legame nei grassi insaturi danno origine a numerosi isomeri di posizione e *cis-trans*.

La corretta identificazione degli isomeri è fondamentale ai fini di un'accurata etichettatura nutrizionale.

La separazione e l'identificazione di omologhi e isomeri degli acidi grassi da una matrice complessa sono operazioni complesse. Dopo l'esterificazione, i corrispondenti metilesteri degli acidi grassi (FAME) possono essere analizzati in maniera riproducibile tramite gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma. L'ordine di eluizione degli isomeri e l'efficienza della separazione sono altamente dipendenti dal tipo di fase stazionaria e dalla lunghezza della colonna. Sebbene nessuna colonna possa risolvere completamente l'ampia varietà di isomeri *cis-trans* dei FAME, una colonna capillare da 100 m rivestita con una fase stazionaria cianopropilica ad alta polarità, come la fase CP-Sil 88, permette una separazione affidabile e dettagliata della maggior parte degli isomeri *cis* e *trans* dei FAME. A differenza delle colonne WAX tradizionali, gli isomeri *trans* eluiscono prima dei *cis* sulla fase stazionaria cianopropilica ad alta polarità.

## Condizioni sperimentali

I dati sono stati ottenuti utilizzando un gascromatografo Agilent 8890 configurato con un iniettore split/splitless (SSL), un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) e un campionatore automatico per liquidi (ALS) Agilent 7693A.

### Prodotti chimici

Per valutare le prestazioni di separazione dei FAME sono stati acquistati i seguenti standard analitici:

- Una miscela di FAME a 37 componenti (47885-U) contenente FAME da C4 a C24 nell'intervallo di concentrazione 100 - 600 µg/mL
- Una miscela a quattro componenti di metilesteri *cis-trans* dell'acido *linoleico*, 10 mg/mL in totale (CRM47791)

- Una miscela a otto componenti di isomeri di metilesteri dell'acido linolenico (L6031) contenente ciascun componente in misura compresa tra 3 e 30% in peso
- Una miscela di FAME *cis-trans* per la valutazione delle prestazioni della colonna (40495-U) contenente vari FAME in concentrazione pari a 2,5 mg/mL

Tutte le miscele di cui sopra sono state acquistate presso MilliporeSigma (St. Louis, MO). Una miscela a otto componenti di FAME *cis-trans* (35079) è stata acquistata presso Restek (Bellefonte, PA).

Tabella 1. Condizioni strumentali.

Condizioni del sistema GC Agilent 8890 – metodo ufficiale AOAC 2012.13	
Iniezione	
Dimensione della siringa	10 µL, codice G4513-80204
Volume di iniezione	1 µL
Iniettore	SSL, modalità split
Temperatura	250 °C
Rapporto di split	10:1
Flusso di spurgo del setto	3 mL/min
Colonna	Agilent CP-Sil 88, codice CP7489
Dimensioni	100 m × 0,25 mm, 0,20 µm
Gas di trasporto	He, 0,8 mL/min, flusso costante
Forno	
Temperatura iniziale	60 °C
Isoterma iniziale	5 minuti
Rampa	15 °C/min fino a 165 °C, isoterma per 1 minuto 2 °C/min fino a 225 °C, isoterma per 20 minuti
Rivelatore	
Tipo	FID
Temperatura	250 °C
Flusso d'aria	400 mL/min
Flusso di combustibile H <sub>2</sub>	40 mL/min
Flusso di make-up di N <sub>2</sub>	25 mL/min

## Risultati e discussione

Per valutare la separazione sull'intero intervallo (Figura 1), è stata iniettata una miscela di 37 FAME da C4:0 a C24:0 in diclorometano come solvente. L'impostazione di temperatura iniziale del forno pari a 60 °C e il tempo di mantenimento permettono la separazione del C4:0, un importante indicatore della qualità del latte, dal fronte del solvente. Il programma del gradiente di temperatura del forno consente un'efficace separazione degli isomeri *cis-trans* e dei FAME polinsaturi a catena lunga, fatta eccezione per la coeluizione dei picchi C23:0 e C20:4n6 dopo circa 48 minuti. Si tratta comunque di un aspetto non particolarmente preoccupante, considerato che il C23:0 non si incontra frequentemente nei prodotti lattiero-caseari.

Una separazione dettagliata di isomeri *cis-trans* è stata indagata impiegando miscele di standard di riferimento disponibili in commercio. La miscela a otto componenti di FAME *cis-trans* in diclorometano prodotta da Restek è stata diluita 20x in diclorometano e iniettata nel gascromatografo. Il metodo si presta bene alla risoluzione dei sei isomeri FAME C18:1 *cis-trans* (Figura 2).

Nonostante la lieve coeluizione tra gli isomeri *trans*, il gruppo è ben separato dagli isomeri monoinsaturi C18 *cis*, una condizione necessaria in quanto gli acidi grassi *trans* sono riportati come un gruppo nel metodo ufficiale AOAC 2012.13.

Per caratterizzare la separazione degli isomeri C18:2, una miscela di metilesteri dell'acido linoleico in diclorometano (MilliporeSigma CRM47791) è stata diluita fino a una concentrazione finale di 500 mg/L. In Figura 3 è possibile osservare come ciascuno degli isomeri FAME dell'acido linoleico sia ben risolto.

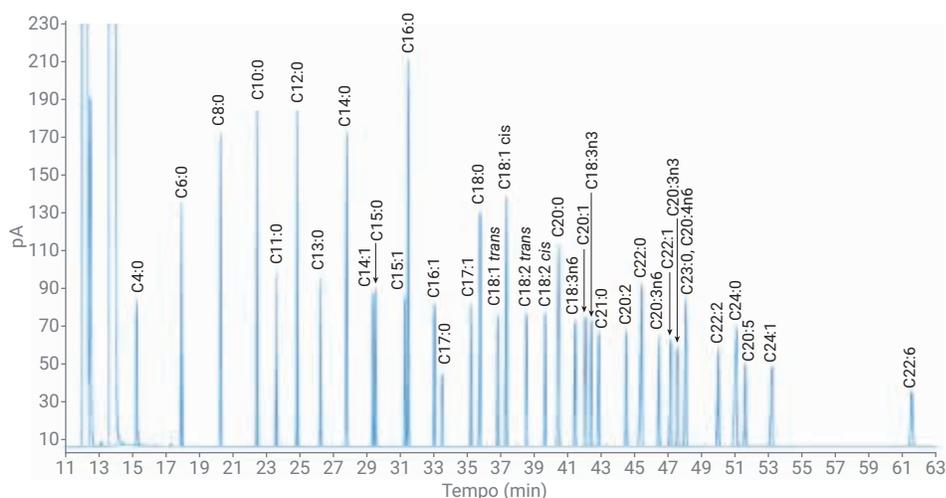


Figura 1. Cromatogramma di 37 metilesteri di acidi grassi.

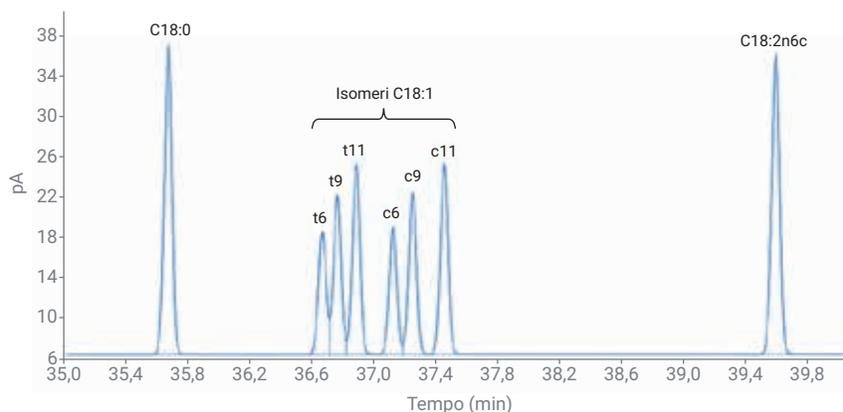


Figura 2. Ingrandimento del cromatogramma degli isomeri C18:1 ottenuto con il metodo AOAC 2012.13.

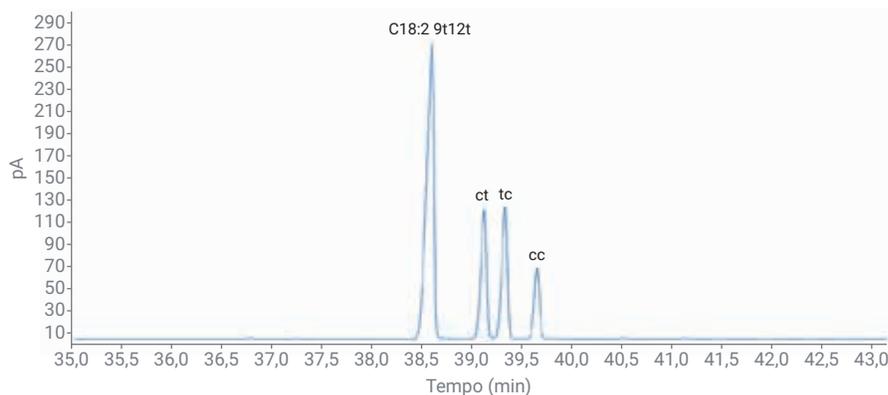
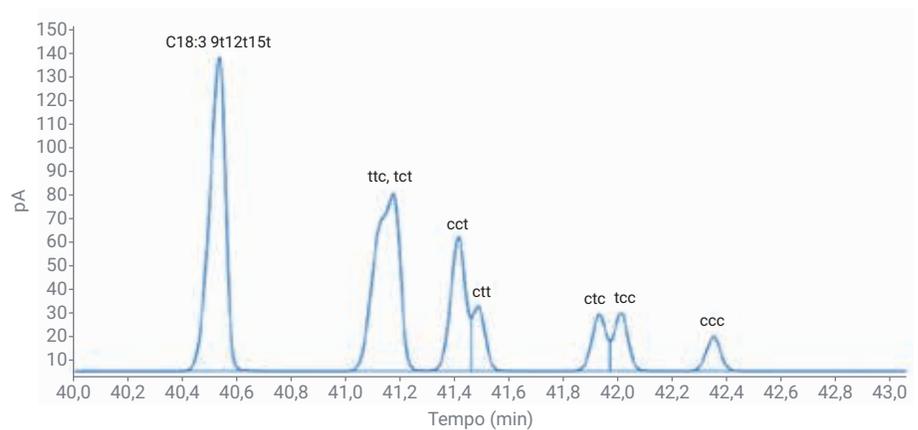


Figura 3. Ingrandimento del cromatogramma degli isomeri C18:2 ottenuto con il metodo AOAC 2012.13.

Infine, le prestazioni del metodo per gli isomeri C18:3 sono state esaminate iniettando una miscela di metilesteri dell'acido linolenico (MilliporeSigma L6031), diluita a 2,5 mg/mL in diclorometano (Figura 4). Nessuna colonna può risolvere completamente gli isomeri dell'acido linolenico; tuttavia, ai fini delle dichiarazioni nutrizionali, gli isomeri contenenti doppi legami *trans* sono ben separati dal metilestere dell'acido *alfa* linolenico.

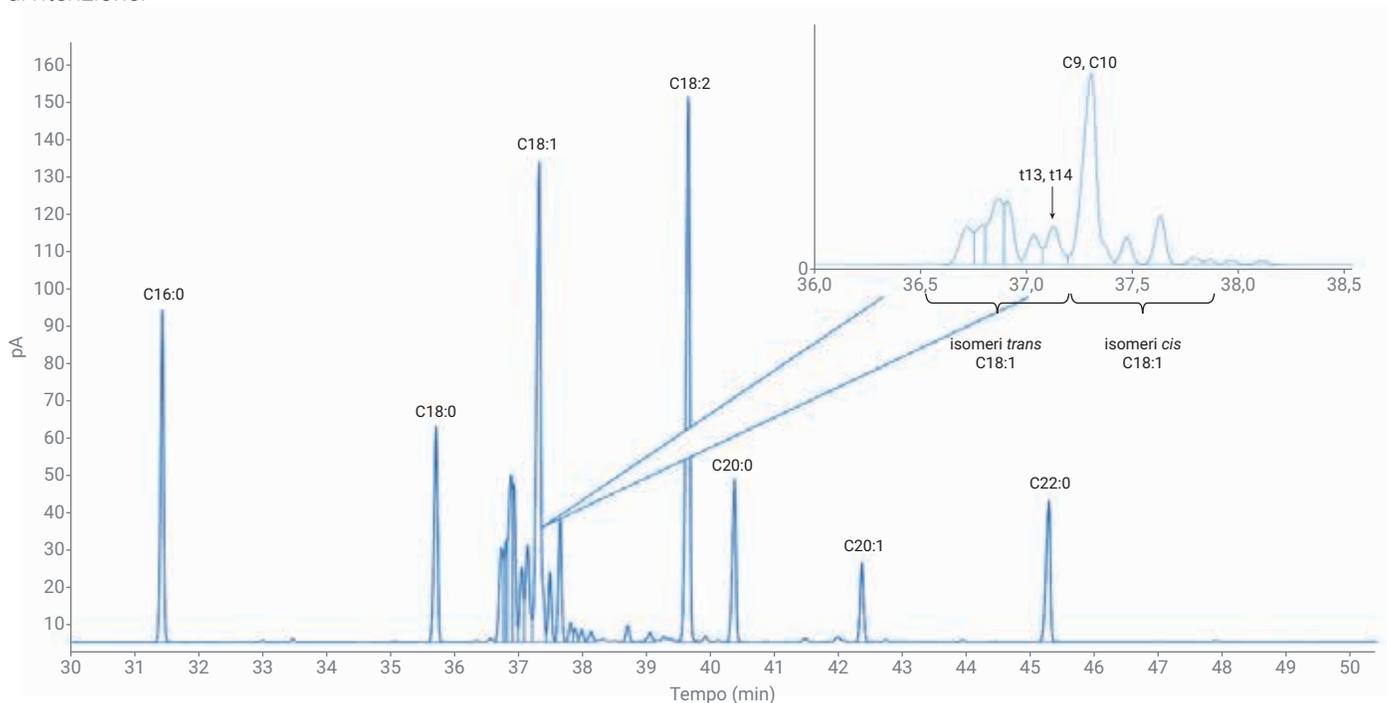
Il metodo AOAC 2012.13 prevede una verifica della valutazione delle prestazioni prima della calibrazione. La risoluzione viene determinata tra i picchi *trans*-C18:1n13t/C18:1n14t e *cis*-C18:1n9c/C18:1n10c (Figura 5, inserto). Impiegando l'equazione 1, si ottiene una risoluzione accettabile quando il valore R calcolato è pari o superiore a 1,00. Sono stati iniettati cinque replicati di una miscela qualitativa di FAME *cis-trans* per la valutazione delle prestazioni della colonna (MilliporeSigma 40495-U) per valutare la risoluzione e la ripetibilità delle aree e dei tempi di ritenzione.



**Figura 4.** Cromatogramma ingrandito che evidenzia la risoluzione di isomeri C18:3 ottenuto con il metodo AOAC 2012.13.

$$R = 1,18 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0,5h1} + W_{0,5h2}} \right)$$

**Equazione 1.** Risoluzione dei picchi a metà altezza.



**Figura 5.** Ingrandimento del cromatogramma dello standard qualitativo per la valutazione delle prestazioni della colonna.

In Tabella 2 sono riassunti i risultati per la coppia critica usata per la verifica della risoluzione: la ripetibilità del tempo di ritenzione per entrambi gli isomeri è eccellente, con una deviazione standard relativa (RSD) pari a 0,007%. Il valore RSD per la precisione dell'area del picco è inferiore a 2,5% per ciascun isomero. La risoluzione media dei picchi a metà altezza, pari a 1,494, è superiore al requisito di risoluzione minima del metodo.

### Blocco del tempo di ritenzione

Per identificare correttamente la serie di FAME determinati con il metodo AOAC 2012.13 è necessario che tanto la temperatura quanto il flusso siano precisi; di conseguenza, si tratta di un'eccellente candidata per l'uso del blocco del tempo di ritenzione (RTL). La funzione RTL di Agilent assicura la ripetibilità a lungo termine su un determinato strumento ed elimina la necessità di regolare i tempi di ritenzione dopo la manutenzione della colonna. È in grado di mantenere gli stessi tempi di ritenzione dopo la migrazione del metodo su un diverso sistema GC, agevolando quindi il trasferimento del metodo e semplificando i confronti inter-laboratorio. La funzione RTL abbina correttamente e blocca i tempi di ritenzione per uno specifico composto esaminando la relazione tra i parametri dell'iniettore e il tempo di ritenzione nel corso di una serie di analisi di riferimento, calibrando il sistema con i risultati ottenuti e memorizzando la relazione nel file del metodo.

La componente Acquisition del software Agilent OpenLab CDS 2 include una procedura guidata RTL che accompagna l'operatore nel processo di blocco del tempo di ritenzione selezionando un metodo di acquisizione da bloccare, unitamente a un composto target scelto da un file di dati acquisito in precedenza. La procedura guidata RTL configura quindi una serie di analisi di calibrazione della pressione in base ai parametri specificati dal metodo di acquisizione selezionato. Un'analisi viene effettuata impiegando l'impostazione originale della pressione e altre due rispettivamente

incrementando/diminuendo la pressione del 15% rispetto al valore impostato nel metodo. La variazione nelle impostazioni della pressione simula i cambiamenti nella lunghezza della colonna che si registrano frequentemente dopo la manutenzione, per esempio dopo il taglio della colonna. I metodi "bloccati" non richiedono il riallineamento dei tempi di ritenzione dopo la manutenzione o la sostituzione

della colonna; al contrario, è possibile ottenere la corrispondenza con i tempi di ritenzione originali dello strumento tramite un semplice standard di ri-blocco. Se lo standard di ri-blocco funge anche da standard di valutazione delle prestazioni della colonna, gli utilizzatori possono soddisfare in un unico passaggio i requisiti di valutazione delle prestazioni prescritti dal metodo AOAC 2012.13.

**Tabella 2.** Risultati di cinque iniezioni replicate di una miscela qualitativa di standard FAME per la valutazione delle prestazioni della colonna.

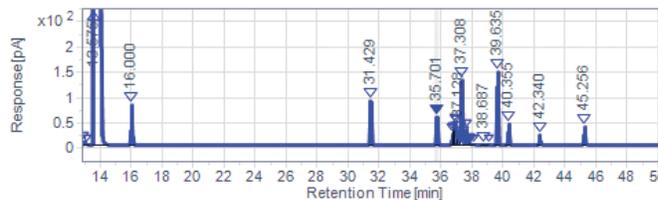
Valore	Descrizione	Rip. 1	Rip. 2	Rip. 3	Rip. 4	Rip. 5	RSD
$t_{R1}$	Tempo di ritenzione 1 in min, picco t13/t14	37,124	37,125	37,128	37,128	37,13	0,007%
$t_{R2}$	Tempo di ritenzione 2 in min, picco c9/c10	37,304	37,305	37,308	37,308	37,31	0,007%
	Area picco t13/t14	115,605	113,463	117,747	115,944	120,812	2,356%
	Area picco c9/c10	599,259	588,91	610,828	602,276	628,644	2,458%
$W_{0.5h1}$	Larghezza a mezza altezza, picco t13/t14	0,073	0,072	0,073	0,073	0,074	0,969%
$W_{0.5h2}$	Larghezza a mezza altezza, picco c9/c10	0,069	0,069	0,069	0,069	0,07	0,646%
R	Risoluzione dei picchi a metà altezza	1,496	1,506	1,496	1,496	1,475	0,77%

To complete the RTL calibration, the wizard will perform three runs. The first run is completed at a flow/pressure lower than the method setpoint, the second run is completed at the flow/pressure in the method, and the third run is completed at a higher flow/pressure than the method setpoint. Specify the pressure change for runs 1 and 3, and specify the sample vials for each of the runs. For liquid samples, this can be the same vial. For headspace samples, prepare three separate vials.

Run #	% Change in Pressure	Pressure	Vial Number
1	- 15%	21.673 psi	107
2		25.498 psi	107
3	+ 15%	29.323 psi	107

Injection Source: GC Injector - Front

From the chromatogram or table below, please select the retention time of your locking compound. If you wish to set that retention time to a specific value, please enter that in the "Targeted Retention Time" box.



Targeted Retention Time: 35.701 min

Targeted Compound Name: C18:0

Peak Number	Compound Name	Retention Time	Area
7	C18:0	35.7009	229.6815
8	C18:1n6t	36.7209	113.8100
9	C18:1n9t	36.7966	77.3611
10	C18:1n11t	36.8657	202.8851
11		36.9096	129.4210

**Figura 6.** Schermata delle impostazioni della procedura guidata del blocco del tempo di ritenzione.

La miscela di standard FAME *cis-trans* per la valutazione delle prestazioni della colonna è stata impiegata per bloccare i tempi di ritenzione del metodo. Sono stati selezionati un metodo di acquisizione, un metodo di elaborazione e un file dei risultati elaborati di un'iniezione acquisita in precedenza della miscela di standard per la valutazione delle prestazioni. Il composto target scelto per l'RTL è stato il C18:0. Come mostrato in Figura 6, la procedura guidata RTL ha diretto il processo di calibrazione della pressione usando il picco C18:0 con un tempo di ritenzione target pari a 35,701 minuti. La curva di calibrazione della pressione ottenuta dalla serie di tre analisi programmate automaticamente dalla procedura guidata RTL è caratterizzata da un'eccellente correlazione (Figura 7). Il metodo analitico è stato quindi bloccato al valore di pressione indicato pari a 25,498 psi. In seguito, è stata eseguita la manutenzione della colonna tagliando circa 0,5 m dalla testa della colonna CP-Sil 88 da 100 m.

Per valutare l'entità della perdita di ritenzione derivante dalla modifica della lunghezza della colonna, la miscela di standard FAME *cis-trans* per la

valutazione delle prestazioni della colonna è stata nuovamente analizzata dopo la manutenzione; il tempo di ritenzione del picco target C18:0 si è spostato in avanti di circa 0,232 minuti. Se per il sistema non fosse stato eseguito il blocco del tempo di ritenzione, l'operatore avrebbe dovuto analizzare uno standard contenente l'intero insieme di FAME di interesse e reinserire manualmente i tempi di ritenzione degli analiti nel metodo di elaborazione dei dati.

Anziché reinserire manualmente i nuovi tempi di ritenzione degli analiti, il metodo analitico è stato quindi nuovamente bloccato tramite la procedura guidata RTL implementando una nuova impostazione della pressione pari a 25,253 psi. Questa nuova impostazione della pressione tiene conto della modifica della lunghezza della colonna per verificare i tempi di ritenzione

previsti, accelerando pertanto la ripresa dell'operatività del sistema. La miscela di standard FAME *cis-trans* per la valutazione delle prestazioni della colonna è stata nuovamente iniettata per verificare se la nuova impostazione della pressione generasse i tempi di ritenzione previsti. In Figura 8 è mostrato un riepilogo dei risultati insieme a una sovrapposizione dei cromatogrammi. I tempi di ritenzione dopo il taglio della colonna e il nuovo blocco riproducevano da vicino i tempi di ritenzione originali prima del taglio, con variazioni comprese nell'intervallo 0,000 - 0,009 minuti per ognuno degli analiti fondamentali sulla colonna da 100 m. È degno di nota il tempo di ritenzione effettivo del C18:0, pari a 35,700, mentre il tempo di ritenzione target iniziale è di 35,701 minuti, con una differenza percentuale relativa dello 0,0028%.



Figura 7. Blocco del tempo di ritenzione - risultati della calibrazione della pressione.

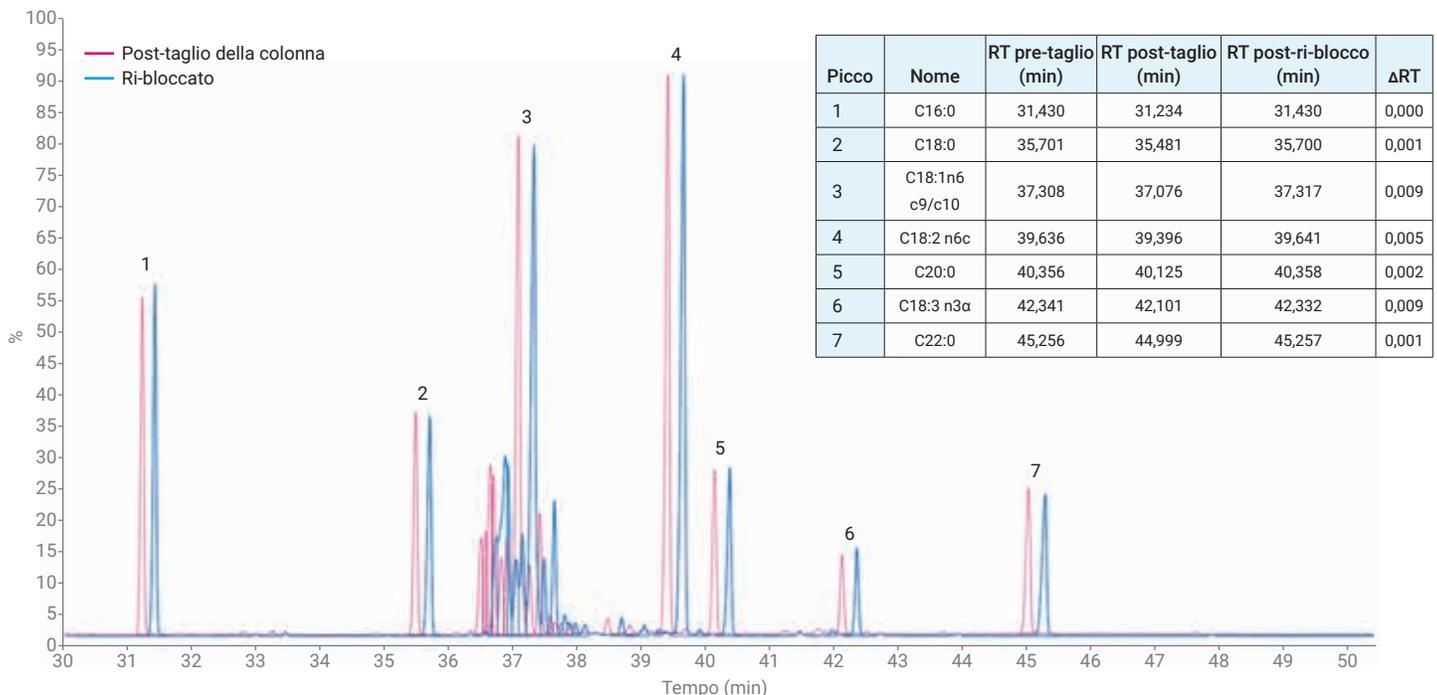


Figura 8. Risultati e sovrapposizione ingrandita dei cromatogrammi dello standard di valutazione delle prestazioni della colonna prima e dopo il nuovo blocco.

## Conclusione

La separazione di isomeri dei FAME su una colonna Agilent CP-Sil 88 da 100 m con un sistema GC Agilent 8890 garantisce una risoluzione affidabile che eccede i requisiti minimi di valutazione delle prestazioni prescritti dal metodo AOAC 2012.13. È stata ottenuta un'eccellente ripetibilità dell'iniezione di uno standard specifico di FAME per la valutazione delle prestazioni della colonna, con valori RSD per il tempo di ritenzione pari a 0,007% per due isomeri C18 fondamentali. Infine, l'uso di uno standard di valutazione delle prestazioni della colonna in abbinamento all'esclusiva funzione RTL di Agilent permette un'identificazione sempre corretta di isomeri dei FAME, accelera il ripristino dell'operatività dopo la manutenzione degli strumenti e semplifica i confronti inter-laboratorio.

## Bibliografia

1. Official Methods of Analysis AOAC International, Method 2012.13, **2012**.
2. David, F.; Sandra, P.; Vickers, A. K. Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. Nota applicativa *Agilent Technologies*, codice pubblicazione 5989-3760EN, **2005**.
3. Zou, Y.; Wu, H. Migliora l'analisi di 37 metilesteri di acidi grassi. Nota applicativa *Agilent Technologies*, codice pubblicazione 5991-8706ITE, **2018**.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Stampato negli Stati Uniti, 15 novembre 2019  
5994-1184ITE

