

# Aportacions de la cromatografia al coneixement dels lípids: olis i greixos

## Contributions of chromatography to the knowledge of lipids: oils and fats

Miquel Gassiot,<sup>1</sup> Lluís Comellas,<sup>1</sup> Francesc Broto,<sup>1</sup> Cristina Ribas,<sup>1</sup> Gemma Gotor,<sup>1</sup> Aracely Guadalupe Artiga<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universitat Ramon Llull. Institut Químic de Sarrià (IOS). Departament de Química Analítica i Aplicada

<sup>2</sup> Universitat Centreamericana José Simeón Cañas (UCA) (El Salvador)

**Resum:** La cromatografia, concretament la de gasos (GC, de l'anglès *gas chromatography*), ha fet possible caracteritzar els materials lipídics a nivell molecular i ha permès posar a punt mètodes ràpids i de gran reproductibilitat. En aquest treball, amb un enfocament històric, es descriuen alguns dels resultats de l'aplicació d'aquesta tecnologia analítica, que ha fet possible distingir clarament les diferents identitats i qualitats dels diversos tipus d'olis, greixos i materials lipídics. Per altra part, també s'explica com, gràcies a la GC, s'han resolt alguns greus incidents amb aquests importants productes alimentaris, deguts a contaminacions i a frauds. També es fa esment al tema de gran actualitat dels isòmers *trans* de l'àcid oleic i a les dificultats que implica la seva identificació analítica. S'aporten alguns resultats de correlació entre retenció cromatogràfica i estructura molecular, que contribueixen a la identificació d'alguns isòmers de configuració de l'àcid oleic *trans*.

**Paraules clau:** Cromatografia de gasos, lípids, àcids *trans*, QSRR.

**Abstract:** *Gas chromatography (GC) has made it possible to characterize lipid materials at molecular level and it has also allowed the development of rapid and high-reproducibility analytical methods. With a historical focus, this paper describes some of the results obtained with this analytical technique relating to the characterization of various types of oils, fats and lipid materials. Likewise, this paper explains how this technique has allowed to solve some serious incidents stemming from contamination and fraud. It also deals with a subject of great interest at the present time: the trans isomers of oleic acid and the difficulty of their identification by analysis. Also presented in this paper are the results obtained in the identification of trans-oleic acid configuration isomers thanks to the application of the methodology of correlation between chromatographic retention time and the molecular structure of compounds (QSRR methodology).*

**Keywords:** *Gas chromatography, lipids, trans fatty acids, QSRR.*

## Introducció

**E**l nom *lípid* prové del grec *lipos*, que vol dir 'greix'. L'ésser humà sempre ha associat el material greixós amb la seva característica fisicoquímica bàsica: ser immiscible amb l'aigua. Per aquest fet, els lípids s'identifiquen de forma primària, a diferència dels dos restants materials biològics bàsics: els glúcids i els pròtids, molt més compatibles amb l'aigua i dissolvents polars. Els lípids són substàncies fonamentals de la constitució dels éssers vius. Es consideren materials o substàncies lipídiques un gran nombre de substàncies naturals que es troben en els organismes vius i que, per la seva composició química, es constitueixen com la

part grassa d'aquests organismes. De totes aquestes substàncies, la part majoritària són els triglicèrids, considerats lípids simples: àcids grassos esterificats amb glicerina. També es consideren lípids simples les ceres (àcids grassos esterificats amb alcohols). A més, existeixen lípids compostos, com els fosfolípids (glicerina unida a dos àcids grassos i un grup fosfat unit a un alcohol) o lípids derivats, com els terpens, els esteroles (colesterol), etc. Si bé aquestes darreres substàncies es troben en quantitats més petites, en certs casos poden ser significatives.

La naturalesa química dels triglicèrids, amb un fort caràcter hidrofòbic, els permet formar vesícules i cèl·lules, els lipòcits, en els teixits adiposos dels éssers vius. Per altra part, els lípids, molt concretament els olis i els greixos, són fonamentals en la nostra alimentació. De la seva ingesta acurada depèn la salut de la nostra dieta. No obstant, el tractament que es realitza amb els olis i greixos, tant en els processos de cuinat dels aliments com en la indústria agroalimentària (obtenció

de preparats alimentaris d'acord amb les demandes), pot produir canvis estructurals en els triglicèrids. Aquestes modificacions poden afectar la qualitat nutritiva dels olis i greixos i arribar, així, a perjudicar la salut dels consumidors.

Afortunadament, les legislacions sanitàries i alimentàries han establert normes, cada vegada més estrictes, referents tant al mercat dels olis i dels greixos destinats al consum alimentari com als productes elaborats industrialment. Per aquest motiu, la FAO (Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació) [1] s'ha pronunciat en el sentit que els aliments greixosos comercialitzats han de declarar tant el contingut de colesterol com la proporció d'àcids grassos saturats i el contingut d'àcids grassos no saturats en configuració *trans*.

La cromatografia és la tècnica analítica que ha fet possible la caracterització dels lípids, molt especialment dels triglicèrids, a nivell molecular. No tan sols per a determinar la composició i la qualitat, sinó per a seguir les transformacions dels materials lipídics durant els processos industrials i biològics.

La taula 1 conté la llista dels àcids grassos més comuns. S'inclou el nom i el símbol usat més comunament. També s'inclou el nombre lipídic i el nombre d'insaturacions. El nombre lipídic conté el número de carbonis seguit del nombre d'insaturacions. Entre parèntesis s'indica la posició de les insaturacions.

TAULA 1. Llista d'àcids grassos més comuns

Símbols	Nom	Nombre lipídic	Insaturacions
B / C <sub>4</sub>	Butíric	C4:0	0
Co / C <sub>6</sub>	Caproic	C6:0	0
Cy / C <sub>8</sub>	Caprílic	C8:0	0
C / C <sub>10</sub>	Càpric	C10:0	0
La / C <sub>12</sub>	Làuric	C12:0	0
My / C <sub>14</sub>	Mirístic	C14:0	0
Pa / C <sub>16</sub>	Palmitic	C16:0	0
Pl / C <sub>16</sub> '	Palmitoleic	C16:1	1
St / C <sub>18</sub>	Esteàric	C18:0	0
O / C <sub>18</sub> '	Oleic	C18:1 (9)	1
L / C <sub>18</sub> ''	Linoleic (AGE)	C18:2 (9, 12)	2
Ln / C <sub>18</sub> '''	Linolènic (AGE)	C18:3 (9, 12, 15)	3

## Caracterització clàssica dels materials lipídics abans del descobriment de la cromatografia: els índexs, que es fonamenten en la química bàsica dels olis i greixos

La primera característica que els humans vam identificar com a pròpia dels olis i greixos va ser que eren saponificables. Els triglicèrids, que són la part majoritària dels lípids, es descomponen per tractament amb àlcalis (hidròxid de sodi o potassi) en les sals sòdiques o potàssiques dels àcids grassos i glicerina. Ha estat aquesta propietat la que ha donat la base per a una caracterització quantitativa d'un triglicèrid, ja sigui un greix o un oli.

La base de la reacció de saponificació és la següent:

triglicèrid + hidròxid de potassi/sodi = sabó potàssic/sòdic + glicerina

Prenent com a base aquesta reacció, es va establir la primera metodologia de tipus quantitatiu per a determinar els materials de naturalesa lipídica, i va aparèixer l'*índex* o *nombre d'esterificació*, que es defineix com «els mil·ligrams de KOH que calen per a saponificar totalment 1 gram d'oli o greix». Aquest índex dona una informació quantitativa del pes molecular mitjà dels àcids grassos que componen el triglicèrid estudiat.

Els olis i greixos poden estar parcialment descomposts en àcids lliures i glicerina per causes molt diverses, una de les quals, usualment la més important, és l'acció de la humitat tant en el fruit del qual s'extreu l'oli com en el greix o oli mateix. Per tant, tot oli o greix pot tenir un cert grau d'acidesa degut a la hidròlisi dels corresponents èsters. Per aquest motiu, s'ha establert l'*índex d'acidesa*, que especifica de forma quantitativa el grau d'hidròlisi d'un triglicèrid i s'expressa com «els mil·ligrams de KOH necessaris per a neutralitzar un gram d'oli o greix utilitzant fenolftaleïna com a indicador».

És evident que, quan es determina l'índex o nombre d'esterificació d'un triglicèrid, també es consumeixen uns mil·ligrams d'àlcali per formar els sabons corresponents als àcids grassos lliures. Per tant, la dada pròpiament representativa del pes

molecular mitjà dels àcids grassos d'un triglicèrid serà l'índex o nombre d'esterificació menys l'índex d'acidesa. Aquesta diferència es denomina *índex d'èster*.

Una altra característica important dels lípids és el grau d'insaturacions que tenen en les cadenes hidrocarbonades els àcids grassos que els componen. Donat que una propietat de les olefines és la fixació d'àtoms de iode en els dobles enllaços, s'ha utilitzat aquesta característica per avaluar el nivell d'insaturació d'un glicèrid determinat. Així, es coneix com a *índex de iode* «els grams de iode que reaccionen amb 100 grams d'oli o de greix».

En la taula 2, es presenten els valors dels índexs de iode i d'èster, abans definits, d'alguns olis i greixos d'ús comú. També s'inclou la composició en esterols de la fracció no saponificable de cada oli o greix.

TAULA 2. Valors dels índexs de iode i d'èster i informació de la fracció insaponificable de diferents olis i greixos			
Oli o greix	Índex de iode	Índex d'èster	Esterols (insaponificable)
Oli de palma	50-55	195-205	$\beta$ -sitosterol i un 6 % de colesterol (fracc. esterols)
Greix de porc	52-70	192-197	98 % de colesterol
Oli d'oliva	75-95	184-196	97 % de $\beta$ -sitosterol
Oli de soja	125-140	188-196	57 % de $\beta$ -sitosterol
Oli de llinosa	170-190	187-194	54 % de $\beta$ -sitosterol i un 2 % de colesterol (fracc. esterols)
Oli de colza	97-106	170-182	63 % de $\beta$ -sitosterol

Cal remarcar l'augment del valor de l'índex d'èster en disminuir el pes molecular mitjà dels àcids grassos majoritaris en la composició de l'oli o del greix. El valor d'índex d'èster més alt de la taula correspon a l'oli de palma, en el qual l'àcid gras majoritari és el palmític (C16:0) i, per tant, els triglicèrids d'aquest oli tindran un pes molecular mitjà inferior als de la resta de la taula, en els quals els àcids grassos majoritaris són l'oleic i l'esteàric, que tenen 18 àtoms de carboni.

Els valors d'índex de iode són baixos en l'oli de palma i el greix de porc, ja que tenen una proporció d'àcid oleic (C18:1) inferior. Aquest índex puja clarament en l'oli d'oliva, en què l'oleic és el majoritari, i encara augmenta més en els olis de soja i llinosa, per la presència d'àcids poliinsaturats, com el linoleic (C18:2) i el linolènic (C18:3).

El cas de l'oli de colza és interessant, ja que té un índex de iode similar al de l'oli d'oliva per la important presència d'àcid oleic. Però l'oli de colza, a més, té àcid erúic (C22:1). Per aquesta raó, té un índex d'èster inferior al de l'oli d'oliva.

Els marges de variació dels índexs de iode o d'èster inclosos a la taula 2 poden superar el 5 %, fet que no ha de sorprendre perquè van associats a la diferència corresponent a l'origen de la llavor o del fruit o a la característica de l'animal del qual provenen els triglicèrids.

L'índex d'acidesa, molt sovint, està relacionat amb un mal emmagatzematge o un tractament inadequat dels fruits o llavors, o, fins i tot, pot ser resultat de patologies sofertes per l'espècie productora degudes a fongs o plagues.

En el cas de l'oli d'oliva, l'acidesa també pot estar relacionada amb la maduresa del fruit. En aquest cas, s'expressa com a grams d'àcid oleic per 100 grams d'oli, donat que aquest és l'àcid gras majoritari. Aquesta mesura específica s'utilitza per classificar la qualitat de l'oli d'oliva.

A la taula 3, es presenten diferents qualitats d'oli d'oliva en relació amb la seva acidesa [2].

TAULA 3. Qualitat de l'oli d'oliva en relació amb el seu valor d'acidesa	
Qualitat de l'oli d'oliva	Acidesa màxima (*)
Extraverge	0,8
Verge	2,0
Verge corrent	3,3
Refinat	0,3

\* Mil·ligrams d'àcid oleic per 100 grams d'oli.

Si l'índex d'acidesa és un indicador del grau d'hidròlisi i, per tant, del deteriorament químic d'un triglicèrid, sorprèn que en el cas de l'oli d'oliva verge l'acidesa sigui superior a la de l'oli refinat, quan el mercat i la societat considera l'oli verge com el de més qualitat. Cal tenir en compte que la denominació de verge per a l'oli d'oliva es reserva, exclusivament, als olis en què les olives han estat tractades només per procediments mecànics: premsat, rentat amb aigua, sedimentació, filtració i centrifugació. Per aquesta raó, l'oli d'oliva verge conserva molts dels components del fruit que caracteritzen el gust d'aquest oli. No obstant, com que no ha estat tractat per algunes de les operacions de refinat, no ha perdut l'acidesa que

s'iniciava ja en els fruits. Així, cal destacar que la qualitat màxima atribuïda a l'oli extraverge només es dona en aquells olis verges amb una acidesa no superior a 0,8.

És convenient tenir en compte aquests aspectes sobre l'acidesa i la qualitat de l'oli d'oliva per utilitzar correctament aquest excel·lent producte lipídic per a la nostra alimentació. L'oli verge és el millor oli per consumir cru, sempre que el sistema gàstric del consumidor no presenti alguna anomalia. Però per cuinar, si es considera oportú utilitzar oli d'oliva, és recomanable que sigui refinat. En qualsevol cas, mai s'ha de sobreescalfar l'oli en els processos de fregida.

Fins al principi de la segona dècada del segle passat, tota la informació bàsica de què es disposava sobre olis i greixos es limitava als índexs esmentats. I, malgrat que els índexs tenien una relació evident amb la composició química dels glicèrids, aquesta era molt distant de la seva composició molecular concreta. Tanmateix, ja en el segle XIX, els laboratoris de recerca havien aconseguit la descomposició analítica i la identificació de la major part dels lípids coneguts. Això va permetre identificar l'estructura bàsica dels triglicèrids i els corresponents àcids grassos. Berthelot, l'any 1854, sintetitza els primers mono-, di- i triglicèrids. Hildritch, el 1927, proposa classificar els glicèrids segons el contingut d'àcids saturats (S) i insaturats (U): SSS, SSU, SUU i UUU. En aquestes recerques i en altres de relacionades es fonamenta la metodologia analítica esmentada, la dels índexs, que encara s'utilitza, molt especialment en el cas de l'índex d'acidesa.

## Fonament físic i químic de la cromatografia

La cromatografia és una tècnica de separació física que es fonamenta en la frenada selectiva dels components d'un fluid quan aquest percola a través d'un llit porós. El fluid pot ser líquid o gasós i el llit porós pot ser sòlid o un líquid estacionari suportat per un sòlid. En les primeres publicacions sobre cromatografia, les separacions es realitzaven utilitzant un gas com a fluid percolant, per això la tècnica es coneixia amb el nom de *cromatografia en fase vapor*. En la *frenada selectiva* és on rau la part més química d'aquesta tècnica. El descobriment de la cromatografia s'atribueix a Tswett (Mikhail Semenovitch Tswett), nascut a Asti (Itàlia) l'any 1872 i mort a Rússia el 26

de juny de 1919. És molt difícil atribuir actualment la nacionalitat real a Tswett. Si bé sempre se l'ha considerat rus, va néixer a Itàlia i era fill de mare italiana. Va estudiar i es va graduar com a doctor a la Universitat de Ginebra i va ser professor de la Universitat de Tartu (Estònia). Quan els alemanys, en la Primera Guerra Mundial, entren a Estònia, la Universitat es trasllada a Voronez (Rússia), on va morir Tswett. Per a més informació, vegeu la referència [3].

### Irrupció de la cromatografia i l'analítica molecular

Els experiments mateixos amb els quals Tswett va descobrir la cromatografia mitjançant la separació de les diferents clorofil·les posen en evidència la subtillesa separativa d'aquesta tècnica. Cal tenir en compte la poca diferència entre la fórmula química de la clorofil·la A ( $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ ) i de la clorofil·la B ( $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ ), ambdues separables cromatogràficament, per a poder apreciar la qualitat d'aquesta metodologia, que permet distingir i separar substàncies molt semblants i de pes molecular elevat. Per tant, era d'esperar que, amb els progressos tecnològics que van fer possible la cromatografia de gasos, aquesta nova versió de la tècnica s'apliqués ràpidament a dos tipus de materials de gran interès: les fraccions de destil·lació del petroli i l'analítica dels lípids, olis i greixos, i permetés una analítica molecular.

L'any 1952, Martin i James, premis Nobel de Química, publiquen la primera separació amb cromatografia de gasos d'una mescla d'àcids orgànics [2], des de l'acètic fins a l'*n*-valeriànic (figura 1). Per tant, s'havia donat un primer pas vers la separació i la identificació dels diferents àcids grassos que componen un glicèrid.

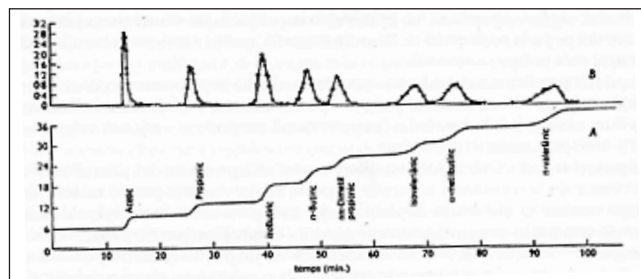


FIGURA 1. Cromatograma corresponent a la primera separació per GC d'una mescla d'àcids orgànics.

La separació i la identificació dels components moleculars d'un material glicèrid és complexa malgrat les possibilitats de

les tècniques cromatogràfiques. Cal tenir en compte que un greix o un oli d'origen natural serà una mescla de glicèrids en què caben totes les combinacions possibles dels èsters de la glicerina amb tots els àcids grassos de nombre lipídic 4 fins a 24, o inclús superior, amb totes les possibilitats d'insaturació en la cadena hidrocarbonada. Així mateix, cal tenir en compte que en un material lipídic també s'hi troben mono- i diglicèrids, àcids grassos lliures i la fracció insaponificable.

Per aquesta raó, en un primer moment, per a la caracterització dels olis o greixos mitjançant cromatografia no es va optar per la separació i la identificació de cada un dels glicèrids que componen un oli o greix.

Encara que James i Martin havien separat els primers àcids grassos lliures amb una cromatografia en fase vapor, la separació d'acord amb les exigències que reclama la química analítica es va aconseguir quan van aparèixer els primers cromatògrafs de gasos en els laboratoris, entre els anys 1959 i 1960. Per altra part, calia tenir en compte les limitacions de la tècnica mateixa: l'elevada temperatura a la qual s'havia de realitzar la cromatografia, les limitacions de resolució degut a la multiplicitat de compostos en forma de glicèrids o l'activitat especial dels àcids lliures, junt amb la limitada estabilitat tèrmica dels àcids lliures i dels olis o greixos.

Per aquests motius, es va decidir metilar els àcids grassos que componen un glicèrid i procedir a la separació cromatogràfica dels èsters metílics obtinguts.

Aquesta metodologia va obligar a assegurar que la metilació es realitzés de forma quantitativa i representativa. O sigui, que la composició dels èsters metílics obtinguts fos una reproducció fidel de la dels àcids grassos en l'oli, greix o glicèrid estudiat. Als anys seixanta ja es disposava dels mètodes pertinents per a metilar olis i greixos, que després de múltiples estudis, ajustos i modificacions han esdevingut norma oficial.

El Reglament (CEE) núm. 2568/91 de la Comissió Europea [2] estableix els mètodes per a la metilació de l'oli d'oliva i ofereix dues opcions:

- Mètode A: Transesterificació en fred amb una dissolució metanòlica d'hidròxid potàssic.
- Mètode B: Metilació en calent amb una dissolució metanòlica de metilat sòdic, seguida d'esterificació en medi àcid.

## Aplicació de la cromatografia a l'estudi analític dels triglicèrids: dificultats i primers resultats

A la figura 2 es mostra la separació dels àcids grassos metilats d'una mostra d'oli d'oliva en un cromatograma fet amb els mitjans de l'any 1964 (cromatografia de gasos amb columna reblerta).

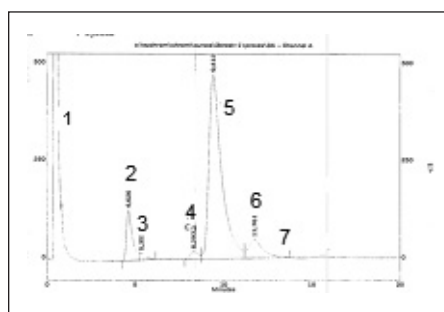


FIGURA 2. Cromatograma corresponent a la separació dels àcids grassos metilats d'una mostra d'oli d'oliva (1964). Identificació dels pics: 1) dissolvent, 2) palmitat de metil (C16:0), 3) palmitoleat de metil (C16:1), 4) estearat de metil (C18:0), 5) oleat de metil (C18:1), 6) linoleat de metil (C18:2), 7) linolenat de metil (C18:3).

A la figura 3 també es mostra el cromatograma d'una mostra d'oli d'oliva realitzat el 2010 amb cromatografia de gasos d'alta eficàcia (columnes capil·lars). Com es pot observar, s'aconsegueix una bona resolució entre els pics corresponents als compostos que no se separaven de forma completa en el cromatograma de la figura 2 de l'any 1964 (palmitat amb palmitoleat de metil i oleat amb linoleat de metil).

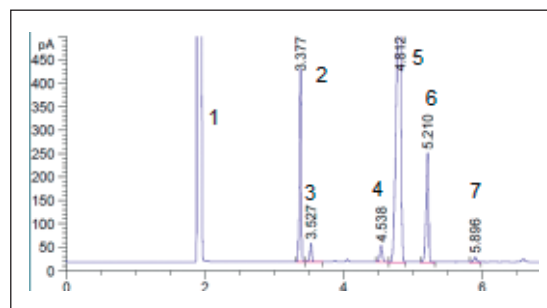


FIGURA 3. Cromatograma corresponent a la separació dels àcids grassos metilats d'una mostra d'oli d'oliva (2010). Identificació dels pics: 1) dissolvent, 2) palmitat de metil (C16:0), 3) palmitoleat de metil (C16:1), 4) estearat de metil (C18:0), 5) oleat de metil (C18:1), 6) linoleat de metil (C18:2), 7) linolenat de metil (C18:3).

No obstant, la cromatografia realitzada l'any 1964 permetia obtenir una informació qualitativa i quantitativa valuosa. Per aquesta raó, ja es va poder verificar una correlació matemàtica entre la retenció cromatogràfica i el nombre d'àtoms de

carboni de cada un dels èsters metílics d'àcids grassos separats [4].

Aquesta correlació entre la retenció cromatogràfica, representada amb el volum de retenció corregit i ajustat ( $V'_p$  i  $V'_a$ ), i el nombre d'àtoms de carboni ( $n$ ) es presenta a continuació:

$$\log V'_p = a_p + b_p \cdot n$$

$$\log V'_a = a_a + b_a \cdot n$$

On:

- els subíndexs  $p$  i  $a$  indiquen la característica de la fase estacionària amb què s'ha efectuat la separació cromatogràfica en fase vapor ( $a$ : no polar;  $p$ : polar).
- $V'_p$  i  $V'_a$  és el volum de retenció corregit.
- $n$  és el nombre d'àtoms de carboni de l'èster metílic considerat.
- $a_a$ ,  $b_a$ ,  $a_p$  i  $b_p$  són les constants d'ajust, corresponents a la sèrie homòloga d'èsters metílics d'àcids grassos saturats separats per cromatografia de gasos a temperatura isoterma.

Per a la sèrie dels èsters metílics dels àcids grassos monoinsaturats s'obtenen unes equacions anàlogues.

Aquesta correlació lineal ha estat i és de gran utilitat per a la interpretació de les anàlisis d'èsters metílics de glicèrids, realitzades per cromatografia de gasos.

Cal destacar que aquestes primeres correlacions entre retenció (gas-cromatogràfica) i estructura, junt amb la important aportació de Kovats i els seus índexs de retenció [5], van ser el precedent d'una innovadora possibilitat d'aprofitament de la cromatografia, que s'inicia els anys vuitanta i dona com a resultat la tècnica QSRR (sigles en anglès de *quantitative structure-retention relationship* (relació quantitativa entre estructura i retenció)) [6]. Aquesta tècnica permetrà fer matisacions moleculars subtils per via experimental cromatogràfica.

### Composició quantitativa en àcids grassos obtinguda per cromatografia de gasos d'alguns greixos i olis

A la taula 4 es presenta la composició d'àcids grassos d'una mantega de llet publicada per J. P. Wolff [7]. Aquestes dades

TAULA 4. Composició d'àcids grassos d'una mantega de llet (J. P. Wolff, 1968)

Àcid gras	Límits (%)	Àcid gras	Límits (%)
C4:0	2,8-5,0	C15:0	1,5-1,8
C6:0	1,1-3,0	C15:1	0,1-0,2
C8:0	1,0-2,1	C16r	0,3-0,5
C10:0	2,1-3,9	C16:0	22,0-37,5
C10:1	0,2-0,5	C16:1	1,9-2,6
C11:0	0,0-0,1	C17r	1,1-1,6
C12:0	2,6-4,2	C17:0	0,5-0,7
C12:1	0,1-0,2	C17:1	0,3-0,6
C13r	0,1-0,2	C18r	0,1-0,3
C13:0	0,1-0,3	C18:0	6,6-13,5
C14r	0,2-0,3	C18:1	16,2-34,5
C14:0	8,2-14,5	C18:2	1,3-2,8
C14:1	0,9-1,5	C18:3	0,7-4,8
C15r	1,1-1,5	C20:0	0,0-0,3

r: ramificat.

són antigues, com indica la data de publicació de l'obra de Wolff (1968), però els resultats obtinguts per cromatografia de gasos dels corresponents èsters metílics són totalment vàlids actualment.

Com es pot observar a la taula 4, el greix de la llet és molt complex i s'hi troben àcids grassos des de C4(0) fins a C20(0), junt amb petites quantitats d'àcids amb un nombre senar d'àtoms de carboni i, fins i tot, alguns amb cadena ramificada. Cal recordar que abans que existís la cromatografia hi havia l'opinió estesa que en la natura no hi havia greixos i olis amb àcids grassos amb un nombre senar d'àtoms de carboni.

A la taula 5 es presenta la composició d'àcids grassos d'un oli d'oliva, publicada per J. P. Wolff [7].

A la taula 6 es presenta la composició de l'oli de palma, junt amb la de l'oli d'oliva. S'indiquen els valors mitjans de la composició d'àcids grassos obtinguts per cromatografia, procedents de la mateixa font que els de la taula 5.

És interessant remarcar la composició d'àcids grassos molt més complexa del greix de la llet en comparació amb la dels dos olis vegetals (oliva i palma), la qual cosa és comprensible si tenim en compte el nivell tròfic superior dels mamífers res-

Àcid gras	Límits (%)
C15:1	–
C16r	–
C16:0	–
C16:1	8,1-12,2
C17r	0,3-1,2
C17:0	–
C17:1	–
C18r	–
C18:0	2,5-3,8
C18:1	74,9-83,7
C18:2	2,4-8,4
C18:3	0,6-1,4
C20:0	0,2-0,5
C20:1	0,2-0,4

Àcid gras	Oli d'oliva (valor mitjà, %)	Oli de palma (valor mitjà, %)
C15:1	–	–
C16r	–	–
C16:0	–	–
C16:1	10,8	46,8
C17r	0,6	0,3
C17:0	–	–
C17:1	–	–
C18r	–	–
C18:0	3,1	5,3
C18:1	78,5	36,6
C18:2	5,7	8,6
C18:3	0,8	0,4
C20:0	0,3	0,5
C20:1	0,3	–

pecte dels productors de triglicèrids vegetals. Per altra part, cal notar que la proporció d'àcids grassos saturats en l'oli d'oliva (un 14,2 %, segons la taula 6) és molt inferior a la de l'oli de palma (54,1 %). Aquest fet està d'acord amb la temperatura mitjana en què creixen les oliveres i *Elaeis guineensis*, productora de l'oli de palma. Com més baixa sigui la tempera-

tura mitjana en què visqui un organisme, més alta serà la proporció d'àcids insaturats dels glicèrids dels seus teixits. Aquesta proporció ve establerta de manera que la fracció de glicèrids doni als teixits una plasticitat adequada a la temperatura mitjana a la qual es troba l'ésser viu corresponent i en faciliti el corresponent metabolisme (vegeu el treball d'A. R. Cossins i C. L. Prosser [8]).

Els primers resultats assolits, a partir de 1965-1966, per la cromatografia dels èsters metílics dels àcids grassos d'un glicèrid va permetre donar una informació qualitativa i quantitativa sobre la composició dels triglicèrids de la part majoritària dels olis i dels greixos, a nivell molecular. No obstant, quedava encara pendent resoldre la separació i identificació dels components de la fracció insaponificable.

### *Aplicació de la cromatografia a la part no saponificable dels olis i greixos*

Quan es realitza la saponificació d'un oli o un greix, els àcids grassos en forma de sals potàssiques o sòdiques es trobaran en la fase aquosa, mentre que el que resta queda en la fase orgànica (èter etílic o hexà).

La part més interessant pel que fa al contingut d'aquesta fase orgànica són els *esteroles*, perquè de la seva composició és possible obtenir informació d'interès sobre la identitat i la qualitat de l'oli o el greix estudiat.

Uns anys després d'haver-se resolt la cromatografia dels èsters metílics dels àcids grassos es va emprendre la separació cromatogràfica de mesclades d'esterols. Donat el pes molecular d'aquestes substàncies, calia realitzar la cromatografia a temperatura elevada, entre 280 i 300 °C, per aconseguir una separació adequada. Aquest fet comportava el risc de descomposició de la mostra a l'injector. A més, per aconseguir una separació amb temps de retenció raonables, era necessari utilitzar columnes reblertes amb una metilsilicona sobre un suport sòlid desactivat i un grau d'impregnació baix, del 2 % o 3 % de la fase estacionària.

En els greixos d'origen animal ja s'hi havia identificat el colesterol com un dels components importants de la fracció no saponificable. No obstant, en els olis o materials greixosos d'origen vegetal, la cromatografia de gasos va permetre separar i

identificar els següents esterols: *campesterol*, *estigmasterol* i  $\beta$ -*sitosterol*.

A la figura 4 es mostra la separació d'una mescla de patrons que contenen colesterol i els esterols propis dels olis vegetals (*campesterol*, *estigmasterol* i  $\beta$ -*sitosterol*). Cal tenir en compte que les estructures dels esterols són totes molt similars i es fonamenten en l'estructura de l'hidrocarbur ciclopentà-perhidrofenantrè.

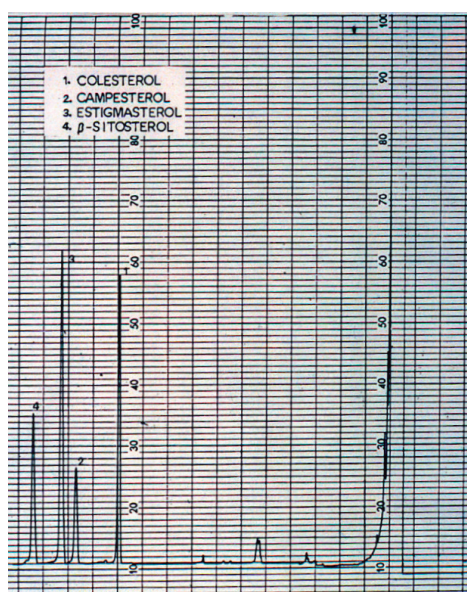


FIGURA 4. Separació cromatogràfica (GC-FID) d'una barreja d'esterols: colesterol, campesterol, estigmasterol i  $\beta$ -sitosterol.

La posada a punt d'aquesta tècnica va permetre detectar l'adulteració d'alguns olis vegetals amb greixos d'origen animal, fet que es va donar en el cas d'alguns olis d'oliva. Tanmateix, cal tenir en compte que es troba colesterol a la fracció insaponificable d'alguns olis vegetals. Per exemple, es pot trobar colesterol en l'oli de palma (de prop d'un 6 % de la fracció d'esterols), en l'oli de cacauet i en l'oli de lli (2 % de la fracció d'esterols).

## La cromatografia com a eina bàsica per a la caracterització dels lípids: qualitat, identificació de mescles i contaminacions

Des dels anys vuitanta del segle passat, la sensibilitat i la capacitat de separació i d'identificació de la cromatografia de

gasos en l'entorn dels greixos i olis era ja molt satisfactòria. Per altra part, la reproductibilitat de la informació quantitativa també era molt bona. Per aquesta raó, les tècniques cromatogràfiques es van imposar en la majoria de normatives analítiques de tipus oficial (UNE i FDA) i, més endavant, també als reglaments (CEE) corresponents de la Comissió Europea. Aquestes metodologies d'analítica molecular, junt amb tot l'esforç per aconseguir normes acreditades entre diversos laboratoris, han contribuït decisivament a la millora de la qualitat i seguretat dels aliments de base lipídica.

Malgrat que el nostre país i Europa disposen d'una capacitat analítica consolidada, els dos fets o anècdotes que es descriuen en els següents paràgrafs són un exemple que «l'absoluta previsió o el control analític global són una utopia».

### *L'oli de colza, un oli conflictiu: frau i problema sanitari*

L'oli de colza s'extreu del premsat de les llavors de la colza, *Brassica napus*, i, convenientment refinat, s'utilitza en alimentació, especialment per a fregir en els països del nord d'Europa. No obstant, aquest oli ha esdevingut un material de partida per a l'obtenció de biodièsel i també s'ha usat en la indústria. Els olis de colza per a aplicacions industrials es tenyeixen amb un colorant o traçador per a evitar que determinades partides d'aquest oli passin a la cadena alimentària, ja que es consideren desnaturalitzats. Com correspon a un oli produït per un vegetal que creix en països freds, aquest oli té una elevada proporció d'àcids grassos insaturats. Entre aquests destaca l'àcid erúic, amb un nombre lipídic de 20:1, que pot arribar a representar fins al 45 % del contingut d'àcids grassos en alguns tipus d'oli de colza.

A la taula 7, es mostren els marges de composició d'àcids grassos publicats per J. P. Wolff [9] per a olis amb un contingut baix d'àcid erúic i un contingut alt d'aquest àcid. També s'ha inclòs en aquesta taula el resultat de l'anàlisi d'un oli de colza realitzat l'any 2016 a l'Institut Químic de Sarrià (IQS).

És interessant remarcar el gran marge de variació en el contingut d'àcid erúic (taula 7). La disminució de la concentració d'àcid erúic ve compensada per un augment de la d'àcid oleic en els diferents tipus d'olis de colza. L'oli de colza canadenc és el que té un contingut més baix d'àcid erúic.



TAULA 7. Oli de colza: marges dels àcids grassos per a olis amb un contingut baix i alt d'àcid erúctic (J. P. Wolff, 1968) [9]

Oli de colza	Fracció d'àcids grassos (%)		
	Baix contingut d'àcid erúctic [4]	Alt contingut d'àcid erúctic [4]	Oli de colza, IQS (2016)
C16:0	2,6-6,0	3,5-3,6	4,8
C16:1	0,1-0,3	0,1-0,2	0,3
C18:0	1,0-1,3	0,7-0,8	1,6
C18:1 (àcid oleic)	28,0-31,0	16,1-19,5	63,3
C18:2	10,0-17,5	14,0-15,4	20,2
C18:3	2,0-8,5	8,1-8,5	7,6
C20:0	0,4-0,5	0,3-0,8	0,6
C20:1	11,1-16,0	11,3-11,6	1,2
C20:2	0,0-0,5	0,0-0,5	0,0
C22:1 (àcid erúctic)	24,9-31,0	41,4-45,5	0,3
C22:2	0,2-0,3	0,2-1,5	0,1

L'any 1976, es va publicar una Directiva europea (76/621/CEE) que regulava la ingesta d'àcid erúctic en l'alimentació humana. En el pròleg, es defineix l'àcid erúctic com una toxina vegetal natural a la qual s'atribueixen certs problemes sanitaris. S'havien realitzat estudis que posaven de manifest que no era convenient sobrepassar un cert nivell d'aquest àcid en el consum d'alguns glicèrids. La normativa esmentada va establir, l'any 1977, que el contingut d'àcid erúctic en greixos i olis no havia de superar el 10 %, i que al 1979 s'havia de reduir al 5 %. Més recentment, l'any 2006, l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) va establir una IDT (ingesta diària tolerable) d'àcid erúctic de 0,7 g/kg de pes corporal [10]. Per tant, és comprensible que s'hagin fet tota classe d'estudis genètics per aconseguir plantes de *Brassica napus* que permetin obtenir olis de colza amb baixos continguts d'àcid erúctic. Aquest fet explica els resultats de l'anàlisi realitzada a l'IQS l'any 2016 (taula 7), que indica un contingut d'àcid erúctic del 0,3 %.

Un altre aspecte interessant és la comparació de la relació entre el contingut d'àcids grassos insaturats i el contingut d'àcids saturats en olis de colza clàssics i en els olis d'oliva espanyols (taula 8).

L'alt contingut d'àcids insaturats de l'oli de colza (una relació superior a dues vegades la de l'oli d'oliva) és coherent amb les condicions climàtiques en què es cultiva *Brassica napus*.

TAULA 8. Relació entre àcids grassos insaturats i saturats en diferents olis

Tipus de mostra d'oli	Àcids grassos insaturats/saturats (%) (*)
Olis de colza clàssics	17,8
Oli de colza (IQS, 2016, taula 7)	13,0
Oli d'oliva espanyol	6,2

\* Composició mitjana.

Tot i els recels de tipus sanitari que ha pogut generar l'oli de colza, basats en les característiques de l'àcid erúctic, no va tenir cap relació amb els greus problemes sanitaris de l'incident denominat *síndrome tòxica*, un greu problema que es va produir a Espanya la primavera de l'any 1981, quan una partida d'oli de colza desnaturalitzat amb anilina per a ús metallúrgic va passar fraudulentament a la cadena alimentària. El Laboratori de Cromatografia de l'IQS va identificar *oleoanilida* en mostres d'aquest oli. Aquest resultat demostrava que les mostres analitzades, que van ser lliurades com a «oli tòxic», havien estat desnaturalitzades amb anilina.

### Quan una mala pràctica pot produir una contaminació en un producte alimentari i, al mateix temps, un seriós problema ambiental

Ara farà una trentena d'anys, quan un carregament d'olives arribava al trull, es feia una valoració de l'oli que se'n podria obtenir. Aquest mesurament es realitzava pel mètode Fosslet. De forma resumida, consistia a extreure amb percloroetilè (C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>) l'oli d'una determinada quantitat d'olives. El percloroetilè té una densitat d'1,62 g · cm<sup>-3</sup>. Amb la disminució de la densitat per l'oli extret i el pes de la mostra, es deduïa la quantitat d'oli que es podria obtenir de la mostra.

El problema es va originar pel fet que, des de feia anys, el percloroetilè utilitzat anava a parar als desaigües. Aquests abocaments havien contaminat l'aigua dels aqüífers que després s'utilitzava en l'obtenció de l'oli. La solubilitat d'aquest dissolvent en aigua és de 0,015 grams per litre.

L'alarma sobre aquest tema es va disparar al Laboratori Cantonal de Zuric quan van detectar la presència de percloroetilè en oli d'oliva verge a una concentració de prop d'algunes parts per milió (ppm).

Una comissió d'exportadors d'oli d'oliva va demanar ajuda a l'IQS per a trobar solució a aquest problema. L'IQS va concloure que aquell resultat era correcte. Quan es va tenir coneixement de com es procedia a valorar el contingut d'oli de les olives en diverses cooperatives, es va decidir estudiar la possible contaminació de l'aigua utilitzada en l'obtenció de l'oli d'oliva verge. Donada aquesta possible sospita, es va encarregar a l'IQS posar a punt un mètode per a detectar dissolvents clorats en aigua i estudiar els aqüífers de diverses zones en què es produïa oli. Es van trobar diversos aqüífers contaminats amb percloroetilè, dels quals alguns trulls cooperatius treien l'aigua per al procés de rentat de l'oli. En alguns casos, el nivell de contaminació arribava fins a la saturació, és a dir  $0,015 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Aquest resultat feia pensar que en el fons de l'aqüífer hi havia percloroetilè com una fase separada més densa, fet que va poder ser comprovat.

Tenint en compte la quantitat d'aigua que s'utilitzava en el procés, i d'acord amb la solubilitat del percloroetilè en l'aigua, els càlculs donaven un resultat de prop d'una ppm en l'oli, que coincidia amb el resultat trobat a Zuric: l'oli extreia el percloroetilè que hi havia a l'aigua.

### *El problema dels àcids trans en els olis i els greixos*

El colesterol és una substància essencial que, a part del que ingerim per la dieta, se sintetitza en el nostre organisme. El fetge és l'òrgan base de la síntesi, el subministrament, la distribució i l'excreció de lípids en el nostre organisme i, per tant, és el responsable que sigui correcte l'equilibri entre el que ingerim, el que sintetitzem i el que eliminem. Les lipoproteïnes són les encarregades del transport del colesterol i dels triglicèrids del fetge als teixits, i dels teixits al fetge per a l'excreció del colesterol sobrant. Les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) són les encarregades del transport del colesterol als teixits. Per tant, el colesterol que es detecta en les LDL no és bo que superi uns certs nivells. Contràriament, les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) són les que transporten el colesterol en sentit contrari (dels teixits al fetge). Per aquest motiu, el colesterol HDL convé que no baixi de certs valors.

En els olis i greixos naturals, els àcids insaturats es troben en conformació *cis*. En la gran majoria dels olis, l'àcid insaturat més important i majoritari, entre els monoinsaturats, és l'àcid

oleic (C18:1). No obstant, qualsevol tractament que es faci sobre un oli o un greix pot posar en marxa la isomerització de l'àcid oleic a la forma *trans*, ja que aquesta és més estable que la *cis*.

La societat, amb les seves exigències des de fa més de cinquanta anys, demana reduir el temps i la feina en les cuines del món occidental. Aquest fet ha potenciat una importantíssima indústria agroalimentària. Per altra part, la competitivitat en aquest ja gran sector industrial ha anat influïent en els gustos, les preferències i les modes de la nostra alimentació. Aquesta realitat ha generat la posada a punt de diferents processos industrials per a adaptar olis i greixos naturals a la preparació dels més diversos productes alimentaris. En molts d'aquests processos, pot tenir lloc la isomerització de l'àcid oleic *cis* en el seu isòmer *trans*: l'àcid elàidic.

No obstant, no és correcte culpar exclusivament d'aquesta modificació els processos industrials, ja que aquesta també es pot produir en el més simple dels processos culinaris: fregir.

Des de principis del segle actual [11], es tenen indicis que la ingesta de greixos que contenen quantitats significatives d'àcids en estructura *trans* augmenta la probabilitat de patir malalties cardiovasculars. Més endavant es va saber que la presència en el nostre organisme d'aquests àcids *trans* dificulta la formació de lipoproteïnes HDL, i això provoca dificultats en l'eliminació del colesterol sobrant. Per aquesta raó, des de fa uns anys, les normatives sobre productes alimentaris exigeixen que s'especifiqui la quantitat d'àcids *trans* que conté, o pot arribar a tenir, un producte que es posa al mercat.

L'anàlisi dels isòmers *trans* que es fa per cromatografia de gasos és una anàlisi complexa i els mètodes establerts es redueixen a la determinació de l'àcid elàidic, que és l'isòmer *trans* de l'àcid insaturat majoritari dels olis i greixos. No obstant, cal tenir en compte que el problema d'isomeria no es limita a l'àcid oleic, ja que també els àcids poliinsaturats poden presentar aquests canvis conformacionals.

Per altra part, tant en els processos industrials com simplement amb el cuinat d'aliments, o també per efecte de la llum o de bacteris, es poden produir, a més de canvis de conformació de *cis* a *trans*, canvis en la transposició de la insaturació del carboni 9 (pròpia dels àcids oleic i elàidic) a altres posicions. De fet, s'han trobat diversos isòmers de posició de l'àcid

elaídic en olis i greixos que han estat tractats per a la preparació de margarines. Alguns d'aquests isòmers encara no s'han pogut identificar.

## La cromatografia de gasos en la separació i la identificació dels isòmers *trans* de l'àcid *trans*-9-octadecenoic (àcid elaídic): correlacions entre retenció cromatogràfica i estructura

Per a la separació dels isòmers *cis* i *trans* d'un determinat àcid gras, com a èsters metílics, cal recórrer a la cromatografia de gasos d'alta resolució, donada la poca diferència de retenció entre ambdós isòmers. La dificultat s'agreuja quan un dels isòmers és majoritari, com succeeix en el cas real de la separació de l'oleat de metil (*cis*) de l'elaïdat de metil (*trans*), en què el pic cromatogràfic de l'oleat serà prop de cent vegades més intens que el de l'elaïdat. La complexitat augmenta quan es tracta d'un greix real tractat, com és el cas d'una margarina, en què apareixen també els diferents isòmers de posició del doble enllaç format a l'àcid oleic i a l'elaídic (figura 5).

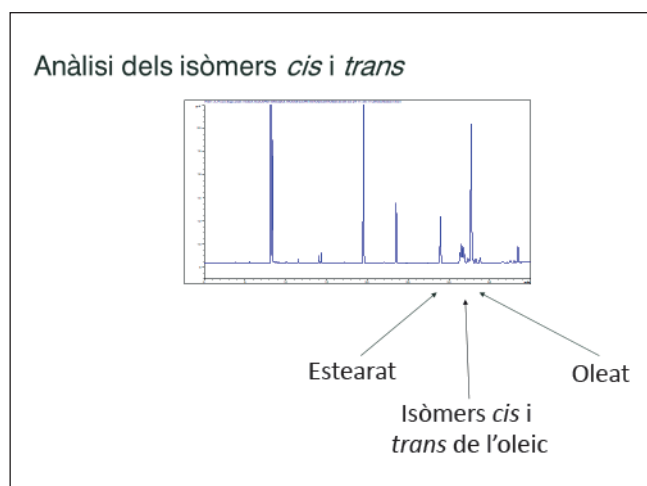


FIGURA 5. Cromatograma corresponent a la separació dels àcids grassos metilats d'una margarina (2009) a 165 °C. Anàlisi dels isòmers *cis* i *trans*.

En la figura 5 s'observa com s'interfereixen els pics corresponents als isòmers *cis* i *trans* conjuntament amb els isòmers de posició de la insaturació de l'àcid *cis*-9-octadecenoic en forma d'èsters metílics.

L'objectiu és identificar i valorar cada un dels components que apareixen en el cromatograma entre l'estearat de metil i l'oleat de metil, i que en la figura es designen globalment com a «isòmers *cis* i *trans* de l'oleic».

Per a aconseguir aquest repte, cal fer una separació prèvia amb cromatografia de líquids (LC), que permetrà obtenir diverses fraccions. La primera contindrà els èsters metílics dels àcids saturats; la segona correspon als àcids monoinsaturats amb conformació *trans*; la tercera, als àcids monoinsaturats amb conformació *cis*, i la darrera, als àcids poliinsaturats.

La separació de les fraccions dels *cis* i *trans* es va aconseguir amb cromatografia de capa fina, utilitzant sílice dopada amb un 10 % de nitrat de plata. L'ió plata ( $\text{Ag}^+$ ) té una capacitat especial per a la retenció selectiva dels orbitals  $\pi$  dels àcids insaturats, els quals tindran un impediment estèric diferent en conformació *cis* o bé en *trans*. Per a les experiències que es descriuen més endavant, s'ha utilitzat una microcolumna de Supelco amb  $\text{Ag}^+$ . El reblliment d'aquesta columna està funcionalitzat amb grups alquil sulfònics ionitzats associats als ions plata que retenen selectivament les configuracions *cis*. Per a aquest treball, només es va poder disposar dels patrons que es troben en el mercat com a «*cis-trans* FAME Mix», subministrats per Restek. La dissolució conjunta conté  $10 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  dels patrons següents en les proporcions indicades a continuació:

- C18:0, estearat de metil, 20 %;
- C18:1, 6t, petroselinat de metil, 8 %;
- C18:1, 9t, elaïdat de metil, 10 %;
- C18:1, 11t, vaccenat de metil, 12 %;
- C18:1, 6c, petroselinat de metil, 8 %;
- C18:1, 9c, oleat de metil, 10 %;
- C18:1, 11c, vaccenat de metil, 12 %;
- C18:2, 9c, 12c, linoleat de metil, 20 %.

A la figura 6 es presenta el cromatograma de la mescla «*cis-trans* FAME Mix». Cal destacar que els isòmers *trans* s'elueixen abans dels isòmers *cis* per a un mateix compost, ja que la fase estacionària és polar (cianopropilmetilpolisiloxà) i els isòmers *cis* tenen l'orbital  $\pi$  menys impedit per a interaccionar amb els grups ciano de la fase, de manera que queden més retinuts.

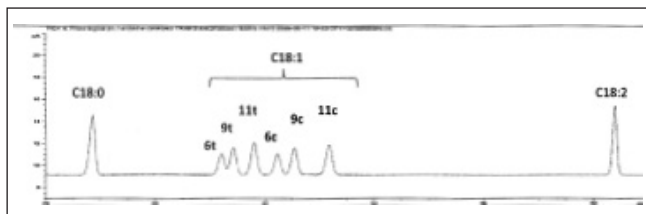


FIGURA 6. Cromatograma ampliat corresponent a la separació dels àcids grassos metilats d'una margarina (2009) a 165 °C. Anàlisi dels isòmers *cis* i *trans*.

A la figura 7 es presenta l'ampliació del cromatograma de la fracció *cis* de la barreja de patrons separada per mitjà de la microcolumna i, també, el cromatograma de la fracció *cis* dels èsters metílics d'una margarina.

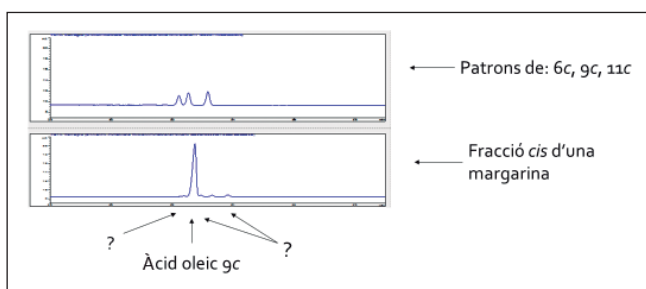


FIGURA 7. Cromatograma ampliat corresponent a la fracció dels isòmers *cis* obtingut per fraccionament per LC amb microcolumna d'ió plata (Supelco), tant del patró «*cis-trans* FAME Mix» com d'una margarina.

Com es pot observar a la figura 7, en la fracció *cis* de la margarina, a més de l'oleat de metil (pic majoritari) apareixen tres petits pics, que molt possiblement corresponen a isòmers de posició de l'oleic en conformació *cis*. Aquest cromatograma evidencia la necessitat de separació prèvia dels èsters metílics de l'oli o greix per cromatografia de líquids amb columna d'ió plata, si es pretén detectar isòmers de posició de l'oleat de metil en conformació *cis*.

A la figura 8, es presenta una superposició del cromatograma de la mateixa mostra de margarina, però ampliant el registre de la zona on s'elueixen els isòmers d'interès *cis* i *trans* (color blau), amb la barreja «FAME Mix» (color vermell), analitzats en les mateixes condicions.

Com es pot observar a la figura 8, a l'extracte de margarina s'observen 10 pics, cinc dels quals coincideixen en temps de retenció amb el del patró:

– pic 1: estearat de metil (coincideix amb el del patró).

– pics 2, 3 i 5: isòmers *trans* C18:1, 6t, petroselinat de metil; C18:1, 9t, elaiïdat de metil, i C18:1, 11t, vaccenat de metil, respectivament. Coincideixen amb el patró de referència.

– pic 4: no present en el patró; podria ser un isòmer de posició de l'elaiïdat de metil, també en conformació *trans*, del qual no es disposa de patró. [Pendent d'identificació.]

– pic 6: coincideix amb el cinquè pic del patró FAME. És el C18:1, 6c, petroselinat de metil.

– pic 7 (majoritari): C18:1, 9c, oleat de metil.

– pics 8 i 10: pendents d'identificació, no presents en el patró.

– pic 9: el darrer pic de FAME correspon amb el novè pic de la mostra de margarina, fet que permet suposar la presència de C18:1, 11c.

Cal tenir en compte que les identificacions proposades en la mostra de margarina ho són tan sols per coincidència en els temps de retenció dels patrons. Per altra part, en el cromatograma de la mostra queden tres pics per identificar (4, 8, 10).

Amb la finalitat d'aconseguir una identificació pluriparamètrica, era imprescindible estudiar la coincidència entre la mostra de margarina i la mescla de patrons FAME també en la fracció *trans* de la cromatografia de líquids de la margarina. A més, els cromatogrames es van realitzar a dues temperatures, 165 °C i 185 °C, respectivament.

A la figura 9 es presenten les superposicions dels cromatogrames de la fracció *trans* obtinguda per LC tant de la mostra de margarina (blau) com del patró FAME (vermell) a les dues

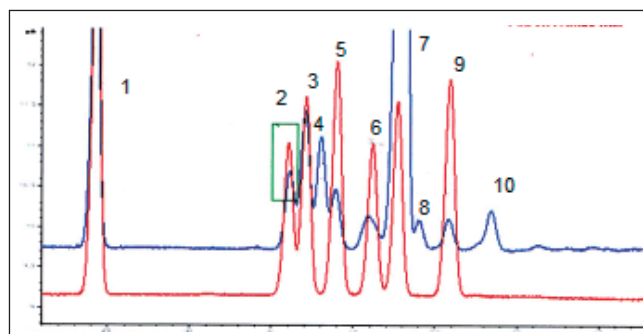


FIGURA 8. Superposició dels cromatogrames corresponents a l'extracte, tant del patró «*cis-trans* FAME Mix» (vermell) com d'una margarina (blau). Ampliació de la zona d'interès. Pics de l'extracte de margarina identificats (1 a 10).

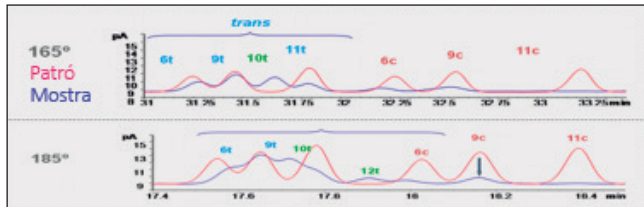


FIGURA 9. Superposició de cromatogrames: el blau correspon a l'extracte de la fracció *trans* obtingut per fraccionament per LC amb microcolumna d'ió plata (Supelco), i el de color vermell és el del patró «*cis-trans* FAME Mix». En els registres s'ha ampliat la zona d'interès. Els cromatogrames superiors s'han registrat en mode isotèrmic a 165 °C i els cromatogrames inferiors s'han registrat en mode isotèrmic a 185 °C.

temperatures assajades (165 °C i 185 °C). D'aquesta manera, es confirmen les coincidències dels pics corresponents a C18:1, 9t, i C18:1, 11t, en el cromatograma de la mostra de margarina estudiada. No obstant, en el pic de la mostra que semblava coincidir amb el patró C18:1, 6t, s'observa una diferència significativa de temps de retenció a les dues temperatures assajades, encara que s'accentua en el registre del cromatograma fet a 185 °C. Per aquesta raó, es descarta aquesta primera identificació, la qual cosa indica que el compost de la mostra és de naturalesa diferent a la del patró C18:1, 6t, ja que el gradient del temps de retenció respecte de la temperatura ( $\delta t_r/\delta \text{temp}$ ) és diferent (l'un i l'altre tenen un  $\Delta H$  de transferència de fase diferent).

En aquest punt també es fa una primera suposició d'identificació dels pics desconeguts de la mostra.

Sembla que el pic identificat prèviament com a C18:1, 6t, podria correspondre al 7t o al 8t. Per altra part, el mateix raonament justifica afirmar que el pic de la mostra, que es manté tant a 165 °C com a 185 °C gairebé equidistant entre el 9t i el 11t, podria correspondre a l'èster metílic de l'àcid C18:1, 10t.

### Correlacions de retenció cromatogràfica i estructura molecular entre els isòmers de posició del *trans*-9-octadecenoic en forma d'èsters metílics

La QSRR [6] ha estat una tècnica interessant i útil, tant per a aportar recursos numèrics i estadístics que ajudin a identificar substàncies en una separació cromatogràfica com per a aconseguir una aproximació al mecanisme de retenció d'un compost en cromatografia. També s'ha recorregut a aquest tipus de correlacions per a obtenir informació de la polaritat complexa d'un compost orgànic.

Així, per a aportar més arguments a la identificació dels possibles isòmers de posició en conformació *trans* de l'oleat de metil, s'han aplicat tècniques QSRR, i s'han obtingut correlacions interessants entre els temps de retenció relatiu a l'èster metílic de l'àcid C17:0 i el nombre de la posició del primer carboni de la insaturació.

En aquesta correlació, s'han inclòs els temps de retenció dels pics de la mostra que coincideixen amb els patrons, i se'ls ha assignat, com a hipòtesi, la mateixa insaturació del patró corresponent (6, 9 i 11, respectivament). Els pics de la fracció *trans* que no coincideixen amb els dels patrons se situen en els gràfics d'acord amb la correlació obtinguda, que s'ha aplicat als dos cromatogrames de la figura 9 (efectuats a 165 °C i a 185 °C).

La identificació més problemàtica és la del primer pic, que s'aproxima molt al del C18:1, 6t, del patró, però també es podria suposar que aquest compost és l'isòmer 7t o bé el 8t.

A continuació, es presenta la correlació entre el temps de retenció corregit i la posició de la insaturació, d'acord amb una de les dues possibles hipòtesis per al pic no identificat (7t o 8t), tant a 165 °C (figura 10) com a 185 °C (figura 11).

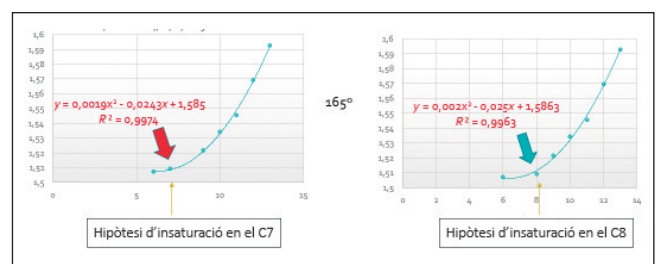


FIGURA 10. Correlació retenció-estructura dels cromatogrames registrats a 165 °C. Representació del temps de retenció corregit vs. el carboni d'insaturació. S'inclouen les dues hipòtesis per al pic posterior al del patró C18:1, 6t: hipòtesi 7t (esquerra) i 8t (dreta).

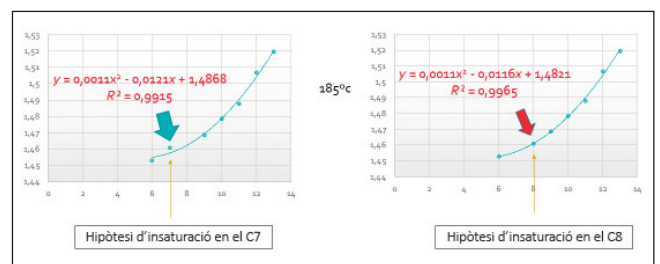


FIGURA 11. Correlació retenció-estructura dels cromatogrames registrats a 185 °C. Representació del temps de retenció corregit vs. el carboni d'insaturació. S'inclouen les dues hipòtesis per al pic posterior al del patró C18:1, 6t: hipòtesi 7t (esquerra) i 8t (dreta).

A les figures 10 i 11 es mostren les equacions de correlació, molt similars per a les dues hipòtesis, si bé el coeficient de correlació  $R^2$  millora lleugerament per a la hipòtesi d'insaturació en el C7, destacada per la fletxa vermella. No obstant, en les correlacions realitzades en el cromatograma fet a 185 °C, la hipòtesi que la insaturació es troba en el C8 és la més versemblant.

Els resultats de les dues correlacions obtingudes a partir dels cromatogrames fets a 165 °C i 185 °C es contradueixen.

Cal reconèixer que, malgrat l'obtenció de nivells de correlació retenció-estructura tan bons, no s'ha aconseguit resoldre el problema: la insaturació arrenca del carboni 7 o del 8?

Podria ser que la diferència que pretenem distingir vagi més enllà de la sensibilitat o capacitat de discerniment de la tècnica cromatogràfica.

### *Quan l'estadística arriba al seu límit*

Per a intentar sortir d'aquesta contradicció, cal examinar amb atenció el cromatograma realitzat a 185 °C (figura 9). S'arriba a la conclusió que el primer pic de la mostra, el que suposem que és C18:1 insaturat en el carboni 7 o 8, queda fortament interferit pel pic que s'elueix immediatament després, que coincideix amb el C18:1, 9t. Aquest encavalcament altera la lectura automàtica del temps de retenció del pic a identificar. Per a poder obtenir un valor més correcte d'aquest possible C18:1 (7t o 8t), caldria haver desconvolucionat aquesta part del cromatograma de la mostra realitzat a 185 °C, per tal de poder obtenir el vertader temps de retenció del primer pic i introduir-lo en el càlcul de la correlació.

Aquesta consideració reforça el valor de la correlació obtinguda amb el registre cromatogràfic de 165 °C, en el qual la interferència entre els dos primers pics considerats és mínima. Per tant, es reforça la hipòtesi que el primer pic correspon a l'èster metílic C18:1, 7t.

## Referències

- [1] ORGANITZACIÓ DE LES NACIONS UNIDES PER A L'AGRICULTURA I L'ALIMENTACIÓ (FAO). *Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos*. Estudi núm. 91. Ginebra: FAO, 2008.
- [2] Reglament (CEE) núm. 2568/91 de la Comissió, de l'11 de juliol de 1991, relatiu a les característiques dels olis d'oliva i dels olis de sànsa d'oliva i sobre els seus mètodes d'anàlisi. Annex I, punts 1 i 2.
- [3] GASSIOT, M. «L'inici de la química subtil: aproximació històrica a la cromatografia cinquanta anys després d'haver estat reconeguda amb el Premi Nobel de Química». *Memorias de la Real Academia de Ciencias y Artes de Barcelona*, 3a època, núm. 988, vol. 61, núm. 2 (2003), p. 45-88.
- [4] WOLFF, J. P. *Manuel d'analyse des corps gras*. París: Azoulay, 1968, p. 57.
- [5] KOWATS, E. «Retention indices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone». *Helv. Chim. Acta*, vol. 41 (1958), p. 1915-1932.
- [6] HÉBERGER, K. «Quantitative structure-retention relationships». A: POOLE, C. F. (ed.). *Gas chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2012, p. 451-475.
- [7] WOLFF, J. P. *Manuel d'analyse des corps gras*. París: Azoulay, 1968, p. 311 i 392.
- [8] COSSINS, A. R.; PROSSER, C. L. «Evolutionary adaptation of membranes to temperature». *Proceedings of the National Academy of Science USA*, vol. 75 (1978), p. 2040-2043.
- [9] WOLFF, J. P. *Manuel d'analyse des corps gras*. París: Azoulay, 1968, p. 338.
- [10] AUTORITAT EUROPEA DE SEGURETAT ALIMENTÀRIA (EFSA). Reglament (CE) núm. 1881/2006.
- [11] RATNAYAKE, W. M. N.; GAGNON, C.; DUMAIS, L.; LILLYCROP, W.; WONG, L.; MELETA, M.; CALWAY, P. «Trans fatty acid content of Canadian margarines prior to mandatory trans fat labelling». *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 84, núm. 9 (2007). © AOCS 2007.



M. Gassiot



L. Comellas



F. Broto



C. Ribas



G. Gotor



A. G. Artiga

**Miquel Gassiot** és doctor en ciències químiques, professor emèrit de la Universitat Ramon Llull al Departament de Química Analítica i Aplicada de l'Institut Químic de Sarrià (IQS) i acadèmic numerari de la Reial Acadèmia de Ciències i Arts de Barcelona (RACAB).

**Lluís Comellas** és doctor en química per l'Institut Químic de Sarrià (IQS) de la Universitat Ramon Llull, professor catedràtic de la Universitat Ramon Llull a l'IQS i vicerector de Recerca i Innovació de la mateixa universitat.

**Francesc Broto** és doctor en química per l'Institut Químic de Sarrià (IQS) de la Universitat Ramon Llull, professor catedràtic de la Universitat Ramon Llull a l'IQS i investigador del Departament de Química Analítica i Aplicada de l'IQS.

**Cristina Ribas** és doctora per la Universitat Ramon Llull i investigadora del Departament de Química Analítica i Aplicada de l'Institut Químic de Sarrià (IQS).

**Gemma Gotor** és doctora per la Universitat Ramon Llull i investigadora del Departament de Química Analítica i Aplicada de l'Institut Químic de Sarrià (IQS).

**Araceli G. Artiga** ha fet el Màster en Investigació en Química i Enginyeria Química de la Universitat Ramon Llull i és professora catedràtica a la Universitat Centreamericana José Simeón Cañas (UCA) d'El Salvador.