



METODICI ANALITICI INNOVATIVI PER LO STUDIO DI MATRICI ALIMENTARI

*Luigi Mondello, Alessandro Casilli,
Peter Quinto Tranchida,
Lucia Cicero, Giovanni Dugo
Dipartimento Farmaco-chimico -
Università di Messina
Paola Dugo - Dipartimento di Chimica
Organica e Biologica - Università di Messina
lmondello@pharma.unime.it*

La gascromatografia è sicuramente la tecnica di elezione per l'analisi di componenti volatili.

La continua ricerca ha permesso di ampliare le conoscenze sulla composizione dei campioni analizzati, mediante l'introduzione e lo sviluppo di tecniche gascromatografiche sempre più versatili e potenti.

Tra quest'ultime meritano di essere menzionate: le tecniche gascromatografiche veloci e ultraveloci e la gascromatografia multidimensionale (GCxGC).

Analisi GC veloce degli acidi grassi

Gli acidi grassi hanno un duplice ruolo metabolico, energetico/strutturale, fondamentale per il mantenimento del benessere del nostro organismo. In particolare, gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) $\omega 3$ e $\omega 6$ rivestono un ruolo di preminente importanza essendo non biosintetizzabili dal nostro organismo e introdotti esclusivamente con la dieta. La determinazione della composizione in acidi grassi di una matrice lipidica può fornire utili informazioni per valutarne la qualità e la genuinità.

La metodica più diffusa per questo genere di analisi è la gascromatografia convenzionale previa metilazione del campione. Risultati soddisfacenti prevedono però un'elevata durata dei tempi di analisi. Tempi di analisi più brevi acquistano particolare importanza nei laboratori dove è necessario effettuare giornalmente un numero consistente di analisi o dove è necessario disporre del responso analitico in tempo reale.

L'approccio più interessante per raggiungere tale obiettivo prevede l'uso di colonne capillari con diametro interno ridotto (narrow bore), caratterizzate da un alto potere risolutivo.

I principi alla base di questo tipo di approccio sono ben conosciuti (1, 2). Una colonna capillare "narrow bore" 10 m x 0,1 mm x 0,1 μm ha approssimativamente lo stesso numero di piatti teorici di una

colonna capillare 25 m x 0,25 mm x 0,25 μm (circa 100.000).

In questo lavoro, viene riportato un metodo GC veloce applicato ad una matrice lipidica, di origine animale, molto complessa: l'olio di menadi. La validità del metodo è stata messa in evidenza comparando i risultati quali/quantitativi ottenuti con quelli di una metodica convenzionale.

Analisi GC ultraveloce degli oli essenziali

Gli oli essenziali sono matrici complesse ottenute mediante processi di distillazione, estrazione con solvente o per pressione meccanica. Il loro utilizzo è previsto soprattutto nel campo alimentare e nell'industria profumiera, anche se alcuni dei loro componenti previamente isolati vengono utilizzati in vari settori per le loro proprietà farmacologiche e anti-microbiche.

La loro composizione è caratterizzata da numerosi composti (più di 200), appartenenti a differenti classi chimiche.

La frazione volatile degli oli essenziali agrumari (85-99%), costituita da idrocarburi monoterprenici e sesquiterprenici e dai loro derivati ossigenati (idrocarburi alifatici, aldeidi, chetoni, acidi e esteri) è di gran lunga predominante rispetto a quella non volatile (1-15%) (3). La gascromatografia è la tecnica più indicata per lo studio di queste matrici. Visti i notevoli risultati ottenuti con le colonne "narrow

bore" da 100 μm di diametro interno (4) e il notevole sviluppo delle strumentazioni GC in grado di supportare le drastiche condizioni sperimentali da esse richieste (alte pressioni di esercizio, rampe di temperatura molto ripide, elevata velocità di raffreddamento del sistema, sistemi d'iniezione con elevati valori di split-tagging, sistemi di rivelazione con elettronica veloce), ci si è rivolti verso condizioni analitiche ancora più drastiche, quali le colonne aventi un diametro interno ancora più ridotto, cioè 50 μm (5). Anche quest'ultime, come le precedenti, mantengono un elevato numero di piatti teorici (20.000 per metro), pur avendo dimensioni ridotte (5 m), consentendo di ottenere elevate risoluzioni. In questo lavoro vengono esplorate le potenzialità di colonne di 5 m x 0,05 mm x 0,05 μm . Per validare il metodo è stato analizzato un campione di olio essenziale di limetta, comparando i dati quantitativi ottenuti con quelli di una metodica convenzionale.

Analisi SPME-GCxGC della frazione volatile del caffè

Il caffè è, per consumo, la seconda bevanda al mondo dopo il tè. La sua enorme importanza commerciale, la rende una matrice di notevole interesse, pertanto la determinazione della sua composizione è di fondamentale importanza per la valutazione della qualità e della genuinità. Le due specie che hanno acquisito maggiore importanza sono: l'Arabica (*Coffea Arabica*) e la meno costosa Robusta (*Coffea Canephora ex Froehner*). L'impossibilità di destinare i chicchi verdi al consumo, impone di doverli sottoporre ad una serie di processi di trasformazione fisica e chimica (tostatura), necessari per la formazione dell'aroma, la cui composizione chimica è altresì dipendente dalle tecniche di lavorazione dei chicchi che precedono la tostatura. Poiché l'aroma del caffè è il primo elemento di valutazione da parte del consumatore, la classificazione della frazione volatile del caffè è divenuta oggetto di grande interesse analitico. Tra le classi di composti riscontrabili nell'aroma del caffè troviamo: furani, pirazine, chetoni, alcoli, aldeidi, esteri, pirroli, tiofeni, composti solforati, composti benzoici, fenoli, piridine, tiazoli, ossazoli, lattoni, alcani, alcheni e acidi. L'elevata complessità di questa matrice ha interessato lo sviluppo di numerose tecniche per isolare la frazione volatile del caffè e altrettante metodiche per l'analisi. L'approccio analitico più valido per tracciare un profilo dell'aroma del caffè è l'analisi del suo spazio di testa mediante l'ausilio di colonne ad alta risoluzione. Una metodica dimostratasi particolarmente adatta per l'analisi dello spazio di testa di matrici complesse è la micro-estrazione in fase solida (SPME) (6). Questa tecnica di campionamento prevede l'utilizzo di una fibra rivestita con un film di fase stazionaria, che viene esposta allo spazio di testa del campione adsorbendone i costituenti che, successivamente, vengono desorbiti termicamente nell'iniettore del gascromatografo. La comparazione di questa tecnica con le metodiche tradizionalmente utilizzate, ne evidenzia oltre che una più semplice operabilità, una maggiore selettività e sensibilità. L'incremento di sensibilità è impu-

tabile ai fattori di concentrazione della fibra, mentre la selettività è dovuta alla disponibilità di varie fibre, caratterizzate da differenti polarità. La GCxGC rappresenta sicuramente una metodica adeguata a supportare l'elevata capacità estrattiva di questa tecnica. Si tratta di una tecnica multidimensionale "on-line", che fornisce una separazione bidimensionale, poiché l'intera matrice è soggetta ad un processo di separazione su due colonne, caratterizzate da fasi stazionarie differenti, collegate in serie mediante un opportuno sistema di modulazione, che regola il passaggio dei composti dalla prima alla seconda colonna. Un sistema così assemblato consente di ottenere una capacità separativa che non può essere paragonata a nessun'altra metodica sviluppata prima (7).

Oltre all'elevato potere risolutivo, da un'analisi GCxGC è possibile ottenere un consistente numero di informazioni aggiuntive. Infatti, i plot bidimensionali relativi consentono di effettuare identificazioni attendibili, anche in assenza di composti standard, grazie al fatto che le posizioni che i picchi occupano nel cromatogramma bidimensionale sono descritte da due tempi di ritenzione relativi a due colonne con selettività diverse.

Altro aspetto peculiare di questa tecnica è la potenziale individuazione in seno alla mappa bidimensionale ottenuta, di zone caratteristiche per ciascuna famiglia di composti o comportamenti regolari per serie omologhe, dalle quali, mediante l'uso di funzioni matematiche che ne descrivano l'andamento, si possono ricavare informazioni sulla natura dei composti separati. Questo lavoro mostra l'elevata capacità separativa di una tecnica altamente innovativa, la GCxGC, accoppiata ad una metodica estrattiva, altrettanto recente, quale la SPME, applicate ad una delle matrici che, con ampia probabilità, è tra le più complesse presenti in natura: il caffè.

Materiali e metodi

Analisi degli esteri metilici degli acidi grassi

Campione e preparazione del campione: campione commerciale di olio di menadi.

I FAMES sono stati ottenuti mediante transesterificazione: l'olio è stato portato alla temperatura di 40 °C e disidratato mediante filtrazione su Na_2SO_4 . 1 ml di campione è stato addizionato di 1 ml di una soluzione al 10% di H_2SO_4 in CH_3OH e poi riscaldato a 110 °C per 2 ore in una siovirel chiusa ermeticamente.

Analisi GC veloce: le analisi GC sono state effettuate su un gascromatografo Shimadzu 2010, munito di un iniettore split/splitless e di un autocampionatore Shimadzu AOC-20i. L'acquisizione dei dati è stata effettuata con il software GC Solution (Shimadzu, Italia). Colonna: Supelcowax-10, 10 m x 0,1 mm x 0,1 μm . Programma di temperatura: 50 °C-280 °C a 14 °C/min. Pressione: 186 kPa a pressione costante. Gas di trasporto: H_2 , u: 57,5 cm/sec. Vol. iniettato: 0,4 μl . Rapporto di split-tagging: 1:200. Rivelatore: FID H_2 : 50,0 ml/min., Aria: 400,0 ml/min., Makeup: 50,0 ml/min. (N_2). Velocità di acquisizione: 4 msec.

Analisi della frazione volatile degli oli essenziali

Campione e preparazione del campione: olio essenziale di limetta diluito 1:100 (v/v) in esano.

Analisi GC ultraveloce: le analisi sono state effettuate su un sistema Shimadzu composto da un GC-2010, dotato di iniettore split/splitless; un autocampionatore AOC-20is; un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID); l'acquisizione dei dati è stata effettuata con il programma GC Solution (Shimadzu, Milano, Italia). Colonna: SE52 5 m x 0,05 mm i.d. x 0,05 µm di spessore di film (MEGA, Legnano, Italia).

Programma di temperatura 50 °C-150 °C a 80 °C/min., fino a 250 °C a 70 °C/min. poi a 350 °C a 55 °C/min.; Pressione: 900 kPa a pressione costante. Gas di trasporto: H₂, u: 122,5 cm/sec. Volume iniettato 1,0 µl. Rapporto di splittaggio: 1:400 (300 °C). Detector: FID (350 °C) H₂: 50 mL/min. Aria: 400 mL/min. Makeup: 50 mL/min. (N₂). Periodo di base: 4 msec (250 Hz). Filtro della costante di tempo: 20 msec (50 Hz); velocità di campionamento: 20 msec (50 Hz).

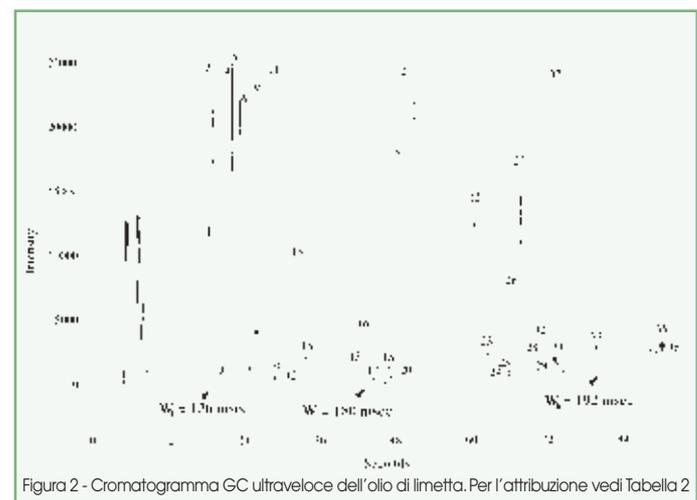
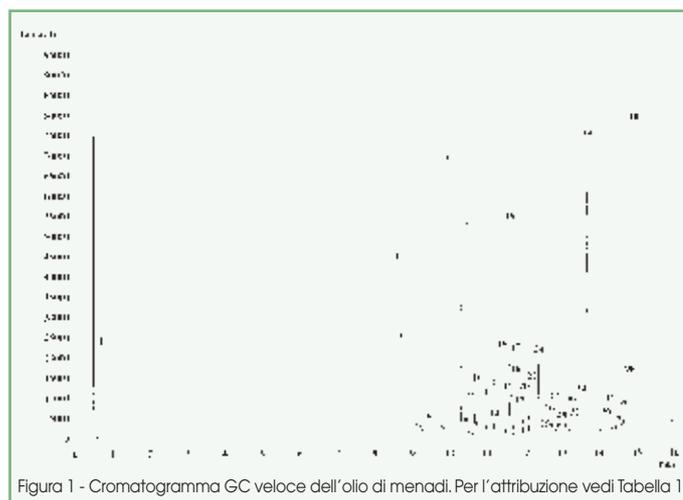
Analisi dell'aroma dei chicchi di caffè tostato

Campione e preparazione del campione: due campioni di caffè tostato in chicchi (Arabica, proveniente dal Brasile e Robusta, proveniente dall'India) forniti da un'industria (Mauro Caffè SpA, Reggio Calabria) sono stati analizzati senza subire alcun trattamento preliminare. Circa 2 g di ogni campione sono stati posti e chiusi ermeticamente in una vial da 10 ml.

Condizioni di estrazione SPME: per le operazioni HS-SPME è stato usato un autocampionatore Shimadzu, modello AOC-5000. Nel campionatore è stata montata una fibra trifasica 50/30 µm (divinilbenzene/carboxen/polidimetilsilossano) (Supelco, Milano, Italia). La fibra è stata opportunamente condizionata prima dell'uso. I campioni contenuti nelle vials sono stati riscaldati a 60 °C per 10 min. ed

agitati (movimento rotatorio alternato) alla frequenza di 500 rpm. Dopo questa fase di equilibrio preliminare, la siringa SPME è stata inserita nella vial sigillata e la fibra è stata esposta allo spazio di testa dei chicchi di caffè per 40 min. alla stessa temperatura e frequenza di agitazione. Dopo il periodo di campionamento, la fibra è stata desorbita termicamente nella camera d'iniezione del gascromatografo per 0,1 min. a 250 °C.

Analisi GCxGC: le analisi sono state effettuate su un sistema GC Shimadzu modello 2010 (Shimadzu, Milano) dotato di rivelatore FID (operante ad una frequenza di acquisizione dati di 50 Hz), e di un autocampionatore AOC-20is (Shimadzu, Milano); l'acquisizione dati è stata affidata al programma GC Solution. Lo strumento presentava nella sua costituzione un sistema criogenico a modulazione longitudinale (SCML, Chromatography Concepts, Doncaster, Australia), operante ad una frequenza di modulazione di 0,1666 Hz (6 secondi). L'espansione della CO₂ immessa nella trappola raffreddava quest'ultima termoregolata a 0 °C. Un piccolo flusso di azoto (circa 10 ml/min.) evitava la formazione di ghiaccio all'interno della trappola. La coppia di colonne analitiche connesse in serie mediante press-fit a zero volume morto (Mega, Legnano, Italia) era costituita da una colonna Supelcowax-10 (polietilenglicole) 30 m x 0,25 mm i.d. 0,25 µm df (Supelco, Milano, Italia) nella prima dimensione e da una colonna SPB-5 (5% difenil + 95% dimetilsilossano) 1 m x 0,10 µm i.d. 0,10 µm df (Supelco, Milano, Italia) nella seconda dimensione. Le condizioni sperimentali erano le seguenti: programma di temperatura da 60 °C (5 min.) fino a 230 °C (2 min.) a 1,5 °C/min.; iniettore split/splitless (250 °C), 2 min. in splitless e poi in split (rapporto di splittaggio 20:1); tempo di desorbimento: 0,1 min. Gas di trasporto: idrogeno con una pressione d'ingresso di 131,2 kPa, ad una velocità lineare costante di 70 cm/s. FID (280 °C). H₂: 50 mL/min.; Aria: 400 mL/min.; Gas di makeup: 50 mL/min. (N₂).



Risultati e discussioni

Analisi degli esteri metilici degli acidi grassi

Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) ottenuti dall'olio di menadi, sono stati analizzati in GC veloce. La scelta della temperatura iniziale del forno di 50 °C è stata fatta per poter usare lo stesso metodo per l'analisi di matrici grasse caratterizzate dalla presenza di FAME a catena corta (C4-C10) di alcuni campioni, come il burro, il sego e lo strutto. La Figura 1 illustra il cromatogramma GC veloce ottenuto. Dalla comparazione di quest'ultimo con quello ottenuto in condizioni convenzionali si è notato che: in entrambi i casi, vengono separati e identificati gli stessi 39 componenti. Il picco 9 è il risultato di una tripla coeluizione (C16:2 ω 4, C17:0iso, C17:0anteiso), e la risoluzione, per i due metodi, è praticamente identica. I risultati quantitativi su tre ripetute sono riportati in Tabella 1 e comparati con quelli ottenuti in separazioni convenzionali. Questo lavoro mostra un'alternativa valida ed efficace, agli approcci convenzionali, per l'analisi di matrici lipidiche, con un guadagno in termini di tempo pari ad un fattore di circa 5.

Analisi della frazione volatile degli oli essenziali

L'analisi dell'olio di limetta ha richiesto circa 90 secondi, come è possibile constatare dalla Figura 2. Nel cromatogramma sono riportate le ampiezze alla base di tre picchi, presenti in tre diverse zone del cromatogramma, che comprovano alta efficienza della colonna. Sebbene la capacità delle colonne da 50 μ m sia inferiore a quella delle colonne convenzionali, l'elevato valore di splittaggio adottato (1:400) permette di non sovraccaricare la colonna. Tale riduzione drastica della quantità iniettata in colonna non influenza la rivelazione; nell'analisi ultraveloce, infatti si ha un minore allargamento della banda rispetto all'analisi convenzionale, con conseguente aumento della sensibilità e con un buon rapporto segnale/rumore. Inoltre il sistema di rivelazione utilizzato riesce a campionare ad una velocità che va da 50 a 250 Hz (da 20 a 4 millisecondi), corrispondente ad un numero di punti al secondo compreso tra 50 e 250. Per dimostrare l'applicabilità del metodo ultraveloce ad analisi di routi-

Tabella 1 - Composizione (valori medi su tre ripetute), come percentuale relativa delle aree dei picchi degli FAMEs di un olio di menadi in GC convenzionale e veloce (V. Figura 1)

N°	Composto	Convenzionale		Veloce		N°	Composto	Convenzionale		Veloce	
		X	CV%	X	CV%			X	CV%	X	CV%
1	C14:0	7,533	0,739	6,960	0,096	20	C18:2 ω 4	0,343	0,657	0,353	0,735
2	C15:0iso	0,252	0,677	0,277	3,409	21	C18:3 ω 6	0,250	2,604	0,294	4,887
3	C15:0anteiso	0,077	0,919	0,129	1,474	22	C18:3 ω 4	0,356	1,882	0,528	2,780
4	C15:0	0,470	0,667	0,516	2,684	23	C18:3 ω 3	1,080	0,425	1,308	2,757
5	C16:0iso	0,096	0,658	0,123	3,781	24	C18:4 ω 3	2,804	1,504	2,972	0,289
6	C16:0	22,721	0,585	20,740	0,071	25	C18:4 ω 1	0,202	0,244	0,245	4,179
7	C16:1 ω 7	10,227	0,515	9,907	0,201	26	C20:0	0,185	0,455	0,211	1,978
8	C16:1 ω 5	0,287	0,931	0,344	0,715	27	C20:1 ω 9	1,393	0,755	1,430	0,895
9	C16:2 ω 4	1,296	0,472	1,395	2,966	28	C20:1 ω 7	0,217	3,145	0,239	3,962
9	C17:0iso	0,000	0,000	0,000	0,000	29	C20:2 ω 6	0,246	0,604	0,330	2,181
9	C17:0anteiso	0,000	0,000	0,000	0,000	30	C20:2 ω 4	0,156	2,066	0,193	2,303
10	C17:0	0,413	2,101	0,319	0,363	31	C20:3 ω 6	0,357	5,558	0,291	3,039
11	C16:3 ω 4	1,353	1,541	1,955	0,297	32	C20:4 ω 6	0,647	0,514	0,750	2,744
12	C17:1	0,156	2,316	0,239	4,555	33	C20:3 ω 3	0,159	2,387	0,174	2,818
13	C18:0iso	0,215	1,987	0,112	4,911	34	C20:4 ω 3	1,504	0,376	1,601	0,802
14	C16:4 ω 1	0,612	0,594	0,805	1,140	35	C20:5 ω 3	12,396	0,369	12,331	0,453
15	C18:0	3,195	0,384	3,311	0,182	36	C21:5 ω 3	0,899	1,429	0,595	5,273
16	C18:1 ω 9	10,110	0,456	9,758	0,301	37	C22:5 ω 6	0,304	1,999	0,333	1,102
17	C18:1 ω 7	2,639	0,448	2,844	0,819	38	C22:4 ω 3	0,129	2,200	0,131	1,443
18	C18:1 ω 5	0,110	0,192	0,124	3,504	39	C22:5 ω 3	2,035	1,037	2,182	0,936
19	C18:2 ω 6	1,062	0,403	1,156	0,765	40	C22:6 ω 3	11,515	2,241	12,489	0,360

Tabella 2 - Risultati relativi alla determinazione quantitativa di alcuni componenti dell'olio di limetta, ottenuti in analisi convenzionale e ultraveloce (V. Figura 2)

N°	Composto	Area % Ultraveloce	Area % Convenzionale
1	α -Thujene	0,52	0,55
2	α -Pinene	1,74	1,78
3	Canfene	0,05	0,05
4	Sabinene	1,38	1,45
5	β -Pinene	10,35	10,44
6	Mircene	1,24	1,26
7	Ottanale+ α -Fellandrene	0,04	0,05
8	α -Terpinene	0,22	0,24
9	p-Cimene+Limonene	59,92	59,37
10	E- β -Ocimene	0,08	0,07
11	γ -Terpinene	14,17	14,29
12	cis-Sabinene idrato	0,04	0,04
13	Terpinolene	0,52	0,55
14	Linalolo	0,18	0,19
15	Terpinen-4-olo	0,13	0,14
16	α -Terpineolo	0,26	0,23
17	Decanale	0,05	0,06
18	Nerolo	0,11	0,13
19	Nerale	1,01	0,99
20	Geraniolo+Piperitone	0,06	0,08
21	Geraniale	1,71	1,70
22	Neril acetato	0,85	0,82
23	Geranil acetato	0,18	0,19
24	β -Elemene	0,04	0,05
25	cis- α -Bergamotene	0,06	0,07
26	β -Cariofillene	0,47	0,46
27	trans- α -Bergamotene	1,04	1,01
28	α -Humulene+E- β -Farnesene	0,13	0,16
29	Santelene	0,03	0,04
30	α -Selinene	0,07	0,08
31	Z- α -Bisabolene	0,11	0,12
32	(E-E)- α -Farnesene+ β -Bisabolene	1,76	1,73
33	Germacrene B	0,17	0,15
34	2,3-Dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)-2-norbornanolo	0,06	0,06
35	Camferenolo	0,06	0,05
36	α -Bisabololo	0,08	0,09

ne, sono stati comparati i risultati quantitativi ottenuti dall'analisi ultraveloce con quelli ottenuti per lo stesso campione mediante analisi GC convenzionale.

Sono stati scelti alcuni componenti, considerati importanti per il controllo della qualità dell'olio di limetta. I risultati sono riportati in Tabella 2. Come si evince dai dati, risultati ottenuti con le due metodiche sono in ottimo accordo. Con il metodo ultraveloce si ha una certa perdita di risoluzione che si traduce nella coeluzione di coppie critiche, come nerolo e citronellolo.

Bisogna comunque sottolineare che lo scopo di questa ricerca era di testare le colonne da 50 μm d.i. nelle condizioni più veloci consentite dalla strumentazione.

Analisi dello spazio di testa del caffè tostato

La scelta di una fibra SPME dipende dalle strutture e dalle proprietà chimico-fisiche degli analiti da estrarre. In questo studio, sono state testate cinque diverse fibre, al fine di valutare la loro capacità estrattiva (polidimetilsilossano 100 μm , poliaccrilato 85 μm , polidimetilsilossano-divinilbenzene 65 μm , Carboxen-polidimetilsilossano 75 μm , divinilbenzene-Carboxen-polidimetilsilossano 50/30 μm). La fibra trifasica (DVB/Carboxen/PDMS) si è dimostrata la più adatta per l'estrazione di analiti aventi un largo intervallo di proprietà chimico-fisiche come quelli presenti nel caffè. Questa fibra infatti è particolarmente indicata per l'estrazione di sostanze volatili e semivolatili da 3 a 20 atomi di carbonio (peso molecolare da 20 a 475).

L'elevata complessità della frazione volatile dei chicchi tostati di caffè può essere osservata nella Figura 3, che mostra il cromatogramma relativo all'analisi SPME-GCxGC di un campione di Arabica (V. anche Tabella 3).

I risultati ottenuti utilizzando questo set di colonne, evidenziano l'elevato numero di classi di composti differenti che caratterizzano questa matrice, infatti è possibile distinguere composti con tempi di ritenzione che variano da 2 a 80 minuti nella prima dimensione (polare), e da 1 a 5 secondi nella seconda (apolare).

Nei caffè tostati, il controllo di qualità e il rilevamento delle frodi alimentari viene generalmente effettuato mediante la determinazione di alcuni componenti predominanti in una delle due specie.

Dalla comparazione di cromatogrammi relativi alle due specie economicamente più importanti (Arabica e Robusta), è stato possibile notare alcune differenze quantitative, che sono state

Innovative Analytical Methods for Food Matrices Investigation

Gas chromatography is an important analytical technique in the field of separation science which allows the study of the volatile fraction of real world samples. Continuous research carried out on matrices of analytical interest has led to a deeper knowledge of these substances. This has been achieved through the introduction and development of more powerful and versatile methods such as: fast and ultra-fast GC methods and comprehensive gas chromatography (GCxGC).

ABSTRACT 

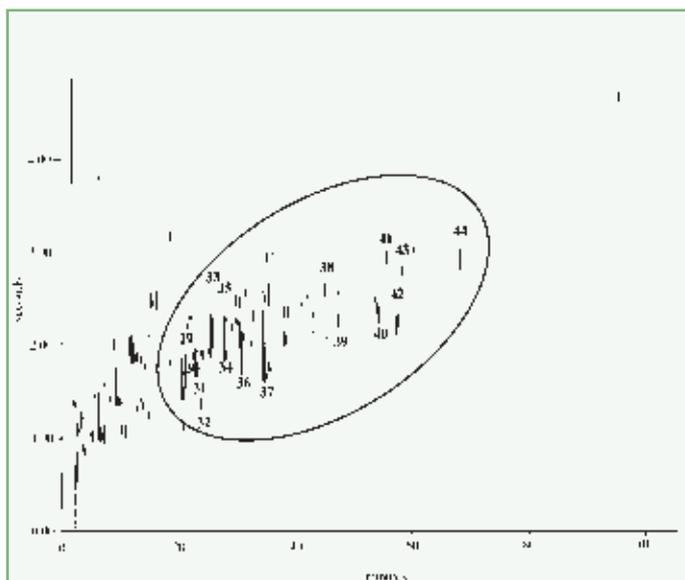


Figura 3 - Cromatogramma GCXGC del caffè Arabica. Per l'attribuzione vedi Tabella 3

evidenziate nella zona cerchiata di Figura 3. I picchi 33-34-35-36-37-40-42 risultano visibilmente più intensi nell'Arabica. Entrambi i campioni sono caratterizzati da un'abbondante

Tabella 3 - Attribuzione dei picchi relativi alla frazione volatile del caffè (V. Figure 3 e 4)

N°	Composti	N°	Composti
1	2-metilfurano	23	2,6-dietilpirazina
2	2,5-dimetilfurano	24	3-n-propilpirazina
3	2-butanone	25	2-etil-3,5-dimetilpirazina
4	2-pentanone	26	2,3-dietilpirazina
5	2-metiltofene	27	2-etil-3,6-dimetilpirazina
6	n-metilpirrolo	28	3,5-dietil-2-metilpirazina
7	2-vinil-5-metilfurano	29	furfurale
8	piridina	30	furfuril formiato
9	pirazina	31	2-acetilfurano
10	2-metilpirazina	32	2-etilpirrolo
11	4-metiltiazolo	33	furanmetanol acetato
12	3-picolina	34	5-metilfurfurale
13	acetolo	35	2-acetil-5-metilfurano
14	2,5-dimetilpirazina	36	γ-butirolattone
15	2,6-dimetilpirazina	37	furanmetanolo
16	2-etilpirazina	38	1-(2-furanilmetil)pirrolo
17	2,3-dimetilpirazina	39	2-metossifenolo
18	3-etilpiridina	40	maltolo
19	2-etil-6-metilpirazina	41	1-(-1H-pirrolo-2il) etanone
20	2-etil-5-metilpirazina	42	4-etil-2 metossifenolo
21	2,3,5-trimetilpirazina	43	2-metilbenzofurano
22	2-etil-3-metilpirazina	44	acido 3,5-dimetil benzoico

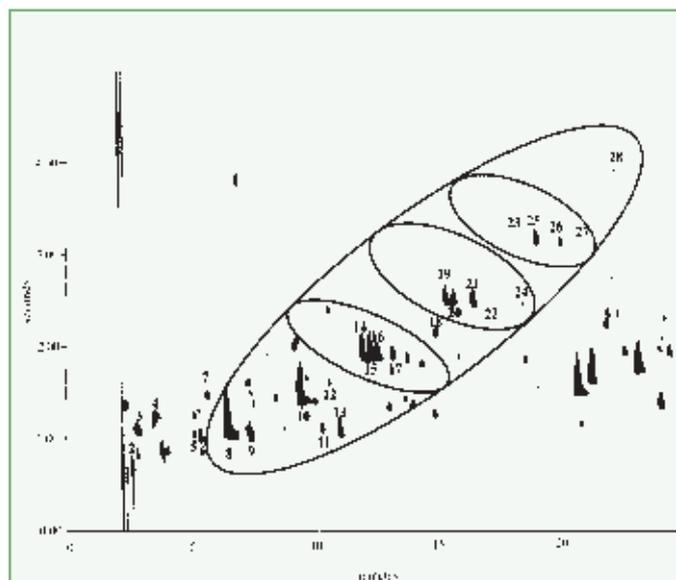


Figura 4 - Espansione 0-25 min. della Figura 3

e quasi identica frazione pirazinica, che ha un ruolo importante nella costituzione dell'aroma del caffè durante la tostatura. Questi componenti, evidenziati in Figura 4, espansione da 0 a 25 min. della Figura 3, assumono un'eluzione regolare e specifica nella seconda dimensione. Infatti, le pirazine con lo stesso grado di sostituzione alchilica (per esempio dimetilpirazina ed etilpirazina) tendono ad allinearsi nella seconda dimensione. Questa analisi evidenzia l'elevato potere risolutivo e identificativo delle metodiche GCxGC e fornisce uno spunto importante per lo studio di una matrice tra le più complesse riscontrabili nel mondo naturale. Infatti in circa 150 minuti è possibile ottenere una separazione completa della frazione volatile, con il vantaggio di poter considerare completamente nullo il rischio di contaminazione.

Bibliografia

- (1) A. van Es, High Speed Narrow Bore Capillary Gas Chromatography, Hüthig, Heidelberg, 1992.
- (2) P. Sandra *et al.*, in Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis, Hüthig, Heidelberg, 1987.
- (3) G. Dugo *et al.*, in Citrus, Taylor & Francis, London/New York, 2002.
- (4) L. Mondello *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 5602.
- (5) L. Mondello *et al.*, *J. Sep. Sci.*, 2004, **27**, 699.
- (6) J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction: Theory and Principles, Wiley-VCH, New York, 1997.
- (7) J. Dalluge, Multidimensional in Capillary Gas Chromatography, Vrije Universiteit, 2003.