

## **ACIDI GRASSI PLASMATICI in GC/MS - Codice GC75010**

### **BIOCHIMICA**

Con il termine **acidi grassi** (abbreviazione **FA**, dall'inglese *Fatty Acids*) si indicano gli acidi monocarbossilici alifatici. Sono, con poche eccezioni, a lunga catena, con un numero pari di atomi di carbonio, senza ramificazioni e aciclici (cioè costituiti da molecole che non presentano catene chiuse ad anello); possono essere saturi (se la loro molecola presenta solo legami singoli C-C) o insaturi (se presentano doppi legami C=C). Sono gli ingredienti costitutivi di quasi tutti i lipidi complessi e dei grassi vegetali e animali.

Gli acidi grassi possono essere classificati in base alla lunghezza della catena carboniosa:

*acidi grassi a catena corta:* con un numero di atomi di carbonio da 1 a 5

*acidi grassi a catena media:* con un numero di atomi di carbonio da 6 a 12

*acidi grassi a catena lunga:* con un numero di atomi di carbonio da 13 a 21

*acidi grassi a catena molto lunga:* con un numero di atomi di carbonio maggiore o uguale a 22.

A seconda della loro lunghezza essi prendono una via di distribuzione ematica differente.

Inoltre in base alla presenza di doppi legami C=C nella catena carboniosa, gli acidi grassi possono essere classificati come:

- acidi grassi saturi: se non sono presenti doppi legami nella catena carboniosa (ad esempio acido caprilico C 8:0, acido palmitico C 16:0, acido stearico C 18:0);
- acidi grassi insaturi: se sono presenti doppi legami nella catena carboniosa; a loro volta si suddividono in:
  - acidi grassi monoinsaturi o monoenoici, se è presente un solo doppio legame C=C (ad esempio acido oleico C 18:1);
  - acidi grassi polinsaturi o polienoici, se sono presenti due o più doppi legami C=C (ad esempio acido linoleico C 18:2, acido linolenico C 18:3, acido arachidonico C 20:4).

Il metabolismo di grassi saturi e insaturi attiva gli stessi enzimi, e l'organismo non è in grado di regolare questa competizione enzimatica. Pertanto, è importante mantenere l'equilibrio corretto nell'assunzione di questi due tipi di grassi. Un sovraccarico di acidi grassi in generale riduce la quantità di enzimi e aggrava il problema della competizione.

Alcuni acidi grassi insaturi sono considerati particolarmente importanti per il metabolismo umano, e si classificano in:

- omega-3: quando l'ultimo doppio legame è presente sul terzo carbonio a partire dalla fine (ad esempio acido  $\alpha$ -linolenico C 18:3);
- omega-6: quando l'ultimo doppio legame è presente sul sesto carbonio a partire dalla fine (ad esempio acido linoleico C 18:2);
- omega-9: quando l'ultimo doppio legame è presente sul nono carbonio a partire dalla fine (ad esempio acido oleico C 18:1). Questi non sono considerati acidi grassi essenziali (EFA).

Gli acidi grassi sono biosintetizzati nell'organismo umano a partire da grassi alimentari, grassi di deposito o lipidi endogeni. Alcuni acidi grassi polinsaturi non possono essere biosintetizzati attraverso i processi metabolici e devono essere assunti mediante la dieta. Questi acidi grassi sono chiamati "essenziali" (EFA dall'inglese *essential fatty acid*) . i principali EFA sono l'acido linoleico (C 18:2  $\omega$ 6) e l'acido  $\alpha$ -linolenico (C 18:3  $\omega$ 3).

La degradazione degli acidi grassi avviene tramite beta-ossidazione in acetilcoenzima A, il quale viene utilizzato per la biosintesi di nuovi acidi grassi, oppure viene degradato nel ciclo di Krebs (con ossigeno) in acqua e anidride carbonica, liberando energia.

Gli acidi grassi liberi rappresentano la frazione circolante e di riserva energetica di lipidi dell'organismo, che possono essere facilmente captati e metabolizzati da fegato e muscoli. Per la loro insolubilità, necessitano di lipoproteine sieriche (albumina) per circolare nel sangue.

Al fine di prevenire alterazioni metaboliche correlate all'obesità ed inoltre malattie di tipo aterosclerotico e tromboembolico è nata la necessità di analizzare, quantificare e monitorare la concentrazione di acidi grassi a lunga catena nella matrice plasmatica.

Ad oggi inoltre, sono diversi gli studi che legano un alto livello di acidi grassi polinsaturi omega 3 a lunga catena (EPA e DHA) ad una riduzione del rischio di sviluppare malattie cardiovascolari, principale causa di decesso nel mondo.

Data la struttura chimica delle molecole prese in considerazione e dalla loro conseguente scarsa solubilità in acqua, oltre il 98% degli acidi grassi non circolano in forma libera nel sangue, bensì necessitano di trasportatori come l'albumina. Essendo questa una delle principali proteine trasportatrici del plasma, si è scelto di operare questa analisi su questa matrice. Solo una modesta frazione,  $<<2\%$  è capace di circolare in forma libera su sangue intero e tale frazione può

aumentare solo in caso di un prolungato digiuno, di intensa attività fisica, feocromocitoma (tumore tessuto cromaffine) o ipertiroidismo.

Tale aumento è sempre e comunque accompagnato da un alto livelli di acidi grassi presenti nel plasma, confermando così l'importanza del monitoraggio su matrice plasmatica. Un ulteriore conferma sulla matrice plasmatica è suggerita dall'attuale stato dell'arte in materia. E' infatti possibile trovare un elevata quantità di lavori volti alla determinazione della concentrazione di acidi grassi a lunga catena in matrice plasmatica piuttosto che su sangue intero.

Il kit permette di determinare i principali acidi grassi nel plasma (C14-C22) mediante determinazione GC-MS.



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION  
Via M. D'Antona 28  
60033 Chiaravalle (AN) - Italy  
Tel. +39 071 7450790  
[eureka-support@sentinel.it](mailto:eureka-support@sentinel.it)  
[www.eurekakit.com](http://www.eurekakit.com)



CE

Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

|        |                                  |         |
|--------|----------------------------------|---------|
| N° 002 | Acidi Grassi plasmatici in GC/MS | 06/2024 |
|--------|----------------------------------|---------|

## **CARATTERISTICHE DEL KIT**

### **Principio del metodo :**

Il presente metodo consente di determinare gli Acidi Grassi in GC/MS. Il campione, previa estrazione e lavaggio, viene trattato con un derivatizzante per 15 minuti a 100 °C; la soluzione, dopo diluizioni varie, viene direttamente iniettata in GC.

### **Recupero del Metodo:**

>98%

### **Sensibilità del Metodo (LOQ):**

| Acido grasso                                        | mg/l |
|-----------------------------------------------------|------|
| Myristic ac.                                        | 0,5  |
| Palmitic ac.                                        | 0,25 |
| Palmitoleic ac. (ω7)                                | 0,25 |
| Stearic ac.                                         | 2,0  |
| Elaidic ac. (trans)                                 | 0,25 |
| Oleic ac.                                           | 0,5  |
| Linolelaidic ac. (trans,trans)                      | 0,25 |
| Linoleic ac. (ω6)                                   | 0,1  |
| γ-Linolenic ac. (ω6)                                | 0,25 |
| α-Linolenic ac. (ω3)                                | 0,25 |
| Dihomo-γ-linolenic ac. (ω6)                         | 1,0  |
| Arachidonic ac. (ω6)                                | 1,0  |
| All cis 5,8,11,14,17 Eicosapentaenoic ac. (EPA ω3)  | 0,5  |
| All cis 4,7,10,13,16,19 Docosahexenoic ac. (DHA ω3) | 0,5  |

### **Valori di riferimento:**

| Acido grasso                                        | mg/l          |
|-----------------------------------------------------|---------------|
| Myristic ac.                                        | 3,43-9,57     |
| Palmitic ac.                                        | 298,00-460,00 |
| Palmitoleic ac. (ω7)                                | 4,00-14,73    |
| Stearic ac.                                         | 144,00-253,00 |
| Elaidic ac. (trans)                                 | 0,90-2,40     |
| Oleic ac.                                           | 98,00-195,00  |
| Linolelaidic ac. (trans,trans)                      | 0,00-2,00     |
| Linoleic ac. (ω6)                                   | 133,00-271,00 |
| γ-Linolenic ac. (ω6)                                | 0,67-2,40     |
| α-Linolenic ac. (ω3)                                | 2,03-5,68     |
| Dihomo-γ-linolenic ac. (ω6)                         | 28,90-69,50   |
| Arachidonic ac. (ω6)                                | 98,00-166,50  |
| All cis 5,8,11,14,17 Eicosapentaenoic ac. (EPA ω3)  | 10,19-40,20   |
| All cis 4,7,10,13,16,19 Docosahexenoic ac. (DHA ω3) | 61,00-125,00  |
| tot ω6 / tot ω3                                     | 5.70 - 21.30  |

|                                                         |                                                                            |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b><u>Contenuto della Confezione :</u></b>              | Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a temperatura 2-8 °C |
| <b>Reagente A – Soluzione Estraiante 1, 1 x 320 ml</b>  |                                                                            |
| <b>Reagente B – Soluzione Coadiuvante, 1 x 2 ml</b>     |                                                                            |
| <b>Reagente C - Standard interno, 1 x 1 ml</b>          |                                                                            |
| <b>Reagente D - Soluzione di lavaggio, 1 x 50 ml</b>    |                                                                            |
| <b>Reagente E – Soluzione Derivatizzante, 1 x 25 ml</b> |                                                                            |
| <b>Reagente F – Soluzione Estraiante 2, 1 x 25 ml</b>   |                                                                            |
| <b>Reagente G – Soluzione Bloccante, 1 x 25 ml</b>      |                                                                            |
| <b>Reagente H – Soluzione Stabilizzante, 1 x 5 ml</b>   |                                                                            |
| <b>Calibratore liofilo plasmatico – 1 x 1 ml</b>        | <b><u>Codice GC75016 (confezionato a parte - vedi scheda tecnica)</u></b>  |

**Dotazione strumentale minima richiesta :**

Strumento GC/MS  
Computer gestionale  
Sistema essiccamento/evaporazione solventi

**Dotazione opzionale :**

Autocampionatore

**Modalità di prelievo :**

Provetta con anticoagulante EDTA o EPARINA. Se non si analizza subito, congelare il campione a -20 °C e al riparo dalla luce. Stabile per circa 6 mesi.

## **PROCEDURA ANALITICA**

### **FASE 1** : Preparazione del Campione

Dispensare nelle provette in pyrex da 10 ml in sequenza:

|                                   | Calibratore | Controllo | Campione |
|-----------------------------------|-------------|-----------|----------|
| Calibratore                       | 200 µl      |           |          |
| Controllo                         |             | 200 µl    |          |
| Campione                          |             |           | 200 µl   |
| Reagente A – Soluzione Estraeante | 3200 µl     | 3200 µl   | 3200 µl  |
| Reagente B – Sol. Coadiuvante     | 20 µl       | 20 µl     | 20 µl    |
| Reagente C – Standard Interno     | 10 µl       | 10 µl     | 10 µl    |

**Tappare la provetta e porre al Vortex per 30 sec.**

**FASE 2** : Centrifugare a 4.000 giri per 7 minuti per la separazione completa delle due fasi

**FASE 3** : Prelevare 2 ml della fase inferiore ed trasferirli in una provetta in pyrex da 10 ml pulita.

**FASE 4** : aggiungere 0,5 ml di **Reagente D** – Soluzione di lavaggio

**Tappare la provetta e porre al Vortex per 30 sec.**

**FASE 5** : Centrifugare a 4.000 giri per 5 minuti ed eliminare con una pipetta pasteur la fase superiore (compreso l'eventuale interfaccia)

**Portare a secco con evaporatore o flusso di azoto**

**FASE 6** : Nella provetta contenente il grasso essiccato aggiungere in sequenza 250 µl di **Reagente E** – Soluzione Derivatizzante e 250 µl di **Reagente F** – Soluzione Estraeante 2

**Vortex per 20 sec.**

**FASE 7** : Porre le provette tappate in forno a 100 °C per 15.

**FASE 8** : Raffreddare velocemente ed aggiungere 250 µl di **Reagente G** – Soluzione Bloccante

**Tappare la provetta e porre al Vortex per 20 sec.**

**FASE 9** : Centrifugare a 4.000 giri per 3 minuti ed attendere 1 minuto perché le due fasi si separino completamente

**FASE 10** : Prelevare 150 µl della fase superiore in cui sono sciolti i FAME (*attenzione a non pescare la parte inferiore!*) e trasferire in un inserto di vetro in una vial ambrata

**Portare a secco con evaporatore o flusso di azoto**

**FASE 11** : Inserire nella insert 50 ul di **Reagente H - Soluzione Stabilizzante**

**Al Vortex per 10 sec.**

**FASE 12** : Centrifugare a 4.000 giri per 3 minuti

**FASE 13** : Iniettare 1 µl nel GC

**Il campione è stabile 24 ore a 2-8 C°**

**ACIDI GRASSI - Avvertenze**

**SETTAGGIO DEL GAS-CROMATOGRAFO :**

- Durabond HP-88 100 m x 0,25 mm 0,2 um
- Temperatura iniettore 250 °C
- Rapporto di Splittaggio Inizio: ON split 10
- Temperatura 100 °C x 0 minuti + 10 °C/min fino a 220 °C x 4 minuto + 10 °C/min fino a 240 °C x 12 minuti (corsa 30 minuti)
- Gas Elio 1 ml/min

**SETTAGGIO DETECTOR DI MASSA (4000) :**

- Range di Massa 40 – 400
- Temperatura della Massa: 190 °C;
- Temperatura Transfer Line: 270 °C;
- Temperatura Manifold: 80 °C
- Filamento on: 10 minuti

**CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA Durabond HP-88 100 m x 0,25 mm 0,2 um**

Seguire le prescrizioni del costruttore.  
Non condizionare la (le) colonna/e se attaccata al Detector di Massa.

**PULIZIA DELLA COLONNA E DELLA SIRINGA**

Lavare la siringa prima dell'iniezione con ESANO e dopo l'iniezione con ISOOTTANO.  
Disconnettere il detector. Tenerla alla massima temperatura per il tempo consigliato.  
( Vedi istruzioni del costruttore )  
**CONTROLLARE LA BUONA FUNZIONALITA' DELLA SIRINGA PRIMA DI OGNI SEDUTA.**

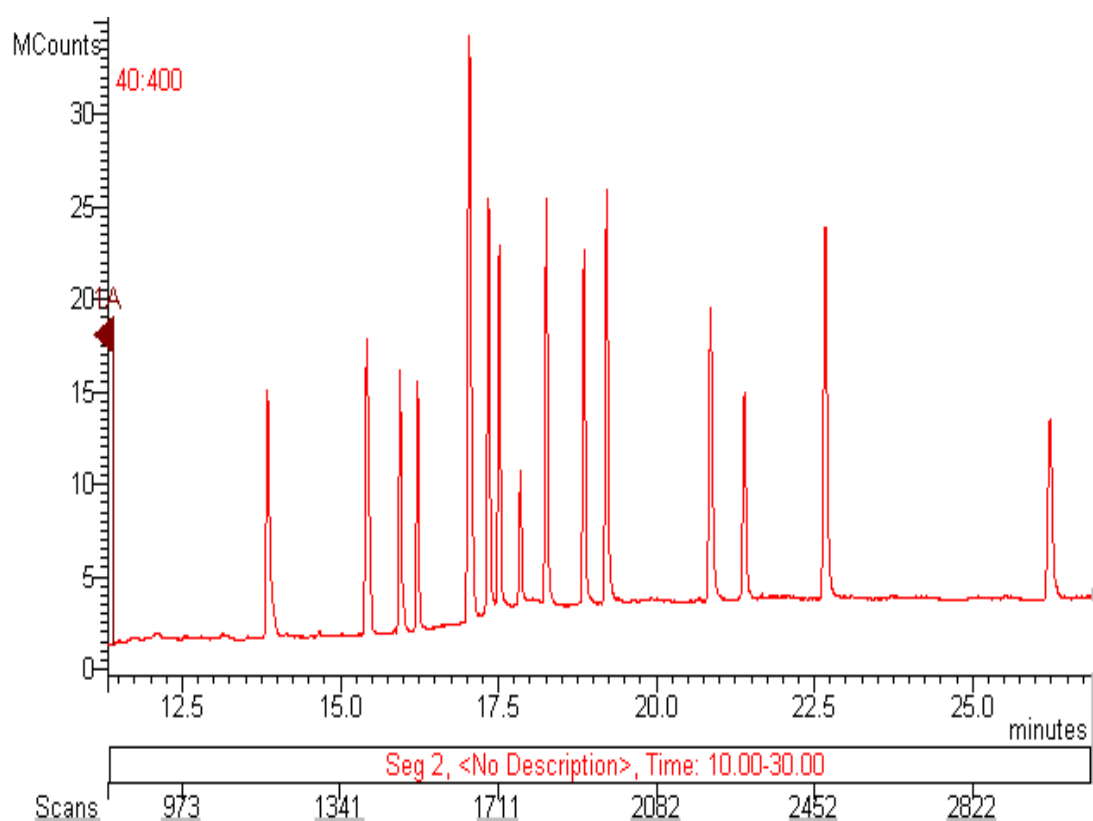
| Acido grasso                                                | Frammenti             |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Myristic ac.                                                | 74.1+87.0+143.0+243.0 |
| Palmitic ac.                                                | 270.0+227.0           |
| Palmitoleic ac. ( $\omega$ 7)                               | 55.0+81.0+96.0+237.0  |
| IS (Heptadecanoic ac.)                                      | 74.1+87.0+284.0+241.0 |
| Stearic ac.                                                 | 255.0+298.0           |
| Elaidic ac. (trans)                                         | 81.1+96.0+264.0       |
| Oleic ac.                                                   | 81.1+96.0+264.0       |
| Linolelaidic ac. (trans,trans)                              | 81.1+95.0+67.0        |
| Linoleic ac. ( $\omega$ 6)                                  | 81.1+67.0+95.0        |
| $\gamma$ -Linolenic ac. ( $\omega$ 6)                       | 79.1+67.0+93.0+95.0   |
| $\alpha$ -Linolenic ac. ( $\omega$ 3)                       | 79.1+67.0+93.0+95.0   |
| Dihomo- $\gamma$ -linolenic ac. ( $\omega$ 6)               | 79.1+67.0+93.0        |
| Arachidonic ac. ( $\omega$ 6)                               | 79.1+67.0+91.0        |
| All cis 5,8,11,14,17 Eicosapentaenoic ac. (EPA $\omega$ 3)  | 79.1+91.0+105.0+67.0  |
| All cis 4,7,10,13,16,19 Docosahexenoic ac. (DHA $\omega$ 3) | 91.1+79.0+67.0+117.0  |

#### ACCESSORI E CONSUMABILI

| CODICE           | DESCRIZIONE                                             | CONFEZIONE   |
|------------------|---------------------------------------------------------|--------------|
| <b>GC75016</b>   | Calibratore plasmatico per Acidi Grassi                 | 4 x 1 ml     |
| <b>GC75019</b>   | Controllo plasmatico per Acidi Grassi – Livelli 1 e 2   | 2 x 5 x 1 ml |
| <b>S11288A7</b>  | Colonna Durabond HP-88 100 m, 0,25 mm - 0,2 $\mu$ m     | 1 Pz         |
| <b>S29004U</b>   | Vial standard di vetro da 2 ml ambrate con tappo a vite | 1 x 100 Pz   |
| <b>S51820717</b> | Tappi per Vial di vetro a volume ridotto                | 1 x 100 Pz   |
| <b>S24717</b>    | Riduttori di volume per vials da 2 ml                   | 1 x 100 Pz   |

# ACIDI GRASSI PLASMATICI

(Cromatogrammi di riferimento)



| Acido grasso                                                | T.R. (min) |
|-------------------------------------------------------------|------------|
| Myristic ac.                                                | 13,8       |
| Palmitic ac.                                                | 15,4       |
| Palmitoleic ac. ( $\omega$ 7)                               | 15,9       |
| IS                                                          | 16,2       |
| Stearic ac.                                                 | 17,1       |
| Elaidic ac. (trans)                                         | 17,4       |
| Oleic ac.                                                   | 17,6       |
| Linolelaidic ac. (trans,trans)                              | 17,8       |
| Linoleic ac. ( $\omega$ 6)                                  | 18,3       |
| $\gamma$ -Linolenic ac. ( $\omega$ 6)                       | 18,9       |
| $\alpha$ -Linolenic ac. ( $\omega$ 3)                       | 19,2       |
| Dihomo- $\gamma$ -linolenic ac. ( $\omega$ 6)               | 20,9       |
| Arachidonic ac. ( $\omega$ 6)                               | 21,5       |
| All cis 5,8,11,14,17 Eicosapentaenoic ac. (EPA $\omega$ 3)  | 22,7       |
| All cis 4,7,10,13,16,19 Docosahexenoic ac. (DHA $\omega$ 3) | 26,3       |