



*Luigi Mondello, Alessandro Casilli, Peter Quinto
Tranchida, 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 MULTIDIMENSIONALE (GC-GC)

per l'analisi di composti chirali di oli essenziali

Questa ricerca è basata sulla valutazione di un sistema multidimensionale di ultima generazione utilizzato per l'analisi veloce di componenti chirali presenti nell'olio di rosmarino. Il cuore di questo sistema consiste in un apparato di trasferimento che garantisce una rapida sequenza di iniezioni di analita dalla prima alla seconda dimensione. L'analisi multidimensionale veloce è stata ottenuta usando colonne a diametro interno ridotto (0,1 mm d.i.) in entrambe le dimensioni.

Le metodiche gascromatografiche convenzionali sono spesso insufficienti per la separazione completa di miscele complesse. Fenomeni di coeluizione di picchi sono frequenti, anche per matrici caratterizzate da bassa complessità [1]. Le maggiori difficoltà si incontrano quando i composti di interesse sono presenti in

tracce e risultano coeluiti con composti ad alta concentrazione.

Al fine di ottenere informazioni più attendibili due sono gli approcci convenzionalmente diffusi: la combinazione di due colonne GC caratterizzate da differente selettività o l'utilizzo dello spettrometro di massa come sistema di rivelazione.

L'utilizzo della GC-MS è un valido approc-

cio non solo per l'identificazione e la quantizzazione dei picchi completamente separati ma consente anche di identificare composti irrisolti mediante deconvoluzione degli spettri di massa [2, 3].

Per quanto concerne l'altro approccio, si può dire che l'accoppiamento di due colonne diverse garantisce un numero di piatti teorici decisamente più elevato

rispetto alle metodiche convenzionali consentendo la separazione totale di matrici altamente complesse (GCxGC) o la risoluzione di coppie critiche opportunamente selezionate (MDGC).

La gascromatografia multidimensionale convenzionale (heart-cutting), sulla scena da più di quarant'anni [4], prevede che solo alcune frazioni dell'eluato della prima dimensione vengano trasferite, ed ulteriormente separate, in una seconda colonna opportunamente scelta. Per quanto concerne la GCxGC, l'intera matrice è sottoposta al processo di separazione sulle due colonne analitiche connesse in serie [4].

In questo lavoro sono state investigate le potenzialità di un nuovo sistema di trasferimento per MDGC mediante analisi dei composti chirali di un olio di rosmarino.

Materiali e metodi

Campioni

Olio di rosmarino idrodistillato (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) diluito 1:10 v/v in n-esano.

Composti standard (Sigma-Aldrich, Milano, Italia): (+)-canfene, (-)-canfene,

Dati analitici quali-quantitativi dell' analisi 2D calcolata su cinque ripetute di olio di rosmarino.						
Composto	t _R medio	s	CV%	Area media	s	CV%
(-)-canfene	4,099	0,000	0,00	160.452	694,21	0,43
(+)-canfene	4,280	0,000	0,00	73.513	332,13	0,45
(+)-β-pinene	4,459	0,001	0,02	50.095	205,89	0,41
(-)-β-pinene	4,533	0,001	0,01	339.489	1449,85	0,43
(-)-limonene	5,755	0,001	0,01	35.923	706,70	1,97
(+)-limonene	5,927	0,000	0,01	61.686	750,88	1,22
(+)-canfora	6,813	0,001	0,01	204.753	1303,24	0,64
(-)-canfora	6,879	0,001	0,01	277.193	1847,07	0,67
(-)-isoborneolo	7,253	0,001	0,01	1.305	94,57	7,25
(+)-isoborneolo	7,335	0,000	0,00	1.343	130,05	9,68
(-)-borneolo	7,464	0,001	0,01	76.553	572,38	0,75
(+)-borneolo	7,553	0,000	0,01	15.608	113,58	0,73
(-)-terpinen-4-olo	8,048	0,000	0,00	4.847	176,39	3,64
(+)-terpinen-4-olo	8,091	0,001	0,01	1.780	80,65	4,48
(-)-α-terpineolo	8,538	0,000	0,01	37.544	201,47	0,54
(+)-α-terpineolo	8,670	0,001	0,01	49.825	263,80	0,53

(+)-sabinene, (+)-β-pinene, (-)-β-pinene, (+)-limonene, (-)-limonene, (+)-canfora, (-)-canfora, (+/-)-isoborneolo, (+)-borneolo, (-)-borneolo, (+)-terpinen-4-olo, (+)-α-terpineolo, (-)-α-terpineolo, diluiti 1:10 v/v in n-esano.

Strumentazione e condizioni sperimentali

Il sistema MDGC è composto da due gascromatografi Shimadzu GC-2010, da questo momento in poi denominati GC1 e GC2 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). GC1 e GC2 sono muniti di iniettori split/splitless e rivelatori a ionizzazione di fiamma (FID1, FID2). I due GC sono collegati mediante una linea di trasferimento termostata. Il sistema di interfacciamento, schematizzato in Figura 1, è posizionato nel forno del GC1.

Colonna GC1: SE 52 (5% difenil + 95% poldimetilsilossano) 10 m x 0,1 mm ID x 0,1 μm; Colonna GC2: DETBuSiilBETA-086 (diethyl-terz-butyl-silil-β-ciclodestrina) 10 m x 0,1 mm ID x 0,1 μm (MEGA, Legnano, Italia). Le due colonne analitiche sono collegate al sistema di trasferimento mediante

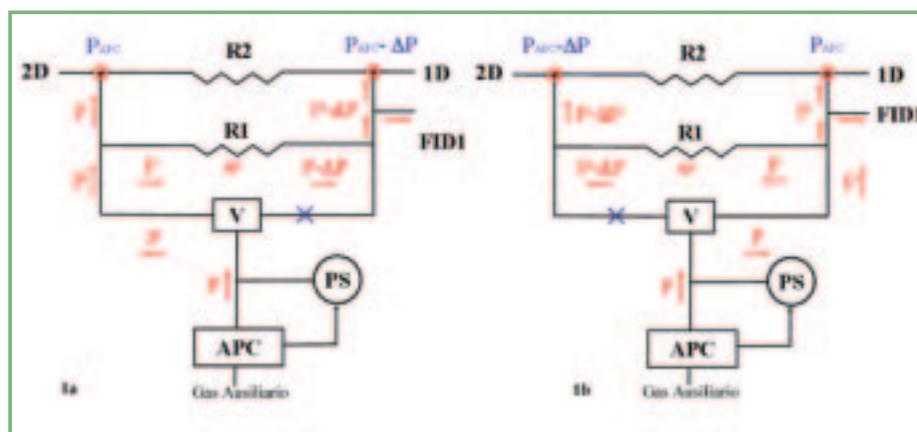


Fig. 1 - Schema del sistema di interfacciamento: 1a) posizione di stand-by; 1b) posizione di cut

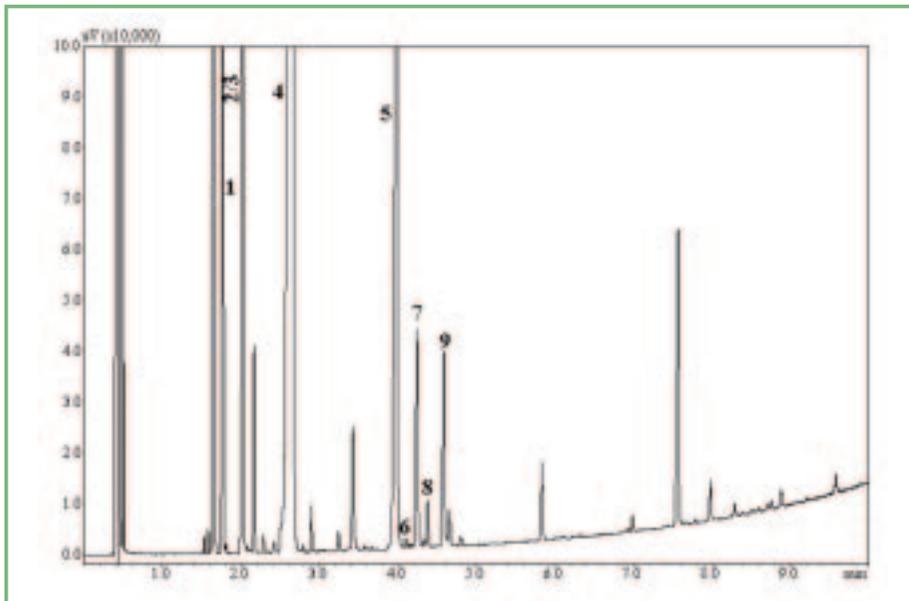


Fig. 2a - Cromatogramma MDGC di un olio essenziale di rosmarino in posizione di stand-by
Identificazione composti: 1-canfene; 2-sabinene; 3- β -pinene; 4-limonene; 5-canfora; 6-isoborneolo; 7-borneolo; 8-terpinen-4-olo; 9- α -terpineolo

due press-fit e due porzioni di retention gap (0,04 m x 0,53 mm d.i.). Il FID1 è collegato al sistema di trasferimento mediante una retention gap (0,5 m x 0,1 mm d.i.). Una pressione di 450 kPa (H_2) è stata applicata

sul sistema di trasferimento mediante un sistema di controllo avanzato della pressione (APC). Volume iniettato (250 °C) nel GC1: 0,5 μ L in split 1:100. Gas di trasporto: H_2 (600 kPa) a pressione costante.



Programma di temperatura GC1: da 50 °C a 280 °C a 10 °C/min. Programma di temperatura GC2: da 45 °C (2,5 min.) a 180 °C (8 min.) a 10 °C/min. FID1 (280 °C): H_2 : 20,0 mL/min.; Aria: 400,0 mL/min.; make up (He): 40,0 mL/min. Velocità di campionamento: 20 msec. FID2 (210 °C): H_2 : 50,0 mL/min.; Aria: 400,0 mL/min.; make up (He): 30,0 mL/min. Velocità di campionamento: 20 msec.

Risultati e discussione

Al fine di esaltare le potenzialità dello strumento in esame è bene non solo discutere le capacità separative ma anche descrivere il sistema di interfacciamento, cuore del sistema, al quale è sicuramente associabile un'elevata efficacia, nonostante la semplicità che lo caratterizza. Dallo schema del sistema di interfacciamento riportato in Figura 1 si vince che il principio di funzionamento è basato sulla capacità che ha quest'ultimo di assumere due posizioni, quella di stand-by (Fig. 1a) e quella di cut (Fig. 1b). L'interfaccia è basata sull'utilizzo di un sistema di controllo ausiliario della pressione (APC), il quale è direttamente collegato ad una valvola solenoide a tre vie (V). La valvola alimenta due rami costituiti da tubi in acciaio inossidabile con a ponte un restrittore di pressione (R1) ottenuto mediante una porzione di retention gap di silice fusa di opportune dimensioni (in questo caso 0,04 m x 0,15 mm d.i.). Quest'ultima ha il compito di generare alternativamente una riduzione di pressione nel cammino che porta dalla valvola ad uno dei due ingressi di pressione ausiliaria

Bibliografia

- [1] J.M. Davis, J.C. Giddings, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 418.
- [2] N. Ragunathan *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 1999, **856**, 349.
- [3] S.A. Mjø, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **488**, 231.
- [4] D.J. McEwen, *Anal. Chem.*, 1964, **36**, 279.
- [5] J. Dallüge *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1000**, 69.
- [6] M. Lo Presti *et al.*, *J. Sep. Sci.*, 2005, **28**, 273.

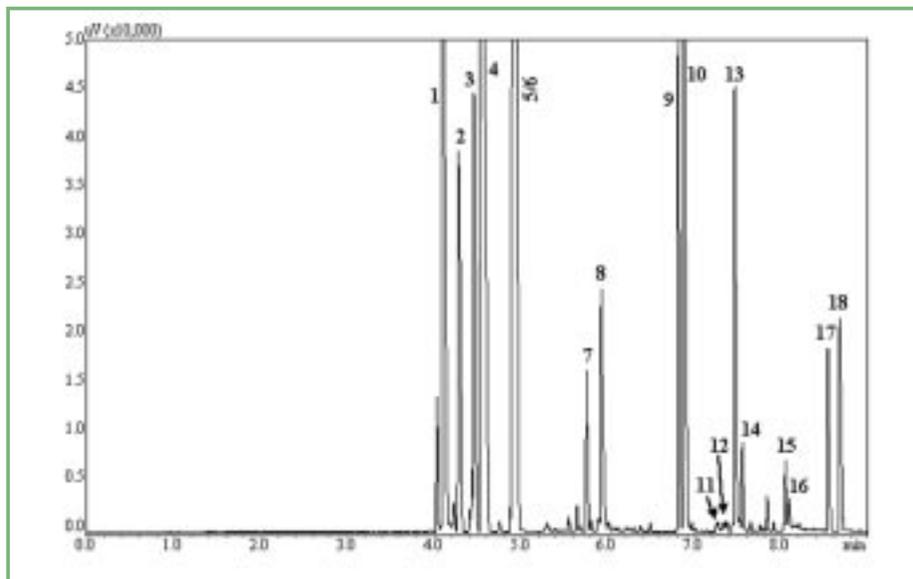


Fig. 2b - Cromatogramma chirale 2D dell'analisi MDGC. Identificazione composti: 1-(-)-canfene; 2-(+)-canfene; 3-(+)- β -pinene; 4-(-)- β -pinene; 5-(+)-sabinene; 6-(-)-sabinene; 7-(-)-limonene; 8-(+)-limonene; 9-(+)-canfora; 10-(-)-canfora; 11-(-)-isoborneolo; 12-(+)-isoborneolo; 13-(-)-borneolo; 14-(+)-borneolo; 15-(-)-terpinen-4-olo; 16-(+)-terpinen-4-olo; 17-(-)- α -terpineolo; 18-(+)- α -terpineolo

del sistema di interfacciamento. Un secondo restrittore di pressione è invece localizzato all'interno del sistema di trasferimento e consente il collegamento o meno della prima alla seconda colonna analitica. Infatti quando la valvola è in posizione normalmente aperta (posizione di stand-by, Fig. 1a), sull'ingresso di pressione ausiliaria del sistema di trasferimento adiacente alla seconda dimensione si registrerà un valore di pressione pari a quello applicato dall'APC (P), mentre nell'altro ingresso (prima dimensione) il valore risulterà leggermente ridotto per effetto del restrittore localizzato nel cammino che alimenta quest'ultima (P- Δ P). In queste condizioni la maggiore pressione nel ramo della secon-

da dimensione fungerà, attraverso il restrittore localizzato all'interno del sistema di trasferimento, da tappo rispetto alla pressione ridotta del ramo della prima dimensione e l'eluato della prima colonna raggiungerà il FID1. Semplicemente cambiando la posizione della valvola (normalmente chiusa, posizione di cut, Fig. 1b) si registrerà in seno al sistema una situazione analoga alla precedente, però in questo caso la pressione maggiore sarà sul ramo della prima dimensione, la quale consentirà ai composti provenienti dalla prima dimensione di raggiungere la seconda colonna passando attraverso R2.

Al fine di validare la funzionalità del sistema è stato sviluppato un metodo MDGC

veloce per l'analisi della frazione chirale dell'olio di rosmarino. La scelta di questa matrice è da imputare all'elevato numero di composti chirali in essa presenti [6].

L'analisi preliminare ha previsto l'acquisizione di un'analisi con il sistema di trasferimento in posizione di stand-by per l'intera durata dell'analisi (Fig. 2a). Sul cromatogramma ottenuto in poco più di dieci minuti di analisi, per comparazione con iniezioni di composti standard e informazioni previamente ottenute mediante analisi GC-MS dell'olio di rosmarino [6], 8 picchi corrispondenti a 9 composti chirali sono stati identificati e selezionati per essere trasferiti nella seconda colonna chirale. In Figura 2b è riportato il cromatogramma relativo alla separazione chirale delle 9 coppie di enantiomeri in circa 9 minuti di analisi. Oltre ad un ottimo responso in termini di qualità cromatografica si registra una buona riproducibilità dei dati quali-quantitativi ottenuti. Infatti in Tabella sono riportati i valori medi, le deviazioni standard e i coefficienti di variazione dei tempi di ritenzione e delle aree su cinque analisi ripetute. Dieci composti hanno dato un valore di CV% inferiore all'1%, altri 4 non superano il 5%, mentre per quanto riguarda la coppia di enantiomeri dell'isoborneolo, presente in tracce siamo sotto il 10%. Dall'analisi dei risultati ottenuti si può comunque concludere che il sistema oltre ad essere di facile utilizzo mostra ottimi risultati in termini di guadagno temporale garantendo ottime prestazioni e soprattutto una buona riproducibilità.

Multidimensional Gaschromatography (GC-GC) in the Analysis of Chiral Products of Essential Oils

ABSTRACT 

The present research is focussed on the evaluation of a recently developed high performance multidimensional gaschromatographic (MDGC) system employed in the fast analysis of a series of chiral compounds contained in rosemary essential oil. The heart of the MDGC system consists in a simple transfer device for the rapid sequential re-injection of analyte "heart-cuts" from the first to the second dimension. Fast MDGC was achieved by using micro-bore (0.1 mm ID) columns in both dimensions.