

PER L'ANALISI DI MISCELE COMPLESSE

Sistema GC multidimensionale automatico

Viene descritto un sistema gascromatografico multidimensionale realizzato utilizzando due camere cromatografiche, una valvola meccanica stabile ad alte temperature che consente il trasferimento di frazioni dalla prima alla seconda colonna capillare una "transfer-line" calda e un sistema atto a mantenere il flusso costante durante i trasferimenti. Il sistema è stato utilizzato per la determinazione della distribuzione enantiomerica di componenti degli olii essenziali agrumari

LUIGI MONDELLO, MAURIZIO CATALFAMO, IVANA BONACCORSI E GIOVANNI DUGO - DIPARTIMENTO FARMACO-CHIMICO UNIVERSITÀ DI MESSINA;
PAOLA DUGO - DIPARTIMENTO DI CHIMICA ORGANICA UNIVERSITÀ DI MESSINA

Le tecniche che prevedono la combinazione di più separazioni gascromatografiche controllate separatamente possono definirsi tecniche gascromatografiche multidimensionali (1); in funzione della sua complessità un sistema gascromatografico multidimensionale può essere utilizzato nei seguenti modi: "Solvent-flush", "Back-flush", "Heart-cut".

Nei primi sistemi gascromatografici multidimensionali venivano impiegate usualmente valvole meccaniche rotative. Nel 1968 Dean (2) mise a punto un sistema gascromatografico multidimensionale, privo di valvole meccaniche in cui il trasferimento di frazioni ("heart cut") dalla precolonna alla colonna principale era reso possibile da variazioni di pressione ottenute mediante l'uso di "restrictor" e di gas ausiliari. Un miglioramento del sistema fu realizzato da Schomburg et al. (3) utilizzando, tra le due colonne, un sistema di connessione denominato "liveswitching" la cui parte fondamentale era costituita

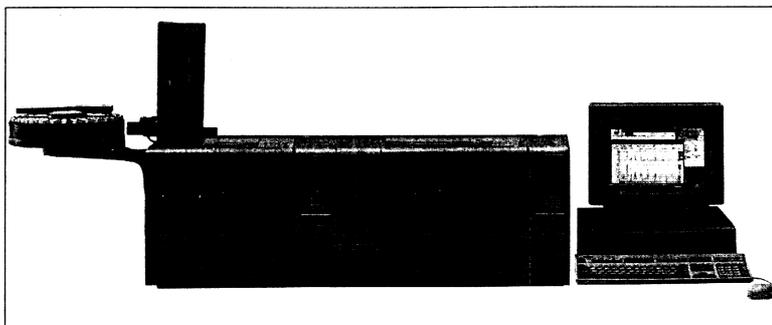


Fig. 1 - Sistema GC-GC multidimensionale utilizzato

da un sottile capillare di platino nel quale si innestavano la coda della prima colonna e la testa della seconda. A partire dalla fine degli anni sessanta sono stati realizzati e commercializzati diversi sistemi basati sul principio di Dean mentre i sistemi basati sulle valvole meccaniche venivano abbandonati completamente poiché le valvole disponibili a quel tempo non possedevano sufficiente stabilità termica e davano luogo ad "effetti

memoria". Oggi, invece, i progressi della tecnologia rendono disponibili valvole meccaniche stabili ad alte temperature che consentono l'uso di connettori miniaturizzati e l'eliminazione dei volumi morti. Queste valvole rendono possibile la realizzazione di sistemi gascromatografici multidimensionali che non presentano inconvenienti e che sono di uso più semplice di quelli basati sul principio di Dean (4-6).

La strumentazione e le condizioni sperimentali utilizzate sono illustrate nelle figure 1-3 e in tabella 1.

Come si può vedere dalle figure 1 e 2, il sistema è reso completamente automatico dall'uso degli eventi esterni del gascromatografo 1. I tempi di rotazione delle valvole relativi ad ogni taglio possono essere determinati con una analisi preliminare. Dopo di ciò è possibile eseguire analisi in maniera completamente automatica programmando gli eventi.

Nella parte superiore della figura 4 (A) è riportato il cromatogramma di un olio essenziale di bergamotto ottenuto con la colonna di SE-52. Nella parte centrale della stessa figura (B) è riportato il cromatogramma dello stesso olio con l'indicazione di sei successivi trasferimenti. I componenti trasferiti ed i tempi di trasferimento sono riportati nella Tabella 1. Nella stessa tabella sono riportate le percentuali nell'olio di bergamotto dei componenti trasferiti.

Nella parte inferiore della figura 4 (C) è riportato il cromatogramma chirale dei componenti presenti nelle frazioni trasferite.

Nella Tabella 2 sono riportati i risultati relativi alla distribuzione enantiomerica di β -pinene, sabinene, limonene, linalolo, terpinen-4-olo, α -terpineolo e acetato di linalile nell'olio di bergamotto.

TAB. 1 - PERCENTUALI RELATIVE NELL'OLIO ESSENZIALE DI BERGAMOTTO E TEMPI DI TRASFERIMENTO DEI COMPONENTI ANALIZZATI

	% relative	Tempi di trasferimento (min)
sabinene*	0.1-2.1	15.60-16.20
β -pinene*	4.3-11.1	19.60-16.20
limonene	24.1-54.9	19.90-20.15
linalolo	1.6-20.3	25.50-26.00
terpinen-4-ol	<0.1	30.90-31.15
α -terpineol	+0.1	32.00-32.70
linalil acetato	15.1-40.4	37.40-37.65

*Coeluiti

Dal confronto dei cromatogrammi 4A e 4B è possibile constatare che i tempi di ritenzione nei due cromatogrammi sono gli stessi anche per quei componenti eluiti dopo numerosi trasferimenti. Dopo l'esecuzione del cromatogramma nella precolonna è quindi possibile programmare i tempi di trasferimento di ciascuna frazione. Come si può notare dalla figura 4 e dalla Tabella 1, sabinene+ β pinene, limonene, linalolo e linalile acetato sono stati solo parzialmente trasferiti mentre terpinen-4-olo e α -terpineolo sono stati trasferiti quantitativamente.

Nella figura 5A è riportato il cromatogramma chirale ottenuto trasferendo

TAB. 2 - RAPPORTI ENANTIOMERICI DI ALCUNI COMPONENTI DELL'OLIO ESSENZIALE DI BERGAMOTTO

Bergamotto* (52 campioni)		
β -pinene	(+)	6.8-8.9
	(-)	93.2-91.1
sabinene	(+)	14.1-16.0
	(-)	85.9-84.0
limonene	(-)	2.0-2.7
	(+)	98.0-97.3
linalol	(-)	99.5-99.7
	(+)	13.4-25.4
terpinen-4-ol	(+)	0.5-0.3
	(-)	86.6-74.6
α -terpineol	(+)	49.3-68.1
	(-)	50.7-31.9
linalyl acetate	(-)	99.7-99.8
	(+)	0.3-0.2

* Risultati preliminari.

il limonene dalla precolonna alla colonna chirale. Nella figura B è riportato il cromatogramma chirale ottenuto trasferendo sabinene+ α -pinene durante una analisi effettuata immediatamente dopo quella del limonene. Come si può osservare dal confronto dei due cromatogrammi, non si evidenzia nessun effetto memoria.

I tempi di ritenzione inoltre, di una miscela standard, dei componenti

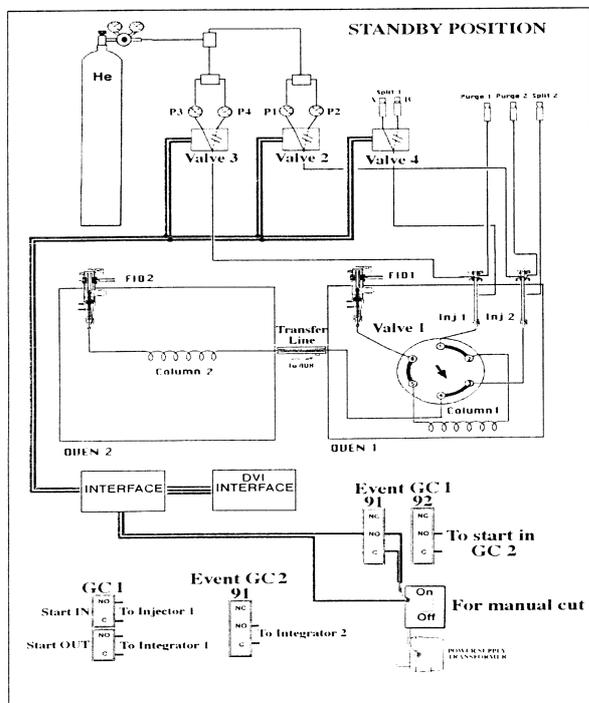


Fig. 2 - Schema pneumatico ed elettronico del sistema multidimensionale in posizione di "standby".

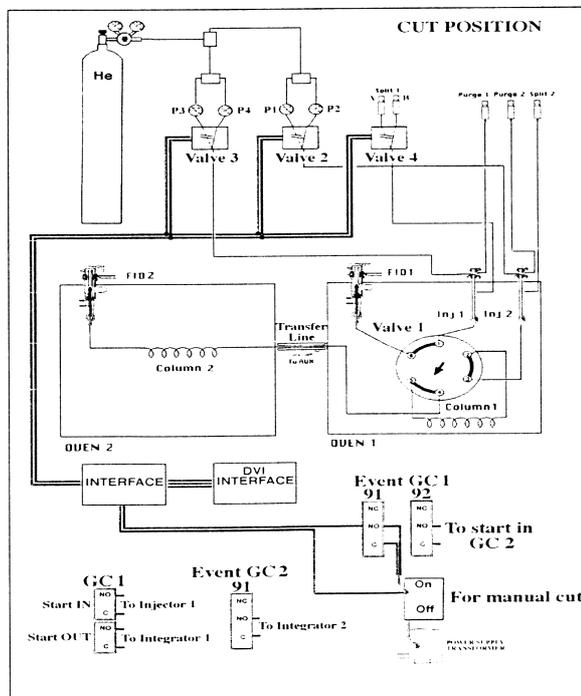


Fig. 3 - Schema pneumatico ed elettronico del sistema multidimensionale in posizione di "cut".

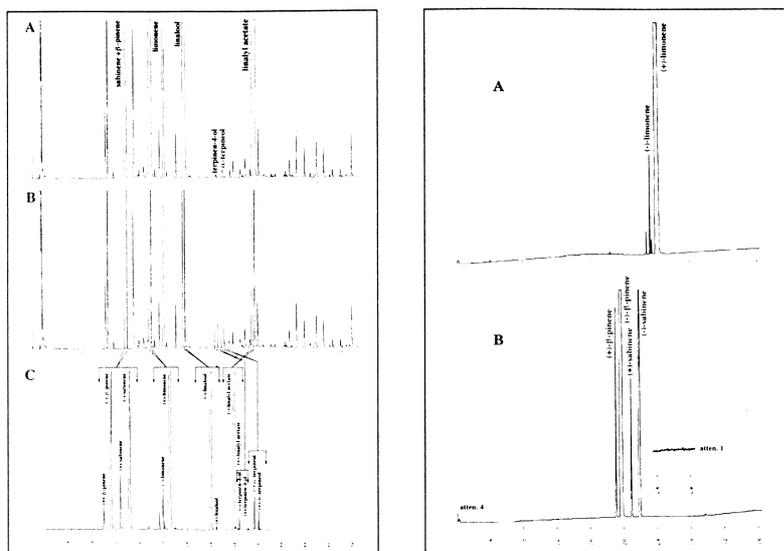


Fig. 4 - (A) cromatogramma HRGC di un olio di bergamotto ottenuto con la colonna di SE-52 ed il sistema in posizione di "stby"; (B) cromatogramma HRGC di un olio di bergamotto ottenuto con la colonna di SE-52 ed il sistema in posizione di "cut" (sul cromatogramma sono indicati i trasferimenti effettuati); (C) cromatogramma su colonna chirale delle frazioni di olio di bergamotto trasferite dalla colonna di SE-52.

Fig. 5 - (A) cromatogramma chirale del trasferimento del limonene di un olio di limone; (B) cromatogramma chirale del trasferimento di capinene+sabinene di un olio di limone (analisi effettuata immediatamente dopo quella del limonene).

analizzati nell'olio di bergamotto, analizzati direttamente nella colonna chirale, risultano identici a quelli ottenuti per gli stessi componenti analizzati con il sistema multidimensionale. In conclusione il sistema descritto in questa nota permette trasferimenti parziali o quantitativi dalla precolonna alla colonna principale, senza limiti di tempo e di realizzare trasferimenti multipli durante la stessa analisi. È inoltre possibile usare differenti programmi di temperatura nei due cromatografi e colonne di differente diametro interno e con differenti spessori delle fasi stazionarie. Inoltre, quando il sistema non viene usato nella configurazione multidimensionale, i due gas cromatografi possono essere usati indipendentemente senza alcuna modifica della strumentazione. □

TAB. 1 - STRUMENTI E CONDIZIONI SPERIMENTALI

Gasromatografo 1

- Due iniettori split/splitless (inj. 1 e inj. 2) con due controllori manuali di pressione; temperatura degli iniettori 250 °C;
- un rivelatore FID (FID 1) alla temperatura di 250 °C;
- una colonna capillare di SE-52, 30 m x 0.32 mm Ø, spessore del film 0.40-0.45 µm (Mega, Legnano, Italia) (column 1); temperatura della colonna: 45 °C per 6 minuti, da 45° a 240 °C a 2 °C/min; gas di trasporto He, 90 kPa (2.7 ml/min);
- una valvola Valco a 6 porte (1/16"), tipo UW a due posizioni (valve 1), con un giunto angolare (A3RADN6WT);
- una interfaccia digitale (DVI-220 - Valco Europa) collegata a "EVENT 91" sul cromatografo 1;
- una valvola a solenoide (valve 2) per portare la pressione del gas di trasporto (P₁, 110 kPa), (colonna 2, posizione di "stby") a una pressione più alta (P₂, 195 kPa), (colonne 1 e 2, posizione di "cut") collegata a "EVENT 92" sul cromatografo 1. Ciò consente di ottenere nella colonna 1 tempi di ritenzione riproducibili anche per quei componenti eluiti dopo più trasferimenti;
- una valvola a solenoide (valve 3) per portare la pressione del gas di trasporto (P₃, 90 kPa), (colonna 1 posizione di "stby") a una pressione più bassa (P₄, 5 kPa) (iniettore 1 e FID 1, posizione di "cut") collegata a "EVENT 91" sul cromatografo 1. Ciò permette di mantenere costante il flusso di gas di trasporto nel FID 1 e impedisce lo spegnimento della fiamma quando nella posizione di "Cut" il gas di trasporto va direttamente dall'iniettore 1 al FID 1 senza incontrare la resistenza della colonna 1;
- una valvola a solenoide (valve 4) che permette di usare alternativamente i due splitter A e B con differenti rapporti di splittaggio nell'iniettore 1. Questa valvola consente di utilizzare, in posizione di stby, lo splitter 1A (rapporto di splittaggio adatto per l'introduzione del campione) e di utilizzare lo splitter 1B nella posizione di "cut" (rapporto di splittaggio elevato per raggiungere rapidamente la pressione P₄);
- un software Shimadzu Class VP collegato ai segnali di "start" e "out" del gasromatografo 1.

"Transfer-line"

Blocco di alluminio termoregolato con una resistenza ed una termocoppia collegata all'uscita AUX 2 del gasromatografo 1.

Gasromatografo 2

- Una colonna MEGA DEXDETTBS, B Shimadzu (dietyl, ter-butyl-β-ciclodestrina) (column 2), 25m x 0.25mm Ø, spessore del film 0.25 µm (Mega, Legnano, Italia); temperatura della colonna: 45° per 6 minuti, da 45° a 180 °C a 2 °C/min; gas di trasporto He, 110 kPa (1.9 ml/min); il programma GC si avvia contemporaneamente all'inizio del primo trasferimento;
- un rivelatore FID (FID 2) alla temperatura di 250°C;
- un software Shimadzu Class VP collegato ai segnali di "start" e "out" del gasromatografo 2.

BIBLIOGRAFIA

- (1) W. Bertsch. Methods in high resolution gas chromatography. I. Two dimensional techniques. J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 1: 85-90 (1978).
- (2) D.R. Deans. A new technique for heart cutting in gas chromatography. Chromatographia 1: 1922 (1968).
- (3) G. Schomburg, F. Weeke, F. Muller, and M. Oréans. Multidimensional gas chromatography (MDC) in capillary columns using double oven instruments and a newly designed coupling piece for monitoring detection after pre-separation. Chromatographia 16: 87-91 (1982).
- (4) L. Mondello, M. Catalfamo, P. Dugo, G. Dugo. Multidimensional Capillary GC-GC Systems for the Analysis of Real Complex Samples. Part I. Development of a Fully Automated GC-GC System. J. Chromatogr. Sci. in stampa.
- (5) L. Mondello, M. Catalfamo, G. Dugo, P. Dugo. Multidimensional Capillary GC-GC for the Analysis of Real Complex Samples. Part II. Enantiomeric Distribution of Monoterpene Hydrocarbons and Monoterpene Alcohols of Coldpressed and Distilled Lime Oils. J. Microcolumn Sep. in stampa.
- (6) L. Mondello, M. Catalfamo, A.R. Proteggente, I. Bonaccorsi, G. Dugo, Multidimensional Capillary GC-GC for the Analysis of Real Complex Samples. Part III. Enantiomeric Distribution of Monoterpene Hydrocarbons and Monoterpene Alcohols of Mandarin Oils. J. Agric. Food Chem. in stampa.