

Mondello L.*, Catalfamo M.*, Dugo P. *, Protégente
A.R.* e Dugo G*.**

**LA GASCROMATOGRAFIA MULTIDIMENSIONALE PER
L'ANALISI DI MISCELE COMPLESSE. NOTA PRELIMINARE.
DETERMINAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE ENANTIOMERICA
DI COMPONENTI DEGLI OLII ESSENZIALI AGRUMARI.**

Estratto da
ESSENZE - DERIVATI AGRUMARI
Anno LXVII - n. 1,62 - 85 (1997)

Anno 1997

LA GASCROMATOGRAFIA MULTIDIMENSIONALE PER L'ANALISI DI MISCELE COMPLESSE. NOTA PRELIMINARE. DETERMINAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE ENANTIOMERICA DI COMPONENTI DEGLI OLII ESSENZIALI AGRUMARI.

Mondello L.*, Catalfamo M.*, Dugo P.*, Proteggente A.R.* e Dugo G*.**

**Dipartimento Farmaco-chimico, Facoltà di Farmacia, Università di Messina, Italia.*

*** Dipartimento di Chimica organica e biologica, Facoltà di Scienze MM, FF, NN, Università di Messina, Italia.*

Riassunto

Un sistema GC-GC multidimensionale completamente automatico costituito da due forni e da una "transfer-line" calda é stato utilizzato per la determinazione del rapporto enantiomerico di β -pinene, sabinene, limonene, linalolo, terpinen-4-olo e α -terpineolo negli olii essenziali di limone, mandarino, arancia dolce, arancia amara e bergamotto. Nell'olio di bergamotto, inoltre, è stata determinata la distribuzione enantiomerica dell'acetato di linalile.

Questo sistema multidimensionale permette il trasferimento di più frazioni durante la stessa analisi gascromatografica e l'uso dei due gascromatografi indipendentemente quando la strumentazione non viene utilizzata nella configurazione multidimensionale.

I risultati ottenuti permettono di caratterizzare gli olii in esame e possono costituire un utile riferimento per svelare l'eventuale aggiunta di sostanze estranee o la presenza di contaminanti.

Parole chiave: GC multidimensionale, GC enantioselettiva, olii essenziali agrumari, idrocarburi monoterpenici, alcoli monoterpenici, acetato di linalile.

Multidimensional Capillary GC-GC for the Analysis of Real Complex Samples. Preliminary Note. Determination of the Enantiomeric Distribution of some Components of Citrus Essential Oils.

Abstract

A multidimensional GC-GC system, fully automated, double oven, equipped with a hot transfer line, has been used to determine the enantiomeric ratio of β -pinene, sabinene, limonene, linalool, terpinen-4-ol and α -terpineol in lemon, mandarin, sweet orange, bitter orange, and bergamot essential oils. In bergamot oils was also determined the enantiomeric distribution of linalyl acetate. The multidimensional system used, allows multitransfers during the same analysis, as well as the independent use of the two gaschromatographs when the system does not operate in the multidimensional configuration. By a previous analysis using the instrument in the standby position, with a SE-52 precolumn, it was possible to determine the concentration of the components of interest and their retention times. Once these informations were obtained for all the different oils, it was possible to perform the transfers automatically and programme the most appropriate cut windows to obtain from the chiral column well resolved peaks either for those components present in high concentration, either for those present in small amounts. Limonene, in all the oils, linalool and linalyl acetate in bergamot oils, were only partially transferred because of their high concentration. Sabinene + β -pinene, terpinen-4-ol and α -terpineol, in all the oils, linalool and linalyl acetate, in all the oils different from bergamot, were totally transferred, since these compounds are present, in the essential oils analysed, in small amounts.

Even if the oils analysed present similar values for enantiomeric ratios of some of the components, among them exist noticeable differences of the enantiomeric distribution of their components.

Therefore, it is possible to characterise each oil, giving the enantiomeric distribution of these components a useful tool for the analytical evaluation of the genuiness and detection of contaminants, for the essential oils analysed

Key words: multidimensional GC, enantioselective GC, citrus essential oils, monoterpene hydrocarbons, monoterpene alcohols, linalyl acetate.

Introduzione

La distribuzione enantiomerica dei componenti degli olii essenziali può dare utili informazioni sulla genuinità, sulla qualità, sulla tecnologia di produzione e sull'origine botanica e geografica degli olii. Per esempio, il rapporto tra (+) e (-)-limonene è stato utilizzato per differenziare gli olii genuini di mandarino e di limone dagli olii ricostituiti (1,2); il rapporto enantiomerico del linalolo e/o del linalile acetato può consentire di svelare la presenza di componenti estranei nell'olio di bergamotto (3), nell'olio di lavanda (4) ed in alcuni petit-grain (5) e può dare informazioni sull'origine geografica dell'olio di arancia amara (6); il rapporto enantiomerico del terpinen-4-olo può essere correlato con la tecnologia di estrazione dell'olio di mandarino (7), mentre quello dell' α -terpineolo è un indice della qualità dell'olio di cardamomo e di *Laurus nobilis* (8), quello dell'(E)-nerolidolo dell'olio di neroli (9) e quello di mentolo, mentone e mentil acetato degli olii di menta (10) e di melissa (11).

La gascromatografia con colonne chirali di ciclodestrine modificate è attualmente la tecnica analitica più frequentemente usata per la determinazione della distribuzione enantiomerica dei composti volatili.

La gascromatografia enantioselettiva dell'olio essenziale come tale, può rappresentare l'unica fase del processo analitico (2,4,8,9,12-17) o la tappa finale di un procedimento analitico più complesso che prevede il prefrazionamento dei componenti di interesse e la loro successiva analisi gascromatografica con colonne chirali. I sistemi utilizzati in

quest'ultimo caso possono essere sistemi automatici HPLC-HRGC (6,7) e più spesso sistemi GC multidimensionali (16,18-24).

Gli olii essenziali sono generalmente miscele complesse e la determinazione gascromatografia diretta dei rapporti enantiomerici dei loro componenti, anche se talvolta possibile, è generalmente difficile e richiede particolare cura nella scelta delle condizioni sperimentali e delle fasi stazionarie onde evitare sovrapposizioni dei picchi delle coppie degli enantiomeri da analizzare con quelli di altri componenti (1,2,17). I sistemi LC-GC o i sistemi GC multidimensionali permettono il pre-frazionamento del campione e la successiva analisi chirale dei singoli componenti di interesse o di frazioni più semplici di quelle dell'olio come tale. In tal modo viene evitato il problema della sovrapposizione dei picchi. I sistemi LC-GC permettono il trasferimento e l'analisi GC di frazioni LC che contengono composti della stessa polarità che manifestano lo stesso comportamento in cromatografia liquida, mentre i sistemi GC multidimensionali permettono di operare trasferimenti di frazioni contenenti componenti della stessa volatilità appartenenti anche a differenti classi chimiche. I sistemi LC-GC permettono di trasferire dall'HPLC al GC più di una frazione LC durante la stessa analisi. Ciascuna frazione LC successiva alla prima, però, può essere trasferita ed analizzata in GC solo dopo il completamento dell'analisi GC della frazione precedente (25). I sistemi GC-GC, invece, permettono il trasferimento di diverse frazioni dalla precolonna alla colonna analitica e la loro analisi contemporanea. Inoltre, nel caso dell'accoppiamento LC-GC è estremamente difficile trasferire quantità differenti di composti che appartengono alla stessa classe, che hanno lo stesso comportamento in cromatografia liquida e che quindi sono coeluiti. Nel caso della GC multidimensionale, poiché anche la precolonna lavora ad alta risoluzione, è possibile la separazione di componenti appartenenti alla stessa classe chimica che posseggono anche solo piccole differenze di volatilità. In conseguenza di ciò per ogni componente possono essere scelti i tempi di trasferimento più opportuni e trasferire differenti porzioni di ciascuno di essi. Nel caso della determinazione, infatti,

mediante LC-GC del rapporto enantiomerico del limonene e del β -pinene nell'olio essenziale di limone, dove i due componenti sono presenti in percentuali relative, rispettivamente, del 70% e del 10% è impossibile il trasferimento di porzioni differenti dei due componenti della colonna LC a quella GC perché in LC sono coeluiti. Nel caso, invece, della stessa determinazione con un sistema GC multidimensionale, i due componenti possono essere facilmente separati nella precolonna e può essere facilmente scelta la porzione di ciascuno di essi da trasferire dalla precolonna alla colonna analitica in maniera da ottenere, in quest'ultima, picchi ben risolti: per esempio l'1% di limonene e il 10% di β -pinene.

I sistemi GC multidimensionali utilizzati negli ultimi anni sono basati sul principio messo a punto da Dean nel 1968 (26), mentre i sistemi che prevedono l'uso di valvole meccaniche sono stati da molti anni completamente abbandonati a causa della scarsa stabilità termica delle valvole e di possibili effetti memoria. I progressi della tecnologia consentono oggi di disporre di valvole stabili ad alte temperature che consentono inoltre di utilizzare connessioni miniaturizzate con la conseguente eliminazione di volumi morti. Tali valvole possono essere utilizzate per assemblare sistemi GC multidimensionali più facili da usare di quelli basati sul principio di Dean e senza gli inconvenienti presentati dalle valvole meccaniche tradizionali.

Nella nota presente vengono riportati i risultati preliminari della determinazione della distribuzione enantiomerica di alcuni monoterpeni (sabinene, β -pinene e limonene) e di alcuni alcoli monoterpenici (terpinen-4-olo, α -terpineolo e linalolo) negli olii di limone, mandarino, arancia amara, arancia dolce e bergamotto. In quest'ultimo olio è stata determinata anche la distribuzione enantiomerica dell'acetato di linalile. Le analisi sono state condotte con un sistema GC multidimensionale, sviluppato nel nostro laboratorio, operando cinque o sei (nel caso dell'olio di bergamotto) trasferimenti durante la stessa analisi.

PARTE SPERIMENTALE

La ricerca é stata condotta su olii essenziali genuini estratti a freddo con le comuni tecnologie industriali durante la stagione 1996/97 ed esattamente: 63 olii di mandarino; 80 olii di limone; 12 olii di arancia dolce; 6 olii di arancia amara; 52 olii di bergamotto. Tutti i campioni sono stati analizzati iniettando 1 μ l di una soluzione al 10% (V/V) di olio essenziale in pentano utilizzando un iniettore split con un rapporto di splittaggio di 1 a 10.

Il sistema GC multidimensionale utilizzato è un modello sviluppato nel nostro laboratorio che consiste di due gascromatografi Shimadzu 17 A e di una "transfer-line". Lo schema della strumentazione e le condizioni sperimentali utilizzate sono illustrate nelle figure 1 e 2 e qui di seguito descritte.

Gascromatografo 1

- Due iniettori split/splitless (inj. 1 e inj. 2) a 250°C con due controllori manuali di pressione;
- un rivelatore FID a 250°C (FID 1);
- una colonna capillare di SE-52, 30 m x 0.32 mm \emptyset , spessore del film 0.40-0.45 μ m (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 (2.7ml/min);
- una valvola Valco a 6 porte (1/16"), tipo UW a due posizioni (valve 1), con un giunto angolare (A3RADN6WT); la valvola ha un rotore costruito in materiale inerte legato (Poliimmide PTFE carbon), stabile fino a 350°C, e un diametro delle porte di 0.40 mm. Inoltre questa valvola può essere connessa con capillari di silice fusa utilizzando uno speciale adattatore (Valco FSR 5-5);
- una interfaccia digitale (DVI-220) (Valco Europa) collegata a "EVENT 91" sul cromatografo 1;

- adattatori removibili per silice fusa da 1/16" (FSR. 5-5 e FSR. 4-5) (Valco Europa) per collegare la valvola (valve 1) e i capillari di silice fusa;
- una valvola a solenoide (valve 2) per portare la pressione del gas di trasporto (P_1 , colonna 2, posizione di "stby") a una pressione più alta (P_2 , colonne 1 e 2, posizione di "cut") collegata a "EVENT 92" sul cromatografo 1;
- una valvola a solenoide (valve 3) per portare la pressione del gas di trasporto (P_3 , colonna 1 posizione di "stby") a una pressione più bassa (P_4 , iniettore 1 e FID1, posizione di "cut") collegata a "EVENT 91" sul cromatografo 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;
- un integratore Shimadzu C-R3A collegato ai segnali "start" e "out" del gascromatografo 1.

"Transfer-line"

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

Gascromatografo 2

- Un rilevatore FID e 250°C (FID 2);
- una colonna MEGA DEXDETTBS β (dietil, ter-butyl- β -ciclodestrina) (column 2), 25m x 0.25 μ m \varnothing , spessore del film 0.25 μ m (Mega, Legnano, Italia); temperatura della colonna: 45° per 6 minuti, da 45° a 180°C a 2°C/min; gas di trasporto He, 110KPa (1.9 ml/min); il programma GC si avviava contemporaneamente all'inizio del primo trasferimento;
- un integratore Shimadzu C-R3A collegato ai segnali di "start" e "out" del gascromatografo 1.

Quando la valvola a 6 porte (valve 1) è in posizione di "stby" (figura 1), i percorsi del gas di trasporto sono: dall'iniettore 1 alla colonna 1 al FID 1, e dall'iniettore 2 alla colonna 2 attraverso la "transfer-line" calda. In questa posizione è possibile condurre analisi indipendentemente su ciascuna delle due colonne senza alcuna modifica della configurazione del sistema. Inoltre è possibile cambiare la pressione del gas di trasporto e il rapporto di splittaggio in ciascun iniettore. Quando la valvola 1 è portata in posizione di "cut" (figura 2) il percorso del gas di trasporto è: dall'iniettore 2 alla colonna 1 e quindi, attraverso la "transfer-line" calda, alla colonna 2 e al FID 2; contemporaneamente la valvola a solenoide 2 è ruotata in maniera da consentire l'aumento della pressione del gas di trasporto da P_1 (110 KPa) a P_2 (200 KPa). Ciò permette di mantenere in posizione di "cut" nelle due colonne in serie (colonna 1 + colonna 2) lo stesso flusso che si aveva nella colonna 1 in posizione di "stby".

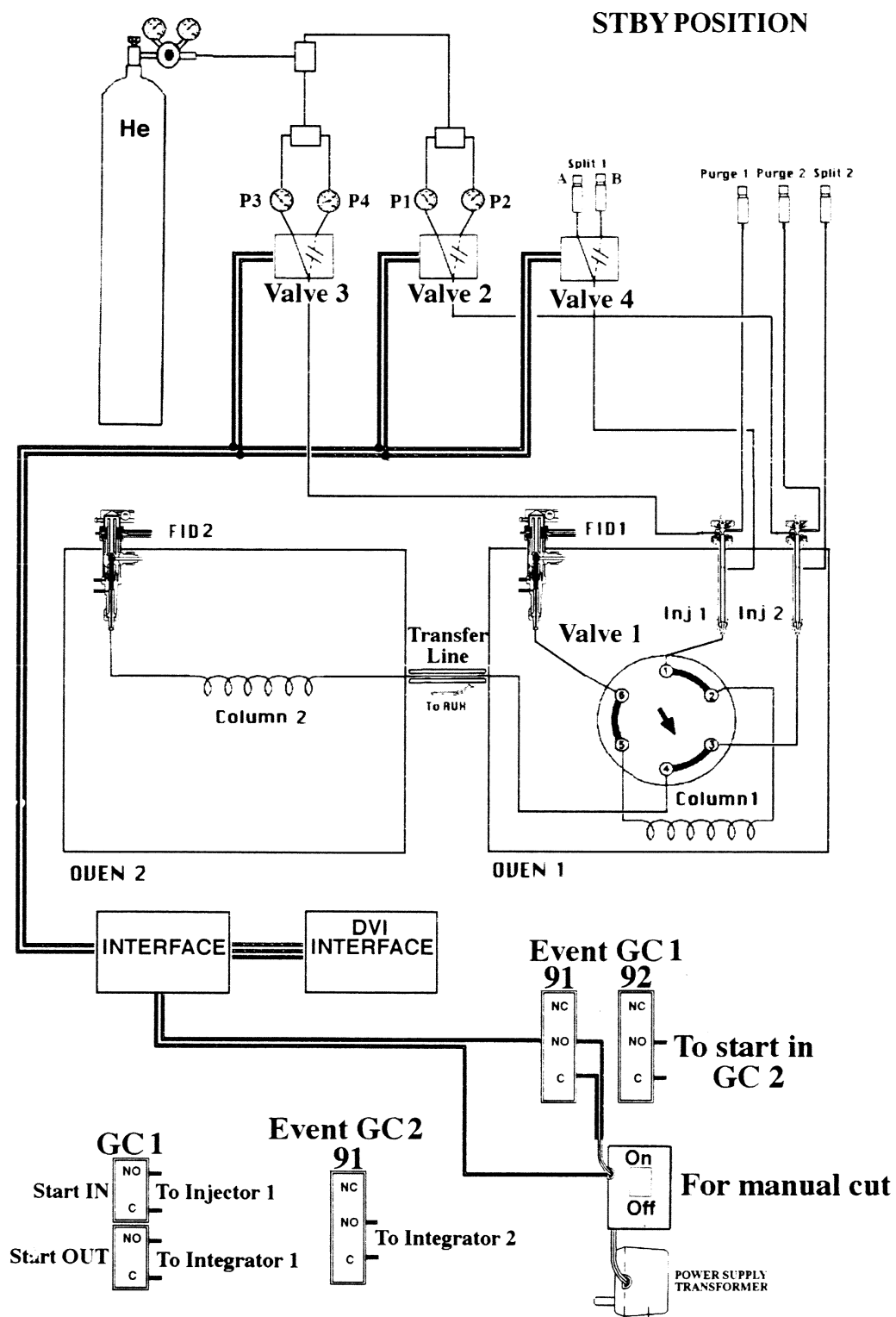


Figura 1 - Schema della strumentazione in posizione di "stby".

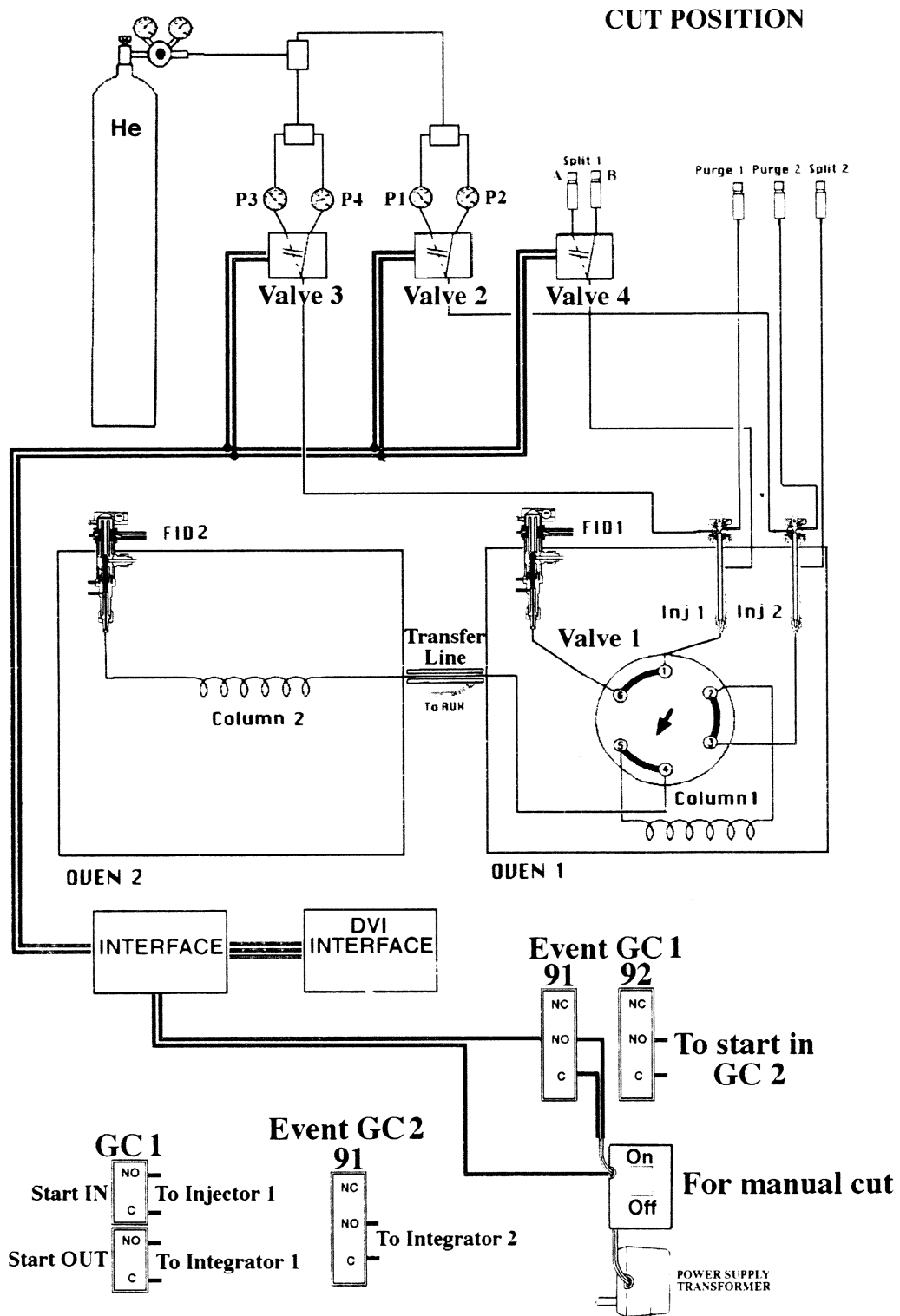


Figura 2 - Schema della strumentazione in posizione di "cut".

L'aumento della pressione è indispensabile quando si operano, durante la stessa analisi, trasferimenti multipli. Infatti, se si lavora con la stessa pressione nella posizione di "stby" e nella posizione di "cut" si verifica un abbassamento del flusso quando nella posizione di "cut" la precolonna (colonna 1) si trova in testa alla colonna principale (colonna 2). Se la pressione non viene aumentata in maniera da mantenere costante il flusso, l'abbassamento di flusso causa, nella colonna 1, un aumento dei tempi di ritenzione dei componenti eluiti dopo ciascun trasferimento e ciò rende impossibile il trasferimento automatico di più di una frazione durante la stessa analisi. Quando la valvola 1 è ruotata in posizione di "cut" l'aumento del flusso, dovuto all'esclusione nel percorso del gas di trasporto della colonna 1, può provocare lo spegnimento della fiamma del rivelatore (FID 1). Questo inconveniente viene evitato dalla valvola 3 che consente di abbassare la pressione del gas di trasporto P_3 (90 KPa) a P_4 (2.5 KPa) in maniera da mantenere costante il flusso di gas che arriva al rivelatore (FID 1). Per consentire, inoltre, il passaggio immediato dalla pressione P_3 alla pressione P_4 , nel sistema è stata prevista una ulteriore valvola a solenoide (valve 4). Questa valvola consente di utilizzare alternativamente lo splitter 1A nella posizione di "stby" (rapporto di splittaggio adatto all'introduzione del campione) e lo splitter 1B nella posizione di taglio (rapporto di splittaggio elevato per permettere il rapido stabilirsi della pressione P_4).

Quando il sistema opera in posizione di "stby" le due colonne lavorano indipendentemente e gli splitter 1A e 2 possono essere regolati per ottimizzare il rapporto di splittaggio e lo splitter 1B viene escluso. Quanto il sistema viene utilizzato nella configurazione multidimensionale lo splitter dell'iniettore 2 è regolato per consentire che un flusso elevato di gas di trasporto possa fuoriuscire dallo splitter quando si ritorna dalla posizione di "cut" alla posizione di "stby" in maniera tale da ristabilire immediatamente la pressione P_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.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli olii essenziali sono stati preliminarmente analizzati, utilizzando il sistema in posizione di "stby", con la precolonna di SE-52 per determinare la concentrazione dei componenti di interesse ed i loro tempi di ritenzione. In funzione dei tempi di ritenzione e della concentrazione di ogni componente di interesse nei vari olii essenziali, sono state scelte e programmate automaticamente le finestre di trasferimento in maniera tale da ottenere nella colonna chirale picchi ben risolti sia per i componenti presenti negli olii in concentrazione elevata sia per quelli presenti in concentrazione molto bassa.

Il limone, in tutti gli olii analizzati, il linalolo e l'acetato di linalile nell'olio di bergamotto, sono stati trasferiti parzialmente a causa della loro elevata concentrazione. β -Pinene+sabinene, terpinen-4-olo e α -terpineolo, in tutti gli olii, linalolo e acetato di linalile, in tutti gli olii diversi da quello di bergamotto, sono stati trasferiti quantitativamente a causa della loro bassa concentrazione.

La figura 3 riporta il cromatogramma dell'olio di bergamotto ottenuto con la colonna di SE-52 e il sistema in posizione di "stby"; il cromatogramma dello stesso olio ottenuto con la colonna di SE-52 e il sistema in posizione di "cut" (su questo cromatogramma sono indicati tutti i trasferimenti effettuati); ed il cromatogramma, ottenuto con la colonna chirale, delle frazioni trasferite dalla precolonna di SE-52.

Nelle figure 4 e 5 sono riportati i cromatogrammi, ottenuti con la colonna chirale, delle frazioni trasferite dalla colonna di SE-52 per gli olii di limone, di mandarino, di arancia dolce e di arancia amara.

Come si può dedurre dallo schema della strumentazione riportato nelle figure 1 e 2, e dai cromatogrammi riportati nella figura 3 il sistema multidimensionale utilizzato consente di programmare e di operare in

maniera completamente automatica trasferimenti multipli con grande riproducibilità dei tempi di ritenzione nella precolonna anche per quei componenti eluiti dopo numerosi trasferimenti. Il corretto uso del sistema permette, inoltre, il trasferimento automatico anche di quei componenti che vengono eluiti nella colonna di SE-52 in una zona critica del cromatogramma. Per esempio il linalolo viene eluito nella colonna di SE-52 tra il *trans*-sabinene idrato ed il nonanale. E' evidente che in questo caso la scelta delle finestre di trasferimento è critica e una non perfetta riproducibilità dei tempi di ritenzione potrebbe provocare una parziale perdita di linalolo o la presenza nella frazione trasferita nella colonna chirale del *trans*-sabinene idrato e/o del nonanale.

La tabella 1 riporta la distribuzione enantiomerica dei componenti analizzati. Come si può vedere dalla tabella, anche se tra alcuni olii si possono notare valori simili dei rapporti enantiomerici di taluni componenti, tra i vari olii esistono complessivamente differenze notevoli.

Ciò consente di caratterizzare i vari olii e di avere un riferimento analitico per rivelare contaminazioni o addizioni di prodotti estranei.

Olio di mandarino (Tabella 1, Figura 4)

I valori della distribuzione enantiomerica del limonene sono in accordo con i dati riportati in letteratura (1,4,15,20,23,27-29) e mostrano intervalli di variabilità piuttosto ristretti. I rapporti enantiomerici degli altri componenti presentano intervalli di variabilità più ampi; tali variazioni non sembrano essere collegati alla tecnologia di estrazione.

Il rapporto enantiomerico del β -pinene è dello stesso ordine di grandezza di quello riportato da Rocca *et al.* (15); in letteratura (4,18,20,23) sono però riportati generalmente intervalli di variabilità molto più ampi di quelli da noi riscontrati e a volte completamente differenti (28). Valori del rapporto tra (-) e (+) β -pinene più elevati di 3:97 potrebbero, a nostro avviso, essere dovuti a contaminazioni con altri olii. I valori della distribuzione enantiomerica degli alcoli

monoterpenici sono in accordo con quelli riportati da Bicchi *et al.* (17) e da Dugo *et al.* (7) mentre sono molto differenti dai valori riportati per il linalolo ((-)-linalolo= 4,0 - 6,5; (+)-linalolo = 93,5 - 96,0) da Casabianca e Graff (28). I risultati riportati per il linalolo da Casabianca e Graff sembrano essere più simili a quelli di un olio di clementine o di arancia dolce che a quelli di un olio di mandarino. I valori riportati per il sabinene non possono essere confrontati con dati di letteratura, perché è la prima volta che la distribuzione enantiomerica di questo componente viene determinata negli olii di mandarino.

Tabella 1 - Rapporti enantiomerici di alcuni componenti degli oli essenziali agrumari

	Mandarino* (63 campioni)	Limone* (80 campioni)	Arancia dolce** (12 campioni)	Arancia amara* (6 campioni)	Bergamotto* (52 campioni)
β -pinene	(+) 97.0-98.8 (-) 3.0-1.2	(+) 5.0-7.0 (-) 95.0-93.0		1.7-3.4 98.3-96.6	6.8-8.9 93.2-91.1
sabinene	(+) 76.2-80.5 (-) 23.8-19.5	(+) 13.3-15.3 (-) 86.7-84.7	94.6-97.9 5.4-2.1	44.4-54.5 55.6-45.5	14.1-16.0 85.9-84.0
limonene	(-) 2.0-2.3 (+) 98.0-97.7	(-) 1.7-1.9 (+) 98.3-98.1	0.6 99.4	0.6 99.4	2.0-2.7 98.0-97.3
linalolo	(-) 13.1-19.8 (+) 86.9-80.2	(-) 57.4-68.7 (+) 42.6-31.3		80.4-87.5 19.6-12.5	99.5-99.7 0.5-0.3
terpinen-4-olo	(+) 10.0-19.2 (-) 90.0-81.8	(+) 15.9-26.7 (-) 84.1-73.3		65.3-67.6 34.7-32.4	13.4-25.4 86.6-74.6
α -terpineolo	(+) 69.6-76.8 (-) 30.4-23.2	(+) 73.5-80.9 (-) 26.5-19.1		6.8-11.6 93.2-88.4	49.3-68.1 50.7-31.9
linalile acetato	(-) 99.7-99.8 (+) 0.3-0.2				

* Risultati preliminari

** Risultati preliminari. tranne che per il sabinene ed il limonene i rapporti enantiomerici nell'olio di arancia dolce mostrano dalle variabilità piuttosto ampie che meritano una indagine statistica approfondita ed una attenta correlazione con la provenienza dei campioni.

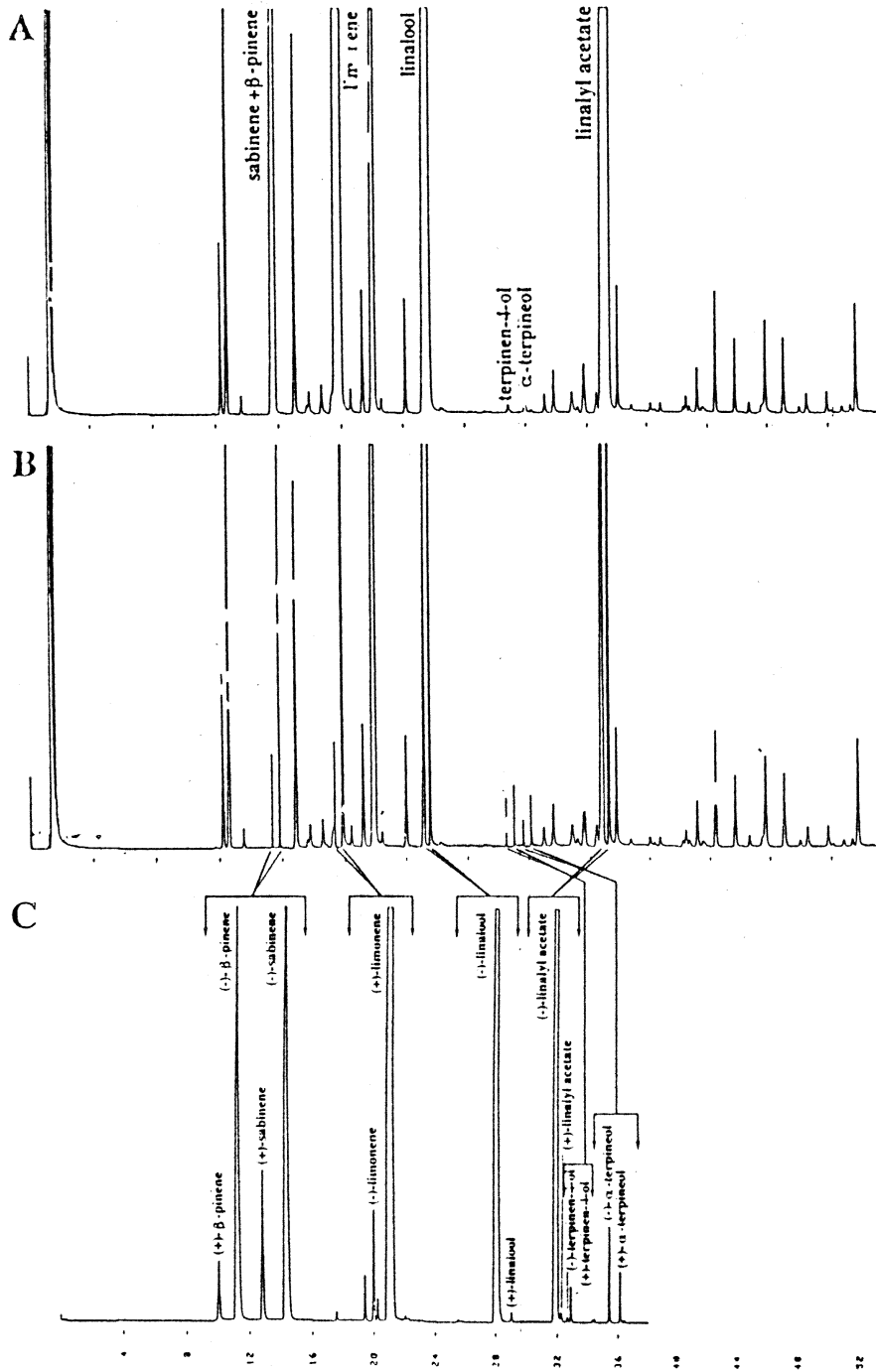


Figura 3 - A) Cromatogramma di un olio di bergamotto ottenuto con colonna di SE-52 ed il sistema in posizione di "stby";
 B) cromatogramma di un olio di bergamotto ottenuto con colonna di SE-52 ed il sistema in posizione di "cut" (sul cromatogramma sono indicati tutti i trasferimenti effettuati);
 C) cromatogramma su colonna chirale delle frazioni di olio di berga-motto trasferite dalla colonna di SE-52.

Olio di limone (Tabella 1, Figura 4)

Nell'olio di limone i valori dei rapporti enantiomerici degli idrocarburi monoterprenici sono compresi in intervalli piuttosto ristretti mentre quelli degli alcoli presentano degli intervalli notevolmente più ampi. I rapporti enantiomerici riscontrati per β -pinene e limonene sono in accordo con la maggior parte dei risultati riportati in letteratura per gli olii industriali estratti a freddo (15,19,23,27,29,30) e per gli olii estratti in laboratorio (20) e differiscono solo da alcuni dei valori di Casabianca *et al.* (28) che riportano percentuali relative di (+) - β -pinene fino a 7 e di (-)-limonene fino a 5. I valori minimi osservati ora per il rapporto tra (-) e (+)-linalolo coincidono con i valori massimi riportati in letteratura da Dugo *et al.* (7) e da Bicchi *et al.* (17) per gli olii estratti a freddo italiani e da Dellacassa *et al.* per gli olii uruguaiani (30). I dati riportati in questo lavoro si riferiscono a olii prodotti nei mesi di ottobre 1996 - dicembre 1996. Durante questi tre mesi è stata notata una diminuzione del valore del rapporto tra (-) e (+)-linalolo, che passa da 67/33 a ottobre a 59/41 a dicembre. E' ipotizzabile, quindi, che nei campioni prodotti nei mesi successivi (in corso di indagine) si potranno riscontrare valori più bassi del rapporto e paragonabili a quelli riportati in letteratura (7,17). I valori relativi al rapporto tra (+) e (-)-terpinen-4-olo sono paragonabili a quelli riportati in precedenza per gli olii italiani (7) e più bassi di quelli presentati dagli olii uruguaiani (30). I valori della distribuzione enantiomerica dell' α -terpineolo, infine, sono molto simili a quelli riportati da Bicchi (17) per gli olii italiani e a quelli degli olii uruguaiani (30). La distribuzione enantiomerica del sabinene, infine, è identica a quella riscontrata in precedenza negli olii uruguaiani (30).

Olio di arancia dolce (Tabella 1, Figura 5)

Sono stati riportati solo i valori dei rapporti enantiomerici del sabinene e del limonene. I valori relativi agli altri componenti analizzati non sono

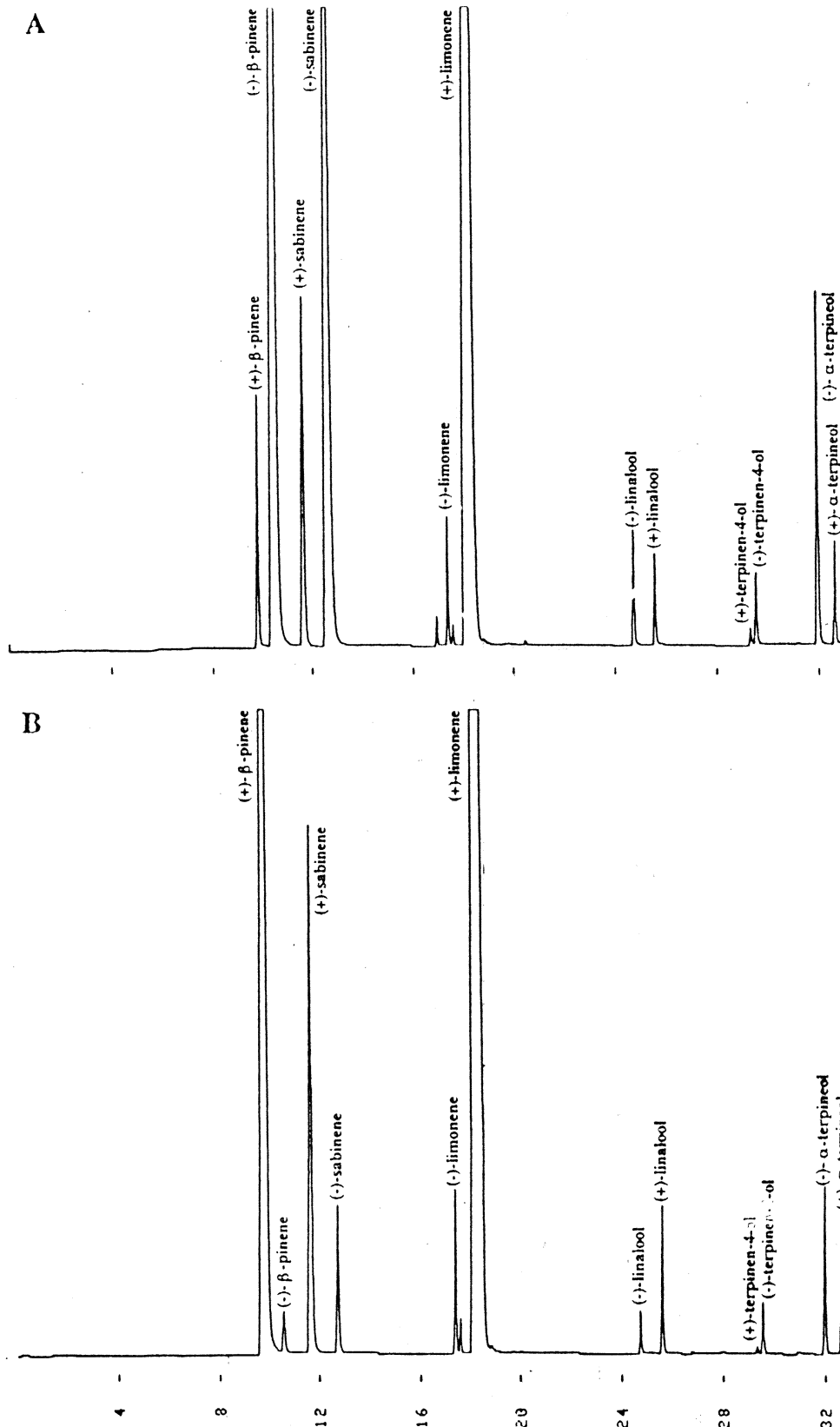


Figura 4 - A) Cromatogramma su colonna chirale delle frazioni di olio di limone trasferite dalla colonna di SE-52;
 B) cromatogramma su colonna chirale delle frazioni di olio di mandarino trasferite dalla colonna di SE-52.

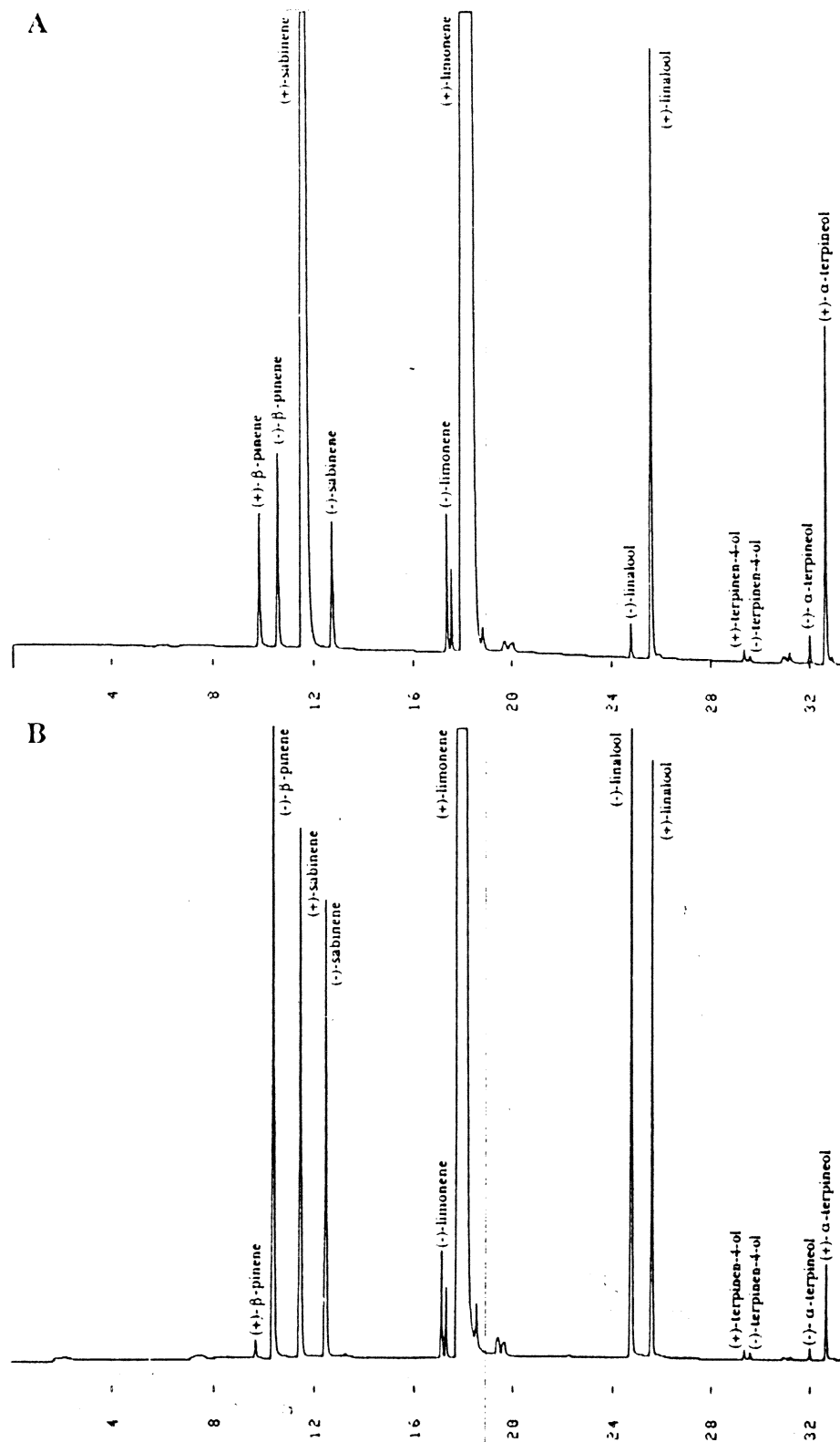


Figura 5 - A) Cromatogramma su colonna chirale delle frazioni di olio di arancia dolce trasferite dalla colonna di SE-52;
 B) cromatogramma su colonna chirale delle frazioni di olio di arancia amara trasferite dalla colonna di SE-52.

stati riportati perché presentano intervalli di variabilità molto ampi, che meritano una indagine statistica approfondita (attualmente in corso), per tentare di chiarirne i motivi, probabilmente legati ad alcune variabili fondamentali quali il tipo di frutti lavorati e il periodo della loro raccolta. I risultati ottenuti per il limonene sono in buon accordo con i valori riportati in letteratura (15,19,20,28,29). Per quanto riguarda il sabinene non esistono in letteratura dati con cui operare confronti.

Olio di arancia amara (Tabella 1, Figura 5)

Nell'olio di arancia amara la distribuzione enantiomerica del limonene presenta valori costanti, identici a quelli presentati nell'olio di arancia dolce, e in accordo con i dati di letteratura (19,20,23,29). I rapporti enantiomerici del β -pinene e del terpinen-4-olo oscillano entro limiti piuttosto ristretti mentre quelli degli altri componenti analizzati presentano dei limiti di variabilità più ampi. I valori riscontrati per il β -pinene sono confrontabili con la maggior parte dei dati di letteratura (19,23,29) dove comunque sono riportati anche intervalli di variabilità più ampi (20) di quelli riportati in questo lavoro. I valori della distribuzione enantiomerica del linalolo sono in accordo con quelli precedentemente riportati per gli olii italiani e determinati mediante HPLC-HRGC (6,31). La distribuzione enantiomerica del sabinene, del terpinen-4-olo e dell' α -terpineolo nell'olio di arancia amara viene riportata per la prima volta.

Olio di bergamotto (Tabella 1, Figura 3)

Nell'olio di bergamotto la distribuzione enantiomerica del β -pinene, del sabinene, del limonene e soprattutto del linalolo e dell'acetato di linalile varia entro limiti ristretti mentre quella del terpinen-4-olo e dell' α -terpineolo presenta degli intervalli di variabilità piuttosto ampi. Le oscillazioni presentate dai rapporti enantiomerici del limonene, anche se abbastanza piccole, sono più ampie di quelle osservate per gli altri olii analizzati. La distribuzione enantiomerica del β -pinene, del

sabinene, del limonene e del terpinen-4-olo nell'olio di bergamotto è molto simile a quella osservata per gli stessi componenti nell'olio di limone mentre differenze sostanziali si osservano per l' α -terpineolo e soprattutto per il linalolo. I valori osservati per la distribuzione enantiomerica del β -pinene sono sostanzialmente in accordo con i valori riportati in letteratura per gli oli estratti a freddo (19,23,29,32,33). Per il limonene in letteratura sono riportati, oltre a valori molto vicini ai nostri (32,33), anche valori molto diversi alcuni dei quali ((-)/(+)-limonene = 14/86) (19,23,29) possono essere attribuiti ad oli ricostruiti, in cui è presente limonene di origine diversa dagli oli agrumari, ed altri ((-)/(+)-limonene = 0/100) (34) possono essere attribuiti ad oli ricostruiti a partire da terpeni di arancia dolce. I valori ottenuti per la distribuzione enantiomerica del linalolo e dell'acetato di linalile confermano la presenza negli oli genuini di bergamotto di quantità molto piccole degli isomeri destrorotatori dei due prodotti (3,5,21,28,32,33,35,38) e che i rapporti enantiomerici di questi due composti costituiscono, per l'olio di bergamotto, un sicuro riferimento di genuinità. I rapporti enantiomerici del sabinene, del terpinen-4-olo e dell' α -terpineolo vengono riportati per la prima volta nell'olio di bergamotto.

Ringraziamenti

La ricerca è stata finanziata dal MURST (fondi del 40% e del 60%). Gli autori ringraziano la Shimadzu Italia, la ditta Simone Gatto ed il Consorzio del Bergamotto di Reggio Calabria per la collaborazione fornita durante l'esecuzione del lavoro, il prof. Carlo Bicchi (Dipartimento di Scienze e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino, Italia) ed il sig. Mario Galli (Mega, Legnano, Italia) per la preparazione delle colonne chirali utilizzate in questo lavoro.

Bibliografia

- 1 - DUGO G., STAGNO d'ALCONTRES I., COTRONEO A. e DUGO P., *J. Essent. Oil Res.* **5**, 589 (1992).

- 2 - DUGO G., STAGNO d'ALCONTRES I., DONATO M.G.e DUGO P., *J. Essent. Oil Res.* **5**, 21 (1993).
- 3 - COTRONEO A., VERZERA A. e TROZZI A., *Flavour Fragr. J.* **7**, 15 (1992).
- 4 - KREIS P. e MOSANDL A., *Flavour Fragr. J.* **7**, 187 (1992).
- 5 - RAVID U., PUTIEVSKY E. e KATZIR I., *Flavour Fragr. J.* **9**, 275 (1994).
- 6 - DUGO G., VERZERA A., COTRONEO A., STAGNO d'ALCONTRES I., MONDELLO L. e BARTLE K.D., *Flavour Fragr. J.* **9**, 99 (1994).
- 7 - DUGO G., VERZERA A., TROZZI A., COTRONEO A., MONDELLO L. e BARTLE K.D., *Essenz. Deriv. Agrum.* **64**, 35 (1994).
- 8 - RAVID U., PUTIEVSKY E. e KATZIR I., *Flavour Fragr. J.* **10**, 281 (1995).
- 9 - KÖNING W.A., GEHRCKE B., ICHELN D., EVERS P., DÖNNECKE J. e WANG W., *J. High Resolut. Chromatogr.* **15**, 367 (1992).
- 10 - FABER B., DIETRICH A. e MOSANDL A., *J. Chromatogr. A.* **666**, 161 (1994).
- 11 - KREIS P. e MOSANDL A., *Flavour Fragr. J.* **9**, 249 (1994).
- 12 - TAKEOKA G., FLATH R.A., MON T.R., BUTTERY R.G., TERANISHI R., GÜNTHERT M., LAUTAMO R. e SZEJTLI J., *J. High Resolut. Chromatogr.* **13**, 202 (1990).
- 13 - KÖNIG W.A., KREBBER R., EVERS P. e BRUHN G., *J. High Resolut. Chromatogr.* **13**, 328 (1990).
- 14 - KÖNIG W.A., RIECK A., HARDT I., GEHRCKE B., KUBECZKA K.H. e MUHLE H., *J. High Resolut. Chromatogr.* **17**, 315 (1994).
- 15 - ROCCA B., ARZOUYAN C. e ESTIENNE J., *Ann. Fals. Exp. Chim.* **85**, 327 (1992).

- 16 - WERKHOFF P., BRENNECKE S., BRETSCHEIDER W., GÜNTERT M., HOPP R. e SURBURG H., *Z. Lebens. Unters Forsch.* **196**, 307 (1993).
- 17 - BICCHI C., D'AMATO A., MANZIN V., GALLI A. e GALLI M., *J. Chromatogr. A.* **666**, 137 (1994).
- 18 - HENER U., KREIS P. e MOSANDL A., *Flavour Fragr. J.* **5**, 201 (1990).
- 19 - MOSANDL A., HENER U., KREIS P. e SCHMARR H.-G., *Flavour Fragr. J.* **5**, 193 (1990).
- 20 - KREIS P., HENER U. e MOSANDL A., *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **87** (1) 8 (1991).
- 21 - SCHUBERT V. e MOSANDL A., *Phytochemical Analysis* **2**, 171 (1991).
- 22 - WEINREICH B. e NITZ S., *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **14**, 117 (1992).
- 23 - MOSANDL A., *Food Rev. Int.* **11**, 597 (1995).
- 24 - WANG X., JIA C. e WAN H., *J. Chromatogr. Sci.* **33**, 22 (1995).
- 25 - MUNARI F., DUGO G. e COTRONEO A., *J. High Resolut. Chromatogr.* **13**, 56 (1990).
- 26 - DEAN D.R., *Chromatographia* **1**, 19 (1968).
- 27 - DUGO G., LAMONICA G., COTRONEO A., STAGNO d'ALCONTRES I., VERZERA A., DONATO M.G., DUGO P. e LICANDRO G., *Perf. Fav.*, **17** (5), 57 (1992).
- 28 - CASABIANCA H., GRAFF J.B., JAME P., PERRUCCHIETTI C. e CHASTRETTE M., *J. High Resol. Chromatogr.* **18**, 279 (1995).
- 29 - HENER U., HOLLENAGEL A., KREIS P., MAAS B., SCHMARR H.-G., SCHUBERT V., RETTINGER K., WEBER B. e MOSANDL A., In *Flavour Science and Technology*, Wiley, Chichester, West Sussex, England (1990).

- 30 - DELLACASSA E., LORENZO D., MOYNA P., VERZERA A., MONDELLO L. e DUGO P., *Flavour Fragr. J.* **12** (1997) in corso di stampa.
- 31 - MONDELLO L., DUGO G., DUGO P. e BARTLE K.D., *Perf. Flav.* **21** (4), 25 (1996).
- 32 - JUCHELKA D. e MOSANDL A., *Pharmazie* **51**, 417 (1996).
- 33 - MOSANDL A. e JUCHELKA D., *J. Essent. Oil Res.* **9**, 5 (1997).
- 34 - CASABIANCA H. e GRAFF J.-B., *J. High Resolut. Chromatogr.* **17**, 184 (1994).
- 35 - CASABIANCA H. e GRAFF J.-B., *Eppos* **7**, 227 (1996).
- 36 - VERZERA A., LAMONICA G., MONDELLO L., TROZZI A. e DUGO G., *Perf. Flav.* **21** (6), 19 (1996).
- 37 - KÖNIG W.A., FRICKE C., SARITAS Y., MOMENI B. e HOHENFELD G., *J. High Resol. Chromatogr.* **20**, 55 (1997).
- 38 - DELLACASSA E., LORENZO D., MOYNA P., CAVAZZA A., *J. Essent. Oil Res.* (1997) in corso di stampa.