

MICRO-CONDENSACION E IDENTIFICACION DE COMPUESTOS  
TERPENICOS SEPARADOS EN UN CROMATOGRAFO DE GASES  
ANALITICO (\*)

por

M. F. ZAFRA (\*\*) y E. GARCIA-PEREGRIN

Ars Pharm. XI, 419 (1970).

INTRODUCCION

Si bien la cromatografía en fase gaseosa es esencialmente una técnica analítica, en algunas ocasiones el tiempo de retención no es suficiente para la identificación de un determinado componente. En estos casos puede utilizarse como técnica preparativa, aumentando el tamaño de las columnas para manejar mayores cantidades de muestra (10 a 15 microlitros) (1, 2, 3). La adecuada recogida de las fracciones es un problema tan arduo, en ocasiones, como la identificación de las mismas. Si se consigue, la cromatografía gaseosa constituye una de las mejores técnicas de separación, requiriéndose diversos análisis adicionales de las fracciones separadas para la positiva identificación de los componentes individuales.

MIROV (4) ha utilizado la espectroscopía infrarroja junto con el valor  $R_f$  para una identificación más exacta de numerosas sustancias. OGUYANOV (5) ha analizado los componentes del *Pinus silvestris* por cromatografía gaseosa, espectroscopía infrarroja y densidad óptica. En estos casos es necesario utilizar columnas preparativas o bien modificar la cromatografía analítica para fines preparativos (6). JAIN (7) ha sugerido como idónea la combinación de la cromatografía gaseosa —en diferentes condiciones de trabajo— con un estudio complementario por espectroscopía infrarroja, que permite confirmar la identidad de los componentes. También RICCIARDI (8) ha empleado la cromatografía gaseosa junto con la espectroscopía infrarroja para la identificación y la confirmación de diversos componentes.

HOERING (9) ha informado sobre la necesidad de una aplicación conjunta de la cromatografía gaseosa y la espectroscopía infrarroja, puesto que cromatogramas aparentemente "limpios" dan espectros infrarrojos con impurezas desconocidas en el cromatograma. Las técnicas de recogida son enormemente variadas (10-14).

---

(\*) Este trabajo forma parte del Grant FG-Sp-145 del Departamento de Agricultura de los EE. UU.

(\*\*) Becario de la Comisaría de Protección Escolar.

La posibilidad de comprobación por espectroscopía IR de los resultados obtenidos en cromatografía gaseosa era muy interesante para los objetivos de nuestro trabajo. A este respecto, BEROZA (15) ha descrito una técnica para la condensación de mínimas cantidades de componentes volátiles cuya identidad, después de su separación por GC, puede ser confirmada bien sea por una nueva cromatografía —en diferentes condiciones— o efectuando el correspondiente espectro infrarrojo. También EDWARDS (16) ha desarrollado un método sencillo para la condensación de pequeñas cantidades de componentes volátiles a partir de cromatografía gas líquido, determinando acto seguido el espectro infrarrojo para una mayor seguridad en su identificación. THOMAS (18) y SNAVELY (17) han descrito, asimismo, diversas técnicas de recogida de los componentes de una mezcla separados por cromatografía de gases para su ulterior identificación por espectroscopía IR. DURSO y col. (13) han puesto a punto un método automático para la resolución de mezclas en gran escala, de general aplicación en las separaciones cromatográficas. La cantidad de muestra de que se dispone y, sobre todo, sus propiedades físicas condicionan la forma de recogida (13-18).

El empleo conjunto de la cromatografía en fase gaseosa y la espectroscopía infrarroja podía constituir, por tanto, el sistema analítico más adecuado para la investigación de los componentes esenciales que, en cantidades mínimas, se obtenían en nuestro laboratorio a partir de plántulas de pino. También era indispensable conocer la fiabilidad de los patrones, analizando exactamente su composición, e intentar identificar componentes de los extractos de tallos y acículas de pino cuando el Rf era desconocido o insuficientemente nítido.

Trabajando con aire líquido y unos dispositivos de microcondensación acoplados al "splitting", se han conseguido muestras (con registro analítico simultáneo) que, empleando microcélulas en el IR, han permitido la obtención de espectros suficientemente expresivos para los objetivos previstos.

## MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado columnas analíticas y, por tanto, pueden inyectarse únicamente cantidades pequeñísimas de muestra (3 microlitros como máximo). Aunque se hace una repetición del ciclo, la cantidad recogida con fines "preparativos" es mínima. Era necesario, por tanto, un colector especial que permitiese recoger volúmenes muy pequeños (décimas de microlitro) para su análisis en microcélula de IR. Basándose en los colectores descritos por SNAVELY (17) y los fabricados por la firma Perkin-Elmer, diseñamos el modelo que se representa en la fig. 1.

Está formado por un tubo de vidrio "Pyrex" de 3 mm. de diámetro interior y 5 cm. de longitud, con una pequeña tubuladura lateral. En este tubo se introduce un capilar de 3 cm. de longitud, adaptándolo mediante un anillo de teflón, cuyo extremo —no capilar— se conecta al "splitting". El gas portador atraviesa el capilar y sale por la pequeña tubuladura lateral.

Enfriando convenientemente el sistema (sumergiéndolo en aire líquido), la escasa cantidad de muestra recogida se condensa en la superficie del tubo capilar. Una vez separado el sistema de refrigeración se añaden por la parte superior 20 microlitros de disolvente, el cual arrastra toda la muestra. Presionando suavemente el tubo de teflón, se practican sucesivas succiones que permiten una

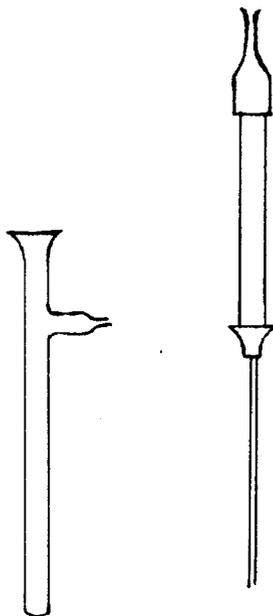


Fig. 1.—Esquema del dispositivo empleado para la recogida de pequeñas muestras separadas por cromatografía gaseosa.

buena recuperación. Finalmente, se saca el capilar quedando la solución problema en el tubito "colector", llenándose las microcélulas del IR mediante una microjeringa.

Para la cromatografía gaseosa se ha utilizado un cromatógrafo Perkin-Elmer, mod. F-7, dotado de dobles columnas, que permiten la compensación de la línea de base al operar a temperaturas altas, y un detector diferencial de llama. La espectroscopía infrarroja se ha realizado en un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer, mod. 137.

Las muestras empleadas han consistido, principalmente, en terpenos patrones, esencia obtenida por destilación en corriente de vapor de agua a partir de tallos y acículas de *Pinus pinaster* (20) y esencia de sábina. La cantidad de muestra inyectada ha sido de 2 microlitros. Puesto que trabajamos a temperaturas elevadas (125-150°C) la refrigeración se ha efectuado con aire líquido contenido en pequeños vasos de precipitado recubiertos de material aislante (esponja de plástico).

Generalmente, son necesarias inyecciones repetidas para obtener una cantidad suficiente de la fracción problema. Los colectores deben permanecer inmersos en aire líquido todo el tiempo que dure la recogida. Una vez obtenida la cantidad necesaria de muestra, se retira del aire líquido y se añaden por la parte supe-

rior del capilar 20 microlitros de  $\text{Cl}_2\text{C}$ . Con la solución resultante se llenan las microcélulas y se realiza el espectro infrarrojo. La pureza de la muestra recogida puede comprobarse —además de por su espectro IR— por nueva separación cromatográfica.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1.—Patrones.

La técnica que se describe ha permitido la investigación de la pureza química de las siguientes sustancias patrones para cromatografía gaseosa: alfa- y beta-pineno, alfa-felandreno, delta-3-careno, geraniol, citronelol, sabineno y limoneno. En todas ellas se han detectado e identificado numerosas sustancias acompañantes en mayor o menor proporción que impurifican al patrón y, en muchos casos, pueden inducir a graves errores analíticos. Se presentan algunos ejemplos: la fig. 2

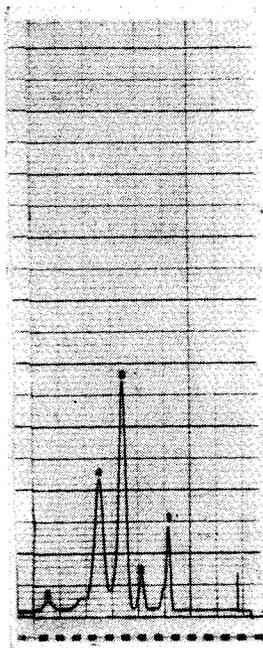


Fig. 2.—Cromatograma del alfa-felandreno patrón.

corresponde al cromatograma del alfa-felandreno patrón obtenido en las siguientes condiciones: columna DC-550; flujo de nitrógeno: 80 ml/min.; temperatura: 125°C; atenuación: 400. La presencia de numerosas impurezas se pone de manifiesto asimismo en el espectro infrarrojo (fig. 3). Dada la importancia cuantitativa de las sustancias acompañantes, se procedió a separar por “splitting” e iden-

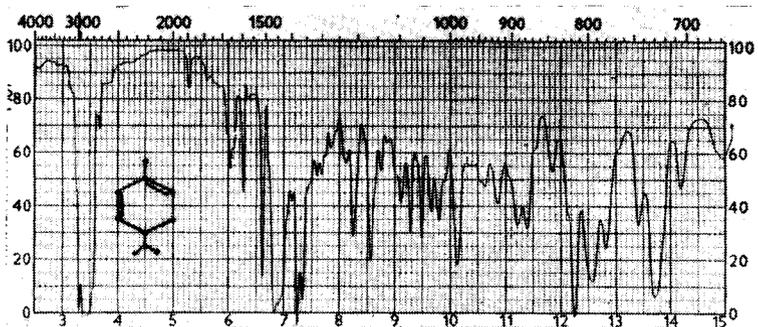


Fig. 3.—Espectro IR del alfa-felandreno patrón.

tificar los componentes mayoritarios 1, 3 y 4. En el primer caso se inyectaron tres veces sucesivas 2 microlitros de alfa-felandreno patrón recogiéndose la fracción correspondiente al pico 1. Para la identificación de las sustancias 3 y 4, dada su mayor proporción, bastó con inyectar dos veces 2 microlitros de muestra. Las fracciones recolectadas se disolvieron en 20 microlitros de  $\text{Cl}_4\text{C}$  y se determinó su espectro infrarrojo en microcélulas del  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , pudiéndose identificar como tu-yeno, alfa-felandreno y beta-felandreno, respectivamente (fig. 4).

En el cromatograma del sabineno (fig. 5), obtenido en idénticas condiciones que el del alfa-felandreno, aparecen dos componentes mayoritarios en tal proporción que se interfieren de una manera manifiesta en su espectro infrarrojo (fig. 6). Por el valor de su  $R_f$  puede sugerirse que el componente 1 corresponde al alfa-pineno y el 2 al sabineno. Para su identificación por espectro IR, ambos "picos" se recogieron tres veces sucesivas, inyectando 2 microlitros de patrón cada vez, y se disolvieron en 20 microlitros de  $\text{Cl}_4\text{C}$ . Los espectros correspondientes (fig. 7) se han identificado como alfa-pineno y sabineno, corroborándose de esta forma las previsiones cromatográficas.

El análisis cromatográfico del limoneno se ha realizado en diversas condiciones, tal como se expresa en la tabla I. Los cromatogramas correspondientes (fig. 8) nos muestran una serie de componentes, de los cuales algunos —como el 3', fig. 8 B— no han podido recogerse como efluyentes de la columna DC-550 debido a su  $R_f$ , muy semejante al del pico 3. Empleando la columna "R" (fig. 8-C) se obtuvo una mejor separación pero esta columna no puede ser utilizada para "splitting". El espectro infrarrojo del limoneno patrón (fig. 9) pone claramente de manifiesto la variedad de estructuras que contiene. Los efluyentes de la columna se recogieron tres veces sucesivas, habiendo inyectado 3 microlitros de muestra cada vez. Sus espectros infrarrojos (fig. 10) permitieron identificar los cuatro componentes mayoritarios: alfa-pineno (pico 1), canfeno (pico 2), limoneno (pico 3) y 1-metil-4-isopropil benceno (pico 4).

## 2.—Extractos esenciales de tallos y acículas de *P. pinaster*

La aplicación de la técnica de "splitting" en la investigación de los componentes no identificados por cromatografía gaseosa existentes en la esencia del

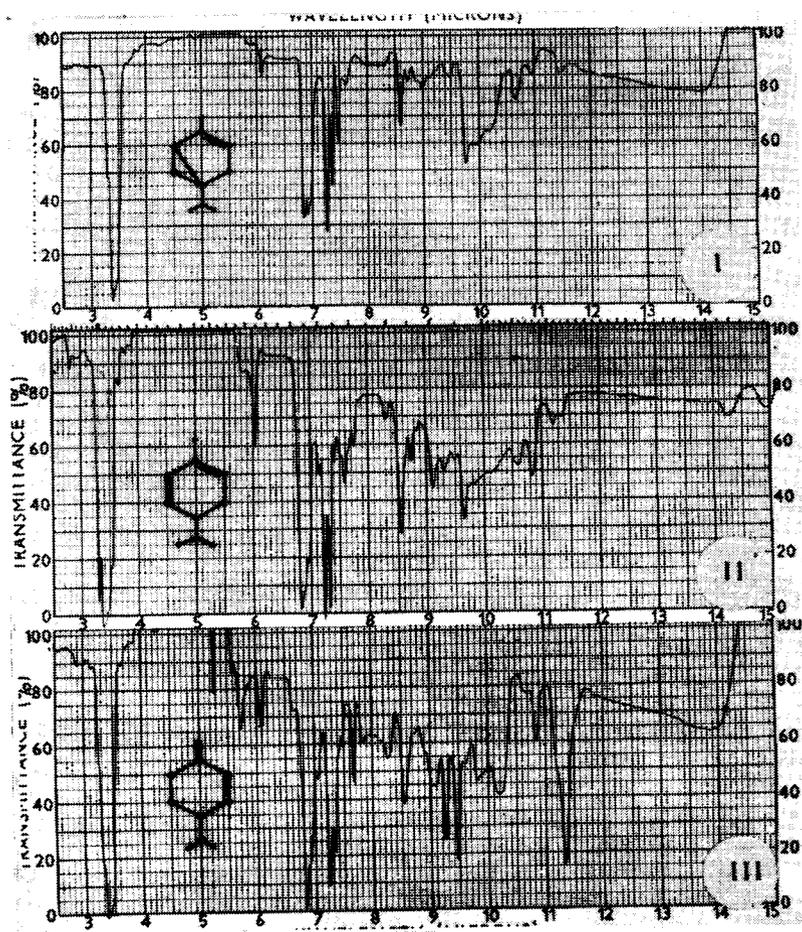


Fig. 4.—Espectro IR de los componentes mayoritarios aislados a partir del alfa-felandreno patrón, I) Pico núm. 1: Tuyeno; II) Pico núm. 3: alfa-felandreno; III) Pico núm. 4: beta-felandreno.

TABLA I

Condiciones experimentales para la cromatografía en fase gaseosa del limoneno

	A	B	C
Columna	DC-550	DC-550	"R"
Flujo (ml/min.)	80	80	35
Temperatura (°C)	160	125	125
Atenuación	400	400	100

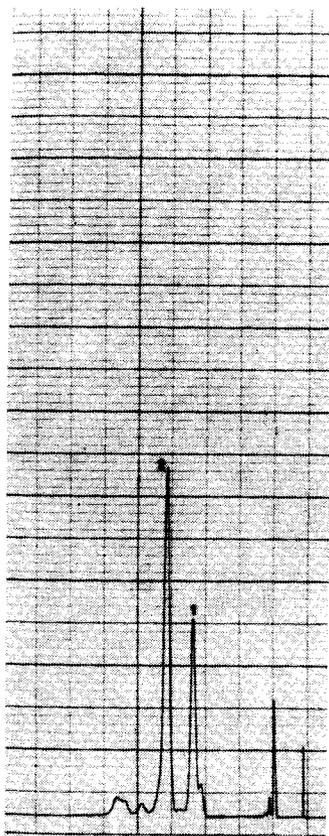


Fig. 5.—Cromatograma del sabineno patrón.

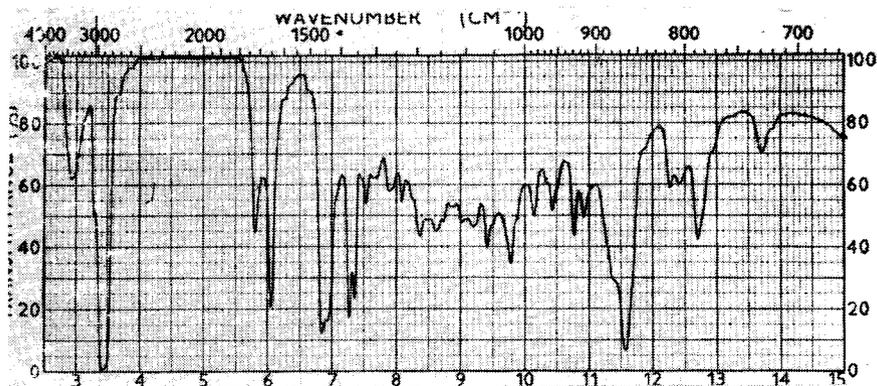


Fig. 6.—Espectro IR del sabineno patrón.

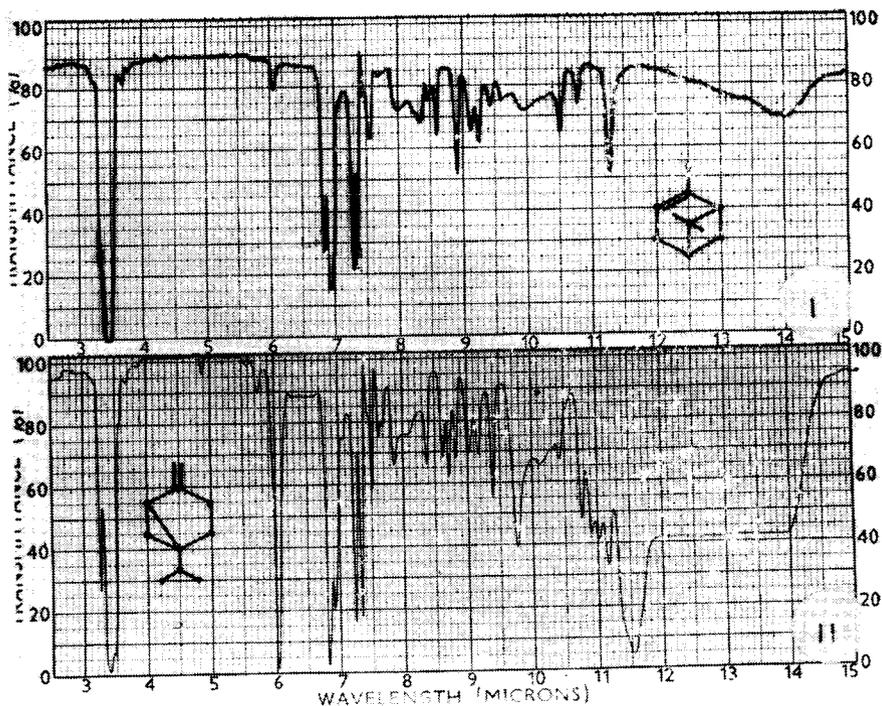


Fig. 7.—Espectro IR de los componentes mayoritarios aislados del sabineno patrón. I) Pico núm. 1: alfa-pineno; II) Pico núm. 2: sabineno.

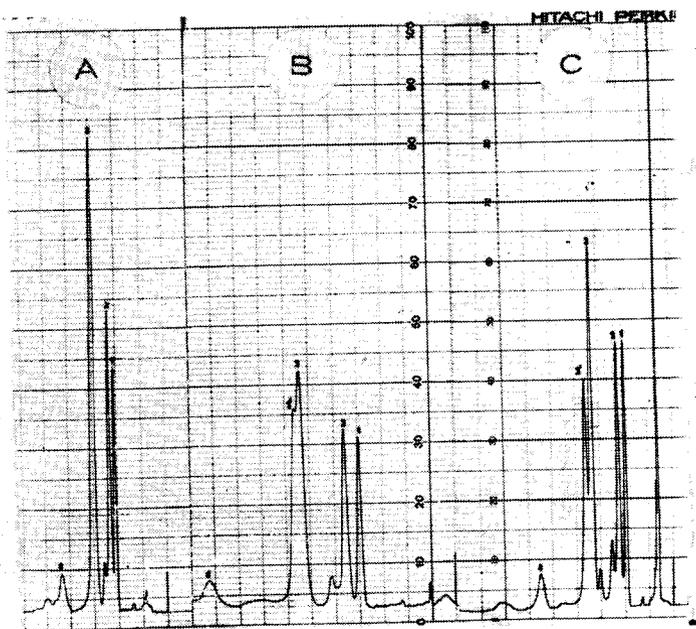


Fig. 8.—Cromatogramas del limoneno patrón, obtenidos de acuerdo con las condiciones indicadas en la tabla I.

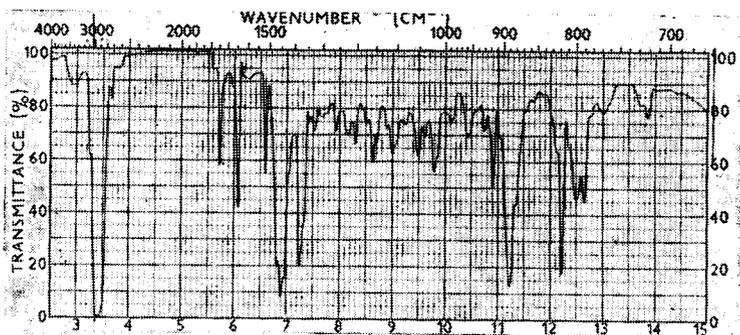


Fig. 9.—Espectro IR del limoneno patrón.

*Pinus pinaster* ha dado resultados muy satisfactorios. Las muestras de esencia, procedentes de tallos y acículas por separado, obtenidas en un aparato Neo-Clevenger modificado (20), se analizaron cromatográficamente en las siguientes condiciones: columna DC-550; flujo de nitrógeno: 70 ml/ml; temperatura: 125°C; atenuación: 400.

La fig. 11 representa el cromatograma obtenido a partir de la esencia de tallo; en él puede apreciarse la existencia de tres componentes no identificados por su  $R_f$  (picos 7, 8 y 9), de los cuales el último pudo recogerse por "splitting" para su identificación por espectroscopía infrarroja. Con la esencia de acículas se obtuvo el cromatograma que se reproduce en la fig. 12, en el que aparecen los picos mencionados para la esencia del tallo, más otros dos de mayor  $R_f$ , de los que uno (pico 11) se separó por "splitting" para su análisis al infrarrojo. Los espectros obtenidos (fig. 13) corroboran la identidad de uno de los componentes de ambas esencias (pico 9) y sugieren la posible identificación de todos ellos como sesquiterpenos esterificados.

### 3.—Esencia de sabiná

El análisis e identificación de los componentes de la esencia de sabiná se ha realizado en las mismas condiciones cromatográficas que las expresadas para la esencia de *P. pinaster*. Como se pone de manifiesto en la fig. 14, el sabineno (pico 2) se presenta como componente mayoritario de la esencia de sabiná. Recogido este componente por microcondensación y efectuado su análisis al infrarrojo se ha obtenido un espectro puro que lo identifica con el sabineno (fig. 7, II). Dada la pequeña proporción en la esencia de los componentes minoritarios 1 y 3, ha sido necesaria su recolección por "splitting" después de varias inyecciones sucesivas de 2 microlitros de muestra. Los espectros infrarrojos obtenidos (fig. 15) demuestran la existencia en el componente 1 de un grupo funcional  $-CH_2-CO-O-R$  y de un radical isopropilo. En el componente 3 se ha podido apreciar la presencia de varios butilos terciarios y de ésteres alfa-beta no saturados, lo cual, unido al alto valor de su  $R_f$  cromatográfico, permite identificarlo como un sesquiterpeno esterificado.

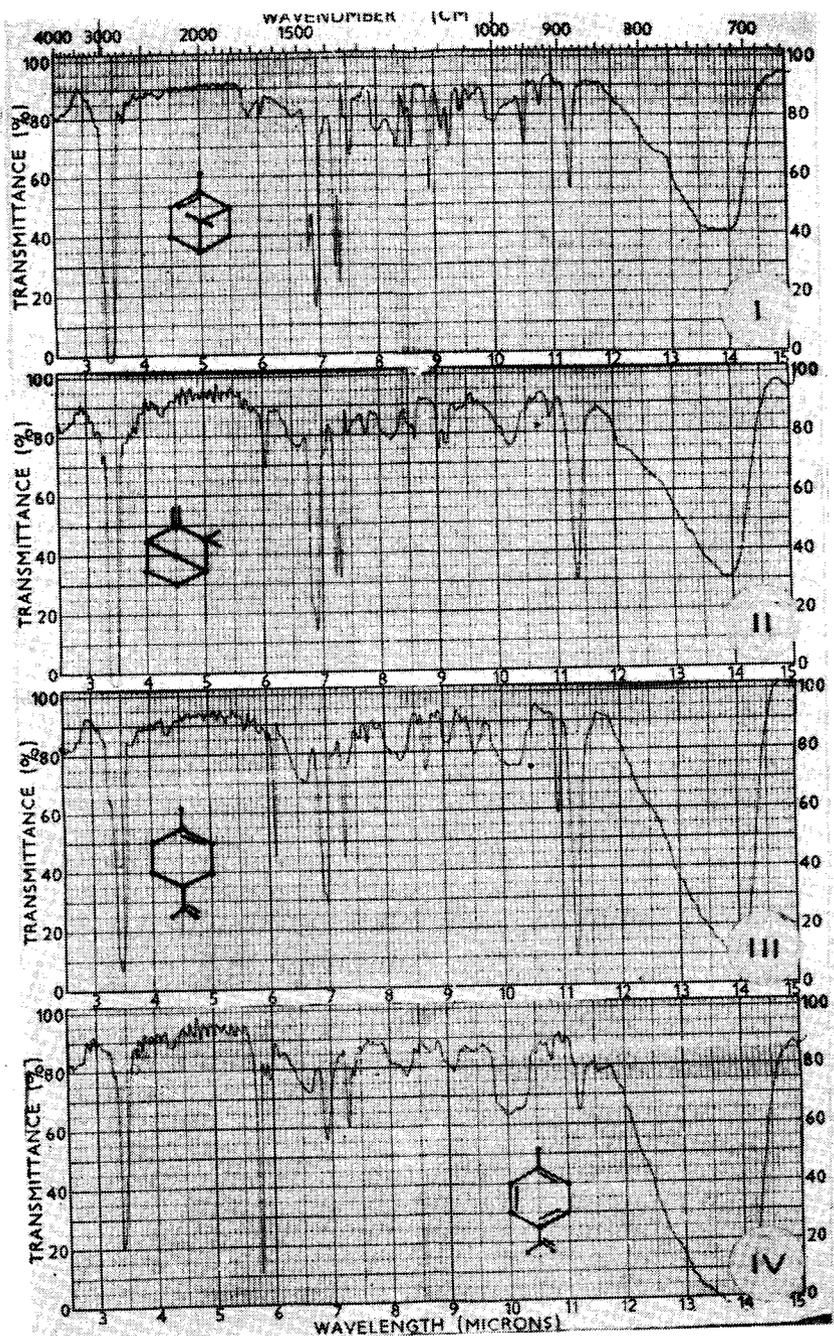


Fig. 10.—Espectro IR de los componentes mayoritarios aislados a partir del limoneno patrón. I) Pico núm. 1: alfa-pineno; II) Pico núm. 2: canfeno; III) Pico núm. 3: limoneno; IV) Pico núm. 4: 1-metil-4-isopropil-benceno.

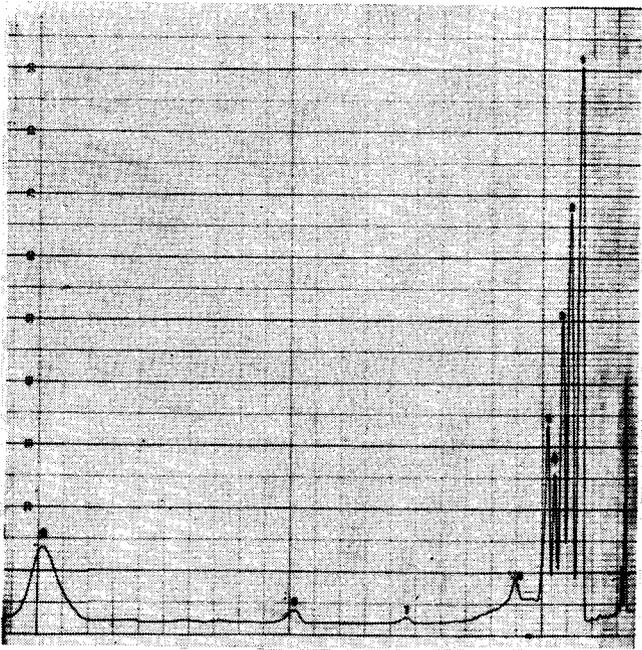


Fig. 11.—Cromatograma de la esencia de tallo de *Pinus pinaster*.

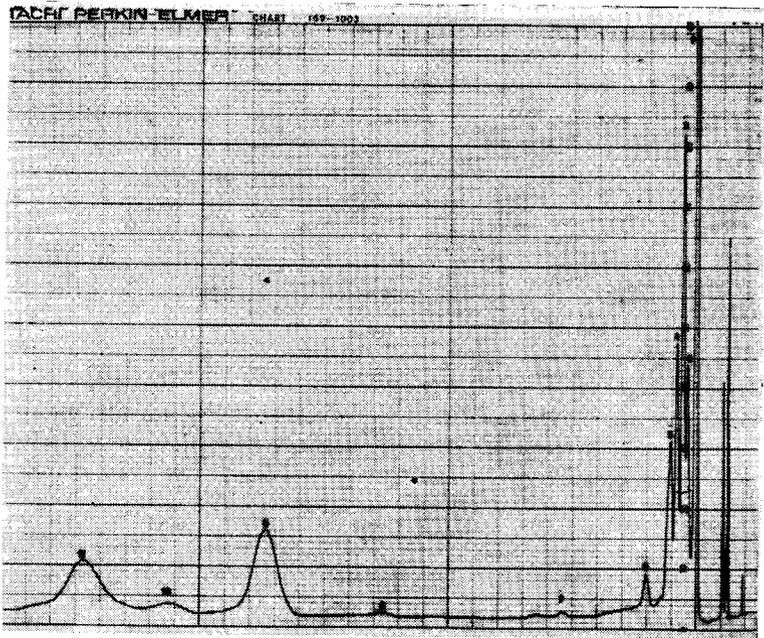


Fig. 12.—Cromatograma de la esencia de acículas de *Pinus pinaster*.

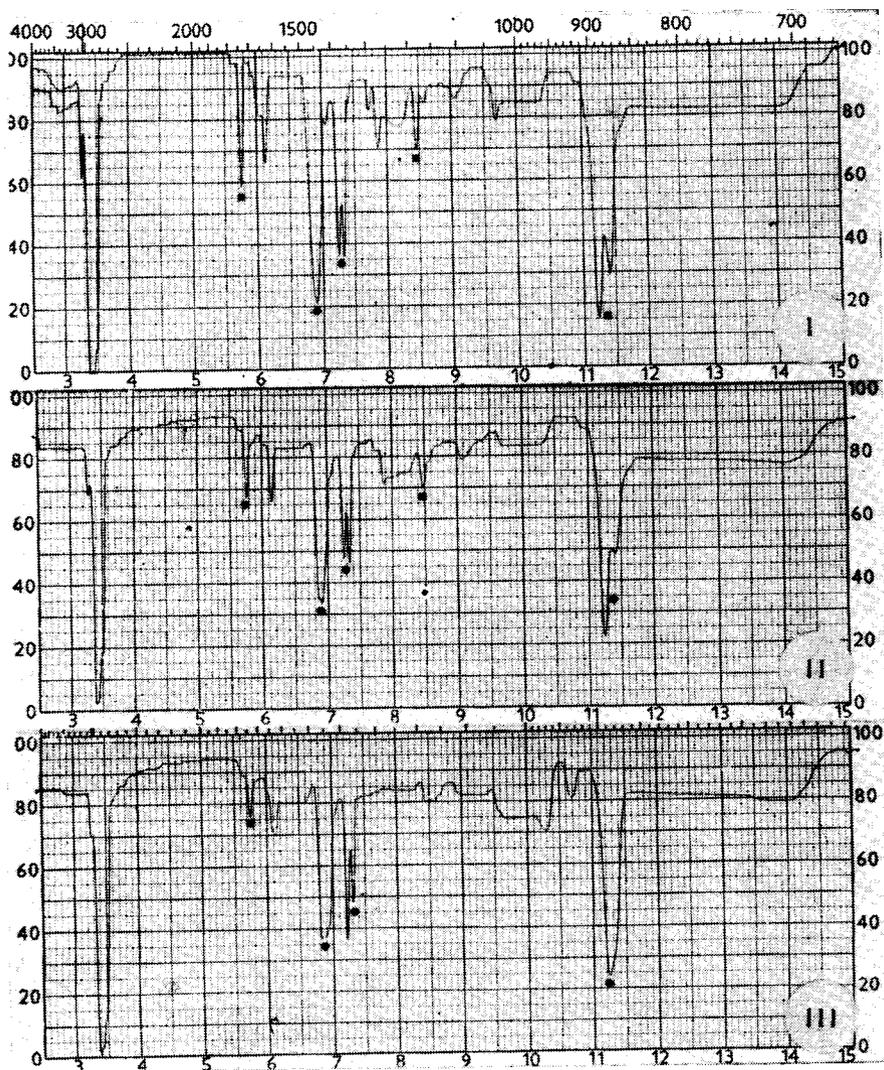


Fig. 13.—Espectros IR de los componentes mayoritarios no identificados aislados a partir de la esencia de *Pinus pinaster*. I) Pico núm. 9 de la esencia de tallo; II) Pico núm. 9 de la esencia de acículas; III) Pico núm. 11 de la esencia de acículas.

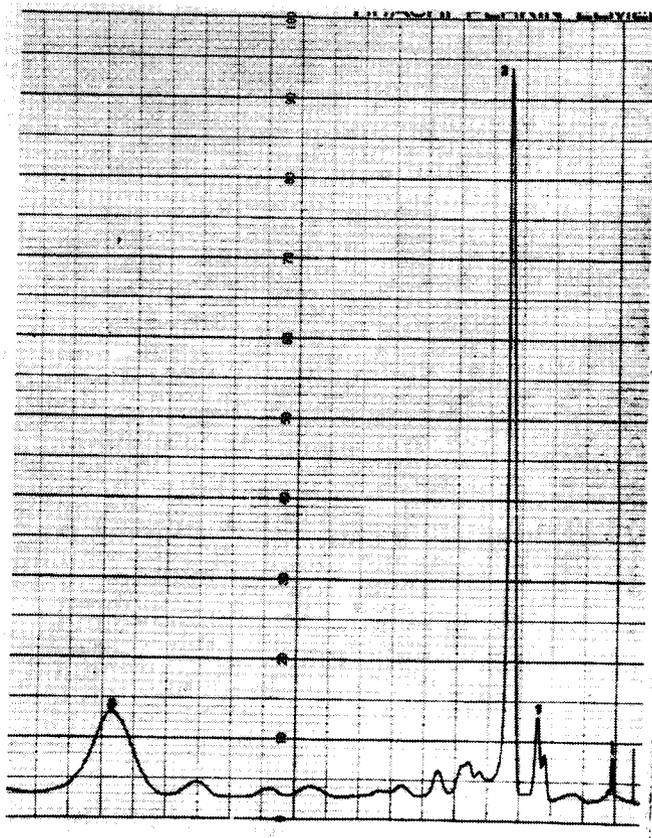


Fig. 14.—Cromatograma de la esencia de sabina.

Los resultados expuestos demuestran la gran importancia de la técnica de "splitting", como procedimiento de extraordinaria garantía para la confirmación de los valores  $R_f$  obtenidos en la cromatografía en fase gaseosa y, especialmente, para la identificación de sustancias con tiempos de retención dudosos o picos poco definidos en las condiciones experimentales. El manejo adecuado de las posibilidades de absorción (columnas) y condiciones de trabajo (temperatura programada) junto con la espectroscopía infrarroja permite disponer de un sistema de reconocimiento y caracterización de un valor analítico indiscutible.

En estas condiciones se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de la composición terpénica de numerosas especies de los géneros *Pinus* y *Cedrus* (21), así como el establecimiento de las variaciones estacionales de las esencias de *P. pinaster*, *P. laricio* y *P. pinea* de la provincia de Granada.

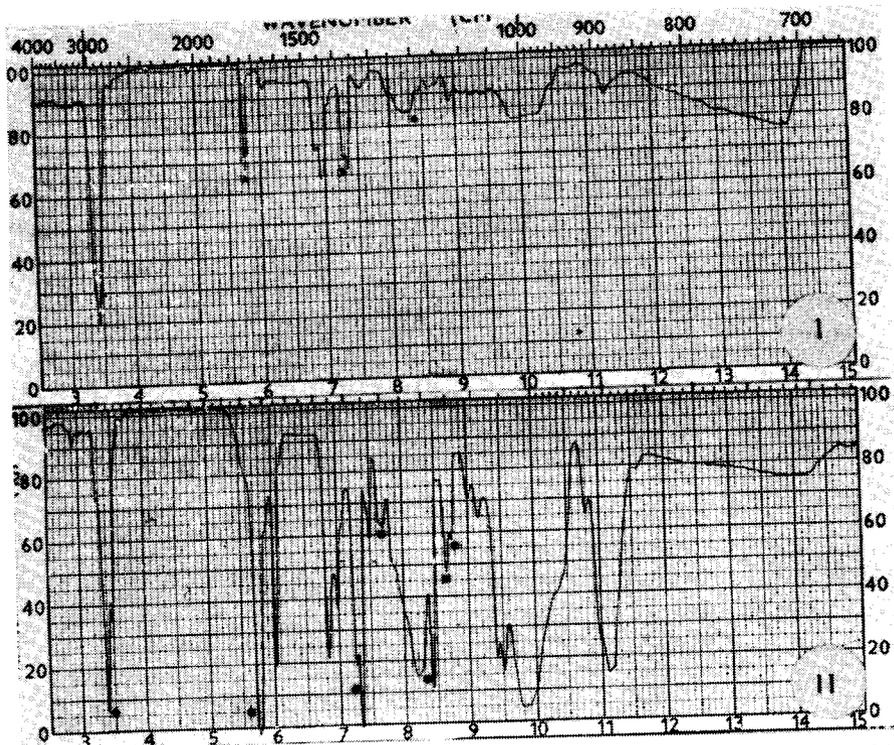


Fig. 15.—Espectro IR de los componentes minoritarios de la esencia de sabiná.  
I) Pico núm. 1; II) Pico n.º 3.

## RESUMEN

Se describe un método de recogida de pequeñas cantidades de muestra para su análisis por espectroscopía infrarroja, previa separación por cromatografía en fase gaseosa, utilizando colectores especiales y refrigeración con aire líquido.

El estudio comparativo de los espectros IR obtenidos en el empleo directo de sustancias patrones y los hallados previo aislamiento por cromatografía en fase gaseosa y microcondensación ("splitting") pone de manifiesto la idoneidad del procedimiento empleado.

En todos los productos considerados (alfa y beta-pineno, alfa-felandreno, delta-3-careno, geraniol, citronelol, sabineno y limoneno) se han detectado numerosas sustancias acompañantes, habiéndose procedido a su separación e identificación por espectroscopía infrarroja. Son particularmente interesantes las impurezas establecidas en alfa-felandreno, sabineno y limoneno.

Aplicado a la diferenciación de los componentes de la esencia de *Pinus pinaster*, el estudio realizado por "splitting" ha permitido establecer la presencia de distintos sesquiterpenos en esencias de tallos y acículas. Sus espectros IR sugieren que los sesquiterpenos se hallan al estado de ésteres.

En la esencia de sabiná ha sido posible corroborar la naturaleza de su componente mayoritario —sabineno— y sugerir la estructura sesquiterpénica de compuestos no identificados de elevado Rf.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—BEHRENDT, S. y RICHTERING, H.—*J. Chromatogr.* 24, 1, (1966).
- 2.—DREW, C. M. y JOHNSON, J. H.—*J. Chromatogr.* 9, 264, (1962).
- 3.—WOOD, R. y REISER, R.—*J. Amer. Oil Chem. Soc.* 42, 159, (1965).
- 4.—MIROV, N. T., ZAVARIN, E. y BICHO, J. G.—*J. Pharm. Sci.* 51, 1.131, (1962)
- 5.—OGUYANOV, I. ULAHOV, R. y TSANKOVA, E.—*C. R. Acad. Bulg. Sci.* 17, 483, (1964).
- 6.—PETROWITZ, H. J.—*Riechstoffe und Aromen*, 12, 397, (1962).
- 7.—JAIN, T. C., VARMA, K. R. y BHATTACHARYYA, S. C.—*Perfum. Essent. Oil Rec.* 53, 678, (1962).
- 8.—RICCIARDI, A. I. y CASSANO, A.—*Rev. Fac. Ing. Quim.* 31, 63, (1961)
- 9.—HOERING, T. C.—*Instrument News* 17, 1, (1967).
- 10.—MCEVEN, D. J.—*J. Chromatogr.* 9, 266, (1962).
- 11.—DUGDALES, N. y JONES, K.—*Chem. Ind.* núm. 33, 1.460, (1965).
- 12.—HUPE, K. H.—*J. Gas Chromatogr.* 3, 92, (1965).
- 13.—DURSO, D. F.—*Anal. Chem.* 23, 424, (1951).
- 14.—SMOUSE, T. H. y RICHTERING, H.—*J. Chromatogr.* 24, 1, (1966).
- 15.—BEROZA, M.—*J. Gas Chromatogr.* 2, 331, (1964).
- 16.—EDWARDS, R. A. y FAGERSON, I. S.—*Anal. Chem.* 37, 12, (1965).
- 17.—SNAVEL, M. K. y GRASSELLI, J. G.—*Appl. Spectr.* 16, 190 (1962).
- 18.—THOMAS, P. J. y DWYER, J. L.—*J. Chromatogr.* 13, 366, (1964).
- 19.—HANTLER.—*Appl. Spectr.* 18, 159, (1964).
- 20.—MONTEOLIVA, M., FUNES, A., GARCIA-PEREGRIN, E., ZAFRA, M. F. y HENARES, M.—*Ars Pharm.* 10, 285, (1969).
- 21.—ZAFRA, M. F., GARCIA-PEREGRIN, E. y MAYOR, F.—Montes (en prensa).