



ANNALI

DELLA FACOLTA' DI AGRARIA DELL' UNIVERSITA'
SASSARI

studi sassaresi

Sezione III

1984

Volume XXXI

ANNALI

DELLA FACOLTA' DI AGRARIA DELL' UNIVERSITA'

————— SASSARI —————

DIRETTORE: G. RIVOIRA

*COMITATO DI REDAZIONE: M. DATTILO - S. DE MONTIS - F. FATICHENTI
C. GESSA - L. IDDA - F. MARRAS - P. MELIS - A. MILELLA - A. PIETRACAPRINA
R. PROTA - A. VODRET*

studi sassaresi

ORGANO UFFICIALE
DELLA SOCIETÀ SASSARESE DI SCIENZE MEDICHE E NATURALI



Istituto di Chimica Agraria dell'Università di Sassari

(Direttore: Prof. C. Gessa)

V. SOLINAS* · A. PREMOLI* · S. DEIANA**

INFLUENZA DEI METODI DI ESTRAZIONE E DI PURIFICAZIONE SUL DOSAGGIO IN HPLC DEGLI IDROSSIFENOLI

RIASSUNTO

Al fine di ottimizzare la determinazione in HPLC in fase inversa degli idrossifenoli in «*Thymus capitatus*» sono state messe a confronto quattro diverse tecniche di estrazione e di clean-up. Dei quattro metodi uno si è dimostrato non adatto per l'HPLC, gli altri tre sono risultati distruttivi nei confronti degli idrossifenoli estratti. Il metodo proposto da Charpentier-Cowles s'è dimostrato il più idoneo in quanto permette di portare all'analisi la maggior parte degli idrossifenoli liberi e di quelli combinati in strutture polifenoliche complesse non estraibili in etanolo. Per gli idrossifenoli liberi è stato messo a punto un metodo di estrazione che consente recuperi degli idrossifenoli estratti superiori a quelli dei metodi di Hagerman-Nicholson e di Horvat-Senter.

SUMMARY

The influence of extraction and clean-up methods on the HPLC quantitation of hydroxyphenols.

Four different extraction methods were compared, in order to optimize the HPLC separation and quantitation of hydroxyphenols in «*Thymus capitatus*». One method was not suitable for HPLC analysis, whereas the others partially destroyed the hydroxyphenols extracted from the plant. The Charpentier-Cowles method was found the most effective allowing to analyse, in spite of the losses, most of the free phenolic acids and of those bounded extractable in hot acidic medium but not in ethanol. For the phenolics in free form a method with recoveries greater than those obtained with Hagerman-Nicholson and Horvat-Senter methods was developed.

Le ricerche sui fenoli hanno dimostrato la loro importanza nella maturazione dei frutti e nella tecnologia di prodotti agrari di rilevanza economica (2, 23), nella regolazione della crescita (10), come precursori nella sintesi di sostanze più complesse.

* Istituto di Chimica Agraria

** Istituto per l'applicazione delle tecniche chimiche avanzate ai problemi agrobiologici, C.N.R.

(Lavoro eseguito con un contributo del C.N.R. - Roma)

se (calconi, cumarine, antociani, tannini, lignine, ecc.) e, soprattutto, come prodotti di reazioni della pianta in risposta a stimoli esterni causati da attacchi parassitari, ferite e condizioni di stress idrico e nutrizionale (12)

Già da tempo è noto l'enzima chiave della sintesi fenolica, il PAL (fenil-alanina-ammonialiasi), la cui attività risulta anch'essa regolata da diversi stimoli interni ed esterni (13).

In genere i fenoli coinvolti nelle reazioni di risposta si concentrano nelle zone dove massima è l'azione dello stimolo. Concentrazioni elevate di acido clorogenico e di un suo chinone con forte potere battericida e fungicida sono state trovate nelle zone circostanti le ferite in foglie di tabacco (6).

Relativamente alte concentrazioni di composti a carattere fenolico sono state trovate anche nelle parti periferiche di radici di piante «efficienti» contro la clorosi (1). È stato dimostrato che molti dei fenoli presenti negli escreti radicalici, in particolare gli orto-diidrossifenoli, fra i quali specificamente l'acido caffeico, hanno la capacità di ridurre il Fe^{3+} a Fe^{2+} , più mobile e quindi più disponibile per la pianta (17). Questo meccanismo, consentendo un maggiore assorbimento di ferro, può essere interpretato come una reazione di risposta da parte della pianta allo stress da clorosi.

Risulta allora importante nello studio del metabolismo dei fenoli disporre di metodi analitici tali da consentire l'estrazione ed il dosaggio sicuri non solo dei fenoli totali, ma anche dei singoli.

I metodi di estrazione proposti sono numerosi e talvolta in apparente contrasto fra loro, forse a causa del diverso materiale vegetale analizzato (2,3,4,5,11,14,15). Altrettanto numerosi sono i metodi di dosaggio: o semplicemente colorimetrici per la determinazione dei fenoli totali (19), o cromatografici in TLC (15), in GC (14, 16) e in HPLC (2,3,4,5,9,11,20,22,23), per la determinazione dei singoli fenoli.

Tutte le tecniche proposte non sono però esenti da critiche in quanto, anche accertata l'impossibilità di poter procedere ad un'estrazione totale dei fenoli dalla pianta (18), esse richiedono sempre una preventiva idrolisi acida o alcalina dell'estratto. Queste idrolisi, per quanto necessarie per ottenere i fenoli più semplici dai composti naturali più complessi presenti nella pianta, sono sempre distruttive e quindi non consentono di avere un quadro completo e reale della composizione fenolica sia in termini quantitativi che qualitativi.

Pertanto, nel continuare le nostre ricerche sulle variazioni fenoliche nei vegetali in dipendenza dei fattori ambientali (7,9), al fine di comprendere meglio i meccanismi messi in atto dalla pianta come risposta specifica soprattutto allo stress idrico e nutrizionale, abbiamo messo a confronto diversi metodi analitici, scelti fra quelli prima citati, allo scopo di individuare quello per noi più idoneo.

MATERIALI E METODI

Materiale vegetale. Le estrazioni degli idrossifenoli venivano effettuate su materiale vegetale costituito dalle cimette di piante di «*Thymus capitatus*», specie endemica sui calcari del sassarese, di cui abbiamo già studiato le variazioni di contenuto e di composizione fenolica nell'olio essenziale (7).

Reagenti. Tutti gli standards dei composti ricercati (acidi gallico, clorogenico, caffeico, p-cumarico, ferulico e cinnamico) erano Reagent-Grade della Hoechst ed erano usati senza ulteriore purificazione. Soluzioni metanoliche contenenti quantità equimolari dei singoli composti venivano usate per la costruzione della curva di taratura per la determinazione colorimetrica secondo il metodo SINGLETON-ROSSI (19). Soluzioni metanoliche degli stessi composti, opportunamente diluite e preparate giornalmente, venivano usate come standard esterno nel dosaggio dei singoli fenoli mediante HPLC.

Tecniche di estrazione. Sono state applicate come tali o leggermente modificate le tecniche descritte da:

- HOAGLAND e DUKE (13), metodo 1;
- HAGERMAN e NICHOLSON (11), metodo 2;
- HORVAT e SENTER (14), metodo 3;
- CHARPENTIER e COWLES (4), metodo 4.

Per ridurre al minimo gli errori sperimentali e quindi rendere più attendibile il confronto, nell'applicazione dei quattro metodi vennero rese uguali le quantità di materiale sottoposto ad estrazione (1,0 g), i volumi finali degli estratti dopo i diversi trattamenti e le quantità di campione iniettate in HPLC (20 μ l). Tutte le prove di estrazione e di dosaggio erano triple e i risultati riportati sono quelli mediati.

Apparecchiature HPLC. Il cromatografo liquido-liquido ad alta pressione era costituito da un sistema Perkin Elmer della serie 3B, equipaggiato con uno spettrofotometrico LC-75 UV-visibile, a lunghezza d'onda variabile, con Autocontrol. I cromatogrammi venivano registrati ed elaborati su un «Sigma 15 Chromatography data station» della Perkin Elmer. La cromatografia usata era quella a fase inversa su una colonna RP-18 (10 μ m) della Brownlee Labs delle dimensioni di 250 x 4,6 mm, fornita di una precolonna Co-Pell ODS della Whatman. La fase eluente era costituita da metanolo per HPLC della Hoechst (A) e da tampone acetato 0,05 M a pH 4,7 (B), filtrati in filtro Millipore da 0,45 μ m, degasati prima dell'uso e miscelati se-

condo i gradienti riportati nelle figure. La velocità di flusso della fase mobile era di 1,5 ml/min; la concentrazione degli idrossifenoli veniva determinata dalla loro assorbanza a 270 nm.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella figura 1 si riportano i cromatogrammi HPLC di estratti di Timo ottenuti secondo il metodo 1 (Fig. 1A), il metodo 2 (Fig. 1B) e il metodo 3 (Fig. 1C).

Metodo 1. È il più semplice in quanto consente l'immediata determinazione dei fenoli totali direttamente sull'estratto mediante il metodo colorimetrico SINGLETON-ROSSI (19). Il metodo 1 venne da noi adattato all'HPLC aggiungendo di seguito, dopo l'estrazione con EtOH 75% a temperatura ambiente, la riduzione dell'estratto a piccolo volume, la ripartizione con CHCl₃, della fase acquosa rimasta e acidificata a pH 1-2 e infine un passaggio su filtro Millipore < 0,2 μm ed uno su colonnina Sep-pak C₁₈ della Waters. Lo scopo era quello di allontanare materiale lipidico o comunque basso polare eventualmente presente nel campione e quindi di evitare l'inutile inquinamento della colonna cromatografica. Il cromatogramma 1A, di cui vengono riportati i primi 30 minuti di eluizione, conferma la mancanza di sostanze basso polari, tuttavia si dimostra abbastanza piatto e poco significativo ai fini analitici. Si hanno solo lievi cenni di picchi ai tempi di ritenzione degli acidi clorogenico, caffeico, p-cumarico e cinnamico, mentre è ben definito il solo picco del gallico assieme a picchi più grossi caratterizzati da tempi di ritenzione molto vicini a quelli del volume vuoto. Questi primi picchi, molto mobili e quindi molto polari, possono essere attribuiti o ad acidi carbossilici oppure ad esteri degli acidi fenolici non risolti cromatograficamente.

Gli acidi fenolici, pur presenti negli estratti, come risulta dall'analisi colorimetrica (Tab. 2), lo sono prevalentemente in forma combinata e poco in forma libera. Si dimostrava pertanto la necessità di un'idrolisi acida o alcalina dell'estratto etanolicco prima dell'analisi in HPLC.

Metodo 2. Il metodo venne scelto proprio perchè richiedeva l'idrolisi alcalina dell'estratto, indicata dagli autori come la più idonea (11), e venne applicato come tale, salvo l'estrazione iniziale ottenuta sostituendo al metanolo l'etanolo 75%. I risultati ottenuti (Fig. 1B) non sono però molto diversi da quelli della Fig. 1A. Si registrano una maggiore quantità di gallico e l'accentuazione dei picchi del clorogenico, del caffeico e del p-cumarico, in quantità però sempre troppo piccole rispetto a quanto determinato colorimetricamente. Prove condotte aumentando il

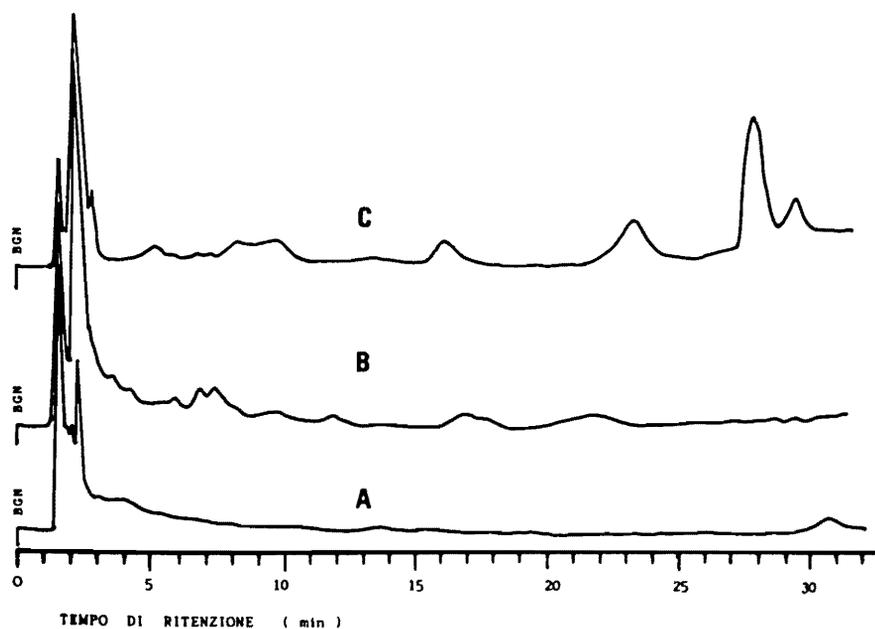


Fig. 1 - Cromatogrammi in HPLC di estratti da «Thymus capitatus» secondo il metodo 1 (A), il metodo 2 (B) e il metodo 3 (C).

Condizioni cromatografiche: fase mobile MeOH e tampone di Na-acetato 0,05 N a pH 4,7 miscelati nel seguente modo: da 0 a 15', isocratica col 20% di MeOH; da 15' a 25', gradiente lineare di MeOH fino al 30%; da 25' a 30', gradiente lineare di MeOH fino al 40%; da 30' a 40', gradiente lineare di MeOH fino al 20%.

Flusso = 1,5 ml/min; UV = 270 nm.

HPLC separation of hydroxyphenols extracted from «Thymus c.» with method 1 (A), 2 (B) and 3 (C). Chromatographic conditions: Eluents: MeOH and 0,05N NaOAc-HOAc pH 4,7 buffer. Flow rate: 1,5 ml/min. Detector: UV 270 nm.

Elution: from 0' to 15', isocratic flow with 20% MeOH

Elution: from 15' to 25', linear gradient 20-30% MeOH

Elution: from 25' to 30', linear gradient 30-40% MeOH

Elution: from 30' to 40', linear gradient 40-20% MeOH.

tempo d'idrolisi dell'estratto da 1 a 4-6 ore (16) non davano migliori risultati. Evidentemente, nonostante la rigorosa applicazione del metodo, i vari passaggi del clean-up dopo l'idrolisi e comprendenti due ripartizioni in dietilere (DE) ed una in NaHCO₃ 5% portavano ad un'eccessiva perdita del campione. Perdite durante la ripartizione tra fase acquosa e fase organica sono state riferite dagli stessi autori (11) e sono state confermate nel nostro laboratorio.

Tab. 1 Quantità di idrossifenoli estratte da 1,0 g di Timo con HCl 2N per 45' a 100°C (estraente A) e con EtOH 75% per 45' a temperatura ambiente (estraente B) e ritrovate dopo la ripartizione con Etilacetato (EA).
Total hydroxyphenols content extracted from 1,0 g of «Thymus c.» with 2N HCl for 45' at 100°C (A) and with EtOH 45' at room temperature (B) and found after partition with Ethylacetate (EA).

Estraente	Idrossifenoli dopo ripartizione con EA											Perdita dovuta all'acidificazione come % fenoli estratti
	in fase acquosa			in fase organica			totale nelle due fasi			100—(d+f)		
	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti	μmoll/g sost. fresca		come % fenoli estratti	
a	b	c	d	e	f	c+e	d+f	95,83	74,76	25,24		
A	29,96	75,65	5,31	17,72	23,40	78,11	28,71	95,83	—	—	—	
B	39,60	100,00	4,67	11,80	24,93	62,96	29,57	74,76	25,24	25,24	—	

Tab. 2 Quantità di idrossifenoli da 39,60 μmoli di idrossifenoli estratti da 1,0 g di Timo con EtOH 75%, determinate mediante SINGLETON-ROSSI (19) dopo idrolisi acida (in HCl 2,5 N per 1 h a temp. amb.) e dopo idrolisi alcalina (in NaOH 2,5 N per 1 h a temp. amb. sotto vuoto) e dopo ripartizione con EA.

Hydroxyphenols from 39,60 μmoles of hydroxyphenols extracted with 75% EtOH from 1,0 g of «Thymus c.» and quantitated by SINGLETON-ROSSI method (19) after acid hydrolysis (in 2,5N HCl for 1 h at room temperature) after base hydrolysis (in 2,5N NaOH for 1 h under vacuum at room temperature) and after EA partition

Idrolisi	in fase acquosa			in fase organica			Totale nelle due fasi			Perdita dovuta all'idrolisi % fenoli estratti			Totale delle perdite come % dei fenoli estratti			
	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti	μmoll/g sost. fresca	come % fenoli estratti
	a	b	c	d	e	f	a+c	b+d	c+e	d+f	100—(b+d)	100—d	36,86	26,77	50,50	38,13
Acida	5,40	13,64	19,60	49,50	25,00	63,14	63,14	36,86	50,50	—	—	—	—	—	—	—
Alcalina	4,50	11,36	24,50	61,87	29,00	73,23	73,23	26,77	38,13	26,77	26,77	38,13	38,13	38,13	38,13	38,13

Metodo 3. Questo metodo, originariamente messo a punto per l'analisi dei fenoli in GC (14), venne parzialmente modificato tenendo conto di quanto riferito da KALUZA e al (15) sull'efficacia estrattiva dei diversi solventi organici, sostituendo quindi il MeOH con lo 0,1% di HCl con EtOH 75%. Rispetto al metodo 3 si interveniva sull'estratto etanologico con un'idrolisi acida e l'idrolizzato veniva ripartito con etilacetato (EA).

Il cromatogramma 1C, ottenuto applicando il metodo 3, risulta più significativo dei cromatogrammi 1A e 1B, tuttavia, anche in questo caso, le quantità di fenoli riportate non sono in accordo con quelle estratte e determinate colorimetricamente.

Metodo 4. Questo metodo è stato provato, nonostante in dubbi sull'estrazione acida richiesta (11, 21), per la sua semplicità e perché applicato con successo dai proponenti (4) e da altri ricercatori (2) su materiali vegetali diversi. Il metodo 4 è stato confrontato col 2, prima che su Timo, su mesocotile di mais sul quale s'era svolta l'esperienza di HAGERMAN e NICHOLSON (11). I cromatogrammi ottenuti sono riportati nella Figura 2 ed evidenziano le diverse rese dei due metodi: picchi molto grandi e quindi facilmente quantificabili per tutti gli idrossifenoli nel cromatogramma del metodo 4 (Fig. 2B), picchi significativi per gli acidi gallico e caffeico, scarsi invece per il clorogenico, il p-cumarico, il ferulico ed il cinnamico nel cromatogramma ottenuto col metodo 2.

Nella figura 3 si riporta il cromatogramma ottenuto da Timo utilizzando il metodo 4. I tempi di ritenzione dei singoli fenoli in questo cromatogramma sono diversi da quelli delle Figure 1 e 2, in quanto è stato applicato un gradiente di eluizione diverso al fine di ottenere la separazione dei picchi del gallico e del clorogenico da quelli ai quali prima, nelle Figure 1 e 2, essi risultavano legati.

Il confronto fra i cromatogrammi delle Figure 1 e 3, ottenuti da uguali quantità di campione estratte ed iniettate, dá conto della diversa efficacia applicativa ai fini analitici dei quattro metodi esaminati sul materiale vegetale usato nella nostra ricerca.

Per valutare più dettagliatamente l'intervento degli estraenti e dei passaggi di clean-up richiesti nei vari metodi messi a confronto sulla resa parziale e globale dei fenoli totali si riportano nella Tabella 1 i risultati ottenuti sottoponendo separatamente campioni di Timo da 1,0 g prima ad estrazione comparativa con HCl 2N per 45' a 100°C (estraente A) e con EtOH 75% per 45' a temperatura ambiente (estraente B) e successivamente ad una ripartizione con EA, mentre nella Tabella 2 si riportano rese e perdite sul solo estratto etanologico dopo idrolisi acida o alcalina e successiva ripartizione in EA.

È evidente dalla Tabella 1 la minore resa globale dell'estrazione acida rispetto a

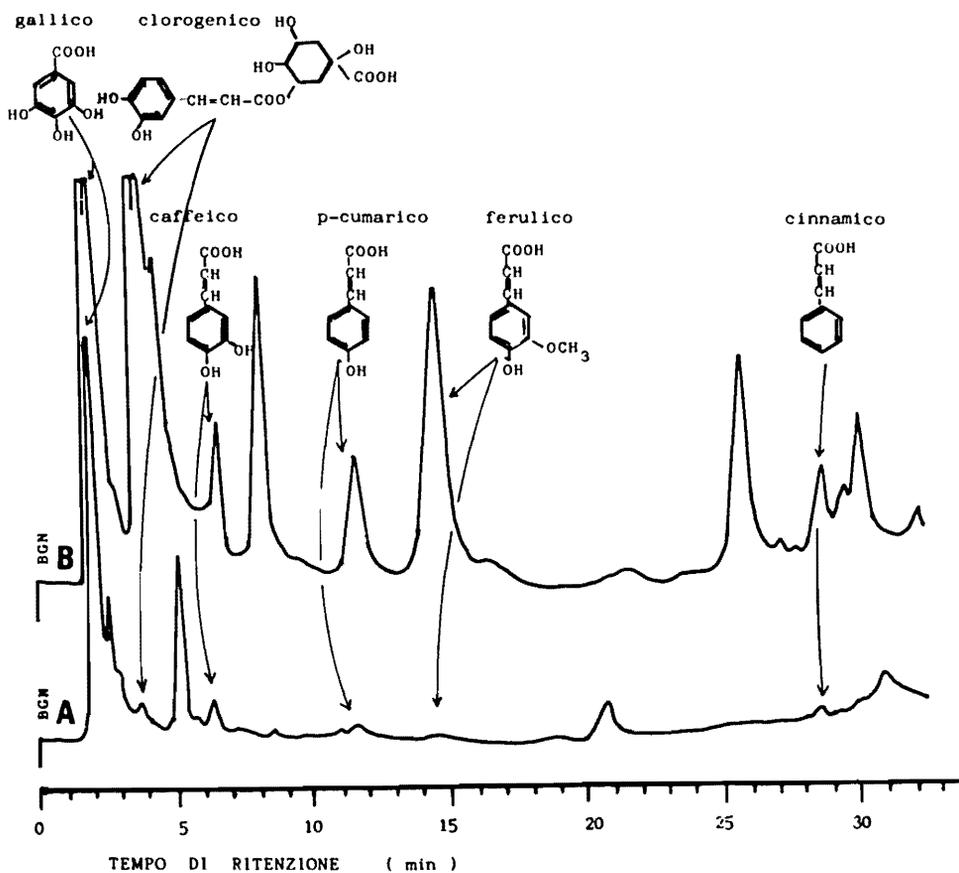


Fig. 2 - Cromatogrammi in HPLC di estratti da mesocotile di mais secondo il metodo 2 (A) e secondo il metodo 4 (B). Stesse condizioni cromatografiche della figura 1.

HPLC separation of hydroxyphenols extracted from maize mesocotyl with method 2 (A) and with method 4 (B). Chromatographic conditions as in Fig. 1.

quella etanolica. Apparentemente, essa mal si accorda con l'esistenza di due pools di idrossifenoli nei vegetali (14): uno composto da piccole quantità di acidi liberi e da maggiori quantità di esteri di acidi caffeico, p-cumarico e ferulico, presenti nei succhi cellulari e quindi facilmente estraibili in etanolo e in soluzioni acquose; l'altro, composto da idrossifenoli sotto forma di esteri insolubili in alcol, facenti parte del materiale delle pareti cellulari, come ad esempio le lignine, estraibili solo con idrolisi (metodo 4).

Per il materiale vegetale da noi esaminato, già abbastanza lignificato, era prevedibile una maggiore resa col trattamento acido: infatti, mentre questo agisce su en-

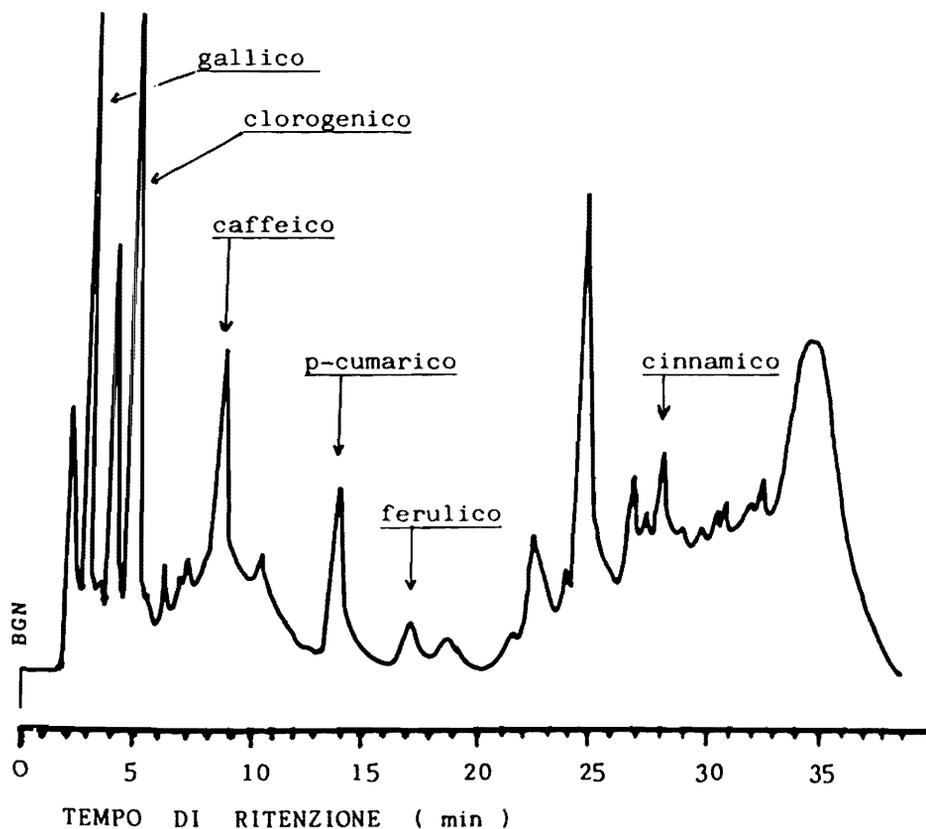


Fig. 3 - Cromatogramma in HPLC di estratto da «Thymus capitatus» secondo il metodo CHARPENTIER-COWLES. Condizioni cromatografiche: stessi eluenti delle figure 1 e 2 ma miscelati nel seguente modo:

da 0 a 5' gradiente lineare di MeOH dal 15 al 20%.

da 5' a 15' isocratica con MeOH al 20%.

da 15' a 30' gradiente lineare di MeOH dal 20 al 50%.

da 30' a 35' isocratica con MeOH al 50%.

da 35' a 50' gradiente lineare di MeOH dal 50 al 15%.

Flusso e detector come nelle figure 1 e 2.

HPLC separation of hydroxyphenols extracted from «Thymus c.» with CHARPENTIER-COWLES method. (4).

Chromatographic conditions: eluents, flow rate and detector as in Fig. 1

Elution: from 0' to 5', linear gradient 15-20% MeOH

Elution: from 5' to 15', isocratic flow of 20% MeOH

Elution: from 15' to 30', linear gradient 20-50% MeOH

Elution: from 30' to 35', isocratic flow of 50% MeOH

Elution: from 35' to 50', linear gradient 50-15% MeOH.

trambi i pools, quello etanolicò può agire soltanto sul primo. La minor resa del trattamento acido può essere attribuita all'effetto distruttivo da esso operato (11, 21) che ridurrebbe considerevolmente la pur maggiore quantità di idrossifenoli estratta. L'importanza dell'effetto distruttivo dovuto al trattamento acido si ricava confrontando anche i risultati della ripartizione con EA riportati nella Tabella 1 e quelli relativi all'idrolisi acida dell'estratto etanolicò, riportati nella Tabella 2.

La semplice acidificazione dell'estratto etanolicò, necessaria per la ripartizione con EA, porta ad una perdita di idrossifenoli pari al 25,24% di quelli estratti; la perdita diventa pari al 36,86% quando il trattamento acido è protratto nel tempo per avere la vera idrolisi (Tab. 2).

Ulteriori perdite si hanno nelle ripartizioni degli estratti etanolicò ed acido con EA: permangono nella fase acquosa da scartare rispettivamente l'11,80 ed il 17,22% dei fenoli estratti, così che le quantità finali portate all'HPLC per il dosaggio dei singoli fenoli risultano essere il 62,96 ed il 78,11% rispettivamente per l'estratto etanolicò e per quello acido (Tab. 1).

Nella Tabella 2 sono messe a confronto le perdite causate dall'idrolisi alcalina e acida sull'estratto etanolicò — parte iniziale dei metodi 2 e 3 — e quindi quelle delle successive ripartizioni in EA. Sommando le quantità di idrossifenoli nelle fasi acquosa e organica dopo il trattamento idrolitico si hanno rispettivamente il 63,14% dei fenoli estratti dopo l'idrolisi acida ed il 73,23% dopo quella alcalina. L'idrolisi alcalina si conferma quindi meno distruttiva di quella acida (11). Rimangono sempre piuttosto significative le perdite di idrossifenoli nelle fasi da scartare nel corso della ripartizione liquido-liquido e tali da ridurre le quantità di fenoli ed avere recuperi fino al 49,50% dopo l'idrolisi acida e fino al 61,87% dopo quella alcalina, quando si parte dall'estratto etanolicò.

Nella Tabella 3 si riportano dettagliatamente le quantità percentuali di idrossifenoli analizzati secondo il metodo 3, dosate durante le diverse fasi di idrolisi e di clean-up mediante SINGLETON-ROSSI (19).

I risultati ottenuti giustificano la scarsa significatività dei picchi nel cromatogramma C riportato nella Figura 1: l'idrolisi acida ed il susseguente clean-up dell'idrolizzato consentono di portare all'HPLC solo il 26,82% dei fenoli estratti, almeno nel caso del Timo da noi studiato.

I risultati riportati nelle Tabelle 1, 2 e 3 concordano perfettamente dando conto dei parziali insuccessi ottenuti applicando i metodi 2 e 3: alle perdite dovute all'idrolisi si devono aggiungere quelle relative alle ripartizioni in DE, in EA, in NaHCO₃, ed in esano.

In conclusione, il confronto fra i quattro metodi mostra l'inadattabilità del metodo 1 (13) al nostro caso specifico in quanto, pur dando ottime rese, queste sono da riferirsi al solo primo pool dei fenoli, costituito soprattutto, nel nostro caso, da este-

Tab. 3 Dosaggio dei fenoli determinati secondo SINGLETON-ROSSI (19) nelle diverse fasi di clean-up del metodo HORVAT-SENER (14), su estratto in EtOH 75% da «*Thymus capitatus*».

Total hidroxphenols from «*Thymus c.*» ethanolic extract quantitated with SINGLETON-ROSSI method (19) in the steps of clean-up of HORVAT-SENER method (14)

Campione	Fenoli in % dei fenoli nell'estratto in EtOH 75%	Nota	Fenoli % dei fenoli iniziali, presenti nelle fasi da scartare
Estratto in EtOH 75%	100	recuperare	—
Estratto acquoso acido, dopo esano	70,88	recuperare	—
Esano	28,93	scartare	28,93
Estratto acquoso acido, dopo ripartizione con EA	26,44	scartare	26,44
Etil acetato (EA)	40,22	recuperare	—
Estratto in EA, dopo ripartizione in NaHCO ₃ 5%	11,69	scartare	11,69
Estratto in NaHCO ₃ 5%	30,84	recuperare	—
Estratto acquoso acido, dopo ripartizione con EA	5,75	scartare	5,75
Estratto in EA per HPLC	26,82	recuperare	—
	Recupero 26,82		Perdita 72,81

ri e non da idrossifenoli liberi, quindi non determinabili in HPLC. Il metodo 2 (11) è risultato anch'esso non adatto per eccessive perdite registrate nei numerosi passaggi del clean-up e tali da ridurre le quantità di fenoli analizzabili all'HPLC a circa il 30% dei fenoli estratti.

Altrettanto dicasi per il metodo 3 (14), già esaminato dettagliatamente nella tabella 3, per quanto riguarda le perdite ed i recuperi.

Il metodo 4 di CHARPENTIER e COWLES (4), pur con le perdite dovute all'idrolisi acida a caldo, è risultato per noi il più idoneo fra i quattro esaminati. Infatti, esso consente recuperi degli idrossifenoli estratti decisamente superiori a quelli con i metodi 2 e 3 e pari, come è ricavabile dalla Tabella 1, al 78,11% di quelli estratti, cioè una quantità pari a circa il 60% dei fenoli estraibili in etanolo. Inoltre, a differenza dei metodi 2 e 3, esso fa riferimento a entrambi i pools di idrossifenoli presenti nella pianta e quindi fornisce un quadro più rappresentativo della composizione fenolica del vegetale esaminato.

Per l'estrazione e la separazione degli idrossifenoli del primo pool, tenendo conto dei risultati riportati nelle tabelle precedenti, è stato da noi messo a punto un metodo che ci ha consentito di avere risultati quantitativi decisamente migliori che con i metodi 2 e 3. Esso comprendeva, dopo l'estrazione etanolica, un'idrolisi alcalina come nel metodo 2 e quindi, dopo neutralizzazione ed acidificazione dell'idrolizzato, una ripartizione in EA ottenuta con sei e non con tre soli passaggi; seguivano, al solito, la riduzione a piccolo volume, filtrazione in Millipore e l'inle-

zione in HPLC. In tal modo le perdite dovute alla ripartizione si riducevano dall'11-13% al 3-5% e quelle totali al 25-30%, mentre i recuperi passavano, di conseguenza, dal 60% circa al 70-75%.

Sulla base dei risultati ottenuti e quindi tenendo conto delle notevoli perdite che accompagnano sempre le fasi di preparazione del campione in tutti i metodi qui messi a confronto, è possibile concludere che la scelta del metodo analitico per la determinazione dei fenoli va fatta in dipendenza delle esigenze della ricerca e anche del materiale vegetale esaminato. Per la determinazione degli idrossifenoli del solo primo pool è risultato più conveniente il metodo sperimentato nel nostro laboratorio di cui è stato riferito prima. Invece, per una determinazione comprendente anche i fenoli del secondo pool è risultato più idoneo il metodo CHARPENTIER-COWLES.

Questo era il nostro caso per due motivi:

- 1) occorreva seguire le variazioni fenoliche totali e dei singoli componenti per lungo tempo, soprattutto quando la pianta era sottoposta a drastiche condizioni di stress idrico;
- 2) in queste condizioni la pianta presentava tessuti abbastanza lignificati e tegumenti particolarmente adatti a minimizzare le perdite idriche per la traspirazione: era quindi da attendersi una composizione fenolica ricca di polifenoli.

L'opportunità di usare metodi diversi di analisi secondo le esigenze della ricerca e del materiale analizzato trova conferma nella diversità dei risultati ottenuti applicando metodi diversi allo stesso materiale.

Si conferma inoltre la piena affidabilità del metodo di dosaggio con l'HPLC, da noi già sperimentato sui fenoli dell'olio essenziale (7, 20). L'HPLC in fase inversa si dimostrava altamente indicata per definire qualitativamente e quantitativamente i singoli fenoli anche in miscele particolarmente complesse come gli estratti vegetali e, per certi versi, più adatto di altri metodi cromatografici come TLC e GC. Infatti, opportunamente modificando la velocità di flusso e/o la composizione della fase mobile, è possibile separare e quindi dosare i singoli fenoli mediante un qualsiasi metodo di calibrazione (Figg. 2 e 3). Dalle figure riportate è possibile osservare come la separazione in fase inversa avvenga in funzione del numero degli OH e degli OCH, presenti nella molecola del fenolo: sono più mobili, perchè più polari, la struttura a tre ossidrili (acido gallico) e quindi, di seguito, nella serie degli acidi cinnamici, quelle con due e con un solo ossidrile. La presenza del gruppo metossi risulta invece ritardante rispetto a quella dell'ossidrile. Nella serie dei composti da noi ricercata l'acido cinnamico, precursore degli idrossifenoli, per il fatto di non possedere nella sua struttura alcun ossidrile legato all'anello benzenico, risulta il meno polare ed infatti è caratterizzato cromatograficamente da un tempo di ritenzione più lungo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BROWN J.C., AMBLER J.E., 1973 - *Agron. J.*, **65**, 311-314.
- 2) BUDINI R., TONELLI D., GIROTTI S., 1980 - *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1326-1328.
- 3) CASTELE K.V., GEIGER H., VAN SUMERE C.F., 1983 - *J. Chromatogr.*, **258**, 11-124.
- 4) CHARPENTIER E.L., COWLES J.R., 1981 - *J. Chromatogr.*, **208**, 132-136.
- 5) COURT W.A., 1977 - *J. Chromatogr.*, **130**, 287-291.
- 6) EDREVA A.M., GEORGIEVA I.D., 1984 - *J.I.E.P.*, Plovdiv, Bulgaria, p. A-9.
- 7) FALCHI DELITALA L., SOLINAS V., GESSA C., 1983 - *Fitoterapia*, **54**, 87-96.
- 8) FISCHER J.F., TRAMA L.A., 1979 - *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1334-1337.
- 9) GESSA C., SOLINAS V., 1984 - *J.I.E.P.*, Plovdiv, Bulgaria, p. A-54.
- 10) GROSS D., 1975 - *Phytochem.*, **14**, 2105.
- 11) HAGERMAN A.E., NICHOLSON R.L., 1982 - *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1098-1102.
- 12) HARBORNE J.B., 1982 - «*Introduction to Biological Biochemistry*», Academic Press, London.
- 13) HOAGLAND R.E., DUKE S.O., 1981 - *Weed Sci.*, **29**, 433-439.
- 14) HORVAT R.J., SENTER S.D., 1980 - *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1292-1295.
- 15) KALUZA W.Z., MC GRATH R.M., ROBERTS T.C., SCROEDER H.H., 1980 - *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1191-1196.
- 16) KRYGIER K., SOSULSKI F., HOGGE L., 1982 - *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 330-334.
- 17) OLSEN R.A., BENNETT J.H., BLUME D., BROWN S.C., 1981 - *J. Plant Nutr.*, **3** (6), 905-921.
- 18) RIBEREAU-GAYON P., 1972 - «*Plant Phenolics*», Hafner Pub. Co., N.Y.
- 19) SINGLETON Y.L., ROSSI J.A., 1965 - *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144-158.
- 20) SOLINAS V., GESSA C., FALCHI-DELITALA L., 1981 - *J. Chromatogr.*, **219**, 332-337.
- 21) VAN SUMERE C.F., COTTENIE J., DE GREFF J., KINT J., 1972 - *Recent Advan. Phytochem.*, **4**, 165-221.
- 22) WALTER W.M., PURCELL A.E., MAC COLLUM G.K., 1979 - *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 938-941.
- 23) WULF L.W., NAGEL C.W., 1976 - *J. Chromatogr.*, **116**, 271-279.