

# STUDI SASSARESI

Sezione III

1979

Volume XXVII

ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA DELL'UNIVERSITÀ  
DI SASSARI

*DIRETTORE:* G. RIVOIRA

*COMITATO DI REDAZIONE:* M. DATTILO - F. FATICHENTI - C. GESSA - L. IDDA  
F. MARRAS - A. MILELLA - P. PICCAROLO - A. PIETRACAPRINA - R. PROTA  
R. SATTA - G. TORRE - A. VODRET



ORGANO UFFICIALE  
DELLA SOCIETÀ SASSARESE DI SCIENZE MEDICHE E NATURALI

GALLIZZI - SASSARI - 1981

St. Sass. III Agr.

Università degli Studi di Sassari  
Istituto di Chimica Agraria della Facoltà di Agraria

(Dir. Prof. C. GESSA)

**La separazione mediante HPLC dei due fenoli isomeri Timolo  
(p-isopropil-m-cresolo) e Carvacrolo (p-isopropil-o-cresolo)**

(Lavoro eseguito con un contributo C.N.R.)

V. SOLINAS (\*), L. FALCHI-DELITALA (\*\*), M. S. FADDA (\*\*\*)

PREMESSA

Nel regno vegetale sono largamente diffusi, tra gli altri costituenti secondari, anche i fenoli ed i loro derivati, distribuiti in modo particolare nelle foglie, negli strati corticali del fusto e della radice, nei fusti modificati, nei frutti, semi e fiori.

Circa la loro origine, si ritiene che i loro precursori siano i carboidrati e si ammette al riguardo che tra questi due gruppi di composti esista di fatto una relazione biogenetica.

Per alcune specie botaniche si è inoltre potuto stabilire come i siti fondamentali delle biosintesi fenoliche siano i tessuti fogliari dove, come è noto, i processi metabolici sono particolarmente intensi e veloci, senza con ciò voler escludere la possibilità di sintesi di questi metaboliti anche a livello di altri organi, legata in ogni caso alla presenza nei loro tessuti di precursori fogliari.

Le nostre conoscenze sul trasporto nel corpo del vegetale di questi componenti secondari sono piuttosto limitate; tuttavia, con le tecniche cromatografiche, è stato possibile seguire per alcune specie vegetali le tappe della loro mobilizzazione, come per esempio per i fenoli del complesso della betanina in *Beta vulgaris* L. o per i fenoli pirogallici in *Quercus suber* L. (10, 15). In-

---

(\*) Ist. di Chimica Agraria

(\*\*) Cattedra di Botanica, Fac. di Medicina Veterinaria, Sassari

(\*\*\*) Borsista CNR - Prov. di OR

negabile è stata in argomento l'importanza dell'impiego degli isotopi radioattivi che hanno tra l'altro consentito di ampliare le nostre conoscenze sulla biogenesi e sul trasporto della lignina e della quercetina (14).

Considerevole è inoltre il potenziale tassonomico di questo gruppo di sostanze naturali. Nè può essere ignorata l'importanza dei fenoli nella patologia vegetale, in quanto è stata dimostrata in alcuni casi una loro possibile azione di prevenzione nelle infezioni virali e fungine (3, 17). In pieno sviluppo sono infine gli studi chemiogenetici sulle sostanze fenoliche (6).

Diversi fenoli ed i loro eteri entrano a far parte degli oli essenziali: tra essi ricordiamo anetolo, eugenolo, apiolo ed ancora timolo e carvacrolo. La presenza degli ultimi due è stata fino ad oggi segnalata in numerose specie, non sempre indigene, appartenenti per la maggior parte alla famiglia delle Labiatae, come riportato nella tabella 1, senza tuttavia poter escludere la loro possibile presenza in altre specie non citate.

Il timolo ed il carvacrolo, anche se in rapporti quantitativi molto differenti — e ciò in relazione più che a fattori genetici, a numerosi complessi

Tab. 1 - *Specie botaniche contenenti Timolo e/o Carvacrolo*

Famiglia	Genere	Specie
Cupressaceae	Thuja L.	T. articulata VAHL
Anacardiaceae	Schinus L.	S. molle L.
Labiatae	Coleus LOUR	C. ambonoicus LOUR
		T. herba-barona LOISEL
	Thymus L.	T. capitatus HOFFMANNS e LINK
		T. pulegioides L. (= T. serpyllum L.)
		T. vulgaris L.
		Monarda L.
	Origanum L.	M. didyma
		M. fistulosa
		O. hirtum L.
		O. creticum UMMEY e BENNET
		O. maru L.
	Satureja L.	O. smyrnaceum L.
		S. hortensis L.
S. montana L.		
S. cuneifolia TEN		
Ocimum L.	S. thymbra L.	
	O. viride	
	O. gratissimum	
Umbelliferae	Ptychotis KOCH	P. ajowan D. C.

fattori esterni — sono di norma presenti entrambi nei diversi oli essenziali. Poco attendibili sono a nostro avviso le segnalazioni fatte nel passato da parte di alcuni AA. sulla presenza di un solo fenolo (timolo o carvacrolo) nelle diverse essenze prese in esame. Presumibilmente ciò è dovuto alle difficoltà di separazione di questi due isomeri con mezzi chimici, soprattutto quando uno è presente in percentuale molto ridotta rispetto all'altro.

Quando esiste un certo equilibrio nel rapporto quantitativo tra timolo e carvacrolo, si possono ottenere discreti risultati per la loro separazione, preparando i loro feniluretani e sfruttando il fatto che il feniluretano del timolo è solubile in etere di petrolio, mentre quello del carvacrolo è pochissimo solubile in questo solvente.

Non ci risulta che siano state utilizzate per la specifica separazione del timolo e del carvacrolo la cromatografia su carta, quella di assorbimento o di ripartizione su colonna, tecniche impiegate in modo più o meno soddisfacente per altri fenoli vegetali.

Con la gas-cromatografia, utilizzando un apparecchio con detector a termistori, RUNTI e BRUNI (12) non poterono obiettivamente separare il carvacrolo dal timolo in un olio essenziale di *Thymus capitatus* HOFF. et LINK. Sempre con la GLC, NAVES (11) poté ottenere invece una separazione, sia pure incompleta, dei due fenoli costituenti la parte alcali-solubile di un olio essenziale di *Thymus vulgaris* L., impiegando un detector a ionizzazione di fiamma e colonne riempite con Reoplex 100, alla temperatura di 200°C (fig. 1).

Uno di noi, FALCHI-DELITALA (5), utilizzando come fase stazionaria il grasso Apiezon al 15%, con rivelatore a ionizzazione di fiamma differenziale, poté con la tecnica gas-cromatografica separare, almeno parzialmente, i fenoli presenti nella frazione solubile in NaOH di oli essenziali di *Thymus herba-barona* LOISEL. (fig. 2); lo stesso A. poté stabilire, in modo piuttosto soddisfacente, i rapporti quantitativi tra i due isomeri.

Tuttavia, è noto come le informazioni qualitative e quantitative sui fenoli vegetali siano ad oggi tutt'altro che definite. Infatti, senza voler sminuire il notevole apporto dato dalle tecniche cromatografiche fino ad ora impiegate e già citate, globalmente i risultati non sempre sono stati incoraggianti perché dispendiosi nel tempo e semiquantitativi. Di recente, invece, l'impiego della cromatografia liquido-liquido ad alta pressione (HPLC) ha reso possibile la separazione rapida e molto selettiva di composti molto simili o addirittura isomeri. Questa nuova tecnica è stata applicata anche nella separazione di diverse sostanze fenoliche (4, 13, 18, 19), consentendo di ottenere in linea di massima buone informazioni.

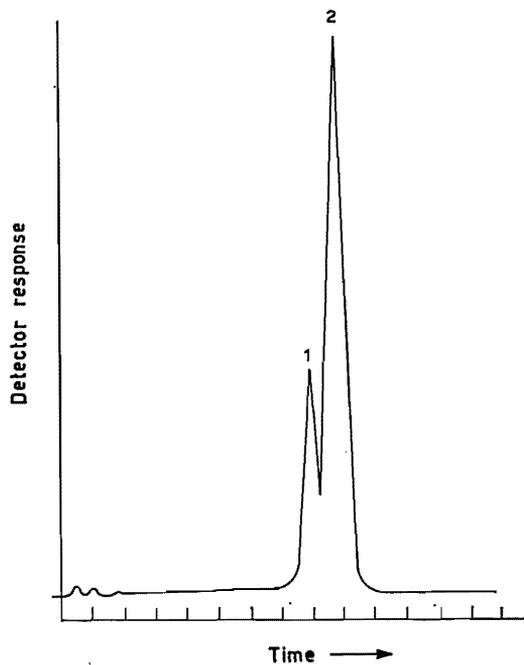


Fig. 1 - Gas-cromatogramma della frazione fenolica di olio essenziale di *Thymus vulgaris* L. Da NAVES (11). Picchi: 1 = Timolo, 2 = Carvacrolo.

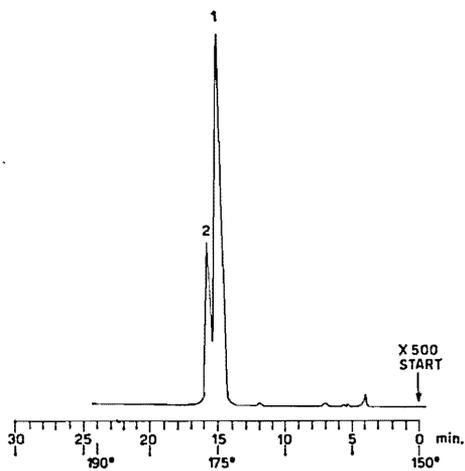


Fig. 2 - Gas-cromatogramma di una frazione fenolica di olio essenziale di *Thymus herba-barona* LOISEL. da FALCHI-DELITALA (5). Picchi: 1 = Timolo, 2 = Carvacrolo.

In considerazione di quanto premesso ed anche in vista di successive ricerche chemiotassonomiche sulle frazioni fenoliche di diverse specie del genere *Thymus L.* e di altri generi della famiglia delle Labiatae, abbiamo voluto impiegare l'HPLC nella separazione dei due isomeri timolo e carvacrolo-

## MATERIALI E METODI

E' stato usato un cromatografo liquido-liquido ad alta pressione della Waters Associated costituito da:

- due pompe mod. 6000 A;
- un iniettore universale U6K;
- un programmatore di gradiente e/o di flusso, mod. 660;
- una colonna  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> da 3,9 mm i.d. x 300 mm.

Il rivelatore era uno spettrofotometro UV-Vis LC-55 della Perkin-Elmer, a lunghezza d'onda variabile, con microcella da 10  $\mu$ l.

I risultati sono stati registrati con registratore Speedomax XL 680 Mark II della Leeds & Northrup.

Gli spettri di assorbimento all'UV del timolo e del carvacrolo in soluzione con metanolo sono stati ottenuti con uno spettrofotometro Varian Techtron mod. 635 D.

Le curve di titolazione sono state ottenute con titolatore automatico della Radiometer.

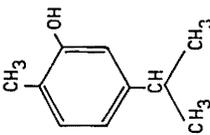
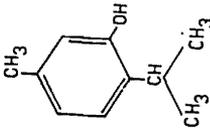
I fenoli puri di riferimento sono stati forniti dalla Fluka AG.

I solventi erano: acqua bidistillata e filtrata attraverso un sistema Millipore a 0,2  $\mu$ m ed acetonitrile, spectrophotometric grade, gold label, della Aldrich Chem. Co.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

In base alle caratteristiche e proprietà fisiche dei due isomeri in esame, riportate nella tabella 2, dalla quale risulta che entrambi sono pochissimo solubili in acqua e solubili in alcol, sono state preparate delle soluzioni standard 200 ppm in metanolo. Queste soluzioni, talvolta diluite con acqua secondo le necessità, sono state utilizzate per l'HPLC e per ottenere gli spettri di assorbimento UV e le curve di titolazione potenziometrica.

Tab. 2 - Costanti fisiche dei fenoli studiati

Nome	Sinonimo	Formula	Peso molecolare	Forma c. colore	Densità g/ml	P. di fusione	P. di ebollizione	Solubilità in	
								g per 100 ml di	acqua
Carvacrolo	p-isopropil-o-cresolo		150,21	incolore liquido oleoso	0,976	0,5 (1-2)	237,9	molto poco solubile	solubile in etere e in alcali
Timolo	p-isopropil-m-cresolo		150,21	incolore c. esag.	0,969	51,5	233,5	0,085 (20)	357 360 et.

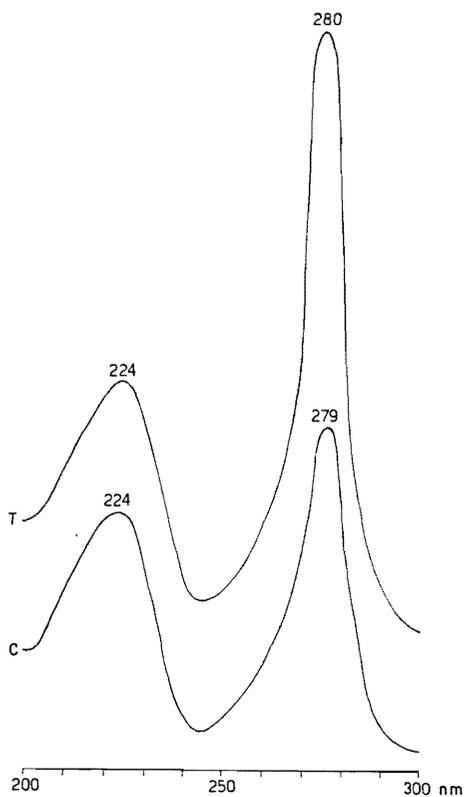


Fig. 3 - Spettri di assorbimento all'UV di soluzioni (200 ppm) di Carvacrolo (C) e di Timolo (T) in metanolo.

Gli spettri di assorbimento UV (fig. 3) sono del tutto simili tra loro per quel che riguarda la posizione delle due zone di massimo assorbimento, rispettivamente a 224 nm ed a 275-285 nm. Non altrettanto si può dire per l'intensità di assorbimento che risultano all'incirca uguali a 224 nm, ma notevolmente maggiore a 275-285 nm per il timolo rispetto a quella del carvacrolo. In entrambi i casi le intensità risultano maggiori a 275-285 nm che a 224 nm.

Questo riscontro ci ha indotti a scegliere i 283 nm come lunghezza d'onda del detector nell'analisi cromatografica.

Le curve di titolazione di soluzioni idroalcoliche (1 : 1) di uguali concentrazioni dei due isomeri con NaOH risultano leggermente differenti, co-

me anche le costanti di dissociazione apparente che da esse si possono ricavare (fig. 4).

Infatti, il pH iniziale della soluzione di carvacrolo è più basso (6,5) di quello della soluzione di timolo (7,2) e questo, applicando la legge

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \sqrt{K_a C_a}$$

dimostra anche il più alto valore della  $K_a$  del carvacrolo rispetto a quella del timolo.

La differenza di acidità fra timolo e carvacrolo è interpretabile in termini di strutture e di conseguente stabilità degli anioni che da essi si originano dopo la deprotonazione del gruppo OH. La maggiore azione elettron repulsiva del gruppo isopropilico rispetto a quella del metilico determina nell'OH del timolo una minore delocalizzazione della carica dell'anione con conseguente diminuzione della sua stabilità.

In base a queste considerazioni non era da ritenere impossibile una separazione cromatografica liquido-liquido che sfruttasse al massimo queste piccolissime differenze fra i due isomeri.

La scarsa solubilità di questi due fenoli in acqua ha consigliato l'uso di un materiale di riempimento apolare come quello della micro-Bondapak  $C_{18}$  e quindi l'utilizzazione di una cromatografia in fase inversa piuttosto che in fase normale. Tuttavia, affinché la separazione potesse procedere in tem-

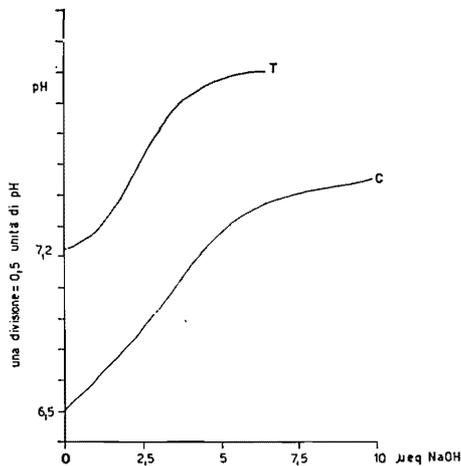


Fig. 4 - Curve potenziometriche di soluzioni (100 ppm) di Carvacrolo (C) e di Timolo (T) in 25 ml di metanolo + 25 ml di acqua, titolate con NaOH 0,01 N.

pi sufficientemente brevi, abbiamo utilizzato una serie di fasi mobili a polarità diverse, costituite da acqua e acetonitrile in diversi rapporti, al fine di ottenere quella combinazione che, unitamente all'opportuna velocità di flusso, consentisse di fatto la migliore separazione.

Di tutte queste operazioni abbiamo riportato soltanto i cromatogrammi più significativi (fig. 5). Come si può notare, con fasi mobili poco polari, costituite ad esempio da  $\text{CH}_3\text{CN}$  all'80%, si sono ottenuti tempi di ritenzione molto brevi, ma non la separazione dei componenti. La separazione della miscela si è manifestata in maniera sempre più evidente quando nella fase mobile è stata aumentata la quantità di acqua, evidenziando in questo modo una piccolissima differenza di solubilità in acqua e di « polarità » in senso strettamente cromatografico che esiste fra timolo e carvacrolo.

Nella figura 6c, che si riferisce ad una miscela diversa nel rapporto quantitativo fra i due componenti rispetto a quella della figura 5d, ma ana-

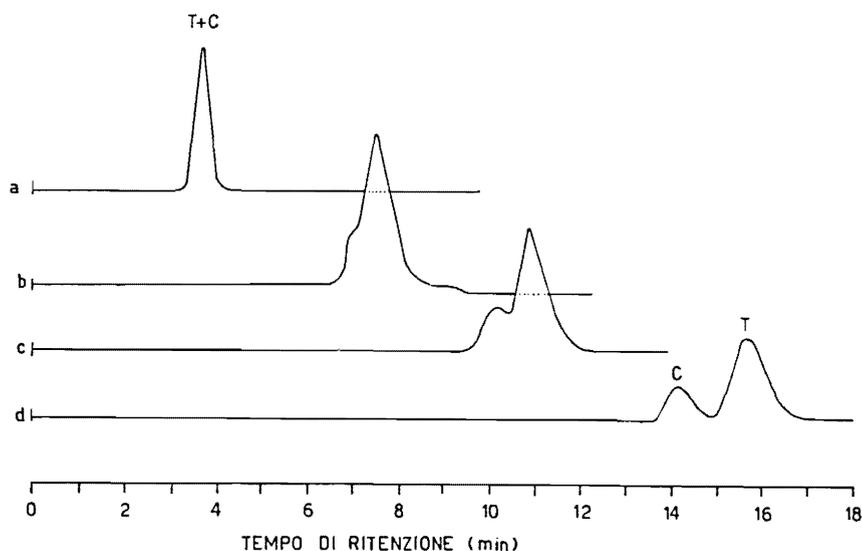


Fig 5 - Cromatogrammi HPLC di miscele timolo - carvacrolo, in diverse condizioni sperimentali. Picchi: T = timolo, C = carvacrolo.

Solvente:

a)  $\text{CH}_3\text{CN}$  80%,  $\text{H}_2\text{O}$  20%

b) " 55%, " 45%

c) " 50%, " 50%

d) " 40%, " 60%

Colonna:  $\mu\text{Bondapak C}_{18}$  da 3,9 mm. i.d. x 300 mm

Velocità di flusso 1,5 ml/min

Temperatura: Ambiente

Detector: UV 283 nm

lizzata nelle stesse condizioni sperimentali, si ottiene una separazione soddisfacente in tempi ragionevolmente brevi e, anche se i due picchi non risultano completamente separati, il risultato è tale da consentire non solo l'identificazione ma soprattutto il dosaggio quantitativo dei due composti.

Aumentando ancora la quantità del solvente più polare nella fase mobile, non si ottenevano risultati migliori per quel che riguarda la separazione, mentre risultavano più lunghi i tempi di ritenzione.

La minore solubilità in acqua del timolo può essere interpretata come dovuta ad un maggiore effetto idrofobico che l'OH del timolo può subire per la sua maggiore vicinanza al gruppo isopropilico e quindi alla maggiore difficoltà che esso può incontrare nello stabilire legami con l'acqua.

Nelle migliori condizioni di analisi da noi sperimentate, cioè quelle riportate nella figura 6, i massimi per i due composti si hanno a 14' e a 16' rispettivamente per il carvacrolo e per il timolo. Questa differenza nei tempi di ritenzione è tale da consentire:

- la raccolta separata dei due picchi — nel caso di una miscela naturale degli stessi — e quindi la loro più precisa identificazione mediante spettroscopia IR;
- il dosaggio di piccolissime quantità di uno dei due isomeri in presenza di quantità preponderanti dell'altro;
- la possibilità, disponendo di detector UV capaci di operare lo « scanning » con la tecnica dello « stop flow », di procedere immediatamente al riconoscimento delle due sostanze mediante la determinazione dello spettro e dei rapporti di assorbanza. Questo riconoscimento può essere limitato nel caso di miscele di più sostanze fenoliche molto simili fra loro, le quali avranno verosimilmente spettri di assorbimento altrettanto simili, ma può essere utile nel caso di miscele naturali comprendenti anche sostanze diverse da quelle fenoliche ma con tempi di ritenzione molto vicini a queste.

In base ai risultati da noi ottenuti ed a quelli già in nostro possesso e che saranno oggetto di una prossima nota, riteniamo che l'HPLC possa essere utilmente applicata nella separazione di miscele di sostanze vegetali naturali molto simili con dei vantaggi rispetto alle altre tecniche cromatografiche dovuti a minor tempo di analisi, maggior rapidità e semplicità di preparazione dei campioni, possibilità di migliori separazioni, dosaggi più attendibili.

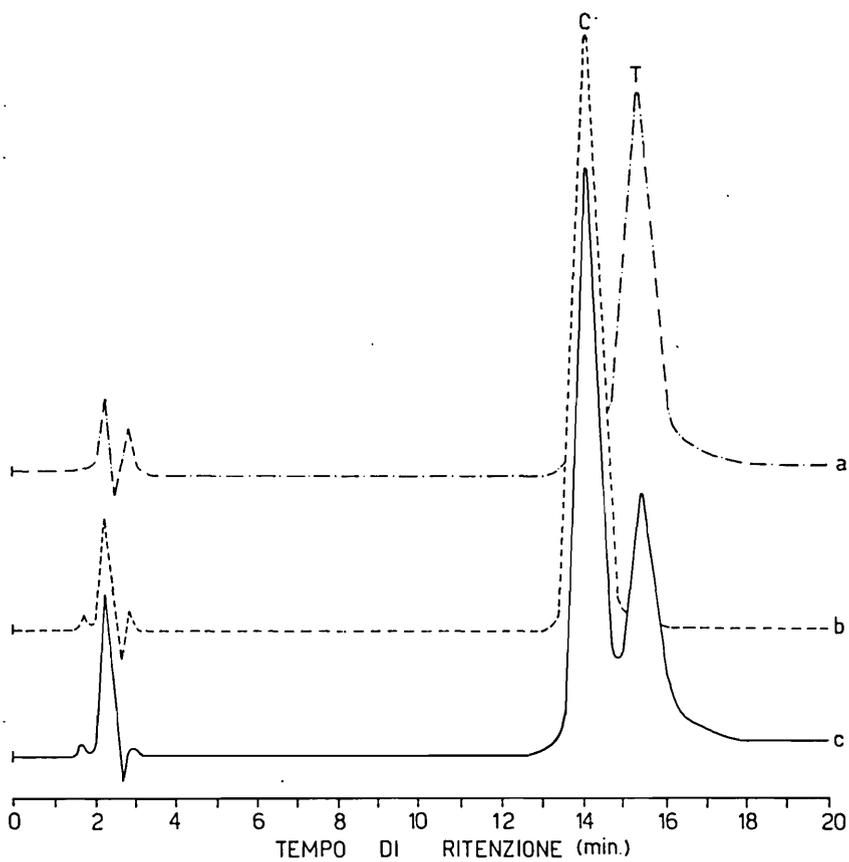


Fig. 6 - Cromatogrammi HPLC di timolo (a), di carvacolo (b) e di timolo + carvacolo (c). Condizioni di analisi:  
Colonna  $\mu$  Bondapak  $C_{18}$  da 3,9 mm n.d. x 300 mm  
solvente:  $H_2O$  60%,  $CH_3CN$  40%  
velocità di flusso: 1,5 ml/min  
temperatura: ambiente  
detector: UV 283 nm

## RIASSUNTO

E' stata sviluppata una tecnica di separazione cromatografica in HPLC dei due fenoli isomeri timolo e carvacolo. Soddisfacenti risultati si sono ottenuti utilizzando una colonna  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> ed una fase mobile costituita da acqua (60%) e acetonitrile (40%), con una velocità di flusso di 1,5 ml/min. E' possibile con la tecnica dai noi messa a punto riconoscere e dosare i due fenoli negli oli essenziali, con notevoli vantaggi rispetto ad altri metodi cromatografici.

## SUMMARY

A method is described for the separation by HPLC of two isomer phenols thymol and carvacrol. Satisfactory results have been obtained by using a chromatographic column  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> and a solvent system constituted by acetonitrile (40%) and water (60%). The flow rate was 1,5 ml/min. The use of this technique permits determination and dosage of these two phenols in essential oils.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) ALSTON R. E. (1964) — The genetics of phenolic compounds in HARBORNE J. B. - Biochemistry of phenolic compounds, Academic Press, London and New York.
- 2) BURCHFIELD H. P., STORRS E. I (1962) — Biochemical applications of gaschromatography - Academic Press, London and New York.
- 3) CADMAN C. H. (1959) — « J. Gen. Microbiolog., 20, 113 ».
- 4) COURT W. A. (1977) — « J. Chromatography, 130, 287 ».
- 5) FALCHI DELITALA L. (1966) — « Boll. Chim. Farm., 105, 873 ».
- 6) FEENSTRA W. J. (1959) — « Kon. Ned. Acad. Wetenschappen, 62c, 119 ».
- 7) FENAROLI G. (1963) — Sostanze aromatiche naturali, Hoepli, Milano.
- 8) FENAROLI G. (1968) — Sostanze aromatiche isolate e sintetiche. Tomo II, Hoepli, Milano.
- 9) GUENTHER E. (1952) — The essential oils. Vol. III. Van Nostrand, Princeton, New Jersey.
- 10) HATHWAY D. E. (1958) — « Biochem. J., 70, 34 ».
- 11) NAVES Y. R. (1959) — « France et ses parfums, 2, 23-27 ».
- 12) RUNTI C. & BRUNI G. (1960) — « Boll. Chim. Farm., 99, 435 ».
- 13) ROUSEFF R. L. (1978) — « Trends in fluorescence. Vol. I., 1, 10-13 ».
- 14) SMITH I. (1976) — Cromatografia Vol. I., Piccin ed., Padova.
- 15) SMITH P. M. (1976) — The Chemotaxonomy of plants, E. Arnold, London.
- 16) SPRAGG S. P. (1960) — Plant phenolics Symp. - Phenolics of plants in health and disease, Pergamon Press, London.
- 17) VALLE E. (1957) — « Acta Chem. Scand., 11, 395 ».
- 18) WALTER W. M., PURCELL A. E., Mc COLLUM G. K. (1979) — « J. Agric. Food Chem. Vol. 27, 5, 938-941 ».
- 19) WULF L. W., NAGEL C. W. (1976) — « J. Chromatogr., 116, 271 ».