

Mario Covello

Giuseppe Ciampa

Maria I. La Rotonda

Influenza dell'altitudine sulla composizione dell'olio essenziale di *Lavandula vera* D.C. (*)

Con una nota precedente (COVELLO & CIAMPA) abbiamo comunicato i risultati relativi alla composizione chimica dell'olio essenziale di *Lavandula vera* D.C. coltivata presso la Stazione Sperimentale per le Piante Officinali annessa all'Orto Botanico di questa Università. Riprendendo ora le ricerche sullo stesso materiale, sempre fornitoci dalla suddetta Stazione Sperimentale, abbiamo voluto stabilire, con l'ausilio della cromatografia su strato sottile ed in fase gassosa, la variazione dei costituenti chimici in relazione all'influenza esercitata da fattori ecologici ed in particolare abbiamo voluto studiare l'influenza dell'altitudine sulla composizione dell'essenza.

PARTE SPERIMENTALE

Il materiale sul quale abbiamo espletato le nostre ricerche ci è stato fornito, come si è detto, dalla Stazione Sperimentale per le Piante Officinali, diretta dal Prof. Aldo Merola che qui sentitamente ringraziamo.

Si è operato su due partite di prodotto: una (campione N.º 1) di *Lavandula vera* coltivata nei terreni della Stazione Sperimentale, siti quasi a livello del mare, un'altra (campione N.º 2) ricavata dal medesimo clone di *Lavandula vera* messa a dimora nei campi Sperimentali del giardino di flora appenninica di Capracotta (Campobasso). Tali campi sono stati impiantati dalla

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica dell'Università di Napoli diretto dal Prof. Mario Covello.

Stazione Sperimentale per le Piante Officinali e sono situati a circa 1.400 metri sul livello del mare.

Per l'ottenimento dell'olio sono state utilizzate le sole infiorescenze, che sono state distillate in corrente di vapore con la tecnica usuale. Successivamente i campioni di oli essenziali sono stati mantenuti per 24 ore su $MgSO_4$ anidro, sottoponendoli, quindi, a distillazione sotto vuoto ed a temperature comprese tra 87 e 107°C. Le rese in essenza, per i due campioni, sono abbastanza diverse, in quanto per il campione N.° 1 si è ottenuta una resa dello 0,946 % e per il campione N.° 2 una resa dello 0,164 %.

Il peso specifico e l'indice di rifrazione dei due campioni risultano abbastanza prossimi:

TABELLA N.° 1

Campione	d_{15}^4	n_D^{20}
1	0,8953	1,4601
2	0,8923	1,4685

Un primo tentativo di separazione e quindi di identificazione dei componenti dei due campioni, è stato effettuato mediante cromatografia su strato sottile. A tale scopo è stato impiegato gel di silice G Merck come fase fissa e la miscela benzolo-acetato di etile (95:5 v/v) come eluente. Il reattivo rivelatore era costituito da una soluzione di vanillina in acido solforico, preparata come appresso:

0,8 g di vanillina sciolti in 10 g di alcool etilico e in 10 di H_2O distillata, raffreddati in bagno a ghiaccio, sono stati lentamente addizionati di 60 g di H_2SO_4 concentrato ($d = 1,85$), agitando continuamente e conservando la soluzione così ottenuta in bottiglia di vetro scuro. Su lastra preparata come sopra, sono state deposte opportune aliquote dell'essenza in esame,

lasciando sviluppare in vaschetta cromatografica per circa 30', con corsa dell'eluente di 17 cm. L'osservazione delle lastre in luce U.V. ha messo in evidenza una sola macchia di color viola, mentre spruzzando successivamente con il reattivo alla vanillina, si è avuta la comparsa di una serie di macchie di colori diversi e con contorni poco netti.

I valori di R_f sono riportati nella tabella N.° 2.

TABELLA N.° 2

Macchia	R_f	Colore
1	0,20	verde
2	0,31	rosso-violaceo
3	0,52	rosso-violaceo
4	0,72	rosso-violaceo
5	0,83	violetto

La terza e la quarta macchia presentavano sempre intensità superiore alle altre e ciò poteva essere attribuito o alla presenza di due soli costituenti principali o al fatto che ciascuna delle macchie era costituita da più sostanze; tentativi effettuati per separarle in eventuali componenti, variando la natura dell'eluente, sono stati infruttuosi. Tale risultato ci sembra in accordo con quanto trovato da altri sperimentatori sulla vicinanza dei valori di R_f degli esteri di alcoli superiori (ATTAWAY & WOLFORD).

A questo punto, tenendo presente che gli oli essenziali sono costituiti principalmente da due gruppi di sostanze: idrocarburi terpenici e composti ossigenati, ciascuno con differenti caratteristiche chimiche, abbiamo pensato di separare mediante cromatografia su colonna le due classi di componenti al fine di analizzarle mediante gas-cromatografia.

A tale scopo abbiamo impiegato la cromatografia di adsorbimento su allumina usufruendo di una colonna in vetro del diametro di 1,3 cm riempita con 50 g di Al_2O_3 Merck mescolata ad etere di petrolio (HOWARD & SLATER). Su di un tale supporto sono stati adsorbiti 3,2 ml dell'olio essenziale, che sono stati successivamente eluiti con etere di petrolio a temperatura ambiente, raccogliendo circa 150 ml di eluato contenente la frazione idrocarburica; la frazione ossigenata, invece, è stata eluita con etere di petrolio addizionato con il 5% di etere etilico, raccogliendo circa 100 ml di eluato. Le due frazioni, concentrate a piccolo volume, sono state cromatografate sia su strato sottile che in fase vapore. I risultati sono stati abbastanza soddisfacenti, in quanto la frazione idrocarburica è risultata qualitativamente separata dalla frazione ossigenata. Allo scopo di migliorare ulteriormente questa separazione, è stato adoperato gel di silice pretrattato come segue (RESNIK, LEE & POWELL): 50 g di gel di silice (80-120 mesh) sospesi in 300 ml di HCl concentrato sono stati lasciati a riposo per 12 ore. Decantato il supernatante, è stato aggiunto altro HCl e si è lasciato a riposo ancora per 12 ore. Il trattamento è stato ripetuto fino ad ottenere un supernatante incolore; il gel di silice è stato quindi sospeso in acqua fino a scomparsa della reazione acida e trattato prima con 200 ml di alcool etilico assoluto e successivamente con etere anidro. Dopo questo ultimo lavaggio, il gel di silice è stato riscaldato per 24 ore a 100°C e mantenuto per altre 24 ore su P_2O_5 sotto vuoto. Alcuni ml di olio di lavanda sono stati adsorbiti su 40 g di gel di silice così preparato; la frazione idrocarburica è stata separata dalla frazione ossigenata con n-esano (CLARK & BERNHARD). Il filtrato è stato successivamente concentrato sotto vuoto alla temperatura ambiente. Per separare la frazione ossigenata, ancora adsorbita su gel di silice, si è adoperato come eluente alcool assoluto; il filtrato concentrato a piccolo volume, è stato reso anidro con MgSO_4 . Con questo procedimento, però, non è stata raggiunta una separazione quantitativa, in quanto i cromatogrammi in fase gassosa relativi alle due frazioni rivelano ciascuno la presenza di componenti dell'altra.

Sulla base dei risultati sopra riportati, abbiamo preferito analizzare direttamente i campioni di olio essenziale facendo va-

riare opportunamente, nell'indagine gas-cromatografica, il tipo di colonna, la sua temperatura, la pressione e quindi il flusso del gas vettore; ciò allo scopo di cercare le condizioni più idonee per una netta separazione delle sostanze componenti sia la frazione idrocarburica che quella ossigenata.

L'apparecchio adoperato in questa ricerca è stato il cromatografo B/F Carlo Erba equipaggiato con un rivelatore a filamento ed un registratore Speedomax-Leeds Northrup. La fase mobile era costituita da elio e le colonne avevano tutte dimensioni di $2\text{ m} \times 6\text{ mm}$. Le prime esperienze sono state effettuate impiegando una colonna in cui il supporto solido era costituito da celite c 22 (250-590 maglie/cm²) e la fase liquida, non polare, era costituita da dideciltalato. Operando in tal modo non è stata ottenuta una separazione netta e questo risultato può essere attribuito alla natura apolare della colonna e quindi alle difficoltà connesse con la separazione fondata esclusivamente sulle diversità dei punti di ebollizione che, nel nostro caso, sono abbastanza vicini; ci siamo orientati quindi verso una fase liquida polare, in modo che la separazione dei diversi componenti possa avvenire non solo sulla base dei diversi punti di ebollizione, ma soprattutto in funzione delle interazioni tra i costituenti dell'olio essenziale e la fase liquida. A tale scopo è stata impiegata una colonna riempita di estere dell'acido succinico al 20 %, adsorbito su di un supporto solido costituito da cromosorb W (60-80 mesh).

Le quantità dei campioni introdotti nella colonna ,variano da un minimo di 0,5 μl ad un massimo di 3 μl . Il tempo richiesto per lo sviluppo di un intero cromatogramma è stato di circa 20'. Le condizioni sperimentali da noi ritenute le più idonee, dopo ripetuti tentativi, si sono dimostrate le seguenti:

sensibilità	S ₄
pressione gas trasportatore	0,8 Kg/cm ²
flusso gas trasportatore	4,1 l/h
temperatura camera vaporizzazione .	240°C

I cromatogrammi sono stati registrati a temperatura di colonna comprese tra 100 e 170°C. Abbiamo preferito lavorare a

CAMPIONE N° 1
LAVANDULA VERA
COLTIVATA A NAPOLI
(A LIVELLO DEL MARE)

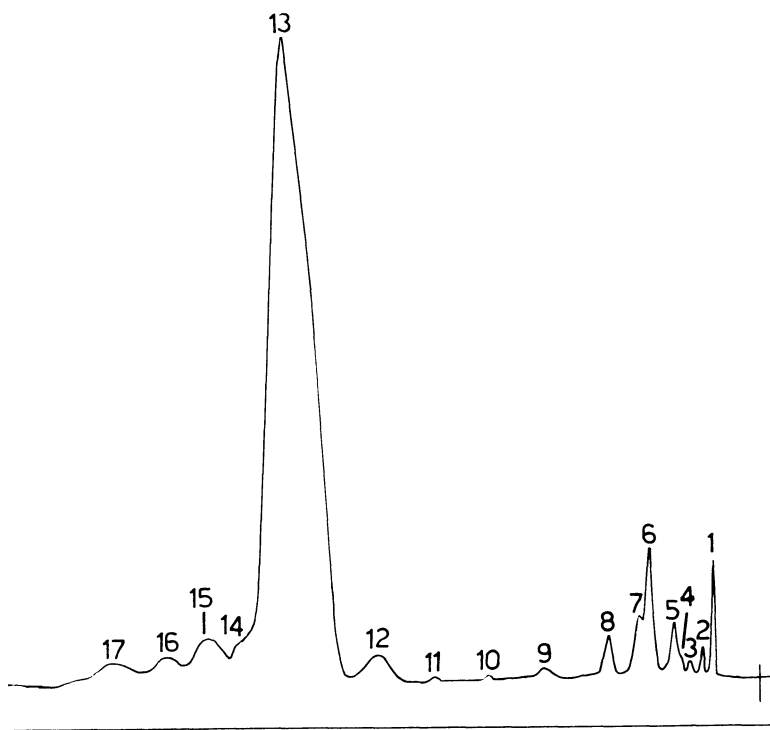


Figura 1

Colonna: estere dell'acido succinico 20% su Cromosorb W.
Temperatura: 120°C - Flusso gas trasportatore (elio) 4,1 l/h.
Analisi gas-cromatografica del campione di essenza n. 1 (μ l 2).

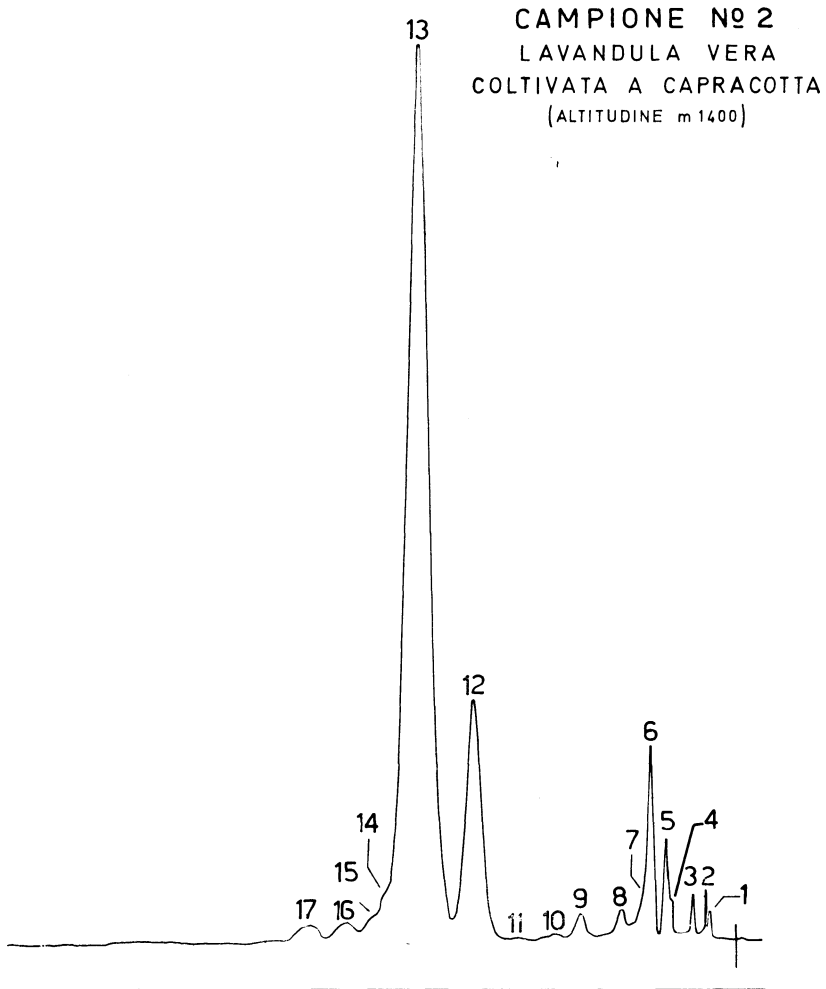


Figura 2

Analisi gas-cromatografica del campione di essenza n. 2 (μl 2).
Colonna: estere dell'acido succinico 20% su Cromosorb W.
Temperatura: 130°C - Flusso gas trasportatore (elio) 4,1 l/h.

diverse temperature allo scopo di meglio separare di volta in volta il costituente puro in esame; in particolare, le misure a 100°C sono risultate utili per la separazione dei costituenti terpenici.

Stabilite in tal modo le condizioni di lavoro, sono stati esaminati i campioni di oli essenziali prima e dopo distillazione, allo scopo di evidenziare eventuali variazioni nelle rispettive composizioni per effetto della distillazione stessa. I cromatogrammi sono risultati perfettamente sovrapponibili.

Nella tabella N.° 3 sono stati raccolti i risultati ottenuti riportando i volumi di ritenzione corretti relativi al mircene. I picchi sono stati numerati in ordine crescente riportando i loro volumi di ritenzione paragonati con quelli di sostanze note (prodotti K e K Laboratories Inc. Plainview, New York); in questo modo è stata effettuata una prima identificazione dei componenti presenti. Per confermare questi risultati, si è proceduto all'addizione dei prodotti singoli ai campioni di *Lavandula vera* D.C. riesaminandoli mediante gas-cromatografia.

La composizione qualitativa che si rivela dall'esame della tabella N.° 3 e dalle figg. 1 e 2, risulta in buon accordo con quanto fornito in merito dalla letteratura (ATKINS, CRABALONA, ELLNER, FENAROLI, KOLSEK & MATICIC, NAVES & Coll, SCHINZ). I dati relativi alla composizione quantitativa dei campioni in esame sono stati raccolti nella tabella n. 4.

TABELLA N.° 3

VOLUMI DI RITENZIONE CORRETTI (RELATIVI AL MIRCENE)
DEI COMPONENTI DI ESSENZA DI LAVANDULA VERA D. C.

Picco	Volume di ritenzione del picco		Composto
	incognito	conosciuto	
1	0.44 (*)	—	—
2	0.58 (*)	0.58	α -pinene
3	0.79 (*)	0.79	Δ -canfene
4	0.98 (*)	0.98	β -pinene
5	1.00 (*)	1.00	mircene
		1.02	sabinene
6	1.45 (*)	1.45	limonene
7	1.63 (*)	1.63	cineolo
8	2.19 (*)	2.19	p-cimene
		2.38	n-octilaldeide
9	3.12(*)	—	—
		3.59	nonilaldeide
		3,59	n-decilaldeide
10	3.68 (*)	—	—
11	4.02 (*)	—	—
12	4.53 (*)	—	—
13	6.89 (*)	6.71	linalolo
		6.91	linalil acetato
		5.43	bornil-acetato
		5.6	decil-acetato
14	5.89 (**)	—	—
15	6.55 (**)	6.55	canfora
16	7.58 (**)	7.58	borneolo
		7.84	citronellolo
17	9.49 (**)	9.49	geranil-acetato

(*) Temperatura della colonna 130°C.

(**) Temperatura della colonna 170°C.

TABELLA N.° 4

COMPOSIZIONE PERCENTUALE DI CAMPIONI DI OLIO
DI LAVANDULA VERA D. C.

Campione n. 1 (Napoli)	%	Campione n. 2 (Capracotta)	%
1 —		1 —	
2 α -pinene	} 11.60	2 α -pinene	} 11.5
3 Δ -canfene		3 Δ -canfene	
4 β -pinene		4 β -pinene	
5 mircene		5 mircene	
6 limonene		6 limonene	
7 cineolo		7 cineolo	
8 p-cimene		8 p-cimene	
9 —		9 —	
10 —		10 —	
11 —		11 —	
12 —	3.79	12 —	14.00
13 { linalolo linalil-acetato }	71.87	13 { linalolo linalil-acetato }	69.5
14 —	3.77	14 —	tracce
15 canfora	3.96	15 canfora	tracce
16 borneolo	2.1	16 borneolo	2.5
17 geranil-acetato	2.81	17 geranil-acetato	2.5

CONCLUSIONI

I risultati dell'analisi effettuata sui due campioni di olio di *Lavandula vera* D.C. permettono di trarre alcune conclusioni piuttosto interessanti.

L'influenza dei fattori ecologici si manifesta in primo luogo sul rendimento in essenza delle piante; difatti esso varia da 0,95 % per la lavandula coltivata a livello del mare (Napoli) a 0,16 % per il campione coltivato in montagna (Capracotta).

Per quanto concerne i costituenti, le diversità riscontrate sono dovute principalmente alle differenze di contenuto in canfora, il quale varia da circa 4 % nel campione coltivato a livello del mare, alle tracce presenti nel campione coltivato in montagna. La frazione terpenica nella sua totalità, invece, è rappresentata con una aliquota costante nei due campioni.

Un altro risultato interessante è il contenuto cineolico delle due essenze, che, ritenuto generalmente come caratteristica negativa del « bouquet » è trascurabile nei due campioni.

Il picco 12 inoltre, corrisponde ad una sostanza non identificata, risulta notevolmente accentuato per il secondo campione e questo risultato sollecita ulteriori e più approfondite indagini.

RIASSUNTO

Sono state analizzate mediante cromatografia su strato sottile ed in fase gassosa campioni di essenze ottenute da *Lavandula vera* D.C. coltivata ad altitudini diverse.

I risultati ottenuti permettono di trarre interessanti conclusioni circa le differenze riscontrate nei due campioni coltivati rispettivamente a livello del mare (Napoli) e in montagna (Capracotta, m. 1.400 s.l.m.); tali differenze riguardano sia la resa in essenza, sia i rapporti quantitativi dei diversi costituenti. In particolare, la canfora è molto più abbondante nel campione coltivato a livello del mare (4%) che nel campione coltivato in montagna (tracce).

SUMMARY

Essential oil samples of *Lavandula vera* D.C. cultivated at various altitudes have been by thin layer chromatography and gas chromatography. The results obtained permit us to draw interesting conclusions about the yield of essential oil, and the quantitative relations of the components. The results obtained permit some interesting conclusions to be drawn concerning the differences noted in two samples cultivated at sea level (Naples), and in the mountains (Capracotta; 1,400 metres above sea level), respectively; such differences concern both the essential yield, and the quantitative proportions of the different constituents. In particular camphor is much more abundant in the sample cultivated at sea level (4%) than in the sample cultivated in the mountains (traces).

BIBLIOGRAFIA

- ATKINS F., 1938. *Analytical examination of lavender oil*. Perfumery Essent. Oil Record, **29**: 85; Recensito in C. A. **32**: 4277/7-8 (1938).
- ATTAWAY J. A. & R. W. WOLFORD, 1965. *Determination of Esters by Thin Layer Chromatography*. Anal. Chem., **37**: 74.
- CLARK J. R. & R. A. BERNHARD, 1960. *Examination of lemon oil by gas-liquid chromatography. The hydrocarbon fraction*. Food Research, **25**: 389.
- COVELLO M. & G. CIAMPA, 1959. *Composizione dell'olio essenziale ricavato da Lavandula vera D. C. coltivata presso la Stazione Sperimentale per le Piante Officinali annessa all'Orto Botanico dell'Università di Napoli*. Rend. Accad. Sci. Fis. e Mat. (Napoli), **26**: 453.
- CRABALONA L., 1939. *Presence of ocimene in true French oil of Lavender II*. Recherches, **3**: 15; Recensito in C.A., **33**: 5125/9 (1939).
- ELLNER E., 1936. *Lavender oil from Upper Bavaria*. Deut. Parfüm.-Ztg., **22**: 19; Recensito in C. A., **31**: 6413/1 (1937).
- FENAROLI G., 1960. *Lavande e Lavandini. Nuove varietà di produzione francese, II parte*. Riv. Ital. Essenze e Profumi, **42**: 489.
- HOWARD G. A. & C. A. SLATER, 1957. *Evaluation of hops VII. Composition of the essential oil of hops*. J. Inst. Brewing, **63**: 491.

- KOLSEK J. & M. MATIČIĆ, 1964. *Zeitrağ zur gaschromatographischen Analyse des Lavendelöls*. J. Chrom., **14** (3): 331.
- NAVES Y. R., 1959. *Volatile plante materials. CLXIII. Presence of borneol and camphor, but not of bornyl acetate, in the essential oil lavender and lavandin*. Helv. Chim. Acta **42**: 2744; Recensito in C. A. **54**: 25594/d (1960).
- NAVES Y. R. & P. TULLEN, 1960. *Volatile plante material. CLXX. Presence of β -myrcene, 3-carene and (+)-l-terpinene-4-ol in the essential oil of lavender*. Bull. Soc. Chim. France: 2123; Recensito in C. A., **55**: 13777/h (1961).
- NAVES Y. R. & P. TULLEN, 1960. *Essential oils CLXXII. The presence of (+)-nopinene and sabinene in the essential oil of lavender*. Helv. Chim. Acta, **43**: 2150; Recensito in C.A. **58**: 11165/e (1963).
- NAVES Y. R. & P. TULLEN, 1961. *Essentials oils CLXXIII. Terpenes from the essential oil of lavender: ocimene, α -pinene, camphene*. Helv. Chim. Acta, **44**: 316; Recensito in C. A., **55**: 27783/b (1961).
- RESNIK F. E., L. A. LEE & W. A. POWELL, 1955. *Chromatography of organic acids in Cured Tobacco*. Anal. Chem., **27**: 928.
- SCHINZ H., 1946. *Lavandulol, a new monoterpenic alcohol from Lavandula vera*. Perfumery Essent. Oil Record, **37**: 167; Recensito in C.A. **41**: 1392/b (1947).