



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

**Analisi del profilo glucidico di campioni di nettare di girasole
mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni**

Relatore: Prof. Luca Cappellin

Laureando: Davide Canton
2111452

Anno Accademico 2025/2026

Indice

1. Introduzione	6
1.1 Biologia del Nettare	6
1.2 Chimica del Nettare.....	6
1.2.1 Composizione glucidica del nettare.....	7
1.2.2 Determinanti della variabilità del profilo glucidico.....	7
1.3 Tecniche analitiche per la determinazione del profilo glucidico.....	8
1.3.1 La cromatografia come tecnica di separazione.....	8
1.3.2 Applicazione della cromatografia liquida ad alte prestazioni.....	9
2. Scopo del lavoro	10
3. Materiali e metodi	11
3.1 Descrizione dei campioni di nettare	11
3.2 Strumentazione e condizioni cromatografiche	11
3.3 Preparazioni delle soluzioni standard e rette di calibrazione	11
3.3.1 Preparazione delle soluzioni standard	11
3.3.2 Analisi delle Soluzioni Standard.....	14
3.3.3 Costruzione delle Rette di Calibrazione	14
3.4 Preparazione dei Campioni di Nettare.....	15
3.5 Elaborazione dei dati	15
4. Risultati e Discussione	17
4.1 Rette di calibrazione.....	17
4.2 Profilo Glucidico dei Campioni di Nettare	19
4.3 Distribuzione e Confronto della Composizione Glucidica	26
4.3.1 Distribuzione della composizione glucidica.....	26
4.3.2 Confronto della composizione glucidica tra i genotipi.....	27
4.3.3 Confronto tra ibridi commerciali e varietà antiche.....	28
4.4 Discussione dei risultati ottenuti e confronto con la letteratura	28
5. Conclusione.....	30
Bibliografia	31

Abstract

Le piante instaurano relazioni mutualistiche con numerosi animali attraverso la produzione di nettare, che rappresenta una ricompensa alimentare. In particolare, il nettare floreale svolge un ruolo essenziale nell'attrazione degli impollinatori, mentre il nettare extraflorale contribuisce alla difesa indiretta della pianta richiamando insetti predatori che limitano i danni causati dagli erbivori.

Circa il 90% delle specie vegetali, comprese il 75% delle colture di interesse agrario, trae beneficio dall'impollinazione mediata dagli animali, un processo fortemente dipendente dalla produzione di nettare. Parallelamente, il nettare extraflorale costituisce uno dei pochi meccanismi di difesa vegetale per i quali è stato dimostrato un effetto positivo stabile sulla salute e sul successo riproduttivo delle piante.¹

Alla luce dell'importanza del nettare nelle interazioni ecologiche e riproduttive delle piante, negli ultimi anni è cresciuto l'interesse verso la caratterizzazione della sua composizione chimica e della sua variabilità tra specie e genotipi. In questo contesto si inserisce il presente studio, finalizzato all'analisi qualitativa e quantitativa del nettare di girasole (*Helianthus annuus* L.), con l'obiettivo di caratterizzarne il profilo glucidico in campioni appartenenti a differenti genotipi. I campioni analizzati comprendevano sia ibridi commerciali, ampiamente utilizzati nella moderna agricoltura, sia varietà antiche, oggi in gran parte cadute in disuso ma di notevole interesse per la conservazione della biodiversità e come potenziale fonte di caratteri genetici utili nei programmi di miglioramento varietale.

L'analisi dei campioni è stata condotta tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), una tecnica analitica che consente la separazione, l'identificazione e la quantificazione di molecole biologicamente attive presenti in miscele complesse. Il principio di funzionamento della tecnica si basa sulla diversa affinità di ripartizione degli analiti tra una fase mobile e una fase stazionaria, che determina differenti velocità di migrazione all'interno della colonna cromatografica e, di conseguenza, la loro separazione.²

Sulla base dei dati ottenuti l'obiettivo è evidenziare eventuali differenze qualitative e quantitative nella composizione del nettare, in relazione alle concentrazioni relative di fruttosio, glucosio e saccarosio, al fine di valutare l'influenza del background genetico sul profilo degli zuccheri e fornire informazioni utili alla valorizzazione delle risorse genetiche del girasole.

1. Introduzione

1.1 *Biologia del Nettare*

Il nettare è una secrezione acquosa ricca di zuccheri, prodotta da numerose specie di angiosperme e, in misura minore, anche da alcune gimnosperme. La sua funzione principale è quella di favorire le interazioni tra le piante e gli organismi impollinatori, rappresentando una ricompensa alimentare che incentiva le visite ai fiori e, di conseguenza, il trasferimento del polline.³

Attraverso questo meccanismo, il nettare contribuisce al successo riproduttivo della pianta, promuovendo sia la fecondazione sia l'impollinazione incrociata, con effetti positivi sulla variabilità genetica delle popolazioni vegetali.

In base alla sede di secrezione, il nettare può essere distinto in nettare floreale ed extrafloreale. Il nettare floreale è prodotto all'interno del fiore da specifici tessuti secretori, i nettari, e svolge principalmente la funzione di attrarre gli impollinatori, favorendo il processo riproduttivo della pianta. Il nettare extrafloreale, invece, è secreto da ghiandole localizzate su organi vegetativi, come foglie, piccioli o fusti, e non partecipa direttamente all'impollinazione. La sua funzione è prevalentemente difensiva e consiste nell'attrarre insetti predatori e parassitoidi che contribuiscono a limitare l'attacco degli erbivori, instaurando una forma di difesa indiretta per la pianta.⁴

Per questo motivo, il nettare extrafloreale riveste un ruolo ecologico e agronomico di rilievo ed è considerato una potenziale risorsa per strategie di difesa biologica e gestione sostenibile delle colture.

Tra le numerose specie che producono nettare floreale, il girasole rappresenta la specie oggetto del presente studio. Appartenente alla famiglia delle Asteraceae, il girasole è una pianta erbacea annuale prevalentemente allogama, in cui l'impollinazione entomofila svolge un ruolo fondamentale per garantire un'efficace produzione di semi. Oltre a costituire una delle principali colture oleaginose a livello mondiale, il girasole è considerato un'importante specie mellifera, poiché il nettare prodotto dai fiori del capolino rappresenta una risorsa alimentare essenziale per api e altri insetti impollinatori.⁵

Il nettare del girasole, dunque, rappresenta un elemento di particolare interesse scientifico e costituisce il focus del presente lavoro, volto ad approfondirne la composizione zuccherina e i fattori che ne influenzano la variabilità.

1.2 *Chimica del Nettare*

La composizione del nettare è altamente variabile e può differire tra specie, popolazioni e persino tra i vari stadi fenologici della stessa pianta, riflettendo la complessità dei processi fisiologici coinvolti nella sua secrezione.

Dal punto di vista chimico, il nettare rappresenta una miscela complessa di sostanze disciolte in una matrice acquosa. Accanto agli zuccheri, approfonditi nel paragrafo “1.2.1 *Composizione glucidica del nettare*”, che ne costituiscono la frazione quantitativamente predominante e sono responsabili della maggior parte del suo valore nutrizionale, il nettare contiene anche numerosi composti non zuccherini, che rappresentano complessivamente circa il 10% del suo peso secco.⁶

Sebbene presenti in quantità inferiori rispetto agli zuccheri, questi composti, tra cui amminoacidi, vitamine, alcaloidi, composti fenolici, terpenoidi, lipidi, proteine, ioni metallici e fitormoni, svolgono un ruolo fondamentale nel determinare le proprietà biologiche del nettare, contribuendo ad attrarre gli impollinatori mutualisti e, al contempo, a scoraggiare organismi indesiderati quali visitatori opportunisti, che sottraggono il nettare senza favorire l'impollinazione, e microrganismi potenzialmente dannosi.⁷

1.2.1 Composizione glucidica del nettare

Gli zuccheri rappresentano metaboliti essenziali per le piante, in quanto svolgono un ruolo fondamentale sia come fonte di energia sia come costituenti del metabolismo del carbonio. Oltre alla funzione energetica, agiscono come molecole segnale coinvolte nella regolazione dello sviluppo vegetale e nelle risposte agli stress ambientali, contribuendo all'attivazione di numerosi processi fisiologici e di meccanismi di difesa.⁸

Tra questi, saccarosio, glucosio e fruttosio rivestono particolare importanza poiché, oltre a essere i principali prodotti del metabolismo dei carboidrati, costituiscono anche i componenti predominanti del nettare floreale.

La composizione glucidica del nettare non è tuttavia uniforme, ma può differire sensibilmente tra le specie vegetali in relazione a diversi fattori ecologici, fisiologici, genetici ed evolutivi, che verranno approfonditi nel paragrafo "*1.2.2 Determinanti della variabilità del profilo glucidico*".

Nelle angiosperme la proporzione di saccarosio rispetto agli altri zuccheri consiste in un valore che può spaziare all'interno di un ampio intervallo tra 0 e 100%, sebbene nella maggior parte delle specie il nettare sia prevalentemente costituito dagli zuccheri esosi, principalmente glucosio e fruttosio. Tra questi due zuccheri il fruttosio risulta essere il più abbondante circa per la metà delle angiosperme, mentre per la restante metà i due zuccheri sono presenti in proporzioni equivalenti, indicando una prevalenza generale del fruttosio oppure un equilibrio tra i due monosaccaridi.⁹

1.2.2 Determinanti della variabilità del profilo glucidico

La composizione glucidica del nettare è una caratteristica altamente variabile, influenzata dall'interazione di numerosi fattori ecologici, fisiologici e genetici.

Tra questi, il principale gruppo di impollinatori rappresenta uno degli elementi che maggiormente contribuiscono a determinare le proporzioni relative di saccarosio, glucosio e fruttosio. Queste differenze evidenziano come la composizione zuccherina del nettare costituisca un adattamento evolutivo alle interazioni tra pianta e impollinatore, riflettendo la selezione esercitata dai principali vettori dell'impollinazione sui caratteri fiorali.¹⁰

Oltre ai fattori biotici, anche le condizioni climatiche contribuiscono alla variabilità della composizione glucidica del nettare, in particolare esiste una relazione tra la fascia climatica di distribuzione di una certa specie e la proporzione dei principali zuccheri presenti nel nettare. Alle latitudini più elevate e in ambienti caratterizzati da basse temperature, il contenuto di saccarosio tende a diminuire a favore di glucosio e fruttosio. Tale andamento potrebbe essere attribuito alla maggiore attività dell'enzima invertasi a basse temperature. Questo enzima, infatti, catalizza l'idrolisi del saccarosio in esosi. L'aumento della quota di glucosio e fruttosio potrebbe inoltre rappresentare un adattamento alle maggiori richieste energetiche degli impollinatori presenti negli ambienti più freddi. Tuttavia, le variazioni osservate potrebbero riflettere anche una risposta plastica alle condizioni ambientali, oltre che un adattamento evolutivo. Nel complesso, le evidenze disponibili suggeriscono

che i fattori climatici di ampia scala esercitino un'influenza significativa sulla composizione glucidica del nettare.¹¹

Su scala più locale, la secrezione e la composizione del nettare risentono invece delle condizioni microambientali a cui la pianta è esposta durante la fioritura. Studi condotti su cultivar di girasole hanno infatti dimostrato che il deficit di pressione di vapore dell'aria rappresenta uno dei principali fattori responsabili della variazione della concentrazione zuccherina del nettare, evidenziando il ruolo dell'umidità atmosferica nei processi di evaporazione dell'acqua. Al contrario, nell'intervallo sperimentale considerato, l'umidità del suolo non ha determinato variazioni significative nella quantità di zuccheri secreta, probabilmente perché le piante non erano sottoposte a uno stress idrico sufficiente a compromettere la secrezione nettariana. La secrezione di nettare segue inoltre un ritmo circadiano, con un progressivo aumento della massa di zuccheri secreta dalle ore mattutine fino al tardo pomeriggio. Analogamente, la temperatura dell'aria modula la secrezione nettariana, che aumenta fino a un intervallo ottimale tra 16–32°C, per poi diminuire a temperature superiori a causa dell'inibizione dell'attività enzimatica.¹²

Infine, oltre ai fattori ambientali, anche il patrimonio genetico della pianta contribuisce alla variabilità delle caratteristiche del nettare. Nel girasole sono state infatti osservate differenze significative tra i diversi genotipi nella quantità di zuccheri secreta per fiore, confermando che il profilo nettariano è il risultato dell'interazione tra fattori genetici, fisiologici e ambientali.

Sulla base di studi condotti su piante di girasole è stato evidenziato che specifiche varianti genetiche possono modificare l'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo degli zuccheri del nettare, determinando variazioni nel rapporto tra saccarosio, glucosio e fruttosio. Tali evidenze indicano dunque che il genotipo svolge un ruolo fondamentale nella definizione delle caratteristiche del nettare

e rappresenta uno dei principali fattori responsabili della variabilità osservata tra le diverse linee di *Helianthus annuus* L.¹³

1.3 Tecniche analitiche per la determinazione del profilo glucidico

1.3.1 La cromatografia come tecnica di separazione

La cromatografia rappresenta una delle tecniche analitiche più diffuse e versatili per la separazione, l'identificazione e la quantificazione dei componenti presenti in una miscela.

Il principio su cui si basa consiste nella diversa distribuzione degli analiti tra una fase stazionaria e una fase mobile e nella loro diversa affinità tra le due fasi che determina una differente velocità di migrazione dei composti all'interno del sistema cromatografico.¹⁴

La fase stazionaria può essere costituita da un materiale solido oppure da un liquido immobilizzato su un supporto solido, mentre la fase mobile può essere di natura liquida o gassosa. La diversa affinità dei composti nei confronti delle due fasi determina differenti tempi di migrazione e, di conseguenza, la loro separazione. In funzione della natura della fase mobile si distinguono principalmente la cromatografia liquida (Liquid Chromatography, LC) e la cromatografia gassosa (Gas Chromatography, GC).¹⁵

Il tempo impiegato da ciascun analita per attraversare il sistema cromatografico e raggiungere il rivelatore prende il nome di tempo di ritenzione (*retention time*, t_R) e rappresenta uno dei principali

parametri utilizzati per l'identificazione delle sostanze. A parità di condizioni cromatografiche, infatti, ogni composto è caratterizzato da un tempo di ritenzione specifico, determinato dalle sue proprietà chimico-fisiche e dall'interazione con la fase stazionaria.¹⁶

La scelta della tecnica cromatografica dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche degli analiti da determinare. La cromatografia gassosa trova impiego principalmente nell'analisi di composti volatili e termicamente stabili, mentre la cromatografia liquida risulta particolarmente indicata per molecole non volatili, polari o termolabili, come i carboidrati.

Per tale motivo, l'analisi del profilo glucidico del nettare floreale viene comunemente effettuata mediante cromatografia liquida, e in particolare mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), descritta nel paragrafo successivo.

1.3.2 Applicazione della cromatografia liquida ad alte prestazioni

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) rappresenta un'evoluzione della cromatografia liquida convenzionale, sviluppata per incrementarne l'efficienza di separazione.

Tale miglioramento è stato reso possibile dall'impiego di colonne impaccate con particelle della fase stazionaria di dimensioni ridotte e uniformi, che offrono un'elevata superficie di interazione tra gli analiti e la fase stazionaria, migliorando la risoluzione e l'efficienza cromatografica. Tuttavia, la riduzione delle dimensioni delle particelle aumenta la resistenza al passaggio della fase mobile attraverso la colonna, rendendo necessaria l'applicazione di pressioni elevate per mantenere un flusso costante del solvente. Proprio l'impiego di sistemi operanti ad alta pressione costituisce la caratteristica distintiva della HPLC e ne giustifica la denominazione.¹⁷

Essa rappresenta una tecnica altamente versatile, in quanto permette l'analisi di composti non volatili e termolabili e offre un'ampia scelta di fasi mobili e stazionarie, consentendo di adattare le condizioni cromatografiche alle caratteristiche degli analiti e di ottenere separazioni efficienti in numerosi ambiti applicativi.¹⁸

Grazie a tali caratteristiche, la HPLC trova ampio impiego nell'analisi di molecole biologicamente attive, tra cui carboidrati, amminoacidi, proteine e acidi nucleici, risultando oggi una tecnica di riferimento nei settori farmaceutico, alimentare, ambientale e biologico.¹⁹

2. Scopo del lavoro

Il presente lavoro ha avuto l'obiettivo di caratterizzare il profilo glucidico del nettare di girasole (*Helianthus annuus* L.) proveniente da diversi genotipi, comprendenti sia ibridi commerciali ampiamente utilizzati in agricoltura sia varietà antiche di interesse per la conservazione della biodiversità genetica. In particolare, l'analisi è stata finalizzata alla determinazione quantitativa delle concentrazioni di glucosio, fruttosio e saccarosio presenti nei campioni di nettare, al fine di evidenziare eventuali differenze nella composizione zuccherina associate al genotipo.

La caratterizzazione è stata effettuata mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) in fase inversa. A tale scopo sono state preparate soluzioni standard di glucosio, fruttosio e saccarosio e sono state costruite le relative rette di calibrazione, utilizzate per la quantificazione degli zuccheri presenti nei campioni. I campioni di nettare, opportunamente diluiti per renderli compatibili con le condizioni analitiche, sono stati analizzati mediante HPLC e i singoli zuccheri sono stati identificati sulla base dei rispettivi tempi di ritenzione e quantificati attraverso le aree dei picchi cromatografici.

L'analisi ha quindi permesso di ottenere informazioni sulla composizione quantitativa del nettare dei diversi genotipi di girasole e di confrontarne il profilo glucidico, con particolare attenzione alla distribuzione relativa di fruttosio, glucosio e saccarosio. In questo modo è stato possibile valutare la presenza di eventuali differenze nella composizione zuccherina del nettare riconducibili al diverso background genetico dei materiali analizzati.

3. Materiali e metodi

3.1 Descrizione dei campioni di nettare

Il materiale sperimentale oggetto del presente studio è costituito da 117 campioni di nettare di girasole, forniti già campionati dal gruppo di ricerca del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova nell'ambito di un progetto volto alla caratterizzazione della composizione zuccherina del nettare di differenti genotipi.

I campioni comprendevano sia ibridi commerciali, selezionati per le loro caratteristiche agronomiche e produttive, sia varietà antiche appartenenti al germoplasma, oggi scarsamente coltivate o cadute in disuso, ma conservate per il loro valore genetico e per il contributo che possono offrire alla conservazione della biodiversità. L'inclusione di entrambe le categorie ha permesso di confrontare materiali vegetali caratterizzati da differenti background genetici, al fine di valutare eventuali differenze nella composizione glucidica del nettare.

Ciascun campione è stato identificato mediante un codice univoco costituito dal nome del genotipo e dal numero della relativa replica sperimentale (ad esempio *CELESTO-1*, *EXCELIO-3* e *P64 HH 150-5*). A ogni campione è stato inoltre associato un numero progressivo di laboratorio, utilizzato per garantirne la tracciabilità durante tutte le fasi della preparazione e dell'analisi.

3.2 Strumentazione e condizioni cromatografiche

Sulla base dei principi descritti nel paragrafo “1.3.2 Applicazione della cromatografia liquida ad alte prestazioni”, il presente studio si basa sull'analisi eseguita tramite RP-HPLC (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography).

Nella configurazione a fase inversa, la fase stazionaria è apolare, mentre la fase mobile è relativamente più polare; la separazione degli analiti avviene in funzione della loro diversa affinità nei confronti delle due fasi. Per queste caratteristiche, l'HPLC rappresenta una delle tecniche di riferimento per la determinazione quantitativa di carboidrati semplici, quali glucosio, fruttosio e saccarosio.²⁰

Il sistema è stato impiegato utilizzando come fase mobile una miscela di acetonitrile e acqua (90:10, v/v), con una portata di 1,0 mL/min. La colonna è stata mantenuta a 60 °C e il rivelatore a indice di rifrazione (RID) a 40 °C. Per ogni analisi sono stati iniettati 10 µL di campione, con un tempo di corsa di 20 minuti.

3.3 Preparazioni delle soluzioni standard e rette di calibrazione

3.3.1 Preparazione delle soluzioni standard

La quantificazione degli zuccheri mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) richiede una fase preliminare di calibrazione, poiché il segnale fornito dal rivelatore non è direttamente interpretabile in termini di concentrazione dell'analita. La risposta strumentale (*S*), espressa come area del picco cromatografico, è infatti correlata alla concentrazione (*C*) secondo la relazione:

$$S=a+b\times C$$

dove a rappresenta l'intercetta e b la pendenza della retta di calibrazione, entrambi determinati sperimentalmente. Nel presente studio è stata adottata una calibrazione esterna per più punti, ottenuta mediante l'analisi di una serie di soluzioni standard a concentrazione nota di glucosio, fruttosio e saccarosio. I valori di area registrati per ciascuno standard sono stati utilizzati per costruire le rette di calibrazione, successivamente impiegate per la determinazione quantitativa degli zuccheri nei campioni di nettare.

Durante la fase di sviluppo del metodo analitico, l'intervallo di concentrazione delle soluzioni standard è stato progressivamente ottimizzato sulla base delle concentrazioni di zuccheri riscontrate nei campioni di nettare. Per tale motivo, nel corso dell'attività sperimentale sono state preparate tre diverse serie di standard, ciascuna caratterizzata da un differente intervallo di concentrazione, fino all'individuazione della curva di calibrazione più idonea a garantire un'elevata linearità della risposta strumentale e un'accurata quantificazione degli analiti.

La prima serie di soluzioni standard è stata preparata utilizzando come solvente una miscela di acetonitrile e acqua (90:10, v/v) contenente 10 mM di ammonio acetato. L'ammonio acetato, ottenuto per diluizione di una soluzione madre 1 M già disponibile in laboratorio, è stato impiegato come additivo della fase mobile per stabilizzarne le caratteristiche chimico-fisiche e migliorare la riproducibilità della separazione cromatografica degli zuccheri. La concentrazione finale è stata ottenuta applicando la relazione:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

dove C_i rappresenta la concentrazione iniziale della soluzione madre, V_i il volume prelevato, C_f la concentrazione finale desiderata e V_f il volume finale della soluzione. Per la preparazione di 1 L di solvente sono stati quindi prelevati 10 mL della soluzione madre di ammonio acetato 1 M, successivamente miscelati con 900 mL di acetonitrile e 100 mL di acqua ultrapura, ottenendo una soluzione finale contenente 10 mM di ammonio acetato.

Per ciascuno dei tre zuccheri è stata quindi preparata una soluzione madre alla concentrazione di 1000 mg/L (1000 ppm) in un matraccio tarato da 10 mL. La massa teorica di analita da pesare è stata calcolata mediante la relazione:

$$C = m/V$$

da cui:

$$m = C \times V$$

dove C rappresenta la concentrazione desiderata della soluzione (mg/L), m la massa dell'analita (mg) e V il volume finale della soluzione (L). Impostando una concentrazione di 1000 mg/L e un volume finale di 10 mL (0,010 L), la massa teorica da pesare è risultata pari a 10 mg. Tale quantità è stata pesata mediante bilancia analitica, caratterizzata da una precisione di $\pm 0,01$ mg, e successivamente trasferita in un matraccio tarato. Dopo la completa dissoluzione degli analiti nel solvente precedentemente preparato, il matraccio è stato portato a volume, ottenendo le soluzioni madri di glucosio, fruttosio e saccarosio, impiegate per la preparazione degli standard di calibrazione.

A partire dalle tre soluzioni madri sono state quindi preparate una serie di soluzioni standard miste, contenenti contemporaneamente glucosio, fruttosio e saccarosio alle medesime concentrazioni. Tutte le soluzioni standard sono state preparate in vial da 1 mL utilizzando il solvente precedentemente preparato.

La soluzione standard a 100 mg/L (100 ppm) è stata ottenuta prelevando 100 µL da ciascuna delle tre soluzioni madri e portando il volume finale a 1 mL con il solvente costituito da acetonitrile/acqua (90:10, v/v). Le soluzioni standard alle concentrazioni di 75, 50, 25 e 10 mg/L sono state preparate mediante opportune diluizioni delle rispettive soluzioni madri, mantenendo costante il rapporto tra i tre zuccheri. Gli standard a 5 mg/L e 1 mg/L sono stati invece ottenuti mediante successiva diluizione della soluzione standard mista a 100 mg/L, garantendo una maggiore accuratezza nella preparazione delle concentrazioni più basse.

L'analisi preliminare dei campioni di nettare ha evidenziato concentrazioni di zuccheri superiori all'intervallo coperto dalla prima serie di standard. È stata pertanto predisposta una seconda serie di soluzioni standard, con un intervallo di calibrazione compreso tra 100 e 2500 mg/L (100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 e 2500 mg/L), al fine di ampliare il range di calibrazione e garantire una corretta quantificazione degli analiti.

Per la preparazione degli standard è stata allestita una soluzione madre mista alla concentrazione di 10 000 mg/L. A tal fine sono stati pesati, mediante bilancia analitica, 100 mg di glucosio, 100 mg di fruttosio e 100 mg di saccarosio, per una massa complessiva di 300 mg, successivamente trasferiti in un matraccio tarato da 10 mL e portati a volume con acqua Milli-Q fino a completa dissoluzione.

Dalla soluzione madre mista sono state successivamente preparate le soluzioni standard di calibrazione, preparate in vial da 1 mL. Gli standard alle concentrazioni di 2500, 2000, 1500 e 1000 mg/L sono stati ottenuti utilizzando acetonitrile puro come solvente di diluizione, mentre per gli standard a 750, 500, 250 e 100 mg/L è stata impiegata una miscela di acetonitrile/acqua (90:10, v/v).

Questa seconda serie di standard è stata utilizzata per la costruzione della retta di calibrazione del saccarosio, in quanto le concentrazioni riscontrate nei campioni di nettare per tale zucchero non hanno superato 700 mg/L, risultando quindi comprese nell'intervallo di calibrazione considerato. Al contrario, per glucosio e fruttosio, le concentrazioni osservate nei campioni sono risultate superiori, motivo per cui è stata necessaria la preparazione di una terza serie di soluzioni standard, descritta nel paragrafo seguente, caratterizzata da un intervallo di concentrazione più idoneo alla quantificazione di tali analiti.

La terza serie di soluzioni standard è caratterizzata da un intervallo di concentrazione compreso tra 20 e 400 mg/L (20, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300 e 400 mg/L). Tale scelta è stata accompagnata da un'opportuna diluizione dei campioni, descritta nel paragrafo "3.4 Preparazione dei campioni di nettare", al fine di ricondurre le concentrazioni degli analiti all'interno del campo di linearità della retta di calibrazione.

Per la preparazione degli standard è stata allestita una soluzione madre alla concentrazione di 2000 mg/L per ciascuno analita. A tal fine sono stati pesati 20 mg di glucosio e fruttosio mediante bilancia analitica, successivamente trasferiti in un matraccio tarato da 10 mL e portati a volume con acqua Milli-Q fino a completa dissoluzione, ottenendo la nuova soluzione madre utilizzata per la preparazione delle successive soluzioni standard.

Le soluzioni standard sono state quindi preparate secondo il medesimo procedimento, prelevando opportune aliquote della soluzione madre e portando il volume finale a 1 mL con il solvente di diluizione. Per gli standard alle concentrazioni di 400, 300, 250 e 200 mg/L è stata impiegata una miscela con percentuale crescente di acetonitrile (rispettivamente 80, 85, 87,5 e 90%), mentre per gli standard a 150, 100, 70, 50 e 20 mg/L è stata utilizzata una miscela acetonitrile/acqua (90:10, v/v), come riportato in *Figura 1*.

Questa terza serie di standard è stata infine utilizzata per la costruzione delle rette di calibrazione definitive di glucosio e fruttosio, impiegate per la determinazione quantitativa dei due analiti nei campioni di nettare.

Concentrazione (mg/L)	Volume prelevato (µL)	Solvente
400	200	ACN 80%
300	150	ACN 85%
250	125	ACN 87,5%
200	100	ACN 90%
150	75	ACN/H ₂ O 90:10
100	50	ACN/H ₂ O 90:10
75	35	ACN/H ₂ O 90:10
50	25	ACN/H ₂ O 90:10
20	10	ACN/H ₂ O 90:10

Figura 1. Schema di preparazione della terza serie di soluzioni standard utilizzate per la costruzione delle rette di calibrazione per fruttosio e glucosio.

3.3.2 Analisi delle Soluzioni Standard

Le soluzioni standard preparate sono state analizzate mediante il sistema descritto nel paragrafo “3.2 Strumentazione e condizioni cromatografiche”, utilizzando le stesse condizioni cromatografiche successivamente adottate per l’analisi dei campioni di nettare. Durante la fase di sviluppo del metodo, l’analisi delle diverse serie di standard ha consentito di valutare l’adeguatezza dell’intervallo di concentrazione selezionato e di modificarlo progressivamente, fino a individuare il campo di concentrazione più idoneo per la determinazione dei singoli analiti.

Per ciascuna serie di standard sono state analizzate due linee di preparazione indipendenti, indicate come A e B, entrambe iniettate due volte nel sistema cromatografico al fine di verificarne la ripetibilità analitica.

3.3.3 Costruzione delle Rette di Calibrazione

Le aree dei picchi cromatografici ottenute dall’analisi delle soluzioni standard sono state elaborate per la costruzione delle rette di calibrazione dei tre zuccheri oggetto di studio. La calibrazione rappresenta una fase fondamentale dell’analisi quantitativa, in quanto consente di definire la relazione tra la concentrazione nota dell’analita e la risposta strumentale misurata dal rivelatore, permettendo così la successiva determinazione quantitativa degli zuccheri presenti nei campioni di nettare.

Assumendo una relazione lineare tra la concentrazione dell’analita e l’area del corrispondente picco cromatografico, i dati sperimentali sono stati elaborati mediante regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati, che consente di individuare la retta che meglio approssima i punti sperimentali, minimizzando la somma dei quadrati degli scarti tra i valori osservati e quelli stimati dal modello. La relazione tra le due variabili è descritta dalla seguente equazione:

$$y=ax+b$$

dove y rappresenta l'area del picco cromatografico, x la concentrazione dell'analita, a la pendenza della retta, indicativa della sensibilità del metodo, e b l'intercetta, corrispondente teoricamente alla risposta strumentale in assenza dell'analita.

L'affidabilità della regressione è stata valutata mediante il coefficiente di determinazione (R^2) e attraverso la costruzione di bande di confidenza, calcolate applicando la distribuzione t di Student. Le bande di confidenza delimitano l'intervallo entro il quale è attesa la retta di regressione reale per un determinato livello di confidenza e presentano un andamento caratteristico: risultano più strette nella porzione centrale dell'intervallo di calibrazione, dove la stima della regressione è più accurata, e si allargano progressivamente verso gli estremi, riflettendo il maggiore grado di incertezza associato al modello.

3.4 Preparazione dei Campioni di Nettare

Prima dell'analisi cromatografica, i campioni di nettare sono stati sottoposti a una procedura di preparazione finalizzata ad ottenere soluzioni omogenee e prive di particolato, così da garantire l'affidabilità delle determinazioni analitiche e preservare l'efficienza del sistema.

Ai campioni, già contenuti nelle rispettive vial di conservazione, sono stati aggiunti 200 μL della soluzione di acetonitrile/acqua (90:10, v/v). Tutti i trasferimenti di volume sono stati eseguiti mediante micropipette opportunamente tarate, al fine di assicurare accuratezza e riproducibilità durante la preparazione dei campioni.

Le vial sono state quindi sottoposte a sonicazione per due minuti mediante bagno a ultrasuoni, favorendo l'omogeneizzazione della miscela e la completa solubilizzazione degli zuccheri presenti nel nettare.

Successivamente, il contenuto delle vial è stato trasferito in provette idonee al processo di centrifugazione, al fine di separare l'eventuale particolato presente dal surnatante. Quest'ultimo è stato impiegato nelle successive fasi di preparazione del campione, evitando che la presenza di particelle solide potesse compromettere il corretto funzionamento del sistema HPLC e l'integrità della colonna cromatografica.

Poiché le concentrazioni di glucosio e fruttosio risultavano superiori all'intervallo di linearità della retta di calibrazione utilizzata per la loro determinazione, i campioni sono stati sottoposti a una diluizione di rapporto 1:10, ottenuta trasferendo 20 μL di campione e 180 μL della soluzione di acetonitrile/acqua (90:10, v/v) all'interno di una vial. Tale diluizione ha consentito di riportare le concentrazioni degli analiti all'interno del campo di calibrazione adottato.

Per i campioni 11, 23, 34, 43 e 79, caratterizzati da concentrazioni inferiori rispetto agli altri, è stata invece adottata una diluizione 1:5, ottenuta trasferendo 40 μL di campione e 160 μL della soluzione di acetonitrile/acqua (90:10, v/v) secondo il medesimo procedimento, così da ottenere una risposta strumentale adeguata alla successiva determinazione quantitativa.

3.5 Elaborazione dei dati

Al termine delle analisi cromatografiche delle soluzioni standard e dei campioni di nettare, i cromatogrammi ottenuti sono stati elaborati mediante un software di acquisizione. Per ciascun cromatogramma è stata verificata l'integrazione automatica dei picchi cromatografici e, in caso di

necessità, questa è stata corretta manualmente al fine di determinare con precisione l'area sottesa a ciascun picco.

L'identificazione degli zuccheri è stata effettuata confrontando i tempi di ritenzione dei campioni con quelli delle soluzioni standard analizzate nelle medesime condizioni cromatografiche. Nelle condizioni analitiche adottate, il primo composto ad eluire è risultato il fruttosio, seguito dal glucosio e infine dal saccarosio, quest'ultimo generalmente presente con un'abbondanza relativa inferiore rispetto agli altri due zuccheri.

Le aree dei picchi così ottenute sono state utilizzate per la quantificazione degli analiti mediante le rispettive rette di calibrazione, consentendo di determinare la concentrazione di fruttosio, glucosio e saccarosio nella soluzione analizzata. Un esempio dell'elaborazione dei dati effettuata mediante il software è riportato in *Figura 2*.

	RT	AREA	Concentrazione campione	Concentrazione effettiva	massa [mg]
PROGEO 1:10 64	4,772	40267	140	1397	0,28
PROGEO 1:10 41	4,77	47618	165	1649	0,33
PROGEO 1:10 68	4,771	20532	72	720	0,14
PROGEO 1:10 35	4,768	30116	105	1049	0,21
PROGEO 1:10 23	4,75	4152	16	158	0,03

Figura 2. Frammento del software di elaborazione dei dati relativo alla quantificazione del glucosio nei campioni di nettare. Sono riportati il tempo di ritenzione (RT), l'area del picco, la concentrazione calcolata mediante la retta di calibrazione, la concentrazione effettiva dopo l'applicazione del fattore di diluizione e la massa dell'analita contenuta nella vial di analisi.

Per i campioni sottoposti a diluizione è stato successivamente applicato il corrispondente fattore di diluizione, pari a 10 per i campioni preparati con diluizione 1:10 e pari a 5 per quelli preparati con diluizione 1:5, così da ricavare la concentrazione effettiva degli zuccheri nel campione originale.

A partire dalla concentrazione effettiva è stata inoltre calcolata la massa di ciascun analita, moltiplicando tale concentrazione per il volume della soluzione contenuta nella vial, pari a 200 μ L.

La tabella riassuntiva delle concentrazioni di fruttosio, glucosio e saccarosio ottenute per i 117 campioni analizzati è riportata nel paragrafo “4.2 Profilo Glucidico dei Campioni di Nettare”.

4. Risultati e Discussione

4.1 Rette di calibrazione

Di seguito vengono riportate le rette di calibrazione ottenute dall'analisi di soluzioni standard, la cui composizione è stata trattata in precedenza, mediante HPLC.

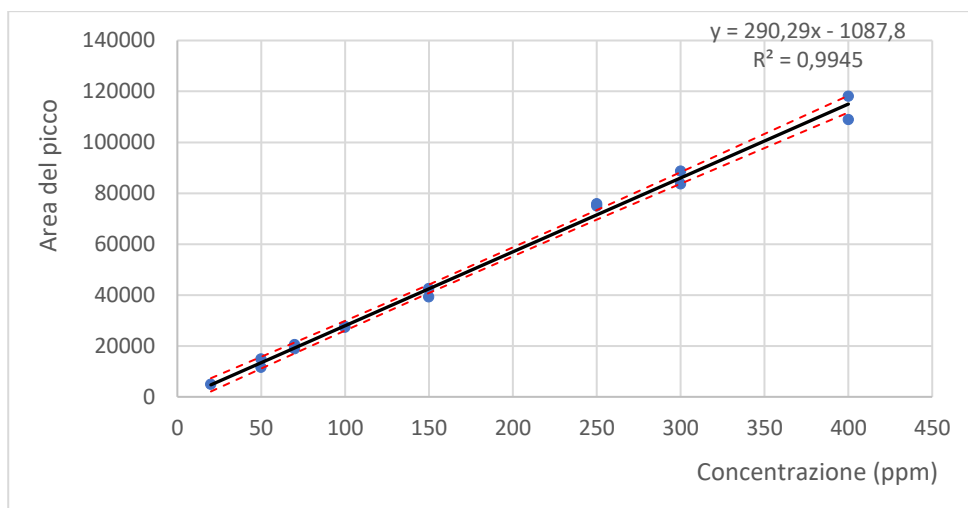


Figura 3. Retta di calibrazione per il fruttosio. Sull'asse delle ordinate è riportata l'area del picco, mentre sull'asse delle ascisse è riportata la concentrazione dell'analita, espressa in ppm.

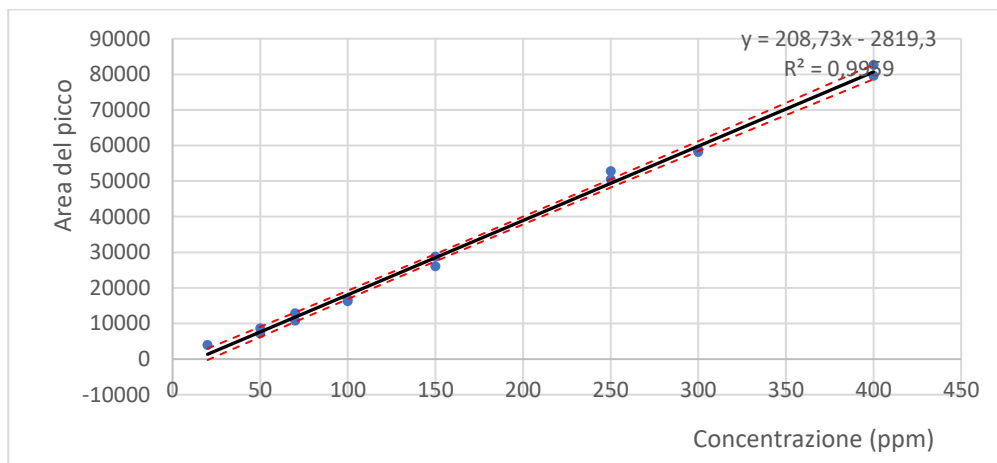


Figura 4. Retta di calibrazione per il glucosio. Sull'asse delle ordinate è riportata l'area del picco, mentre sull'asse delle ascisse è riportata la concentrazione dell'analita, espressa in ppm.

In entrambe le calibrazioni, per il fruttosio e per il glucosio, il punto corrispondente alla concentrazione di 200 ppm è stato escluso dalla regressione lineare, poiché risultava esterno alle bande

di confidenza. Su indicazione del laboratorio, le rette di calibrazione sono state quindi ricalcolate utilizzando i restanti punti sperimentali, ottenendo un modello caratterizzato da una migliore linearità e da un'elevata correlazione.

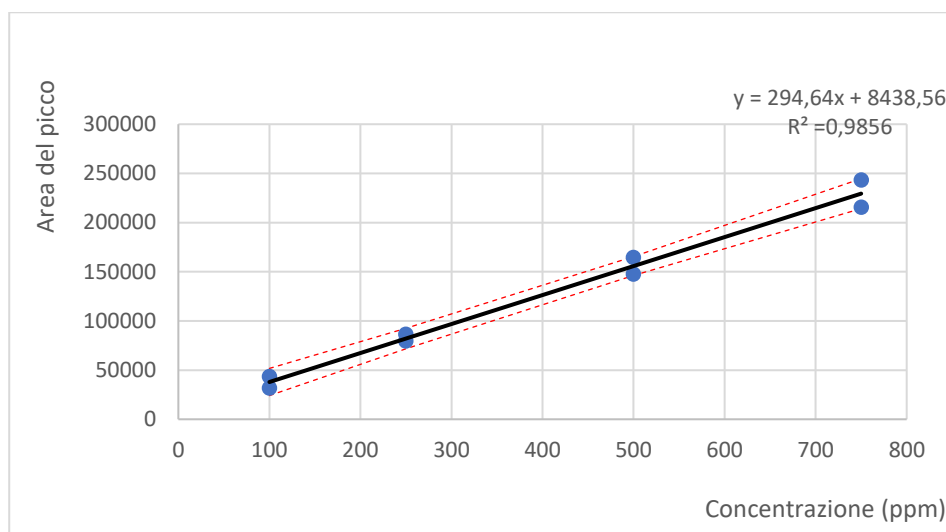


Figura 5. Retta di calibrazione per il saccarosio. Sull'asse delle ordinate è riportata l'area del picco, mentre sull'asse delle ascisse è riportata la concentrazione dell'analita, espressa in ppm.

A differenza delle rette di calibrazione del fruttosio e del glucosio, quella relativa al saccarosio è stata ottenuta utilizzando la seconda serie di soluzioni standard preparata nel corso delle analisi. Tale serie ha fornito una regressione lineare caratterizzata da un'elevata linearità e da un coefficiente di determinazione soddisfacente, senza rendere necessaria l'esclusione di alcun punto sperimentale.

4.2 Profilo Glucidico dei Campioni di Nettare

La provetta numero 56 risulta mancante tra i 117 campioni analizzati, in quanto non presente nel lotto iniziale. I campioni numero 6, 96 e 2 sono stati esclusi a causa di errori di preparazione. Infine i campioni numero 79, 43, 11, 23 e 34 sono stati analizzati mediante una diluizione 1:5, mentre per gli altri campioni è stata applicata una diluizione 1:10.

Tabella 1 – Risultati analitici dei campioni CELESTO

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
48	CELESTO-1	ibrido commerciale	975	0,20	503	0,10	339	0,068
104	CELESTO-2	ibrido commerciale	1131	0,23	699	0,14	322	0,064
116	CELESTO-3	ibrido commerciale	1227	0,25	563	0,11	409	0,082
96	CELESTO-4	ibrido commerciale						
102	CELESTO-5	ibrido commerciale	1027	0,21	476	0,10	349	0,070
109	CELESTO-6	ibrido commerciale	1083	0,22	524	0,10	400	0,080

Note Tabella 1. Il campione numero 96 è stato annullato a causa di un errore di preparazione.

Tabella 2 – Risultati analitici dei campioni EXCELIO

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
65	EXCELIO-1	ibrido commerciale	1311	0,26	793	0,16	211	0,042
97	EXCELIO-2	ibrido commerciale	793	0,16	561	0,11	324	0,065
84	EXCELIO-3	ibrido commerciale	2623	0,52	1481	0,30	372	0,074
79	EXCELIO-4	ibrido commerciale	667	0,13	392	0,08	283	0,057
70	EXCELIO-5	ibrido commerciale	1562	0,31	795	0,16	98	0,020
105	EXCELIO-6	ibrido commerciale	1395	0,28	841	0,17	308	0,062

Note Tabella 2. Il campione numero 79 è stato analizzato per fruttosio e glucosio con una diluizione 1:5

Tabella 3 – Risultati analitici dei campioni HE 133

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
51	HE 133-1	ibrido commerciale	629	0,13	437	0,09	277	0,055
35	HE 133-2	ibrido commerciale	1075	0,21	532	0,11	335	0,067
52	HE 133-3	ibrido commerciale	910	0,18	484	0,10	344	0,069
75	HE 133-4	ibrido commerciale	1142	0,23	440	0,09	217	0,043
101	HE 133-5	ibrido commerciale	464	0,09	368	0,07	307	0,061
99	HE 133-6	ibrido commerciale	1091	0,22	440	0,09	305	0,061

Tabella 4 – Risultati analitici dei campioni HE 144

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
77	HE 144-2	ibrido commerciale	1184	0,24	619	0,12	184	0,037
114	HE 144-3	ibrido commerciale	744	0,15	273	0,05	413	0,083
81	HE 144-4	ibrido commerciale	510	0,10	331	0,07	118	0,024
62	HE 144-5	ibrido commerciale	1635	0,33	793	0,16	232	0,046
76	HE 144-6	ibrido commerciale	1308	0,26	704	0,14	317	0,063

Tabella 5 – Risultati analitici dei campioni IOLEN

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
15	IOLEN- 5	ibrido commerciale	1174	0,23	724	0,14	306	0,061
27	IOLEN-1	ibrido commerciale	1635	0,33	879	0,18	200	0,040
43	IOLEN-2	ibrido commerciale	295	0,06	187	0,04	267	0,053
24	IOLEN-3	ibrido commerciale	883	0,18	476	0,10		
32	IOLEN-4	ibrido commerciale	1150	0,23	604	0,12	181	0,036
38	IOLEN-6	ibrido commerciale	852	0,17	447	0,09	334	0,067

Note Tabella 5. Il campione numero 43 è stato analizzato per fruttosio e glucosio con una diluizione 1:5. Nel campione numero 24 (IOLEN-3) il saccarosio non è riportato poiché la concentrazione rilevata è risultata inferiore al limite di quantificazione del metodo analitico, non consentendo una determinazione accurata.

Tabella 6 – Risultati analitici dei campioni LG50 531

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
100	LG50 531-5	ibrido commerciale	1301	0,26	709	0,14	281	0,056
115	LG50 531-1	ibrido commerciale	1126	0,23	591	0,12	300	0,060
82	LG50 531-2	ibrido commerciale	468	0,09	246	0,05	332	0,066
50	LG50 531-3	ibrido commerciale	1038	0,21	711	0,14	264	0,053
49	LG50 531-4	ibrido commerciale	3686	0,74	1727	0,35	326	0,065
118	LG50 531-6	ibrido commerciale	710	0,14	470	0,09	258	0,052

Tabella 7 – Risultati analitici dei campioni LG50 797

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
41	LG50 797-6	ibrido commerciale	1678	0,34	762	0,15	367	0,073
47	LG50 797-1	ibrido commerciale	1057	0,21	773	0,15	309	0,062
83	LG50 797-2	ibrido commerciale	809	0,16	510	0,10	296	0,059
53	LG50 797-3	ibrido commerciale	954	0,19	487	0,10	353	0,071
61	LG50 797-4	ibrido commerciale	1139	0,23	678	0,14	309	0,062
113	LG50 797-5	ibrido commerciale	1194	0,24	528	0,11	384	0,077

Tabella 8 – Risultati analitici dei campioni MAS 85

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
18	MAS 85- 1	ibrido commerciale	1040	0,21	469	0,09	168	0,034
11	MAS 85- 4	ibrido commerciale	1057	0,21	698	0,14	356	0,071
3	MAS 85- 5	ibrido commerciale	475	0,09	333	0,07	158	0,032
21	MAS 85- 6	ibrido commerciale	1658	0,33	812	0,16	187	0,037
42	MAS 85-2	ibrido commerciale	2088	0,42	846	0,17	372	0,074
39	MAS 85-3	ibrido commerciale	866	0,17	453	0,09	233	0,047

Note Tabella 8. I campione numero 11 è stato analizzato per fruttosio e glucosio con una diluizione 1:5.

Tabella 9 – Risultati analitici dei campioni MAS 89 HO

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
8	MAS 89 HO- 1	ibrido commerciale	1081	0,22	536	0,11	382	0,076
14	MAS 89 HO- 2	ibrido commerciale	1076	0,22	527	0,11	414	0,083
22	MAS 89 HO-1	ibrido commerciale	770	0,15	422	0,08	150	0,030
23	MAS 89 HO-3	ibrido commerciale	636	0,13	320	0,06	436	0,087
37	MAS 89 HO-4	ibrido commerciale	968	0,19	400	0,08	82	0,016
29	MAS 89 HO-6	ibrido commerciale	1198	0,24	602	0,12	397	0,079

Note Tabella 9. Il campione numero 23 è stato analizzato per fruttosio e glucosio con una diluizione 1:5.

Tabella 10 – Risultati analitici dei campioni MAS 910 OL

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
4	MAS 910 OL- 1	ibrido commerciale	1134	0,23	571	0,11	337	0,067
7	MAS 910 OL- 2	ibrido commerciale	826	0,17	534	0,11	320	0,064
17	MAS 910 OL- 4	ibrido commerciale	1307	0,26	542	0,11	370	0,074
13	MAS 910 OL-6	ibrido commerciale	1406	0,28	621	0,12	401	0,080
36	MAS 910 OL-3	ibrido commerciale	754	0,15	443	0,09	400	0,080
30	MAS 910 OL-5	ibrido commerciale	1046	0,21	468	0,09	373	0,075

Tabella 11 – Risultati analitici dei campioni NGH 471 CL

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
5	NGH 471 CL-2	ibrido commerciale	780	0,16	427	0,09	339	0,068
19	NGH 471 CL-1	ibrido commerciale	697	0,14	419	0,08	340	0,068
6	NGH 471 CL-5	ibrido commerciale						
40	NGH 471 CL-3	ibrido commerciale	1294	0,26	576	0,12	331	0,066
92	NGH 471 CL-4	ibrido commerciale	2196	0,44	1386	0,28	319	0,064
25	NGH 471 CL-6	ibrido commerciale	879	0,18	485	0,10	373	0,075

Note Tabella 11. Il campione numero 6 è stato annullato a causa di un errore di preparazione.

Tabella 12 – Risultati analitici dei campioni OKO

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
66	OKO-1	Varietà antiche	404	0,08	307	0,06	274	0,055
88	OKO-2	Varietà antiche	650	0,13	344	0,07	376	0,075
58	OKO-3	Varietà antiche	1327	0,27	628	0,13	263	0,053
74	OKO-3	Varietà antiche	1121	0,22	636	0,13	284	0,057
67	OKO-5	Varietà antiche	1311	0,26	793	0,16	320	0,064
73	OKO-6	Varietà antiche	1105	0,22	537	0,11	344	0,069

Tabella 13 – Risultati analitici dei campioni P64 HE 244

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
44	P64 HE 244-1	ibrido commerciale	1060	0,21	566	0,11	351	0,070
78	P64 HE 244-1	ibrido commerciale	444	0,09	372	0,07	305	0,061
110	P64 HE 244-2	ibrido commerciale	1254	0,25	618	0,12	334	0,067
64	P64 HE 244-3	ibrido commerciale	1425	0,28	659	0,13	323	0,065
46	P64 HE 244-4	ibrido commerciale	811	0,16	432	0,09	401	0,080
112	P64 HE 244-5	ibrido commerciale	581	0,12	293	0,06	301	0,060
69	P64 HE 244-6	ibrido commerciale	739	0,15	468	0,09	288	0,058

Tabella 14 – Risultati analitici dei campioni P64 HH 150

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
98	P64 HH 150-1	ibrido commerciale	1010	0,20	457	0,09	360	0,072
80	P64 HH 150-2	ibrido commerciale	1045	0,21	588	0,12	315	0,063
107	P64 HH 150-3	ibrido commerciale	702	0,14	403	0,08	318	0,064
95	P64 HH 150-4	ibrido commerciale	1198	0,24	444	0,09	403	0,081
111	P64 HH 150-5	ibrido commerciale	921	0,18	562	0,11	356	0,071
85	P64 HH 150-6	ibrido commerciale	1087	0,22	555	0,11	418	0,084

Tabella 15 – Risultati analitici dei campioni P64 LE 25

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
94	P64 LE 25-1	ibrido commerciale	783	0,16	342	0,07	334	0,067
54	P64 LE 25-2	ibrido commerciale	484	0,10	225	0,05	284	0,057
108	P64 LE 25-3	ibrido commerciale	422	0,08	154	0,03	313	0,063
117	P64 LE 25-4	ibrido commerciale	1254	0,25	477	0,10	375	0,075
93	P64 LE 25-5	ibrido commerciale	951	0,19	587	0,12	86	0,017
60	P64 LE 25-6	ibrido commerciale	1249	0,25	678	0,14	301	0,060

Tabella 16 – Risultati analitici dei campioni RGT ABSOLUTE

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
16	RGT ABSOLUTE- 1	ibrido commerciale	1053	0,21	579	0,12	319	0,064
20	RGT ABSOLUTE- 2	ibrido commerciale	839	0,17	539	0,11	305	0,061
33	RGT ABSOLUTE-3	ibrido commerciale	918	0,18	380	0,08	393	0,079
31	RGT ABSOLUTE-4	ibrido commerciale	1173	0,23	625	0,13	389	0,078
34	RGT ABSOLUTE-5	ibrido commerciale	289	0,06	143	0,03	324	0,065
26	RGT ABSOLUTE-6	ibrido commerciale	1209	0,24	583	0,12	366	0,073

Note Tabella 16. Il campione numero 34 è stato analizzato per fruttosio e glucosio con una diluizione 1:5.

Tabella 17 – Risultati analitici dei campioni RGV e RVG

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
28	RGV 5/24 CL-1	Varietà antiche cadute in disuso	1274	0,25	548	0,11	368	0,074
1	RVG 5/24 CL- 2	Varietà antiche cadute in disuso	1099	0,22	565	0,11	399	0,080
12	RVG- 3	Varietà antiche cadute in disuso	957	0,19	557	0,11	312	0,062
10	RVG- 4	Varietà antiche cadute in disuso	1318	0,26	580	0,12	109	0,022
2	RVG-5	Varietà antiche cadute in disuso						
9	RVG-6	Varietà antiche cadute in disuso	1316	0,26	665	0,13		

Note Tabella 17. Il campione numero 2 è stato annullato a causa di un errore di preparazione. Nel campione numero 9 (RVG-6) il saccarosio non è riportato poiché la concentrazione rilevata è risultata inferiore al limite di quantificazione del metodo analitico, non consentendo una determinazione accurata.

Tabella 18 – Risultati analitici dei campioni RSR

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
91	RSR 08014-1	Varietà antiche cadute in disuso	983	0,20	586	0,12	305	0,061
87	RSR 08014-2	Varietà antiche cadute in disuso	1400	0,28	621	0,12	393	0,079
89	RSR 08018-1	Varietà antiche cadute in disuso	922	0,18	502	0,10	141	0,028
71	RSR 08019-1	Varietà antiche cadute in disuso	379	0,08	255	0,05	265	0,053
86	RSR 08022-1	Varietà antiche cadute in disuso	721	0,14	540	0,11	246	0,049
68	RSR 08022-2	Varietà antiche cadute in disuso	745	0,15	446	0,09	343	0,069
72	RSR 0821-1	Varietà antiche cadute in disuso	1503	0,30	616	0,12	300	0,060
90	RSR 0821-2	Varietà antiche cadute in disuso	1009	0,20	385	0,08	396	0,079
57	RSR 0821-3	Varietà antiche cadute in disuso	1493	0,30	764	0,15	417	0,083

Tabella 19 – Risultati analitici dei campioni SOBEO

Campione	Condizione sperimentale	Ibrido/V. antica	Fruttosio (ppm)	Fruttosio (mg)	Glucosio (ppm)	Glucosio (mg)	Saccarosio (ppm)	Saccarosio (mg)
103	SOBEO-1	ibrido commerciale	876	0,18	421	0,08	415	0,083
59	SOBEO-2	ibrido commerciale	958	0,19	520	0,10	308	0,062
45	SOBEO-3	ibrido commerciale	1116	0,22	464	0,09	336	0,067
55	SOBEO-4	ibrido commerciale	1469	0,29	775	0,15	334	0,067
106	SOBEO-5	ibrido commerciale	875	0,18	366	0,07	368	0,074
63	SOBEO-6	ibrido commerciale	1160	0,23	688	0,14	308	0,062

4.3 Distribuzione e Confronto della Composizione Glucidica

4.3.1 Distribuzione della composizione glucidica

La distribuzione delle concentrazioni di fruttosio, glucosio e saccarosio è stata analizzata mediante dei grafici a dispersione, con lo scopo di fornire una rappresentazione complessiva della variabilità dei dati sperimentali nei diversi genotipi. Questa rappresentazione permette di evidenziare l'intervallo di concentrazione dei singoli zuccheri e di individuare eventuali campioni caratterizzati da valori che si discostano dall'andamento generale, rappresentato in seguito.

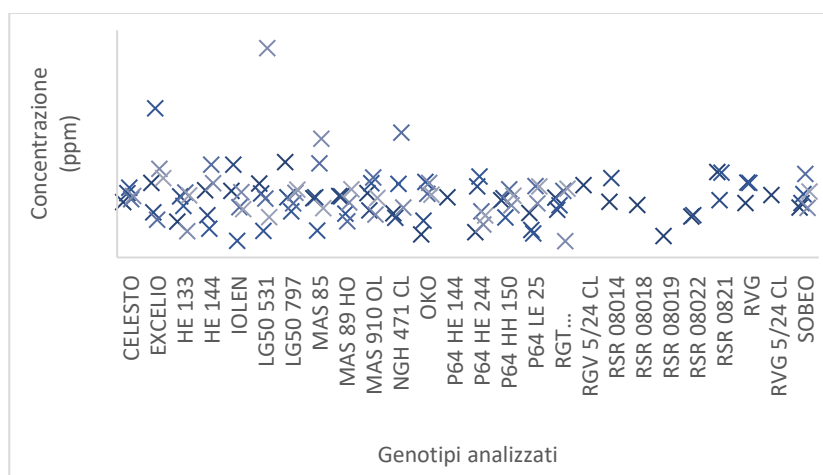


Figura 6. Distribuzione della concentrazione di fruttosio nei campioni di nettare appartenenti ai diversi genotipi di *Helianthus annuus L.*

Il fruttosio presenta l'intervallo di concentrazione più ampio tra gli zuccheri analizzati, con la maggior parte dei campioni distribuita tra circa 600 e 1400 ppm. Alcuni campioni mostrano concentrazioni superiori ai 2000 ppm, determinando un'estensione della distribuzione verso valori più elevati. Il fruttosio risulta lo zucchero quantitativamente predominante nel nettare dei genotipi analizzati.

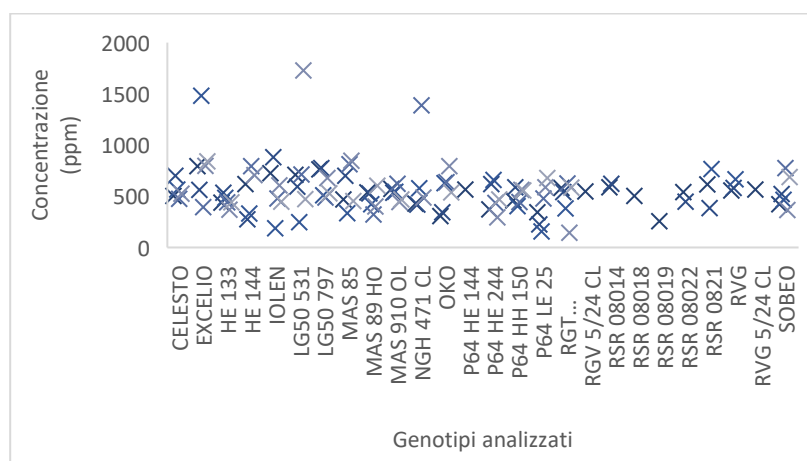


Figura 7. Distribuzione della concentrazione di glucosio nei campioni di nettare appartenenti ai diversi genotipi di *Helianthus annuus* L.

La distribuzione delle concentrazioni di glucosio risulta più contenuta rispetto a quella del fruttosio. La maggior parte dei campioni presenta valori compresi tra circa 400 e 800 ppm, mentre un numero limitato di osservazioni raggiunge concentrazioni prossime a 1700 ppm. Nel complesso, il glucosio mostra una distribuzione relativamente uniforme, con una variabilità inferiore rispetto al fruttosio.

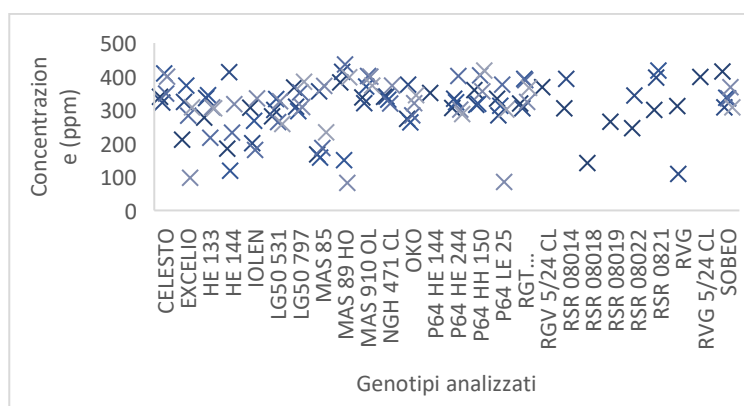


Figura 8. Distribuzione della concentrazione di saccarosio nei campioni di nettare appartenenti ai diversi genotipi di *Helianthus annuus* L.

Il saccarosio è caratterizzato dall'intervallo di concentrazione più ristretto. La maggior parte dei campioni presenta concentrazioni comprese tra circa 250 e 380 ppm, mentre solo pochi campioni evidenziano valori inferiori o superiori rispetto alla distribuzione prevalente. Rispetto agli altri zuccheri analizzati, il saccarosio rappresenta il componente quantitativamente meno abbondante del profilo glucidico del nettare.

4.3.2 Confronto della composizione glucidica tra i genotipi

Il confronto tra i diversi genotipi evidenzia una certa variabilità nelle concentrazioni dei tre zuccheri analizzati, a fronte del mantenimento di un andamento comune nella composizione del nettare. In tutti i genotipi esaminati il fruttosio rappresenta lo zucchero quantitativamente predominante, seguito dal glucosio, mentre il saccarosio risulta costantemente il componente presente alle concentrazioni inferiori.

La variabilità osservata risulta particolarmente evidente per il contenuto di fruttosio e glucosio. Alcuni genotipi, tra cui *EXCELIO* e *LG50 531*, presentano concentrazioni più elevate di entrambi gli zuccheri rispetto alla maggior parte degli altri materiali analizzati, mentre genotipi *HE 133* e *P64 LE 25* mostrano valori generalmente più contenuti. Per il saccarosio le differenze sono meno marcate e le concentrazioni risultano maggiormente concentrate all'interno di un intervallo più ristretto, pur con alcune variazioni tra i diversi genotipi.

I risultati ottenuti costituiscono la base per il successivo confronto tra gli ibridi commerciali e le varietà antiche, riportato nel paragrafo seguente.

4.3.3 Confronto tra ibridi commerciali e varietà antiche

Al fine di valutare eventuali differenze nella composizione glucidica del nettare, i genotipi analizzati sono stati raggruppati in due categorie: ibridi commerciali e varietà antiche cadute in disuso.

Il confronto tra le due categorie mostra un profilo glucidico complessivamente simile, caratterizzato in entrambi i casi dalla predominanza del fruttosio, seguito dal glucosio e, infine, dal saccarosio. Le concentrazioni medie dei tre analiti risultano pertanto confrontabili tra ibridi commerciali e varietà antiche, mentre le differenze osservate riguardano soprattutto l'eterogeneità dei valori all'interno delle singole categorie.

In particolare, gli ibridi commerciali presentano una maggiore eterogeneità delle concentrazioni di fruttosio e glucosio, comprendendo valori sia relativamente più bassi sia alcuni dei valori più elevati nell'intero insieme dei campioni analizzati. Al contrario, le varietà antiche mostrano una distribuzione apparentemente più contenuta e concentrata, caratterizzata da un intervallo meno esteso.

Per quanto riguarda il saccarosio, le distribuzioni dei due gruppi risultano maggiormente sovrapponibili e non evidenziano differenze sostanziali nell'intervallo delle concentrazioni rilevate.

Nel complesso, il confronto tra ibridi commerciali e varietà antiche mette in evidenza una sostanziale uniformità del profilo glucidico del nettare, associata tuttavia a una maggiore variabilità delle concentrazioni di fruttosio e glucosio nei campioni appartenenti agli ibridi commerciali.

4.4 Discussione dei risultati ottenuti e confronto con la letteratura

I risultati ottenuti al termine del presente studio evidenziano una variabilità nelle concentrazioni dei singoli zuccheri tra i genotipi analizzati, con intervalli più o meno ampi in particolare per fruttosio e glucosio sia all'interno degli ibridi commerciali sia nel confronto con le varietà antiche. Tale variabilità riflette principalmente l'aspetto quantitativo della composizione glucidica, mentre il profilo qualitativo risulta relativamente conservato.

In accordo con la letteratura scientifica, in tutti i genotipi di *Helianthus annuus L.*, il nettare è caratterizzato da una predominanza di esosi, con fruttosio e glucosio come zuccheri principali, mentre il saccarosio rappresenta lo zucchero meno abbondante e quello che mostra una minore variabilità tra i diversi genotipi. Nel complesso, quindi, le differenze osservate riguardano principalmente l'entità delle concentrazioni, piuttosto che il profilo qualitativo della composizione zuccherina del nettare.

La relativa conservazione del profilo qualitativo del nettare tra i diversi genotipi analizzati trova riscontro con quanto riportato in letteratura. In particolare, uno studio condotto su un'ampia gamma di specie di angiosperme ha evidenziato come la composizione zuccherina del nettare sia un carattere fortemente conservato dal punto di vista filogenetico.²¹ Sebbene tale evidenza derivi da un confronto interspecifico e non tra genotipi appartenenti alla stessa specie, i risultati ottenuti nel presente studio risultano coerenti con tale affermazione, mostrando il mantenimento della predominanza del fruttosio rispetto al glucosio e al saccarosio nei diversi genotipi di *Helianthus annuus L.* La conservazione del profilo qualitativo non esclude tuttavia una variabilità quantitativa, evidenziata dalle diverse concentrazioni dei singoli zuccheri rilevate tra i campioni.

Le differenze osservate nelle concentrazioni dei singoli zuccheri risultano quindi associate ai diversi genotipi analizzati, ma non possono essere interpretate come una diretta conseguenza del loro background genetico. La composizione del nettare può infatti essere influenzata dalle condizioni ambientali e dalle interazioni tra genotipo e ambiente. Nel presente studio i dati disponibili non consentono di separare completamente l'effetto genetico da quello ambientale e, di conseguenza, non permettono di stabilire in quale misura la variabilità quantitativa osservata sia riconducibile alle caratteristiche genetiche dei genotipi piuttosto che alle condizioni ambientali nelle quali si sono sviluppati.²²

5. Conclusione

Il presente studio ha consentito la caratterizzazione del profilo glucidico del nettare di diversi genotipi di *Helianthus annuus* L. mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni a fase inversa (RP-HPLC), permettendo sia la quantificazione dei tre principali zuccheri, ovvero fruttosio, glucosio e saccarosio, sia il confronto della composizione glucidica all'interno degli ibridi commerciali e delle specie appartenenti a varietà antiche oggi cadute in disuso.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una variabilità quantitativa nelle concentrazioni dei singoli zuccheri tra i campioni dei genotipi analizzati. Tale variabilità è accompagnata tuttavia dal mantenimento di un profilo qualitativo relativamente conservato: in tutti i campioni il fruttosio rappresenta lo zucchero quantitativamente predominante, seguito da glucosio e saccarosio.

Tali osservazioni sono coerenti con quanto riportato in letteratura, secondo cui la composizione del nettare può essere influenzata sia da caratteristiche legate alla filogenesi della specie sia dalle condizioni ambientali e dalle interazioni tra piante e organismi impollinatori. Allo stesso tempo l'eterogeneità dei valori osservati suggerisce un'interazione sinergica tra fattori genetici e ambientali che modulano la concentrazione relativa dei principali zuccheri. La variabilità quantitativa analizzata tra i campioni e i diversi genotipi può quindi essere considerata nell'ambito dell'influenza sinergica di tali fattori, senza che i dati disponibili consentano di separare completamente i rispettivi effetti o stabilire quali di essi abbia un ruolo prevalente nella determinazione delle concentrazioni osservate.

Nel complesso questo studio contribuisce ad ampliare le conoscenze sulla composizione del nettare di girasole e costituisce una base per futuri aggiornamenti. In particolare, sarebbe interessante estendere l'analisi a un numero maggiore di genotipi e valutare l'influenza delle condizioni ambientali dei diversi stadi fenologici sulla composizione glucidica del nettare. Inoltre, l'integrazione di tali studi con l'analisi qualitativa e quantitativa del polline consentirebbe una valutazione più completa delle ricompense floreali. Infine, l'impiego di metodologie sperimentali che non prevedano l'esclusione degli impollinatori mediante il campionamento potrebbe fornire dati maggiormente rappresentativi delle reali condizioni di foraggiamento, contribuendo a chiarire il ruolo ecologico della composizione del nettare e del polline nelle relazioni mutualistiche tra pianta e impollinatore.

Bibliografia

- (17) Berger, Terry A. «Separation of polar solutes by packed column supercritical fluid chromatography». *Journal of Chromatography A* 785, fasc. 1 (1997): 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00849-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00849-2).
- (5) Bergonzoli, Simone, Elio Romano, Claudio Beni, Francesco Latterini, Roberto Lo Scalzo, e Antonio Scarfone. «Nectar Dynamics and Pollinators Preference in Sunflower». *Insects* 13, fasc. 8 (2022): 717. <https://doi.org/10.3390/insects13080717>.
- (12) Chabert, Stan, Christopher Sénéchal, André Fougeroux, et al. «Effect of Environmental Conditions and Genotype on Nectar Secretion in Sunflower (*Helianthus Annuus* L.)». *OCL* 27 (2020): 51. <https://doi.org/10.1051/ocl/2020040>.
- (10,11) Chalcoff, Vanina R., Gabriela Gleiser, Cecilia Ezcurra, e Marcelo A. Aizen. «Pollinator Type and Secondarily Climate Are Related to Nectar Sugar Composition across the Angiosperms». *Evolutionary Ecology* 31, fasc. 4 (2017): 585–602. <https://doi.org/10.1007/s10682-017-9887-2>.
- (2,15,19) Coskun, Ozlem. «Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY». *Northern Clinics of Istanbul*, pubblicazione online ad accesso anticipato, 2016. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>.
- (20) Dorsey, John G., e Ken A. Dill. «The Molecular Mechanism of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography». *Chemical Reviews* 89, fasc. 2 (1989): 331–46. <https://doi.org/10.1021/cr00092a005>.
- (8) Grahovac, Nada, Milica Aleksić, Lato Pezo, et al. «Box–Behnken-Assisted Optimization of High-Performance Liquid Chromatography Method for Enhanced Sugar Determination in Wild Sunflower Nectar». *Separations* 12, fasc. 9 (2025): 244. <https://doi.org/10.3390/separations12090244>.
- (3) Heil, Martin. «Nectar: Generation, Regulation and Ecological Functions». *Trends in Plant Science* 16, fasc. 4 (2011): 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.01.003>.
- (9,21) Liu, Yicong, Susanne Dunker, Walter Durka, et al. «Eco-Evolutionary Processes Shaping Floral Nectar Sugar Composition». *Scientific Reports* 14, fasc. 1 (2024): 13856. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64755-5>.
- (7) Nicolson, Susan W. «Sweet solutions: nectar chemistry and quality». *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 377, fasc. 1853 (2022): 1–9.
- (18) «[No Title Found]». *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences* 2, fasc. 6 (s.d.).
- (22) Prasifka, Jarrad, Beth Ferguson, e Karen K. Fugate. «Genotype and Environment Effects on Sunflower Nectar and Their Relationships to Crop Pollination». *Journal of Pollination Ecology* 33 (febbraio 2023): 54–63. [https://doi.org/10.26786/1920-7603\(2023\)719](https://doi.org/10.26786/1920-7603(2023)719).
- (1,4,6) Roy, Rahul, Anthony J. Schmitt, Jason B. Thomas, e Clay J. Carter. «Review: Nectar biology: From molecules to ecosystems». *Plant Science* 262 (settembre 2017): 148–64. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.04.012>.

- (14,16) Scott, Raymond P. W. *PRINCIPLES AND PRACTICE OF CHROMATOGRAPHY*. s.d.
- (13) Tueux, Guillaume, Nicolas Pouilly, Jordan Bernigaud-Samatan, et al. «A Plant Single Nucleotide Polymorphism Impacts Nectar Sugar Composition, Microbial Diversity and Pollinator Visits». Preprint, bioRxiv, 12 aprile 2026. <https://doi.org/10.64898/2026.04.09.717461>.

