

ANALISI DEGLI ALIMENTI: VINO

Obiettivi

L'analisi del vino può essere interpretata sotto diversi punti di vista in quanto molti sono i parametri che contribuiscono a definire le proprietà organolettiche come la sicurezza e la qualità del prodotto finito.

Abbiamo quindi diversi aspetti da considerare:

- ✓ [aspetto normativo](#): legato a parametri analitici che ogni prodotto enologico deve rispettare per poter essere commercializzato: grado alcolico, acidità totale, parziale e fissa, estratto secco ecc. (sebbene i disciplinari di produzione siano poco restrittivi);
- ✓ [aspetto nutrizionale](#): legato all'attività biologica di alcune costituenti che svolgono attività antiossidante e/o protettiva rispetto all'invecchiamento cellulare (polifenoli, antocianine ecc...);
- ✓ [aspetto qualitativo](#): legato principalmente all'aroma e al bouquet del vino e quindi alla frazione di sostanze volatili;
- ✓ [aspetto di sicurezza](#): legato all'assenza di contaminanti (metalli pesanti, fitofarmaci) e/o sostanze tossiche regolamentate dalla normativa vigente.

Quadro Normativo

A livello di Unione Europea, il **Regolamento CEE n.2676/90** (Regolamento (CEE) n. 2676/90 della Commissione, del 17 settembre 1990, che determina i metodi di analisi comunitari da utilizzare nel settore del vino e successivi aggiornamenti: Reg. CE n. 2348/91, Reg. CE n. 2645/92, Reg. CE n. 60/95, Reg. CE n. 69/96, Reg. CE n. 822/97, Reg. CE n. 761/1999, Reg. CE n. 1622/2000, Reg. CE n. 1609/2001, Reg. CE n. 440/2003, Reg. CE n. 1410/2003, Reg. CE n. 128/2004, Reg. CE n. 355/2005, Reg. CE n. 1293/2005) determina i metodi d'analisi comunitari da utilizzare nel settore del vino.

La legislazione Italiana, come quelle di altri paesi europei, fa riferimento a quella comunitaria, recependone i regolamenti per quanto riguarda i metodi d'analisi da utilizzare.

Per quanto riguarda i limiti massimi di concentrazione per le sostanze indesiderate nel vino, invece, non ci sono ancora regole comuni.

Composizione chimica

Nel vino sono presenti centinaia di composti diversi (attualmente sono note non meno di 600 sostanze) ed è interessante notare che le principali proprietà organolettiche sono influenzate dai componenti minori e da quelli presenti in tracce e ultratracce.

Per esempio, è sufficiente una concentrazione di poche decine di ng/L di 2,4,6-tricloroanisolo (un metabolita secondario di alcuni funghi) per impartire al vino il classico, sgradevole gusto di tappo.

I composti presenti sono ascrivibili alle seguenti classi chimiche:

- Acqua
- Alcoli: etanolo, metanolo, alcoli superiori, glicerina
- Acidi organici: tartarico, malico, citrico, lattico, acetico
- Zuccheri: glucosio, fruttosio
- Gomme e pectine

- Polifenoli: antociani, tannini
- Sostanze minerali: anioni, cationi
- Sostanze volatili: acidi volatili, esteri, aldeidi, terpeni
- Vitamine
- Gas disciolti: anidride carbonica, anidride solforosa, ossigeno

Composizione chimica

Ogni produttore di vino sa che per fare un buon prodotto è necessario realizzare l'armonia tra i vari componenti del vino. Ad esempio, aumentare artificialmente la gradazione alcolica del vino serve a poco se questo non è bilanciato da un equivalente corredo di sostanze aromatiche.

A livello chimico, la qualità di un vino è determinata da una serie di sostanze tra le quali hanno particolare importanza le seguenti:

- ✓ Alcol etilico
- ✓ Estratto secco netto
- ✓ Zuccheri (fruttosio, glucosio)
- ✓ Acidità (acidi carbossilici)
- ✓ Polifenoli (antociani, stilbeni, flavanoli, ecc.)
- ✓ Anidride carbonica
- ✓ Composti aromatici (terpeni, esteri, alcoli superiori, aldeidi, ecc.)

Composizione chimica: alcol etilico

La sua importanza, dal punto di vista merceologico e commerciale, è determinante essendo la sostanza a maggior concentrazione dopo l'acqua e quindi influenza notevolmente tutto il complesso dei caratteri organolettici.

Oltre al sapore dolce, l'alcol etilico o etanolo è responsabile della morbidezza del vino. È inoltre importantissima la sua capacità di solubilizzare tutti i composti importanti ai fini della costituzione del bouquet, che non sarebbero solubili in un mezzo esclusivamente acquoso.

Infine è decisivo dal punto di vista della genuinità, in quanto è possibile riconoscere l'addizione di zucchero non proveniente dall'uva per aumentare il grado alcolico in base alla misura di parametri analitici sull'alcol

L'alcol etilico o etanolo si forma dalla fermentazione alcolica del glucosio presente nel mosto, favorita dall'azione dei lieviti *Saccharomyces Cerevisiae* e batteri.

Composizione chimica: alcol etilico

Il contenuto di etanolo nel vino si esprime attraverso il **titolo alcolometrico volumico**, di cui è bene distinguere tre varianti:

- ✓ Il **titolo alcolometrico potenziale**, ovvero il numero di volumi di alcol puro a 20°C potenzialmente in grado di essere prodotti dalla fermentazione totale degli zuccheri contenuti in 100 volumi di vino a 20 °C; il coefficiente ufficiale di trasformazione dello zucchero in alcol è 0.6 (1/1.67, ovvero 1.67 kg di zuccheri per produrre 1L di etanolo);
- ✓ Il **titolo alcolometrico effettivo (TAV)**, ovvero il numero di volumi di alcol etilico a 20 °C contenuti in 100 volumi di vino a 20°C; simbolo % vol. E' rimasto in uso il termine ad esso equivalente "grado alcolico" ed indicato con % v/v . Nel titolo alcolometrico oltre all'alcol etilico sono compresi i suoi omologhi e gli esteri etilici che passano nel distillato;
- ✓ Il **titolo alcolometrico totale**, dato dalla somma del titolo effettivo e potenziale.

Composizione chimica: alcol etilico

Metodo ebulliometrico

Il metodo più semplice per determinare il grado alcolico di un vino è quello ebullioscopico, nel quale cioè si misura il punto di ebollizione del campione.

Considerando il vino una miscela binaria acqua-etanolo, è possibile risalire alla % di etanolo nel campione in base alla temperatura alla quale esso bolle, facendo riferimento a valori tabulati; l'abbassamento del punto di ebollizione dell'acqua (abbassamento ebullioscopico) è infatti funzione quasi lineare dell'aggiunta di un altro componente.

In alternativa si può eseguire la determinazione del grado alcolico per distillazione (metodo ufficiale della Repubblica Italiana) o mediante analisi GC, determinando l'etanolo insieme agli altri alcoli, oppure per HPLC o mediante analisi FT-NIR (metodo indiretto).

Composizione chimica: alcol etilico

Metodo
ebullimetrico

Ebullimetro di Malligand:

L'ebullimetro di Malligand è un apparecchio di interesse puramente merceologico, la versione illustrata risale agli anni '30, per la determinazione rapida e ragionevolmente accurata del grado alcolico di vini secchi, preferibilmente rossi, fondato sul principio che le miscele idroalcoliche presentano una temperatura di ebollizione inferiore a quella dell'acqua, in misura proporzionale al loro contenuto in alcool.



Composizione chimica: alcol etilico

Metodo
ufficiale per
distillazione

Metodo densimetrico:

Si distilla il vino con un comune apparecchio di distillazione raccogliendo un distillato sul quale eseguire la misura densimetrica mediante alcolometro oppure mediante bilancia idrostatica. In quest'ultimo caso dalla densità relativa d 20/20 della miscela idroalcolica si risale al titolo alcolometrico volumico TAV a 20 °C mediante apposite tabelle (Tabelle alcolometriche internazionali).

Il Regolamento CEE n. 2676/90 prevede per la determinazione del titolo alcolometrico volumico (TAV) del vino :

1. Distillazione del vino alcalinizzato con una sospensione di idrossido di calcio ;
2. Determinazione del titolo alcolometrico del distillato.

Composizione chimica: alcol etilico

Metodo
ufficiale per
distillazione

Metodo densimetrico:

La normativa vigente prevede la possibilità di utilizzare qualunque modello di apparecchio di distillazione a condizione che esso soddisfi il seguente saggio :

1. Distillare 5 volte di seguito una miscela idroalcolica al 10% in volume.
2. Dopo l'ultima distillazione, il distillato deve presentare un titolo alcolometrico di almeno 9.9% in volume, ossia nel corso della distillazione non si deve perdere una quantità di alcol superiore a 0.02 % in volume .



I limiti massimo e minimo per il titolo alcolometrico effettivo e totale per i vini da tavola al consumo sono rispettivamente 9 % vol. e 15 % vol. La tolleranza sul titolo alcolometrico effettivo dichiarato è di ± 0.5 (che naturalmente non si applica al limite minimo).

Composizione chimica: alcol etilico

Metodo
ufficiale per
distillazione

Metodo densimetrico:

Sebbene la normativa preveda la picnometria, quale tecnica di riferimento per la determinazione della densità del distillato ai fini della determinazione del grado alcolico del vino, le tecniche aerometriche e densimetriche (bilancia idrostatica o bilancia di Mohr) risultano più veloci ed accurate.

Entrambe le tecniche sfruttano il principio di Archimede secondo cui : “ *un corpo immerso in un fluido riceve una spinta dal basso verso l'alto pari al peso del volume di fluido spostato* “ .

La progressiva diminuzione del peso specifico nel passaggio del mosto a vino, è dovuta alla trasformazione di una sostanza ad elevato peso specifico, lo zucchero invertito ($P_s = 1.613 \text{ g/ml}$) in un'altra sostanza a basso peso specifico, l'alcol etilico ($P_s = 0.794 \text{ g/ml}$). Così il peso specifico del vino è inferiore a quello dell'acqua ed è tanto minore quanto più elevata è la gradazione alcolica : in genere varia fra 0.9900 e 0.9997 .

Opportune tabelle di conversione permetteranno di correlare il peso specifico del distillato con l'esatta proporzione volumetrica % (v/v%) etanolo/acqua.

Composizione chimica: alcol etilico

Metodo
ufficiale per
distillazione

Tabelle del Reichard

| d_4^{20} | g/l | d_4^{20} | g/l | d_4^{20} | g/l | d_4^{20} | g/l |
|------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|
| 1,0000 | 0,0 | 1,0040 | 10,3 | 1,0080 | 20,6 | 1,0120 | 31,0 |
| 1 | 0,3 | 1 | 10,6 | 1 | 20,9 | 1 | 31,3 |
| 2 | 0,5 | 2 | 10,8 | 2 | 21,1 | 2 | 31,5 |
| 3 | 0,8 | 3 | 11,1 | 3 | 21,4 | 3 | 31,8 |
| 4 | 1,0 | 4 | 11,3 | 4 | 21,6 | 4 | 32,0 |
| 5 | 1,3 | 5 | 11,6 | 5 | 21,9 | 5 | 32,3 |
| 6 | 1,6 | 6 | 11,9 | 6 | 22,2 | 6 | 32,6 |
| 7 | 1,8 | 7 | 12,1 | 7 | 22,4 | 7 | 32,8 |
| 8 | 2,1 | 8 | 12,4 | 8 | 22,7 | 8 | 33,1 |
| 9 | 2,3 | 9 | 12,6 | 9 | 22,9 | 9 | 33,3 |
| 1,0010 | 2,6 | 1,0050 | 12,9 | 1,0090 | 23,2 | 1,0130 | 33,6 |
| 1 | 2,9 | 1 | 13,2 | 1 | 23,5 | 1 | 33,9 |
| 2 | 3,1 | 2 | 13,4 | 2 | 23,7 | 2 | 34,1 |
| 3 | 3,4 | 3 | 13,7 | 3 | 24,0 | 3 | 34,4 |
| 4 | 3,6 | 4 | 13,9 | 4 | 24,2 | 4 | 34,6 |
| 5 | 3,9 | 5 | 14,2 | 5 | 24,5 | 5 | 34,9 |
| 6 | 4,2 | 6 | 14,5 | 6 | 24,8 | 6 | 35,2 |
| 7 | 4,4 | 7 | 14,7 | 7 | 25,0 | 7 | 35,4 |
| 8 | 4,7 | 8 | 15,0 | 8 | 25,3 | 8 | 35,7 |
| 9 | 4,9 | 9 | 15,2 | 9 | 25,5 | 9 | 35,9 |
| 1,0020 | 5,1 | 1,0060 | 15,4 | 1,0100 | 25,8 | 1,0140 | 36,2 |
| 1 | 5,4 | 1 | 15,7 | 1 | 26,1 | 1 | 36,5 |
| 2 | 5,6 | 2 | 15,9 | 2 | 26,3 | 2 | 36,7 |
| 3 | 5,9 | 3 | 16,2 | 3 | 26,6 | 3 | 37,0 |
| 4 | 6,1 | 4 | 16,4 | 4 | 26,8 | 4 | 37,2 |
| 5 | 6,4 | 5 | 16,7 | 5 | 27,1 | 5 | 37,5 |
| 6 | 6,7 | 6 | 17,0 | 6 | 27,4 | 6 | 37,8 |
| 7 | 6,9 | 7 | 17,2 | 7 | 27,6 | 7 | 38,0 |
| 8 | 7,2 | 8 | 17,5 | 8 | 27,9 | 8 | 38,3 |
| 9 | 7,4 | 9 | 17,7 | 9 | 28,1 | 9 | 38,5 |
| 1,0030 | 7,7 | 1,0070 | 18,0 | 1,0110 | 28,4 | 1,0150 | 38,8 |
| 1 | 8,0 | 1 | 18,3 | 1 | 28,7 | 1 | 39,1 |
| 2 | 8,2 | 2 | 18,5 | 2 | 28,9 | 2 | 39,3 |
| 3 | 8,5 | 3 | 18,8 | 3 | 29,2 | 3 | 39,6 |
| 4 | 8,7 | 4 | 19,0 | 4 | 29,4 | 4 | 39,8 |
| 5 | 9,0 | 5 | 19,3 | 5 | 29,7 | 5 | 40,1 |
| 6 | 9,3 | 6 | 19,6 | 6 | 30,0 | 6 | 40,4 |
| 7 | 9,5 | 7 | 19,8 | 7 | 30,2 | 7 | 40,6 |
| 8 | 9,8 | 8 | 20,1 | 8 | 30,5 | 8 | 40,9 |
| 9 | 10,0 | 9 | 20,3 | 9 | 30,7 | 9 | 41,1 |

Composizione chimica: alcoli superiori

Metodi cromatografici

Il vino contiene altri alcoli che possono influenzarne la qualità, in senso positivo o negativo. Tra quelli apprezzabili vi è la glicerina o glicerolo, prodotta come l'etanolo nella fermentazione alcolica. La glicerina impartisce al vino un sapore marcatamente dolciastro e contribuisce a migliorarne l'equilibrio e il corpo. Essendo un composto non troppo volatile, la sua determinazione si effettua per separazione HPLC

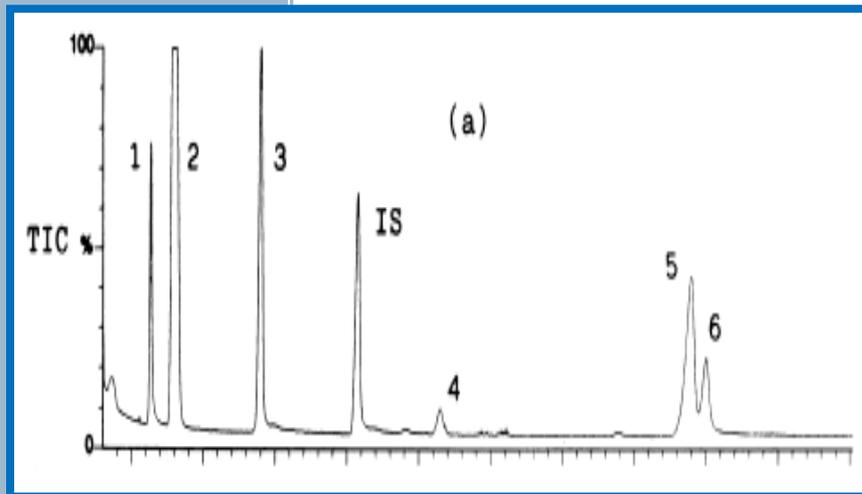
Un altro alcol, questa volta meno desiderabile, è l'alcol metilico o metanolo (CH_3OH) che si forma dall'idrolisi enzimatica della pectina, un polisaccaride presente nell'uva. Pur essendo tossico, il suo contenuto nel vino non costituisce rischio, a meno di quantità fraudolentemente aumentate (come nel caso tristemente noto di Narzole). La sua determinazione si effettua normalmente per gascromatografia ed in particolare mediante tecniche per spazio di testa (HS-GC).

Composizione chimica: alcoli superiori

Metodi cromatografici

I cosiddetti alcoli superiori, cioè alcoli con più di due atomi di carbonio, si originano dagli aminoacidi presenti nell'uva: nel vino i più importanti sono 1-propanolo, 2-metil-1-propanolo, 3-metil-1-butanolo e 2-metil-1-butanolo

Gli alcoli superiori influenzano in vario modo il gusto del vino; nel *Cabernet Sauvignon* ne è stato identificato uno particolare, il 3-metil-1-propanolo ($\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$) che deriva dall'aminoacido Met e impartisce al vino una forte nota dolce.



La determinazione degli alcoli superiori si può effettuare per GC. Nel cromatogramma sono riconoscibili i seguenti composti, in ordine di eluizione: 1-propanolo, etil acetato (un estere), 2-metil-1-propanolo, 1-butanolo (standard interno), etil acetale (un etere), 3-metil-1-butanolo e 2-metil-1-butanolo.

Composizione chimica: estratto secco

Metodo densimetrico

L'**estratto secco netto** dà l'idea della *robustezza* del vino.

Ad esso contribuiscono le sostanze non volatili lasciate dopo l'evaporazione dell'etanolo: composti diversi come gli acidi tartarico, malico e lattico, la glicerina, i pigmenti, i tannini, le sostanze minerali e gli zuccheri, anche se questi ultimi contribuiscono più correttamente all'estratto secco apparente, potendo generare altro etanolo.

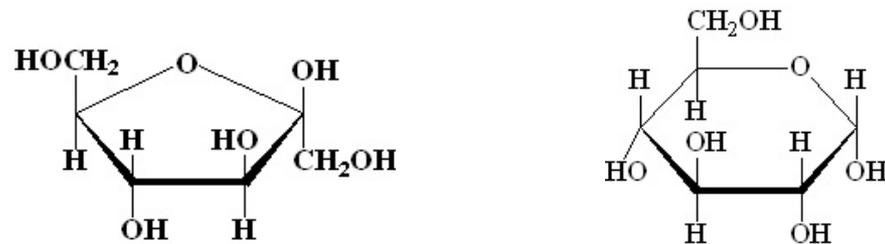
L'estratto secco netto, il cui valore si esprime in g/l, è legato al tipo di vino ed alla tecnica di vinificazione. I vini rossi, a causa della presenza delle antocianine e dei tannini, hanno solitamente un estratto superiore a quello dei bianchi.

L'estratto secco netto è uno dei parametri previsti dai disciplinari dei vini D.O.C. e D.O.C.G., ed entra quindi a far parte degli elementi di giudizio sulla genuinità. Ciò è particolarmente vero per quanto riguarda la correlazione fra il valore dell'estratto e il valore delle ceneri di un vino. Infatti il contenuto in ceneri di un vino è normalmente circa 1/10 del valore dell'estratto secco netto. La determinazione si effettua per densitometria, misurando la differenza tra la densità del campione di vino e quella del distillato alcolico (privo delle sostanze che compongono l'estratto). Nell'effettuare la determinazione, è necessario porre attenzione a non arricchire il distillato in sostanze debolmente volatili come l'acido malico, il glicole etilenico o la stessa acqua

Composizione chimica: zuccheri

GLUCOSIO E FRUTTOSIO

Rappresentano una parte importante del mosto e quindi del vino e sono costituiti principalmente da fruttosio (levulosio) e glucosio (destrosio).



I due zuccheri vengono fermentati dai lieviti naturalmente presenti nel mosto con produzione di etanolo; quando la fermentazione è terminata non sono più presenti o si ritrovano in tracce. Altri zuccheri piranosidici nel mosto sono il ramnosio, l'arabinosio e lo xilosio

Oltre ai monosaccaridi citati, nell'uva sono presenti disaccaridi come il saccarosio (fruttosio + glucosio) e polisaccaridi come la pectina (acido galatturonico) e le gomme (arabinosio, galattosio).

Secondo il tenore di zuccheri presenti i vini vengono classificati come secchi, amabili, dolci, ecc.;

ovviamente i vini dolci e liquorosi contengono una quantità di zuccheri non fermentati più elevata che ne conferisce il sapore dolce.

Composizione chimica: zuccheri

GLUCOSIO E FRUTTOSIO

Glucosio e fruttosio nel mosto si trovano inizialmente in quantità pressoché uguali per cui il loro rapporto varia tra 0.7 e 1.1, a seconda di fattori come il grado di maturità delle uve, le condizioni climatiche e naturalmente la varietà di uva.

Durante la fermentazione alcolica, il glucosio viene consumato per primo dai lieviti: ciò comporta una sua diminuzione e il rapporto fra i due zuccheri, al procedere della fermentazione, si allontana sempre di più dall'unità, fino ad arrivare alla fine attorno a 0.25.

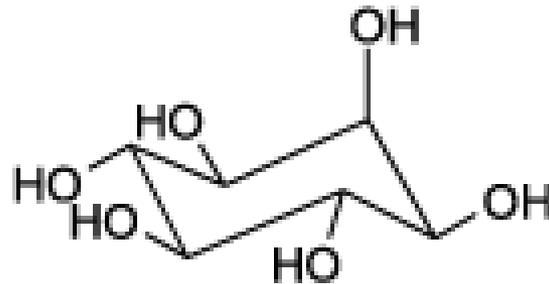
Nel caso di vini dolci e nei casi in cui non è consentita la dolcificazione, il valore di questo rapporto può rappresentare un elemento di controllo della genuinità

Nel vino non è presente naturalmente il saccarosio. Le piccole quantità che si trovano nell'uva all'atto della spremitura spariscono rapidamente nel giro di qualche ora per idrolisi, quindi un'eventuale addizione fraudolenta è difficile da rivelare. Nei casi sospetti, la ricerca del saccarosio e dei suoi derivati di idrolisi (glucosio e fruttosio) è uno dei parametri di controllo della genuinità

Composizione chimica: zuccheri

INOSITOLO

Sempre nell'ambito del controllo della genuinità, un elemento di notevole valore diagnostico è costituito dalla presenza di due composti che vengono collocati nel quadro zuccherino naturale dei vini: mio-inositolo e scillo-inositolo. La determinazione del contenuto di questi due polialcoli ciclici e il rapporto fra le loro concentrazioni assume un significato rilevante agli effetti del controllo della genuinità



mio-inositolo



scillo-inositolo

Composizione chimica: zuccheri

Determinazione
zuccheri
riducenti:
metodo classico

La determinazione degli zuccheri si può effettuare con tecniche diverse.

Una determinazione classica è quella degli *zuccheri riducenti*: essendo il glucosio e il fruttosio composti riducenti in virtù del gruppo alcolico e del gruppo aldeidico, è possibile determinarne la quantità totale (comprensiva anche dei pentosi, zuccheri non fermentabili ma ugualmente riducenti) mediante il *metodo di Rebelein* che consiste nel fare reagire gli zuccheri con una soluzione di Cu^{2+} in ambiente basico:

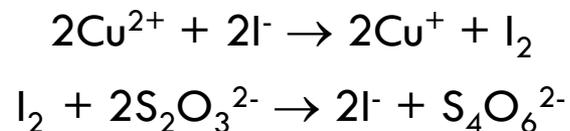


Lo ione Cu^{2+} è addizionato in quantità nota sotto forma di *reattivo di Fehling*, composto da due soluzioni di cui una contenente $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e l'altra contenente tartrato di sodio e potassio in idrossido di sodio.

Composizione chimica: zuccheri

Determinazione
zuccheri
riducenti:
metodo classico

Dopo la reazione redox, l'eccesso di Cu^{2+} è fatto reagire con KI in ambiente di H_2SO_4 e si titola lo iodio sviluppatosi con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in presenza di indicatore salda d'amido:

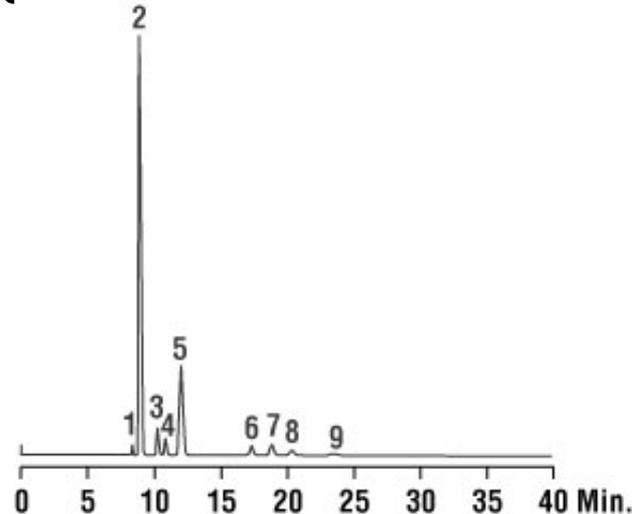


Per l'analisi dei vini rossi o di vini ricchi di polifenoli è bene eliminare i polifenoli stessi con carbone attivo, per evitare interferenze positive nella determinazione.

Composizione chimica: zuccheri

Determinazione
zuccheri
riducenti:
metodo HPLC

La separazione cromatografica degli zuccheri è possibile con HPLC su colonna di silice con gruppi aminici e fase mobile acqua/acetonitrile. Per la rivelazione si impiega normalmente il detector a indice di rifrazione, basato sulla capacità di una sostanza in soluzione di deviare un raggio luminoso; in alternativa, essendo gli zuccheri composti riducenti in virtù del gruppo alcolico e del gruppo aldeidico, è possibile utilizzare un rivelatore amperometrico pulsato (PAD) nel quale i vari composti separati sono sottoposti ad una reazione elettrochimica



1. iso-Eritritolo
2. Fruttosio
3. Sorbitolo
4. Mannitolo
5. Glucosio
6. Inositolo
7. Saccarosio
8. Maltitolo
9. Maltosio

Composizione chimica: zuccheri

Table 4. Mean Content (mg/L), Minimum, Maximum and Standard Deviation of Free Monosaccharides and Some Amino Acids Evaluated by HPAEC-PAD in Red ($n = 21$) and White ($n = 11$) Wines

| compound | red wine ^a | | | white wine ^b | | |
|----------------|-----------------------|------|---------------|-------------------------|-----|---------------|
| | min | max | mean \pm SD | min | max | mean \pm SD |
| arabinose | 35 | 120 | 72 \pm 16 | 5 | 40 | 18 \pm 18 |
| galactose | 22 | 85 | 48 \pm 18 | 10 | 65 | 26 \pm 14 |
| glucose | 5 | 220 | 62 \pm 40 | 20 | 162 | 124 \pm 60 |
| xylose | 5 | 45 | 14 \pm 9 | 5 | 27 | 10 \pm 9 |
| fructose | 23 | 315 | 122 \pm 75 | 25 | 178 | 148 \pm 65 |
| threonine | 3 | 30 | 16 \pm 6 | 10 | 32 | 26 \pm 6 |
| proline | 470 | 1190 | 870 \pm 192 | 168 | 286 | 208 \pm 32 |
| hydroxyproline | 100 | 240 | 170 \pm 45 | 40 | 112 | 96 \pm 55 |

^a All red wines were obtained from local producers of Aglianico red grapes, kindly supplied by Azienda Agricola Patemoster and Azienda Agricola Mustilli. ^b White wines were always DOC (controlled and guaranteed denomination of origin) wines collected from producers in the South of Italy.

J. Agric. Food Chem., Vol. 51, No. 13, 2003

Analisi di zuccheri riducenti ed aa in campioni di vino mediante cromatografia liquida a scambio anionico (HPAEC) accoppiata a detector amperometrico pulsato (PAD).

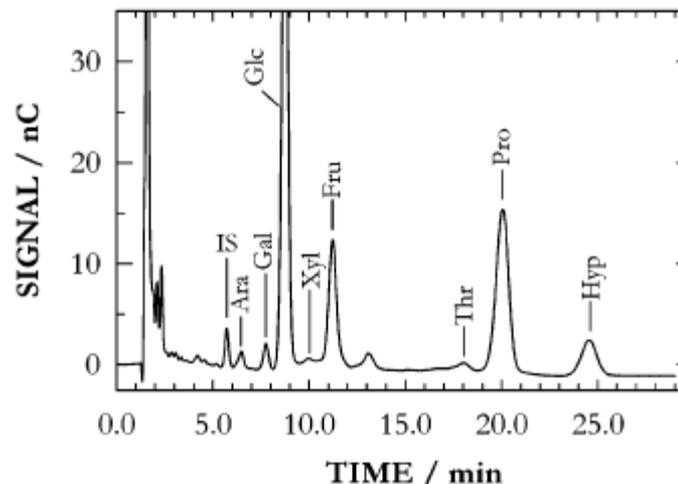


Figure 4. HPAEC-PAD separation of a white wine sample, Pipoli 2000. Sample diluted 25-fold before injection. Other conditions as those for Figure 1.

Composizione chimica: acidi

Oltre ai parametri di acidità, è utile la determinazione dei singoli acidi organici, in quello che è noto come il quadro acido.

I principali acidi che lo compongono sono i seguenti:

- Acido tartarico, l'acido caratteristico dell'uva, in parte perso per precipitazione come potassio bitartrato
- Acido malico, la cui concentrazione è limitata nei vini rossi dalla fermentazione malo-lattica
- Acido citrico, la cui presenza è artificiale se al di sopra di 800 mg/l
- Acido succinico, formato dalla fermentazione alcolica
- Acido lattico, formato dalla fermentazione malo-lattica
- Acido acetico, formato dall'ossidazione dell'acetaldeide e dalla fermentazione acetica

Acidi minori sono il formico, l'ossalico, il piruvico e il gluconico

Composizione chimica: acidi

Metodo
tradizionale:

Acidità totale
titolazione

La determinazione **dell'acidità totale** del vino prevede la quantificazione delle specie acide (acidi fissi e volatili) nel vino mediante una titolazione con base forte (KOH 0.25N) e con individuazione del punto di equivalenza (pH 7.0) mediante potenziometro.

Tale misura tiene in considerazione appunto tutte le specie acide e si esprime in mg/L di acido tartarico.

Normalmente tale valore, nei vini, è compreso tra 4 e 12. Se sono sopravvenute alterazioni che hanno aumentato l'acidità volatile, anche quella totale risulterà aumentata.

L'acidità titolabile può anche essere espressa in meq di base per L di bevanda. Normalmente allora il suo valore è compreso tra 53 e 160 meq/L.

Composizione chimica: acidi

Metodo
tradizionale:

Acidità volatile
distillazione in
corrente di
vapore e
titolazione

L'acidità volatile (g/L acido acetico) è costituita dall'insieme degli acidi appartenenti alla serie acetica, separabili per estrazione in corrente di vapore, presenti nel vino sia allo stato libero che salificato.

L'acidità volatile è costituita principalmente dall'acido acetico, ma comprende anche i suoi omologhi superiori come l'acido propionico e l'acido butirrico.

L'anidride carbonica e l'anidride solforosa non sono valutate: la prima viene eliminata prima della titolazione, mentre l'acidità dovuta all'anidride solforosa viene sottratta dall'acidità del distillato.

Il metodo ufficiale CEE prevede :

1. Eliminazione dell'anidride carbonica.
2. Separazione degli acidi volatili per trascinalamento in corrente di vapore.
3. Titolazione volumetrica dell'acidità ; occorre detrarre l'acidità dovuta all'anidride solforosa libera e combinata.

Esistono sistemi dedicati per la distillazione in corrente di vapore dei vini, un esempio è rappresentato dall'Acidimetro di lozzi. Con tale apparecchiatura si ottiene un distillato, a partire da un volume fisso di vino in esame, che verrà sottoposto a titolazione con base forte (KOH 0.1N) e viraggio della fenolftaleina.

Composizione chimica: acidi

Detrazione dell'anidride solforosa:

Al distillato già titolato, dopo raffreddamento, si aggiunge una soluzione acida (acido solforico diluito 1:4 oppure HCl) e salda d'amido.

Si titola con I_2 0,1 o 0.01N fino a viraggio al blu l'anidride solforosa libera quindi si aggiunge una soluzione acquosa satura di borato di sodio (pH alcalino) e si sposta l'anidride solforosa legata che verrà successivamente titolata.

Si indicano con m i ml impiegati.

Considerando ora i volumi di I_2 utilizzati nella determinazione della SO_2 libera e legata si potrà correggere il valore di acidità volatile.

I valori di riferimento indicati dalla normativa europea sono i seguenti:

| VINI | Limite massimo in meq/l di acido acetico | Limite massimo in g/l di acido acetico |
|---------|--|--|
| Bianchi | 18 | 1,08 |
| Rossi | 20 | 1,20 |

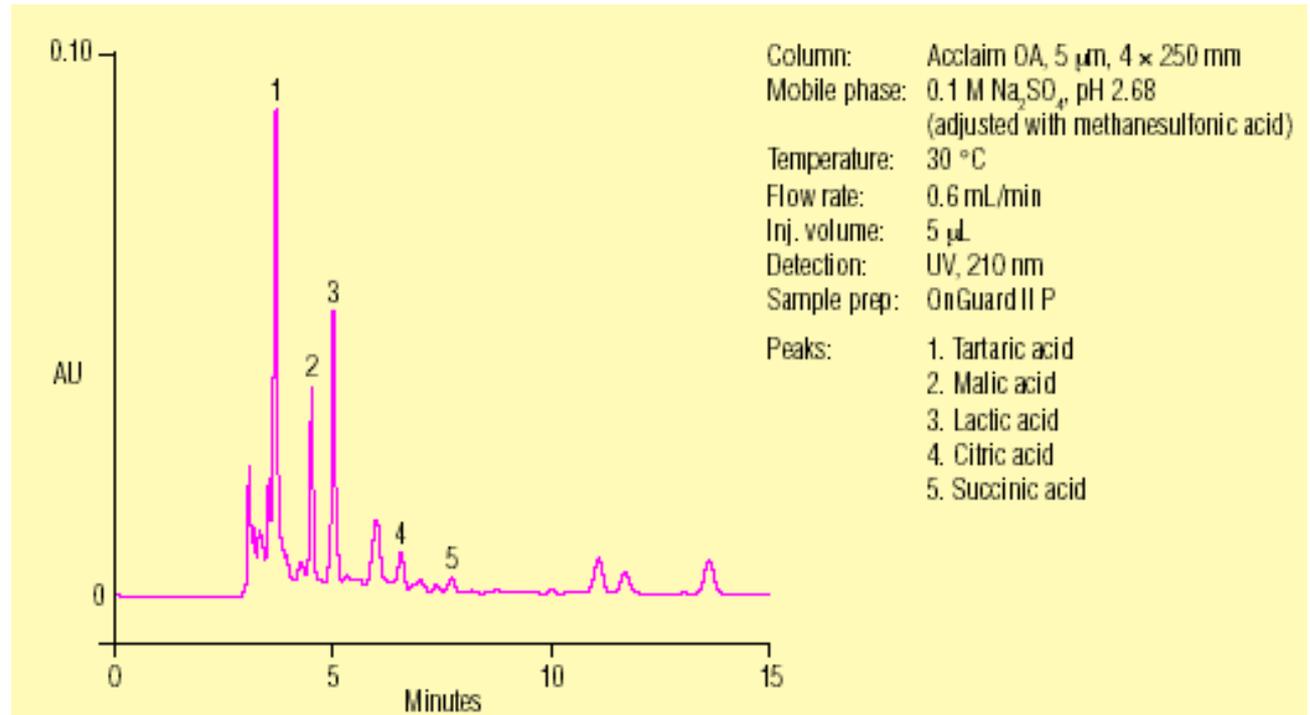
Tali valori sono decisamente elevati: i valori normali variano generalmente tra $0.40 \div 0.60$ g /l di acido acetico .



Composizione chimica: acidi

Metodi cromatografici

La determinazione del quadro acido si effettua con tecniche cromatografiche. Si può utilizzare la cromatografia HPLC, separando gli acidi in forma protonata e quindi meno polare, su una colonna C18 con fase mobile acqua/acetonitrile oppure solo acquosa, e rivelazione spettrofotometrica a 210 nm

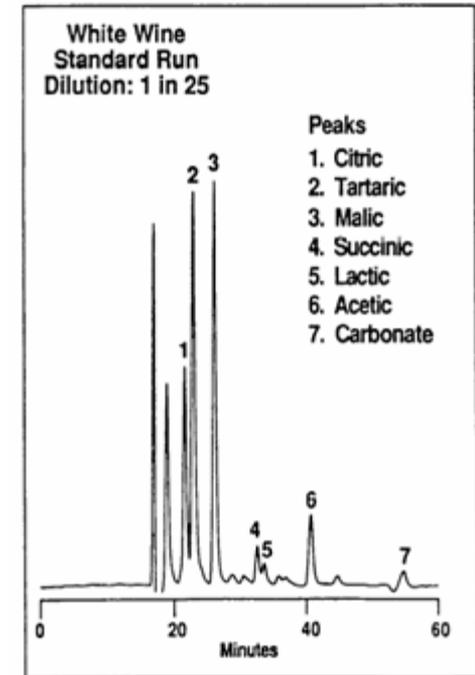
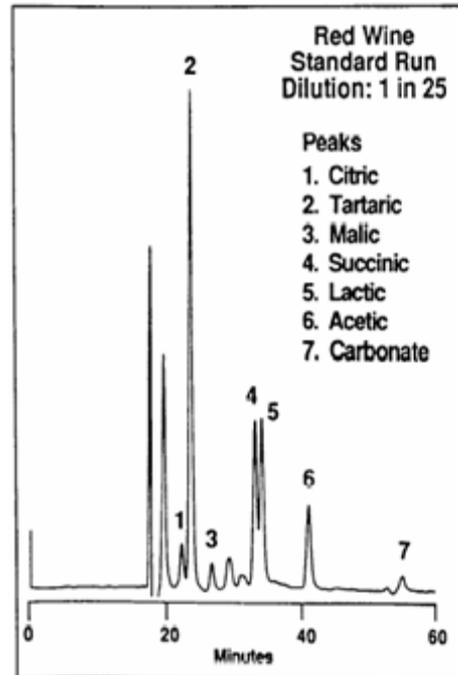


Composizione chimica: acidi

Metodi cromatografici

Altra tecnica impiegata è la cromatografia ionica. In questa tecnica, gli acidi sono separati in forma parzialmente ionizzata, utilizzando una variante nota come esclusione ionica. Si utilizza acido eptafluorobutirrico come fase eluente e rivelazione conducimetrica. Gli acidi sono eluiti in ordine di pK crescente, ovvero gli acidi più forti per primi e gli acidi più deboli per ultimi.

Normalmente si effettua una diluizione 1:25-1:50 del campione per ridurre la possibilità di interferenze da parte di sostanze fenoliche; inoltre, essendo la concentrazione di acido tartarico molto elevata, la diluizione ne riporta il livello a valori opportuni.



Composizione chimica: polifenoli

Dopo i carboidrati e gli acidi, i polifenoli o composti fenolici sono il gruppo più abbondante di costituenti chimici dell'uva. Nel vino hanno un ruolo importantissimo: innanzitutto sono responsabili delle differenze tra vini bianchi e vini rossi, soprattutto per colore e aroma, in particolare contribuendo al gusto amaro e all'astringenza del vino; in secondo luogo, hanno proprietà antiossidanti e battericide, particolarmente gradite dal punto di vista salutistico; infine hanno un ruolo primario nella conservazione e nell'invecchiamento del vino

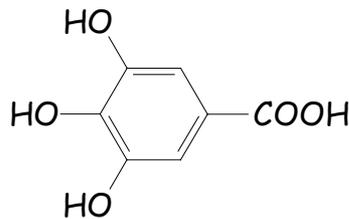
A livello macroscopico, i polifenoli rappresentano la parte colorata e colorante del vino. Sono composti contenuti nella buccia dell'uva e la loro presenza nel vino dipende dalla tecnica di vinificazione. Il contatto più o meno prolungato del mosto con le bucce ne determina il contenuto nel mosto e quindi nel vino. In base al contenuto di polifenoli si possono classificare i vini come bianchi, rosati, rossi, rossissimi e torchiati. I vini bianchi hanno un contenuto in polifenoli inferiore rispetto ai vini rossi

Composizione chimica: polifenoli

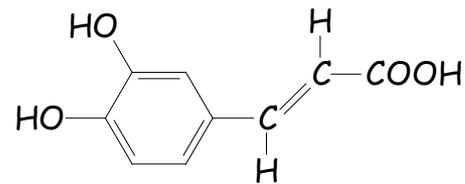
Vini bianchi

Nella vinificazione in bianco, essendo ridotto il contatto con le bucce, passano nel vino principalmente i polifenoli contenuti nella polpa, che sono prevalentemente di tipo non flavonoidico.

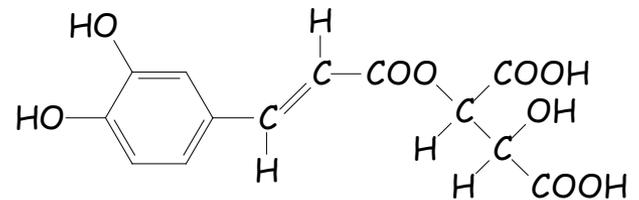
Prevalgono infatti gli acidi idrossibenzoici (acido gallico, vanillico, siringico, salicilico, gentisico), gli acidi idrossicinnamici (acido cumarico, caffeico, ferulico) e i loro esteri con l'acido tartarico (acido coutarico, caftarico, fertarico) che sono i polifenoli maggiori nei vini bianchi.



Acido gallico



Acido caffeico

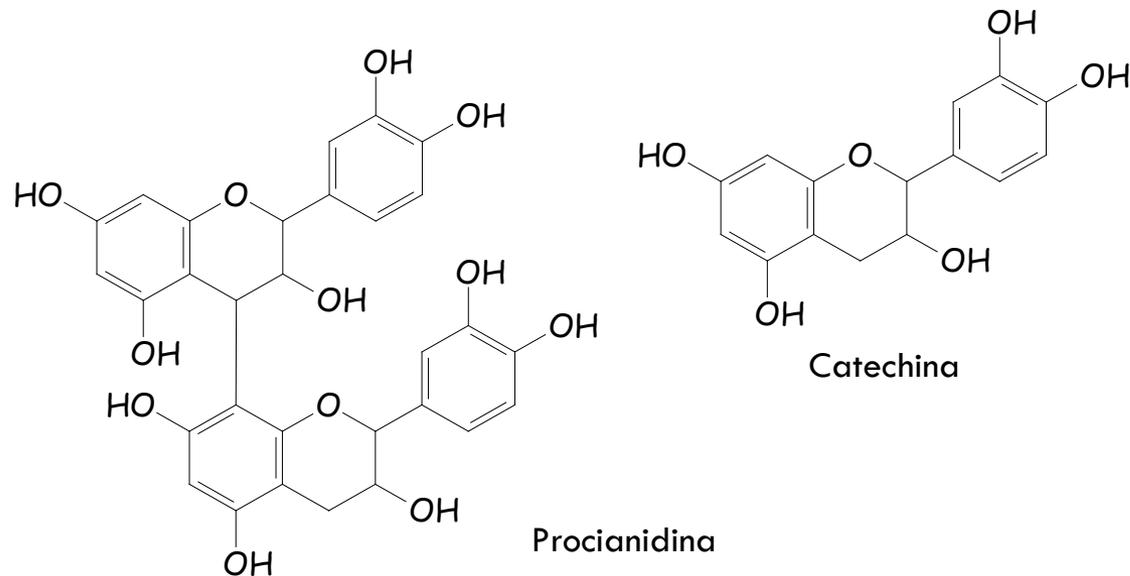


Acido caftarico o trans-caffeoiltartarico

Composizione chimica: polifenoli

Vini bianchi

Oltre ai non flavonoidi, sono presenti polifenoli a struttura flavonoidica chiamati flavan-3-oli, tra cui prevalgono la catechina e l'epicatechina, composti che contribuiscono significativamente al profilo sensoriale. Derivati delle catechine sono le procianidine e gli esteri con l'acido gallico.



Composizione chimica: polifenoli

Vini rossi

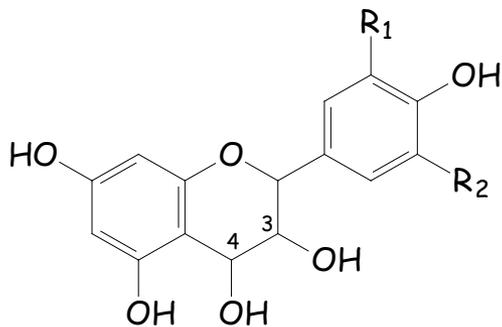
Nella vinificazione in rosso sono presenti tutti i polifenoli citati più altre famiglie di composti flavonoidi che sono contenuti in prevalenza nelle bucce.

Flavan-3,4-dioli o leucoantocianidine;

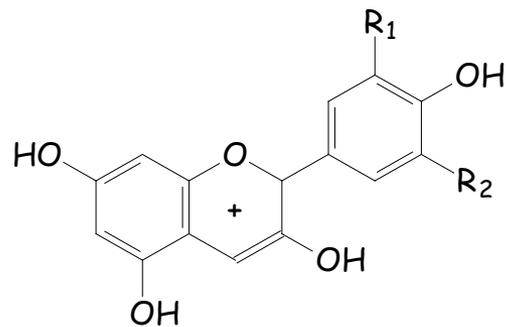
Flavonoli, composti che hanno quasi sempre un residuo di glucosio, tra cui la quercetina, la miricetina e il kaempferolo;

Antociani, i composti per eccellenza legati al colore del vino rosso;

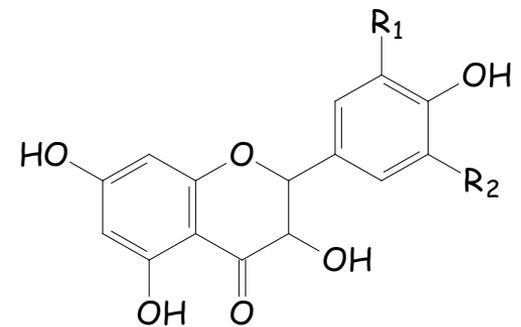
Tannini, composti polimerici di origine anche non flavonoidica e di grande importanza nelle caratteristiche organolettiche dei vini, in particolare di quelli invecchiati.



Flavan-3,4-diolo



Antocianina



Flavonolo

Composizione chimica: polifenoli

Determinazione
polifenoli:

Reattivo di
Folin-Ciocalteu

Come per gli zuccheri e per l'acidità, la determinazione dei polifenoli ha significato a livello dei singoli composti oppure sull'insieme dei composti della medesima famiglia.

Per quanto riguarda la determinazione totale dei composti fenolici, il metodo più noto è quello dell'Indice di Folin-Ciocalteu, nel quale si utilizza la spettrofotometria UV-visibile. Si utilizza il reattivo di Folin-Ciocalteu (miscela di acido fosfotungstico, $H_3PW_{12}O_{40}$, e acido fosfomolibdico, $H_3PMo_{12}O_{40}$) che in presenza di composti fenolici si riduce a miscela di ossidi di tungsteno e molibdeno (W_8O_{23} e Mo_8O_{23}); la colorazione blu sviluppata ha un massimo di assorbimento a 750 nm. Convenzionalmente il risultato della misura spettrofotometrica si esprime in **mg di acido gallico per litro di vino (GAE)**.

Il metodo è molto pratico da eseguire, anche se ha scarsa selettività, in quanto misura il numero di gruppi fenolici presenti nel campione, quindi anche quelli dei monoidrossifenoli, ed è inoltre sensibile a sostanze facilmente ossidabili come l'acido ascorbico, l'anidride solforosa e gli zuccheri riducenti nei vini dolci.

Composizione chimica: polifenoli

Determinazione
polifenoli:

Metodi
cromatografici

La determinazione dei singoli polifenoli è piuttosto complessa, in quanto non ci sono reazioni selettive che si possano sfruttare per effettuare ad esempio misure spettrofotometriche. La tecnica più idonea a determinare singolarmente i composti fenolici è la cromatografia, e in particolare, essendo i polifenoli composti non volatili, la tecnica HPLC.

Esistono metodi di separazione HPLC che consentono di determinare un quadro polifenolico abbastanza ampio, anche se mai esaustivo: abbiamo visto come sotto la denominazione polifenoli rientrino in realtà composti piuttosto diversi, che dal punto di vista cromatografico hanno comportamento sicuramente differente. Per cui la separazione cromatografica è possibile per alcuni dei più importanti composti fenolici, generalmente impiegando metodi in gradiente, che consentono nella stessa corsa cromatografica di modificare le caratteristiche della fase mobile in modo da includere nella separazione famiglie diverse di polifenoli.

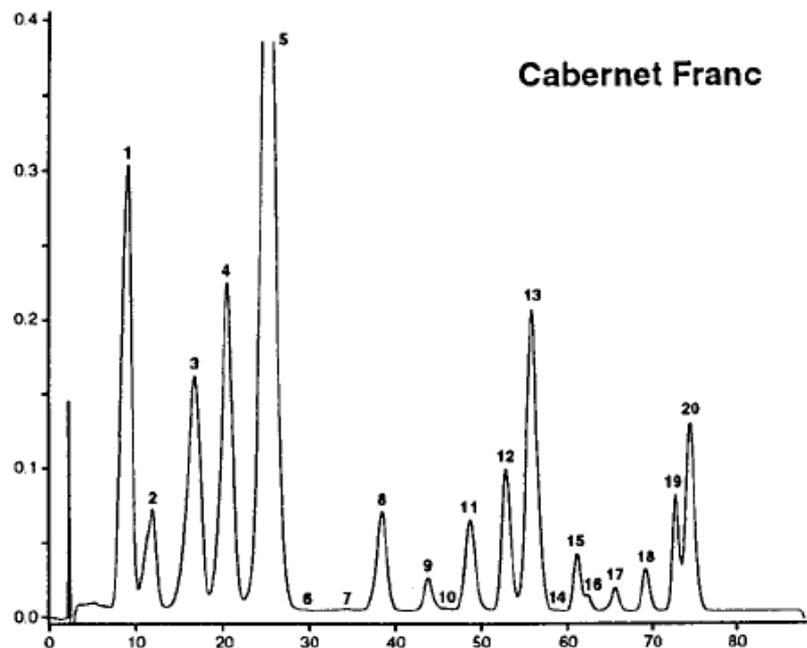
In alternativa, esistono metodi di pretrattamento che consentono di isolare una o più famiglie di polifenoli che possono essere poi determinate con maggiore accuratezza

Composizione chimica: polifenoli

Determinazione
polifenoli:

Metodi
cromatografici

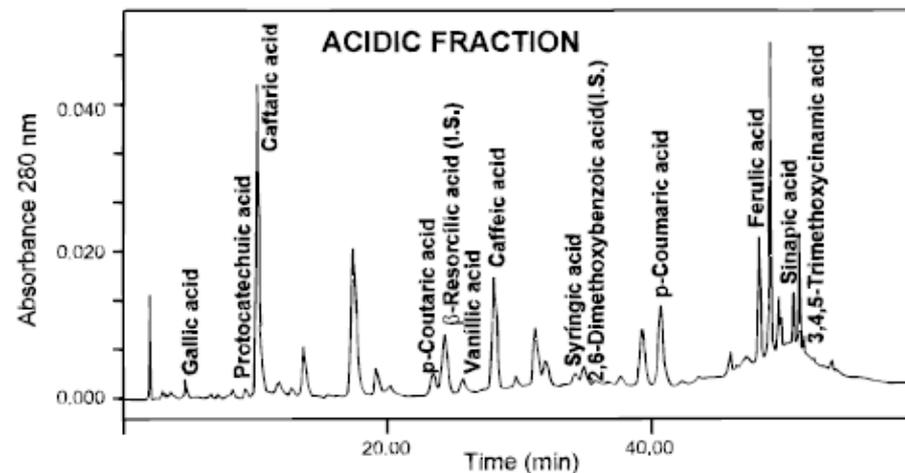
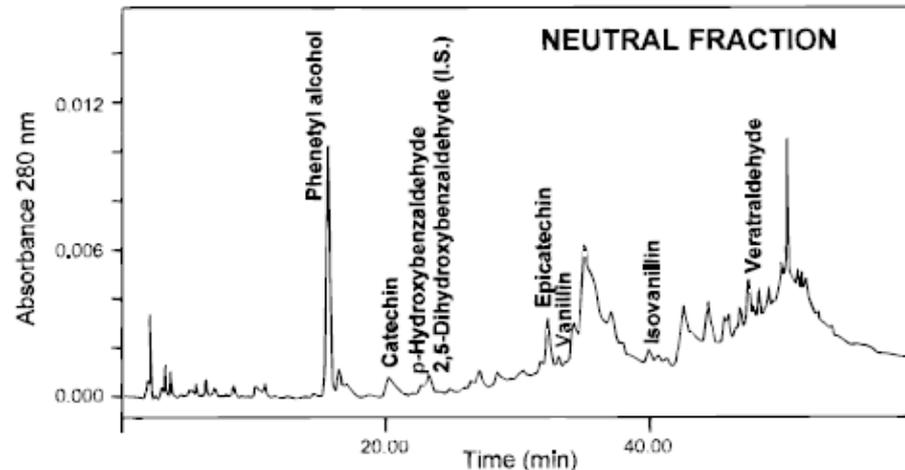
In questo esempio è riportato il cromatogramma di un estratto di bucce di Cabernet Franc in cui le antocianine sono state separate su colonna C18 (fase mobile acqua/metanolo/acido formico). La rivelazione è spettrofotometrica (UV/DAD) a 525 nm.



| peak ^b | anthocyanin |
|-------------------|--|
| 1 | delphinidin 3-monoglucoside |
| 2 | cyanidin 3-monoglucoside |
| 3 | petunidin 3-monoglucoside |
| 4 | peonidin 3-monoglucoside |
| 5 | malvidin 3-monoglucoside |
| 6 | unknown |
| 7 | unknown |
| 8 | delphinidin 3-monoglucoside-acetate |
| 9 | cyanidin 3-monoglucoside-acetate |
| 10 | unknown |
| 11 | petunidin 3-monoglucoside-acetate |
| 12 | peonidin 3-monoglucoside-acetate |
| 13 | malvidin 3-monoglucoside-acetate |
| 14 | unknown |
| 15 | delphinidin 3-monoglucoside- <i>p</i> -coumarate |
| 16 | peonidin 3-monoglucoside-cafфеoate |
| 17 | cyanidin 3-monoglucoside- <i>p</i> -coumarate |
| 18 | petunidin 3-monoglucoside- <i>p</i> -coumarate |
| 19 | peonidin 3-monoglucoside- <i>p</i> -coumarate |
| 20 | malvidin 3-monoglucoside- <i>p</i> -coumarate |

Composizione chimica: polifenoli

In questo esempio è riportato il cromatogramma di un vino cherry, sottoposto a clean-up successivo su fase stazionaria C18 e quindi SAX (strong anion exchange), al fine di preconcentrare e separare la frazione acida e neutra dei polifenoli in esso contenuti. L'analisi HPLC-UV/DAD registrata a 280 nm mostra i due profili in cui si possono ritrovare i composti elencati di seguito.



| compd | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| gallic acid | epicatechin |
| protocatechuic acid | syringialdehyde |
| protocatequialdehyde | <i>p</i> -coumaric acid |
| gentisic acid | <i>o</i> -vanillin |
| <i>p</i> -hydroxybenzoic acid | ferulic acid |
| catechin | veratric acid |
| <i>p</i> -hydroxybenzaldehyde | sinapic acid |
| <i>m</i> -hydroxybenzoic acid | <i>o</i> -coumaric acid |
| vanillic acid | 3,4,5-trimethoxycinnamic acid |
| caffeic acid | 3,5-dimethoxybenzaldehyde |
| syringic acid | |
| vanillin | |

Composizione chimica: polifenoli

Nell'immagine riportata si mostra il profilo polifenolico dettagliato (acidi fenolici, flavonoidi e tannini) di un vino rosso Nero d'Avola analizzato mediante una tecnica di cromatografia liquida bidimensionale di tipo comprensive (LCxLC-UV/DAD). In questo caso la possibilità di accoppiare due fasi stazionari la cui selettività è complementare permette di separare tra loro classi di composti la cui ritenzione è piuttosto simile e che una tecnica monodimensionale (HPLC) non avrebbe risolto in modo opportuno.

Quantification of polyphenolic compounds by one-dimensional and comprehensive LC.

| ID | Compounds | Chemical class | Wine 1 | |
|----|-----------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | 1D ($\mu\text{g/mL}$) | 2D ($\mu\text{g/mL}$) |
| 1 | Gallic acid | Benzoic acid-like | 67.8 ± 2.2 | 67.0 ± 1.6 |
| 2 | Procyanidin | Flavan-3-ol-like | - | 38.4 ± 3.3 |
| 3 | Caftaric acid | Cinnamic acid-like | - | 19.2 ± 0.9 |
| 4 | Tyrosol | Phenyl-ethyl alcohol-like | - | 28.8 ± 0.1 |
| 5 | Epicatechin | Flavan-3-ol-like | 28.4 ± 0.1 | 28.3 ± 4.1 |
| 6 | Catechin | Flavan-3-ol-like | 22.0 ± 0.4 | 21.3 ± 2.6 |
| 7 | Caffeic acid | Cinnamic acid-like | - | 16.0 ± 1.6 |
| 8 | Ethylgallate | Benzoic acid ethyl ester-like | - | 13.2 ± 1.1 |
| 9 | Rutin | Flavonol-glycoside-like | - | 5.4 ± 0.6 |
| 10 | Isoquercitrin | Flavonol-glycoside-like | - | 9.9 ± 1.2 |
| 11 | p-Coumaric acid | Cinnamic acid-like | - | 6.9 ± 0.1 |
| 12 | Syringic acid | Flavan-3-ol-like | 3.2 ± 0.2 | - |
| 13 | Syringaldehyde | Flavan-3-ol-like | 0.5 ± 0.2 | - |

P. Dugo et al. / J. Chromatogr. A 1216 (2009) 7483–7487

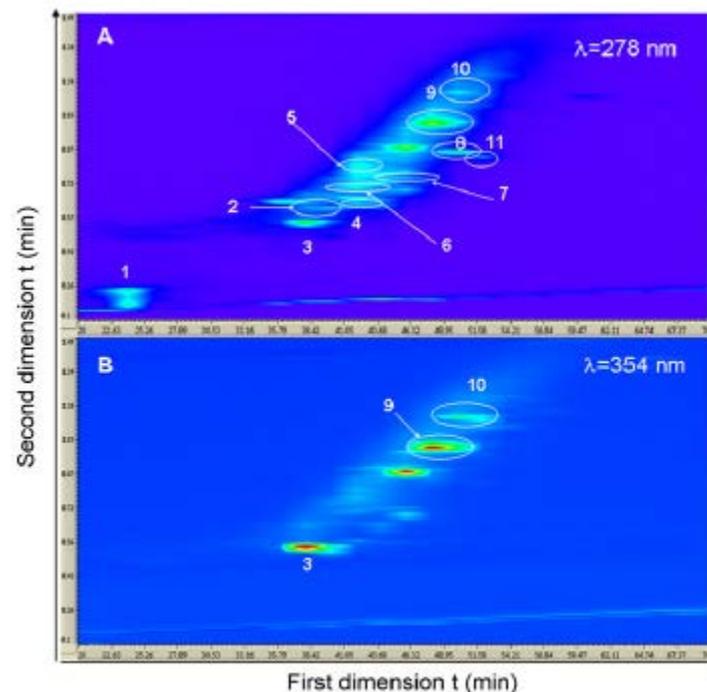
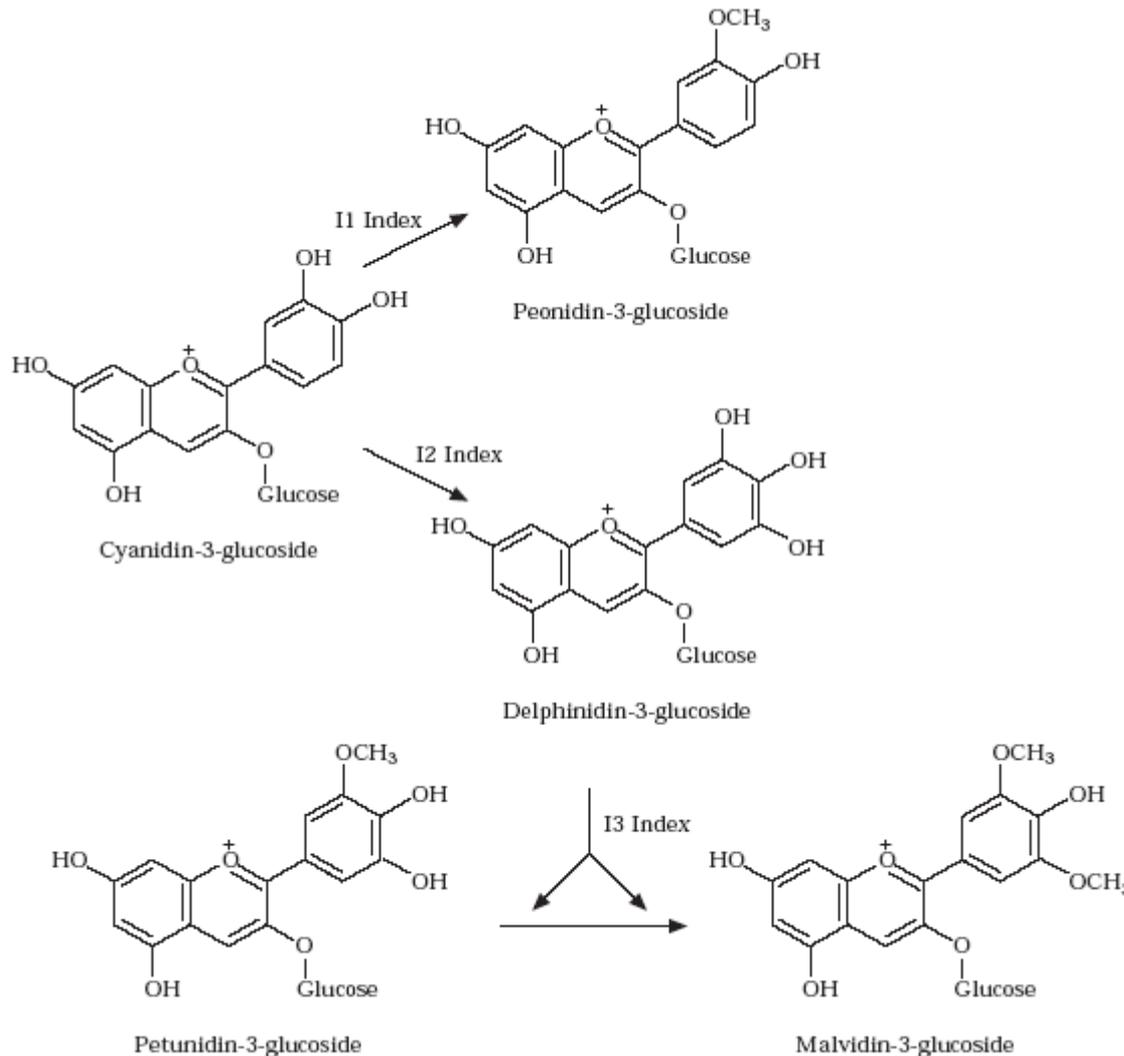


Fig. 2. Two-dimensional plots of wine 3 at 278 nm (A) and 354 nm (B). For identification see Table 3.

Composizione chimica: polifenoli



Gli antociani sono composti polifenolici del gruppo dei flavonoidi.

Essi vengono sintetizzati nelle bucce dell'uva, ai cui frutti impartiscono il colore che, a seconda degli antociani presenti, può essere verde-giallo, rosa, rosso, rosso-violetto, rosso-nero e blu-nero

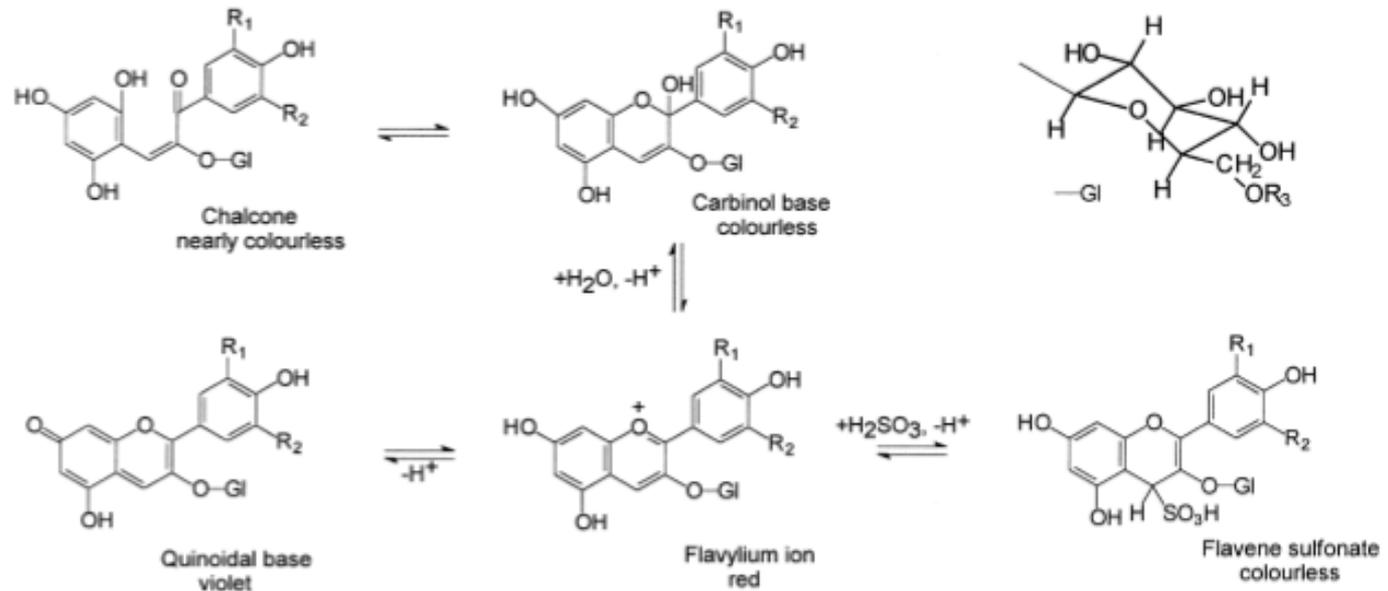
Nell'uva *Vitis vinifera* esistono almeno cinque tipi di antocianine: Cianidina, Delfinidina, Malvidina, Peonidina e Petunidina.

Esistono poi alcuni derivati di questi cinque composti-base, in particolare gli esteri formati dal glucoside con l'acido acetico e p-cumarico.

Composizione chimica: polifenoli

Determinazione antociani

Gli antociani si trovano in strutture diverse a seconda del pH:



A valori di pH < di 1.5 prevale la forma ionizzata dello ione flavilio che ha un massimo di assorbimento caratteristico intorno a 520 nm. Determinazioni spettrofotometriche degli antociani totali si basano infatti su misurazioni a pH controllato.

Composizione chimica: polifenoli

Determinazione resveratrolo

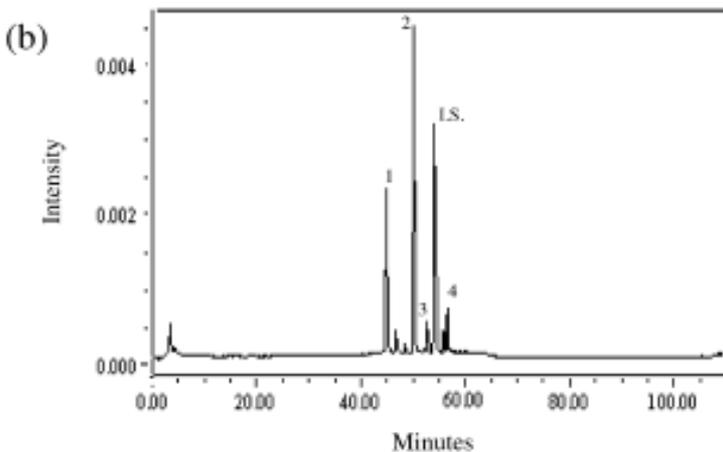
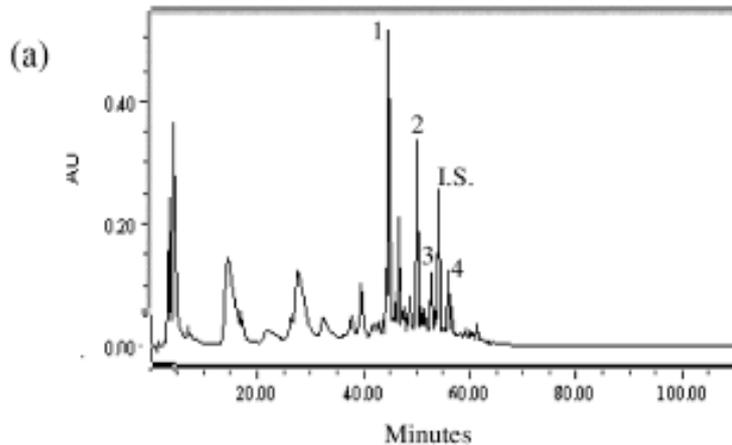
Resveratrolo

Il più importante tra i polifenoli è sicuramente il composto 3,5,4'-triidrossistilbene, più noto come trans-resveratrolo, appartenente alla classe degli stilbeni. Questa sostanza, presente in molte piante ma in misura prevalente nell'uva, è diventata oggetto di numerosissime ricerche per la sua attività biologica (vedi lezione vino).

Dal punto di vista biochimico, la sintesi del resveratrolo (fitoalessina) è indotta nel sistema vegetale in risposta ad infezioni microbiche o stress, ma paradossalmente si produce anche in seguito a trattamenti chimici come l'applicazione di erbicidi e fungicidi, o per esposizione alla luce UV.

Nell'uva, la sintesi del resveratrolo è localizzata prevalentemente nelle cellule della buccia. Nella vinificazione in rosso, quindi, la macerazione con le bucce fa sì che i vini rossi abbiano livelli di resveratrolo maggiori rispetto ai vini bianchi. Il contenuto di resveratrolo nel vino dipende soprattutto dalle caratteristiche genetiche del vitigno e dalle condizioni enologiche. Nei vini americani il livello di resveratrolo è inferiore a 1 mg/l, mentre nei vini europei la concentrazione è maggiore, soprattutto per quelli italiani, francesi e spagnoli.

Composizione chimica: polifenoli



La determinazione quantitativa del resveratrolo nelle sue varie forme (isomeri liberi e glicosilati) si effettua mediante separazione cromatografica con la tecnica HPLC, utilizzando una fase fissa Si-C18 e una fase mobile costituita da un gradiente binario acqua/acetonitrile

L'analisi non si effettua sul campione di vino tal quale, ma su un estratto ottenuto con SPE, facendo passare il campione su una fase adsorbente ed eluendo i composti trattenuti con tetraidrofurano

Utilizzando il convenzionale rivelatore UV-visibile a 305 nm si ottiene il cromatogramma (a), mentre con l'impiego del rivelatore a spettrometria di massa (b) si ha un notevole incremento della sensibilità.

Gli analiti separati sono:

1. trans-resveratrolo glicoside
2. cis-resveratrolo glicoside
3. trans-resveratrolo
4. cis-resveratrolo
5. I.S. standard interno (acido 3,4,5-trimetossicinnamico)

Composizione chimica: una visione d'insieme

Spettroscopia FT-NIR

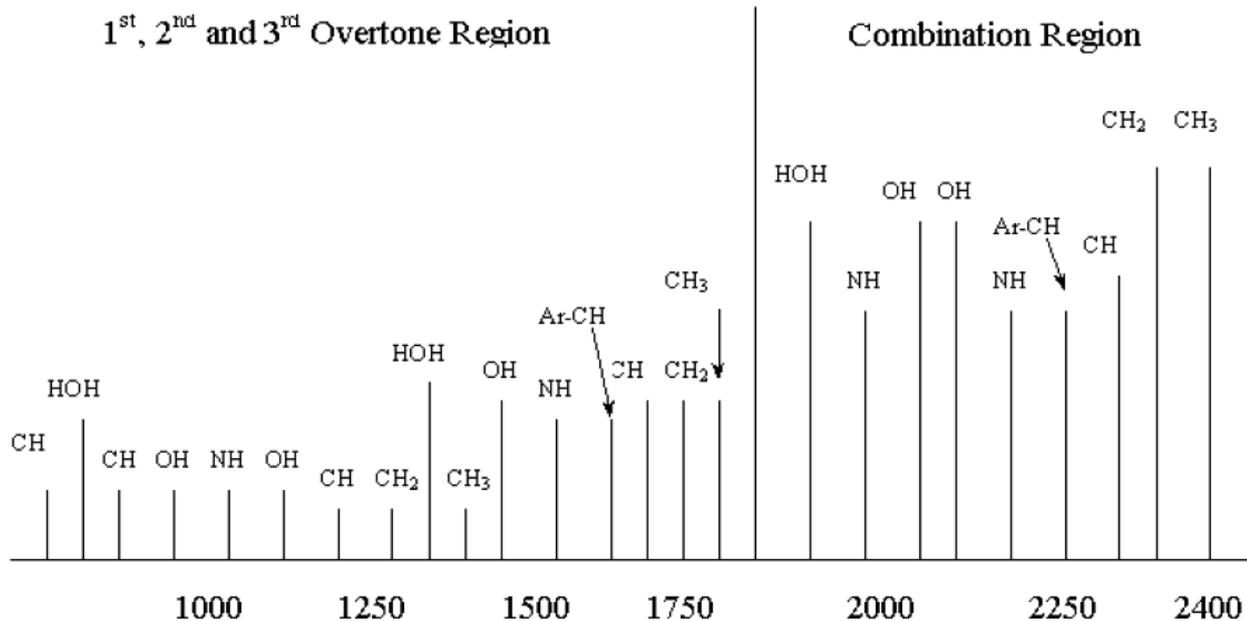
La spettrometria IR e nel vicino infrarosso (NIR) è una tecnica ampiamente utilizzata in campo alimentare.

L'interpretazione (derivata matematica dello spettro e deconvoluzione) e l'elaborazione statistica dei profili spettrali (PCA e PLS), acquisiti nell'intervallo compreso tra 700 e 2500 nm (NIR), di matrici alimentari di varia natura (solide, liquide) permette di stimare indirettamente molti parametri analitici (% umidità, acidità, residuo secco, % di grasso, N totale ecc...).

Correlando infatti i profili NIR di un campione con l'esatto valore del parametro analitico di interesse (o più di uno), determinato per via diretta, è possibile ottenere informazioni compositive in maniera non distruttiva e in tempi molto rapidi.

L'utilizzo del NIR è molto diffuso nell'industria lattiero-casearia dove strumentazione di questo genere ha soppiantato i metodi diretti grazie anche a protocolli di validazione interlaboratorio attivi a livello internazionale che verificano accuratezza a precisione delle misure mediante continue verifiche e ricalibrizioni.

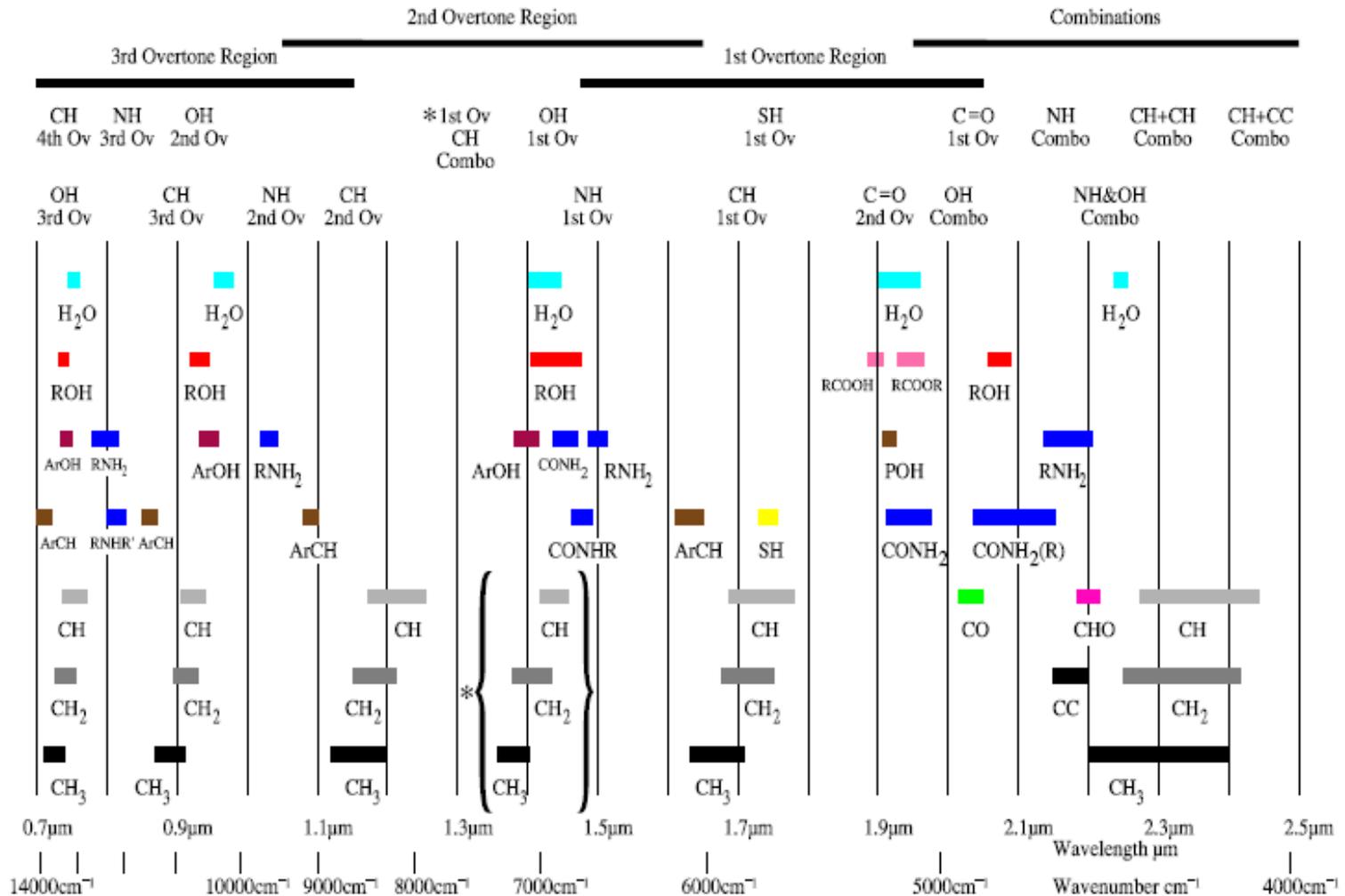
Composizione chimica: una visione d'insieme



Nelle misure NIR si osservano assorbimenti dovuti ad armoniche (overtone) e a bande di combinazione derivanti da interazioni tra più moti vibrazioni. La I assorbita dipende sempre dalla massa degli atomi e dalla forza di legame tra questi, i legami coinvolti sono in genere C-H (grassi, oli ed idrocarburi), O-H (acqua, alcoli), N-H (proteine).

Composizione chimica: una visione d'insieme

Absorption Bands in the Near-Infrared



Composizione chimica: una visione d'insieme

International Journal of Wine Research 2009:1 123–130

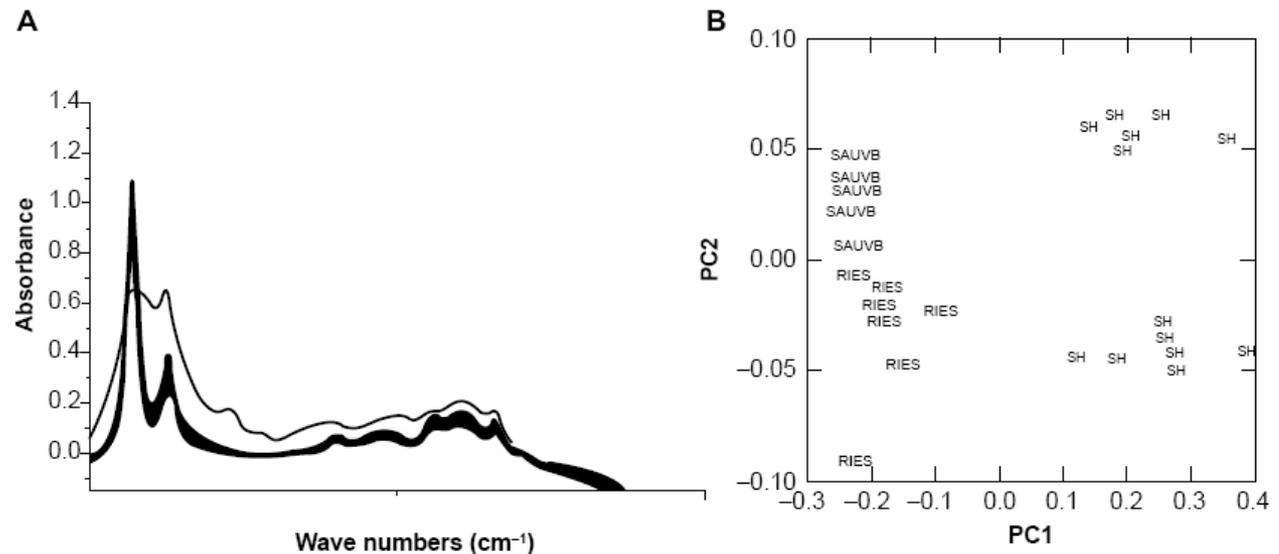


Figure 1 A combination of PCA and rapid methods. **A** the mid-infrared spectra of a set of wine samples, **B** and their principal component scores.
Abbreviations: PCA, principal component analysis; PC, principal component score.

Nel caso di vino, mosti ed estratti di uva è possibile applicare la tecnica FT-NIR accoppiata all'analisi statistica multivariata per determinare (in modo indiretto) parametri compositivi importanti tra i quali: grado alcolico, pH, acidità totale, acidità volatile, singole specie (acido tartarico, malico, citrico, lattico), zuccheri riducenti, glicerolo, antociani totali, polisaccaridi ecc..

Table 2 Use of partial least squares regression combined with instrumental methods to measure chemical compounds in grape and wine samples

| Reference | Parameter | Sample | Instrumental method | SEP |
|-----------|--|------------------------------------|---------------------|-------|
| 40 | Alcoholic degree (% v/v) | Red, rose and white wines | VIS + NIR | 0.24 |
| | Total acidity (meq L ⁻¹) | | | 0.48 |
| | pH | | | 0.07 |
| | Glycerol (g L ⁻¹) | | | 0.72 |
| | Reducing sugars (g L ⁻¹) | | | 0.33 |
| 41 | Sodium (mg L ⁻¹) | White wine | VIS + NIR | 9.22 |
| | Potassium (mg L ⁻¹) | | | 79.0 |
| | Magnesium (mg L ⁻¹) | | | 14.5 |
| | Calcium (mg L ⁻¹) | | | 8.09 |
| 42 | Sugar (Brix) | White varieties (must and wine) | NIR | 0.31 |
| | Malic acid (g L ⁻¹) | | | 1.02 |
| | Lactic acid (g L ⁻¹) | | | 1.34 |
| 18 | Methanol (g L ⁻¹) | Grape spirit | NIR | 0.06 |
| 44 | Alcohol (vol %) | Several varieties and styles | MIR | 0.02 |
| | Alcohol (g L ⁻¹) | | | 1.96 |
| | Volatile acidity (g L ⁻¹) | | | 0.008 |
| | pH | | | 0.01 |
| | Total acid (g L ⁻¹) | | | 0.06 |
| | Fructose (g L ⁻¹) | | | 1.21 |
| | Glucose (g L ⁻¹) | | | 0.49 |
| 43 | Malvidin-3-glucoside (mg L ⁻¹) | Several varieties and styles | Spectroscopy | 0.02 |
| | Total anthocyanins (mg L ⁻¹) | | | 1.96 |
| 45 | Polysaccharides | White wine | MIR | |

Abbreviations: VIS + NIR, visible plus near infrared spectroscopy; MIR, mid infrared spectroscopy; SEP, standard error of prediction.

Composizione chimica: anidride carbonica

Determinazione della CO₂

L'anidride carbonica o biossido di carbonio è un gas che si forma come prodotto secondario durante la fermentazione ed ha un ruolo importante nel ciclo di produzione del vino: durante la fermentazione del mosto mantiene infatti un ambiente favorevole impedendo il contatto con l'ossigeno ambientale. La sua presenza diventa di importanza decisiva nel caso di vini spumanti e frizzanti nei quali l'anidride carbonica diventa elemento distintivo e qualificante. La sua quantità nel prodotto, espressa come pressione in bottiglia, è soggetta a precise norme nazionali e comunitarie.

La determinazione dell'anidride carbonica si effettua per volumetria. Si porta il campione di vino a temperatura prossima a 0°C in una soluzione a titolo noto di NaOH (pH 10-11), nella quale la CO₂ è idratata e convertita ad H₂CO₃. Si titola l'eccesso di NaOH con una soluzione acida in presenza di anidrasi carbonica per catalizzare l'idratazione della CO₂. Il contenuto in CO₂ viene ricavato dal volume di soluzione acida impiegato per passare da pH 8,6 (forma bicarbonato) a pH 4,0 (acido carbonico). Una titolazione di riferimento, effettuata nelle stesse condizioni sul vino privato di CO₂, permette di tener conto del volume di soluzione di NaOH consumato dagli acidi del vino

Composizione chimica: aromi primari, secondari e terziari

Determinazione delle sostanze dell'aroma

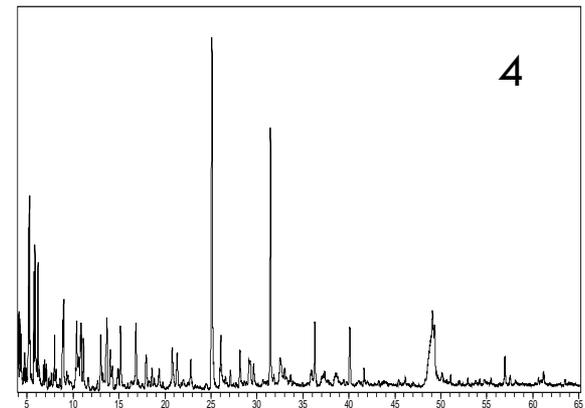
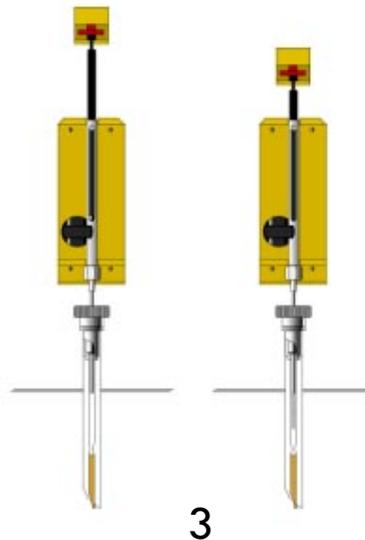
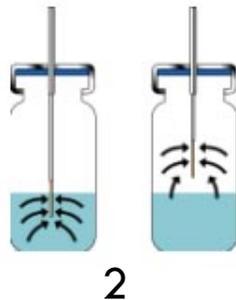
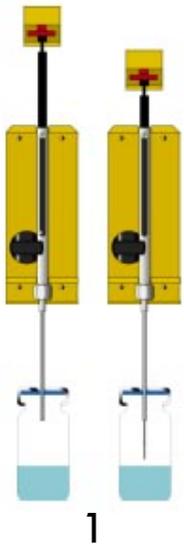
La determinazione delle sostanze volatili si effettua per gascromatografia, impiegando preferenzialmente la versione accoppiata con la spettrometria di massa (GC-MS) che permette di identificare strutturalmente le sostanze volatili presenti nel vino.

Per effettuare l'analisi delle componenti volatili, è bene effettuare un pretrattamento per isolare soltanto la frazione che li contiene ed evitare di inviare in colonna sostanze non volatili (composti fenolici o sostanze inorganiche). Per questo motivo si è soliti estrarre la frazione volatile con un'estrazione liquido-liquido, con metodi SPE (Solid Phase Extraction) oppure con tecniche di spazio di testa (Static headspace, Dynamic headspace, HS-SPME ecc..).

Composizione chimica: aromi primari, secondari e terziari

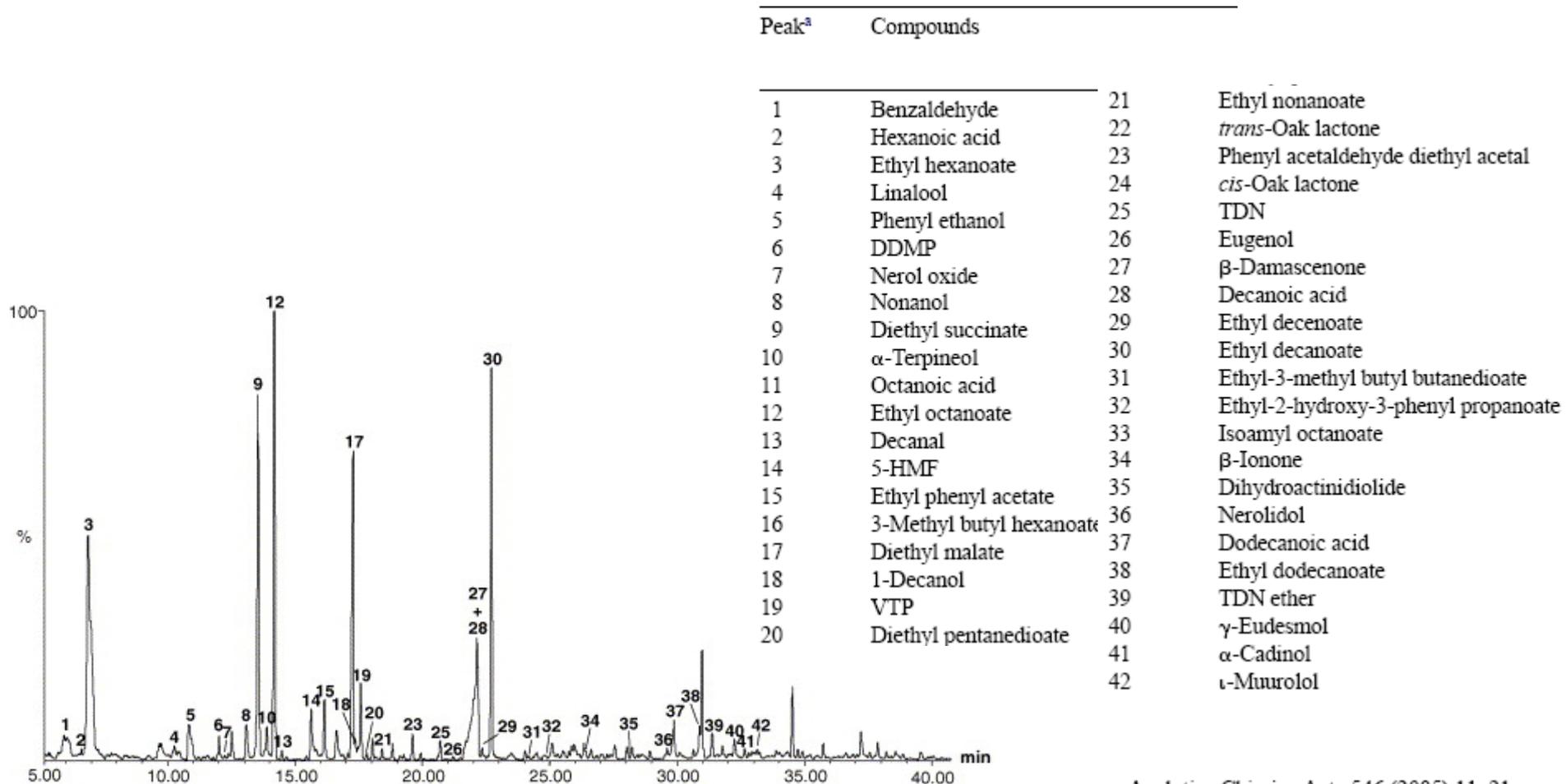
Determinazione
delle sostanze
dell'aroma

Nella microestrazione in fase solida (SPME) una fibra ricoperta di materiale sorbente è immersa nel campione di vino oppure nello spazio di testa in recipiente chiuso (1); le sostanze che hanno affinità per la fase sorbente vengono estratte (2) e possono essere rilasciate per riscaldamento della fibra (3), cosa che può avvenire nell'iniettore di un gascromatografo (4).



Composizione chimica: aromi primari, secondari e terziari

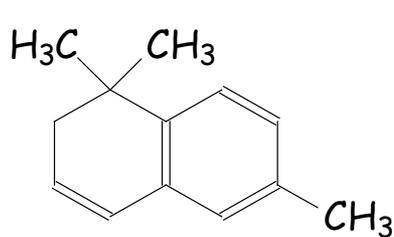
Profilo HS-SPME-GC-MS di vino Madeira.



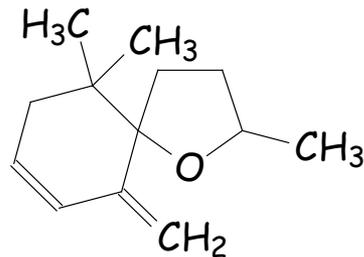
Composizione chimica: aromi primari, secondari e terziari

Determinazione
delle sostanze
dell'aroma

Tra i composti terziari, aromi che si formano durante il processo di invecchiamento del vino in ambiente ossidante (in botte) o riducente (in bottiglia), la nota di kerosene o asfalto, presente in alcuni vini bianchi invecchiati in botti è dovuta alla presenza di norisoprenoidi. In particolare si tratta del vitispirano e dell'1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftalene o TDN, derivati dalla degradazione dei carotenoidi presenti nelle uve.



TDN



vitispirano

Questi composti hanno una soglia olfattiva di 0.8 mg/l e 0.02 mg/l rispettivamente.

Benché la nota di asfalto sia considerata spesso un'imperfezione nei vini bianchi, essa è caratteristica dei *Riesling* invecchiati.

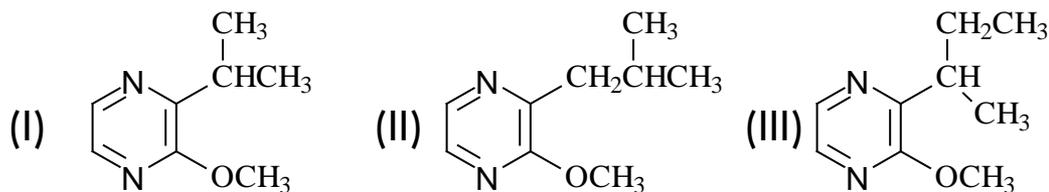
La determinazione di questi composti non è semplice, essendo presenti a concentrazioni molto basse. Normalmente è necessario uno stadio di estrazione per isolare gli analiti dalla matrice, a cui segue l'analisi gascromatografica.

Composizione chimica: aromi primari, secondari e terziari

Determinazione delle sostanze dell'aroma

Le pirazine sono composti aromatici molto interessanti, presenti sia in alcuni alimenti freschi quali piselli e i peperoni verdi ma anche in molte matrici alimentari sottoposte a trattamento termico (il caffè tostato è ricco di molti composti di questa classe).

Nel vino le principali, responsabili di note olfattive caratteristiche sono la: 3-isopropil-2-metossipirazina (I), la 3-isobutil-2-metossipirazina (II) e la 3-sec-butil-2-metossipirazina (III).



Nei vini Sauvignon bianco, Merlot nero, Cabernet sauvignon conferiscono una nota erbacea e di peperone verde in virtù della loro soglia olfattiva estremamente bassa: 1-2 ng/L nei vini bianchi e 10–15 ng/L nei rossi, ovvero l'equivalente di un grappolo su 500.000 tonnellate. Sono quindi sostanze di grande interesse dal punto di vista aromatico; peraltro i consumatori ne gradiscono il contributo nei vini bianchi ma non nei rossi.

Composizione chimica: aromi primari, secondari e terziari

Determinazione delle sostanze dell'aroma

Tali composti, presenti in tracce nei vini sono generalmente analizzati mediante Gascromatografia accoppiata a tecniche di spazio di testa in grado di arricchire la frazione volatile prima dell'analisi. Mediante campionamento per spazio di testa con dispositivo per estrazione in fase solida HS-SPME si può analizzare un ampio spettro di composti volatili che rientrano nella definizione dell'aroma del vino: aromi primari (terpeni), secondari (esteri) e terziari (fenoli, norisoprenoidi, furani, pirazine ecc..).

Ranges of pyrazine contents of the three samples and their evolution throughout the winemaking process of experimental musts and wines

| Samples | Pyrazine (ng/l) | | | | | |
|---------|-----------------|-----------|----------|--------------------|---------|------|
| | Merlot | | | Cabernet sauvignon | | |
| | IBMP | SBMP | IPMP | IBMP | SBMP | IPMP |
| 1 | 3.4–8.6 | 1.0–4.4 | 1.0–3.2 | 1.7–2.9 | – | – |
| 2 | 13.6–24.1 | 12.1–22.5 | 4.7–10.3 | 8.1–12.4 | 1.3–4.8 | – |
| 3 | 17.5–35.1 | 4.5–15.7 | 2.4–7.4 | 10.6–15.5 | 2.4–4.5 | – |
| 4 | 18.8–38.0 | 4.2–15.1 | 2.5–6.1 | 8.2–16.3 | 3.4–5.8 | – |

Samples: (1) musts collected on harvest day; (2) musts collected after 1 day of maceration with the solid parts; (3) wines at the end of alcoholic fermentation; (4) wines at the end of malolactic fermentation. All samples were analysed in duplicate.

Composizione chimica: aromi primari, secondari e terziari

Determinazione
delle sostanze
dell'aroma

C. Sala et al. / J. Chromatogr. A 953 (2002) 1–6

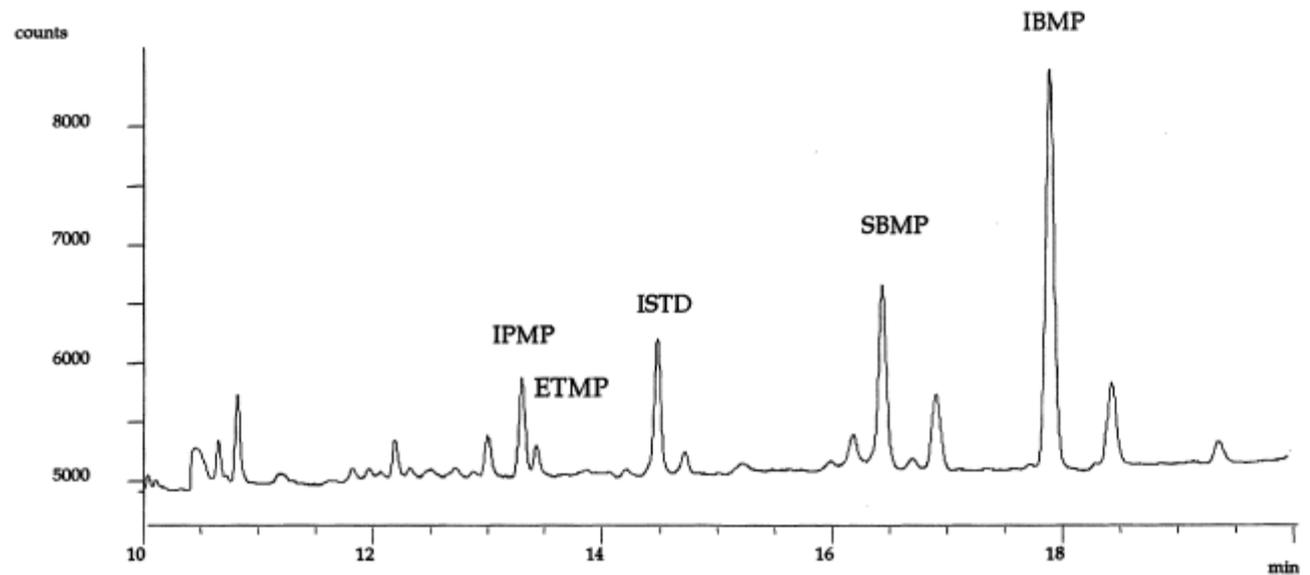


Fig. 1. Chromatogram of a Merlot wine sample analysed using the proposed procedure.

Composizione chimica: aromi primari, secondari e terziari

Table 4

Volatile compound concentrations found in 2006 and 1996 Semillon wines expressed as mgL⁻¹.

| Peak ^a | Analytes | Published White wine | Semillon wine 2006 | |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------|---------|
| | | Concentration ^a | Mean ± SD | RSD (%) |
| 1 | Ethyl butanoate | 0,04–1,00 | 0,27 ± 0,01 | 2 |
| 2 | Ethyl 2-methylpropanoate | 0,00–0,60 | 0,107 ± 0,002 | 2 |
| 3 | Isoamyl acetate | 0,04–6,10 | 0,017 ± 0,001 | 9 |
| 4 | Ethyl 3-methylbutanoate | 0,00–0,04 | 0,0274 ± 0,0003 | 1 |
| 5 | 3-Methyl-1-butanol | 83–400 | 83,2 ± 0,9 | 1 |
| 6 | Ethyl hexanoate | 0,06–0,60 | 0,81 ± 0,02 | 2 |
| 7 | Hexyl acetate | 0,08 | <LOQ | |
| 8 | Ethyl-S-lactate | 3,8–15 | 12,7 ± 0,8 | 6 |
| 9 | 1-Hexanol | 0,50–12 | 0,417 ± 0,003 | 1 |
| 10 | Ethyl octanoate | 1,10–5,10 | 1,14 ± 0,002 | 0 |
| 11 | Methyl octanoate | Not reported | <LOQ | |
| 12 | Ethyl decanoate | 0,90–2,50 | 0,53 ± 0,05 | 9 |
| 13 | Isoamyl octanoate | Not reported | | |
| 14 | cis-3-Hexen-1-ol | 0,10 | | |
| 15 | 2-Phenylethylacetate | 0,25 | | |
| 16 | Ethyl dodecanoate | 0,10–1,20 | | |
| 17 | Hexanoic acid | 1,00–73 | | |
| 18 | 2-Phenylethanol | 50 | | |
| 19 | Methyl decanoate | Not reported | | |
| 20 | Octanoic acid | 2–717 | | |
| 21 | Decanoic acid | 0,5–7 | | |

L. Rebière et al. / *Analytica Chimica Acta* 660 (2010) 149–157

RSD, relative standards deviation; LOQ, limit of quantification.

^a Literature sources: Clarke et al. [34].

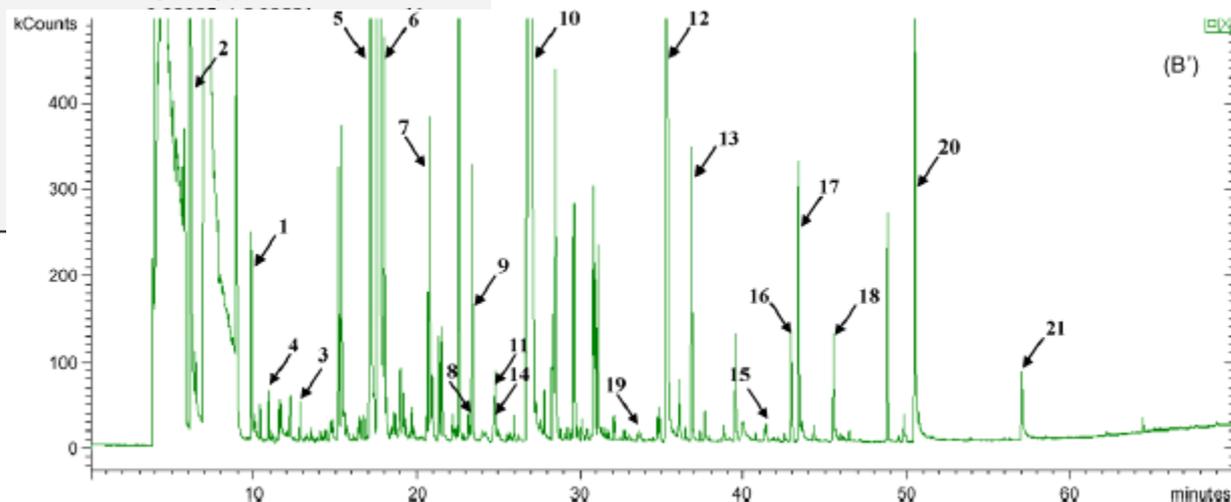


Fig. 4. Total ion chromatogram of Semillon wines: 2006 (A) and 1996 (B and B' with y axes changed) obtained by HS-SPME at the optimal sampling condition. Peak identification: 1, ethyl butanoate; 2, ethyl 2-methylpropanoate; 3, isoamyl acetate; 4, ethyl 3-methylbutanoate; 5, 3-methyl-1-butanol; 6, ethyl hexanoate; 7, hexyl acetate; 8, ethyl-S-lactate; 9, 1-hexanol; 10, ethyl octanoate; 11, methyl octanoate; 12, ethyl decanoate; 13, isoamyl octanoate; 14, cis-3-hexen-1-ol; 15, 2-phenylethylacetate; 16, ethyl dodecanoate; 17, hexanoic acid; 18, 2-phenylethanol; 19, methyl decanoate; 20, octanoic acid; 21, decanoic acid.

Composizione chimica: aromi primari, secondari e terziari

Table 4

Volatile compound concentrations found in 2006 and 1996 Semillon wines expressed as mgL⁻¹.

| Peak ^a | Analytes | Published White wine | Semillon wine 2006 | |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------|---------|
| | | Concentration ^a | Mean ± SD | RSD (%) |
| 1 | Ethyl butanoate | 0,04–1,00 | 0,27 ± 0,01 | 2 |
| 2 | Ethyl 2-methylpropanoate | 0,00–0,60 | 0,107 ± 0,002 | 2 |
| 3 | Isoamyl acetate | 0,04–6,10 | 0,017 ± 0,001 | 9 |
| 4 | Ethyl 3-methylbutanoate | 0,00–0,04 | 0,0274 ± 0,0003 | 1 |
| 5 | 3-Methyl-1-butanol | 83–400 | 83,2 ± 0,9 | 1 |
| 6 | Ethyl hexanoate | 0,06–0,60 | 0,81 ± 0,02 | 2 |
| 7 | Hexyl acetate | 0,08 | <LOQ | |
| 8 | Ethyl-S-lactate | 3,8–15 | 12,7 ± 0,8 | 6 |
| 9 | 1-Hexanol | 0,50–12 | 0,417 ± 0,003 | 1 |
| 10 | Ethyl octanoate | 1,10–5,10 | 1,14 ± 0,002 | 0 |
| 11 | Methyl octanoate | Not reported | <LOQ | |
| 12 | Ethyl decanoate | 0,90–2,50 | 0,53 ± 0,05 | 9 |
| 13 | Isoamyl octanoate | Not reported | | |
| 14 | cis-3-Hexen-1-ol | 0,10 | | |
| 15 | 2-Phenylethylacetate | 0,25 | | |
| 16 | Ethyl dodecanoate | 0,10–1,20 | | |
| 17 | Hexanoic acid | 1,00–73 | | |
| 18 | 2-Phenylethanol | 50 | | |
| 19 | Methyl decanoate | Not reported | | |
| 20 | Octanoic acid | 2–717 | | |
| 21 | Decanoic acid | 0,5–7 | | |

L. Rebière et al. / *Analytica Chimica Acta* 660 (2010) 149–157

RSD, relative standards deviation; LOQ, limit of quantification.

^a Literature sources: Clarke et al. [34].

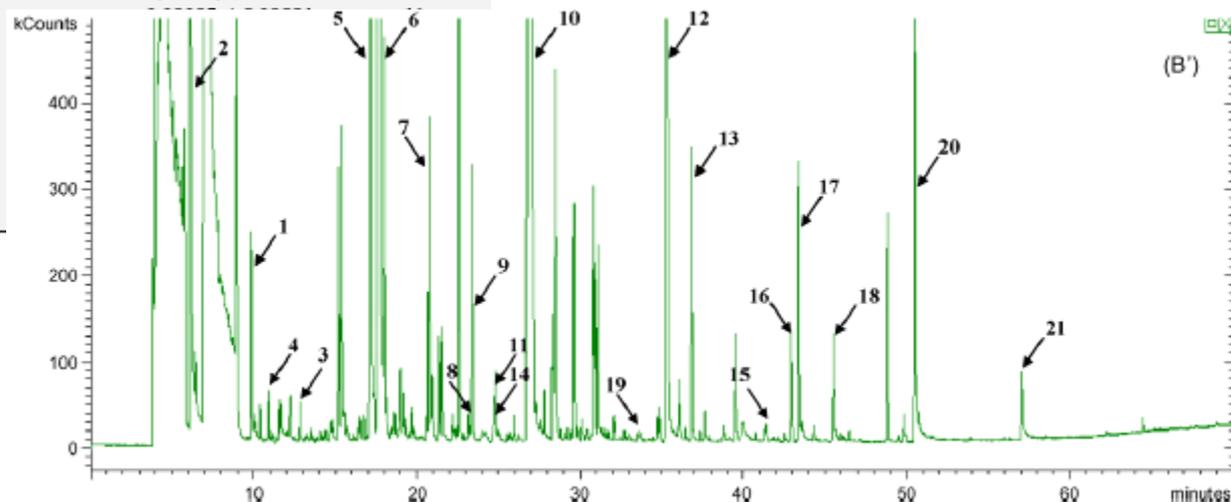


Fig. 4. Total ion chromatogram of Semillon wines: 2006 (A) and 1996 (B and B' with y axes changed) obtained by HS-SPME at the optimal sampling condition. Peak identification: 1, ethyl butanoate; 2, ethyl 2-methylpropanoate; 3, isoamyl acetate; 4, ethyl 3-methylbutanoate; 5, 3-methyl-1-butanol; 6, ethyl hexanoate; 7, hexyl acetate; 8, ethyl-S-lactate; 9, 1-hexanol; 10, ethyl octanoate; 11, methyl octanoate; 12, ethyl decanoate; 13, isoamyl octanoate; 14, cis-3-hexen-1-ol; 15, 2-phenylethylacetate; 16, ethyl dodecanoate; 17, hexanoic acid; 18, 2-phenylethanol; 19, methyl decanoate; 20, octanoic acid; 21, decanoic acid.

Composizione chimica: sostanze inorganiche

Le sostanze inorganiche nel vino hanno scarsa importanza dal punto di vista qualitativo, tranne influenzare negativamente i caratteri organolettici se presenti in quantità eccessive, es. il sodio in eccesso può dare una nota salata sgradevole.

Dal punto di vista analitico possiamo classificare i composti inorganici in tre categorie:

- ✓ Cationi di metalli, presenti come controioni di composti organici carichi negativamente, come gli acidi carbossilici, oppure come impurezze;
- ✓ Anioni solitamente provenienti dall'addizione di composti impiegati nel processo di vinificazione;
- ✓ Ceneri, l'insieme delle sostanze inorganiche rimaste dopo l'incenerimento dell'estratto secco.

Composizione chimica: sostanze inorganiche

Determinazione delle ceneri

Con il termine ceneri si intende l'insieme dei prodotti ottenuti per incenerimento del residuo dell'evaporazione del vino (il già citato estratto secco), trattamento condotto in modo da ottenere la totalità dei cationi (ad esclusione dello ione ammonio) sotto forma di carbonati, di ossidi o di altri sali minerali anidri.

L'incenerimento dell'estratto del vino è effettuato fra 500 e 550°C fino a combustione completa dei composti di carbonio. A quelle temperature tutta la materia organica è decomposta a CO_2 , H_2O e sottoprodotti di degradazione termica

La determinazione delle ceneri si effettua in modo semplice, dosando un volume noto di vino su crogiolo di platino tarato e ponendo il crogiolo prima su piastra riscaldante a 200°C per portare a secco il campione, poi in forno elettrico a 525°C. Il peso finale, detratto della tara del crogiolo, fornisce il dato delle ceneri.

Composizione chimica: sostanze inorganiche

Determinazione delle ceneri

Le ceneri hanno carattere alcalino, essendo composte prevalentemente da ossidi e carbonati. L'alcalinità delle ceneri è un altro parametro che si misura ed equivale alla somma dei cationi, diversi dall'ammonio, combinati agli acidi organici del vino.

La determinazione si effettua per titolazione con NaOH dell'eccesso di acido solforico necessario per solubilizzare a caldo le ceneri, in presenza di indicatore metilarancio.



Composizione chimica: sostanze inorganiche

Determinazione dei cationi

Cationi

I cationi hanno funzioni varie nell'uva; nel vino non hanno invece un ruolo di primaria importanza. Si originano nel vino a seguito di assunzione di sostanze minerali da parte della vite, oppure per addizione di composti aventi funzioni varie all'uva, al mosto e al vino grezzo.

Possiamo distinguere i cationi in tre gruppi:

1. elementi derivanti dal contributo minerale del terreno e dalla capacità della vite di assumere sostanze minerali (Al, B, Ba, Li, Mn, Mo, Rb, Si, Sr e Ti o elementi in tracce e ultratracce)
2. elementi la cui origine è in parte naturali, in parte artificiale (Ca e Mg, Cu e Zn, Fe, K e Na, P)
3. elementi di origine quasi esclusivamente artificiale (Pb, Cd, Co, Cr, Ni).

La determinazione dei cationi ha importanza soprattutto dal punto di vista sanitario e qualitativo, in quanto molti di questi elementi in concentrazioni eccessive sono dannosi per la salute o comunque per la qualità del vino. Non a caso nel processo di vinificazione si effettua il passaggio di affinamento che provoca un abbassamento generale del contenuto di metalli mediante precipitazione.

Composizione chimica: sostanze inorganiche

Determinazione dei cationi

Per la determinazione dei cationi, le normative ufficiali prevedono metodi di analisi singoli, ad esempio:

- ✓ Fotometria di fiamma per K e Na;
- ✓ Spettrofotometria di assorbimento atomico con fiamma per Mg, Ca, Fe, Cu, Ag e Zn;
- ✓ Spettrofotometria di assorbimento atomico con fornetto di grafite per Cd e Pb.

Dal punto di vista pratico ed economico è molto più vantaggioso l'impiego di tecniche multielementari, cosa che, tra l'altro, permette di determinare un numero maggiore di elementi oltre a quelli espressamente richiesti dalle normative.

Le tecniche più idonee sono le seguenti:

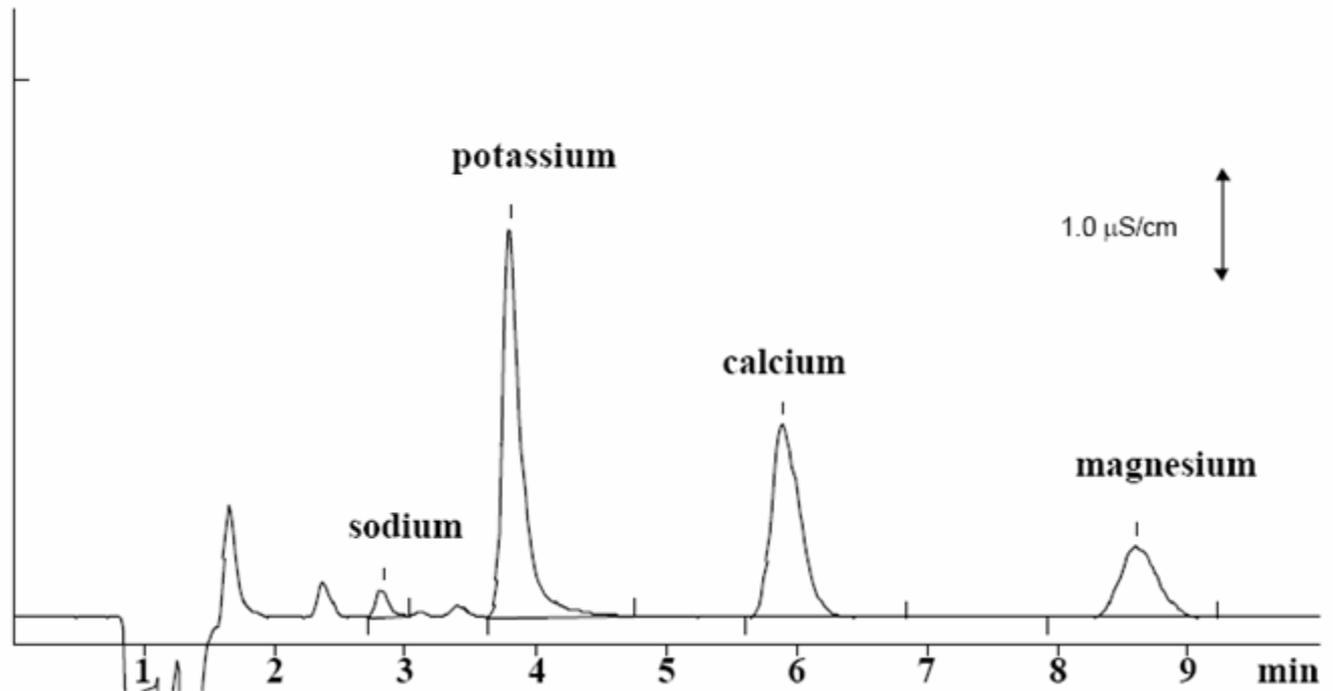
- ✓ Cromatografia a scambio cationico, per ioni alcalini e alcalino-terrosi e metalli di transizione;
- ✓ Voltammetria di stripping anodico per metalli di transizione;
- ✓ Spettrometria di emissione atomica con plasma induttivamente accoppiato per tutti gli elementi;
- ✓ Spettrometria di massa con plasma induttivamente accoppiato per tutti gli elementi.

Composizione chimica: sostanze inorganiche

Determinazione
dei cationi:

Cromatografia
Ionica IC

La cromatografia ionica permette di separare e quantificare ioni in soluzione. Nell'analisi del vino è impiegata per determinare cationi alcalini (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+), alcalino-terrosi (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) e ione ammonio (NH_4^+). La determinazione si effettua con rivelazione condittimetrica sul campione diluito 1:50 e con eluente acido.



Composizione chimica: sostanze inorganiche

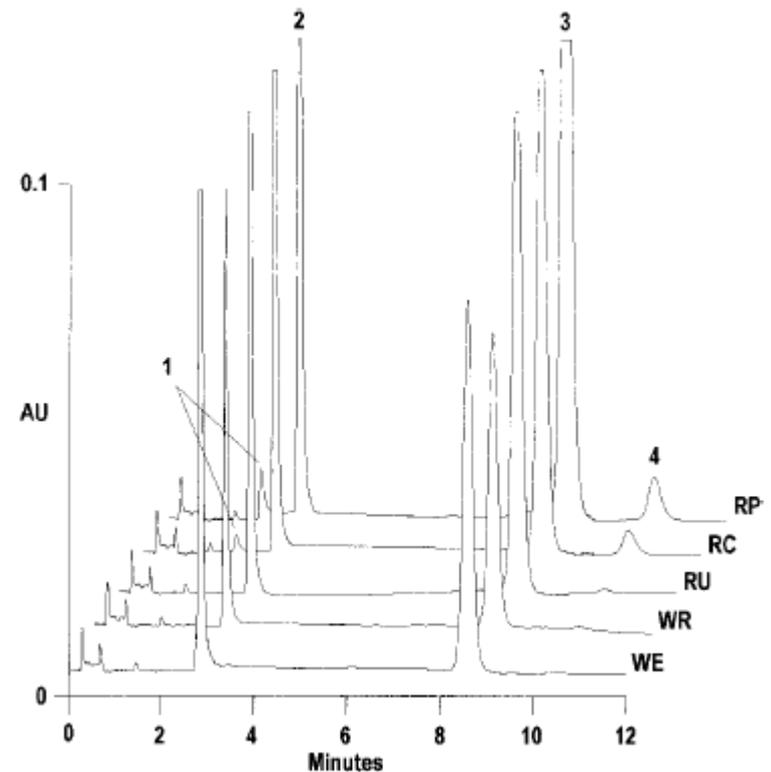
Determinazione
dei cationi:

Cromatografia
Ionica IC

Per la determinazione di metalli di transizione (Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) e metalli pesanti (Pb^{2+} , Cd^{2+}) è necessario un altro tipo di rivelatore; normalmente si utilizza una reazione di derivatizzazione post-colonna con un legante e rivelazione spettrofotometrica a 530 nm.

La separazione è preceduta da un trattamento del campione con raggi UV, in modo da distruggere i composti organici presenti nel vino che interferirebbero pesantemente con la separazione cromatografica agendo da complessanti.

1. Pb^{2+}
2. Cu^{2+}
3. Zn^{2+}
4. Ni^{2+}



Composizione chimica: sostanze inorganiche

Determinazione
dei metalli:

ICP-MS e
ICP-AES

Tra le tecniche spettroscopiche per la determinazione degli elementi nel vino, particolarmente utili sono la spettrometria di massa con plasma induttivamente accoppiato (ICP-MS) e la spettrometria di emissione atomica con plasma induttivamente accoppiato (ICP-AES), tecniche che presentano limiti di rivelabilità dell'ordine di ng/l (la prima) e $\mu\text{g/l}$ (la seconda) e quindi sono idonee per l'analisi del vino in cui molti elementi sono presenti in tracce o ultratracce, soprattutto quelli significativi dal punto di vista sanitario (Cd, Hg, Pb).



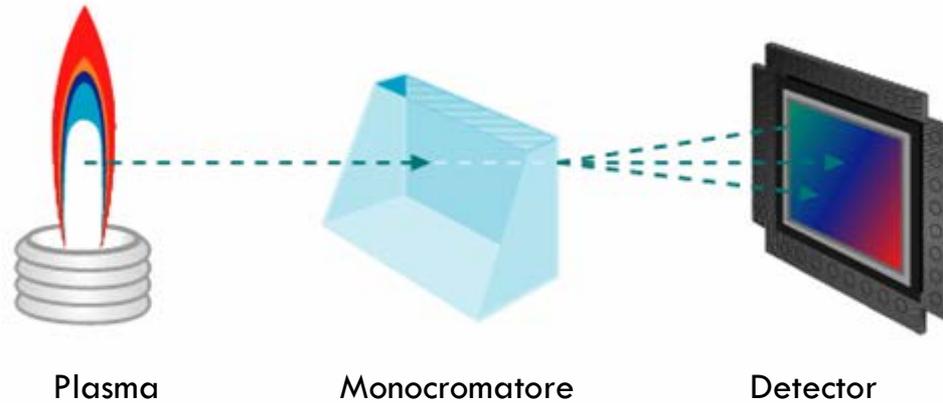
Le due tecniche presentano il grosso vantaggio di poter determinare sequenzialmente un numero elevatissimo di elementi

Composizione chimica: sostanze inorganiche

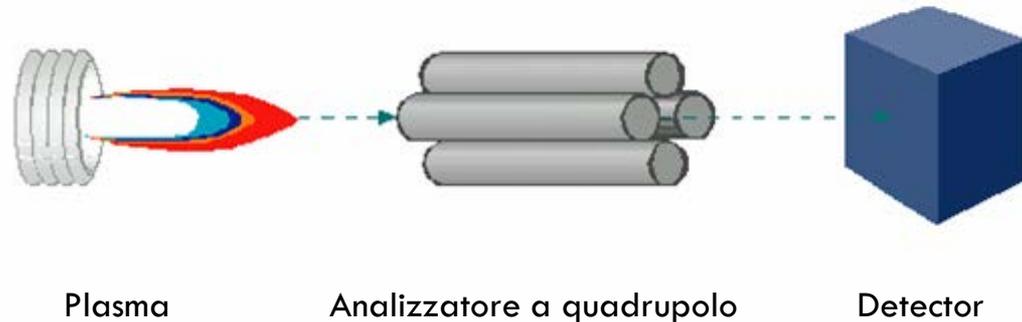
Determinazione
dei metalli:

ICP-MS e
ICP-AES

Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer



Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer



Composizione chimica: sostanze inorganiche

Determinazione
dei metalli:

ICP-MS e
ICP-AES

I limiti di rivelabilità per la tecnica ICP-MS sono molto più bassi rispetto all'ICP-AES e alle altre tecniche di spettroscopia atomica.

Table 3. Detection limit comparison ($\mu\text{g/L}$)

| Element | ICP-MS | ICP-AES | Flame AAS | GFAAS |
|---------|--------|---------|-----------|-------|
| As | <0.050 | <20 | <500 | <1 |
| Al | <0.010 | <3 | <50 | <0.5 |
| Ba | <0.005 | <0.2 | <50 | <1.5 |
| Be | <0.050 | <0.5 | <5 | <0.05 |
| Bi | <0.005 | <20 | <100 | <1 |
| Cd | <0.010 | <3 | <5 | <0.03 |
| Ce | <0.005 | <15 | <200000 | ND |
| Co | <0.005 | <10 | <10 | <0.5 |
| Cr | <0.005 | <10 | <10 | <0.15 |
| Cu | <0.010 | <5 | <5 | <0.5 |
| Gd | <0.005 | <5 | <4000 | ND |
| Ho | <0.005 | <1 | <80 | ND |
| In | <0.010 | <30 | <80 | <0.5 |
| La | <0.005 | <0.05 | <4000 | ND |
| Li | <0.020 | <1 | <5 | <0.5 |
| Mn | <0.005 | <0.5 | <5 | <0.06 |
| Ni | <0.005 | <10 | <20 | <0.5 |
| Pb | <0.005 | <20 | <20 | <0.5 |
| Se | <0.10 | <50 | <1000 | <1.0 |
| Tl | <0.010 | <30 | <40 | <1.5 |
| U | <0.010 | <30 | <100000 | ND |
| Y | <0.005 | <0.5 | <500 | ND |
| Zn | <0.02 | <1.0 | <2 | <0.01 |

Composizione chimica: sostanze inorganiche

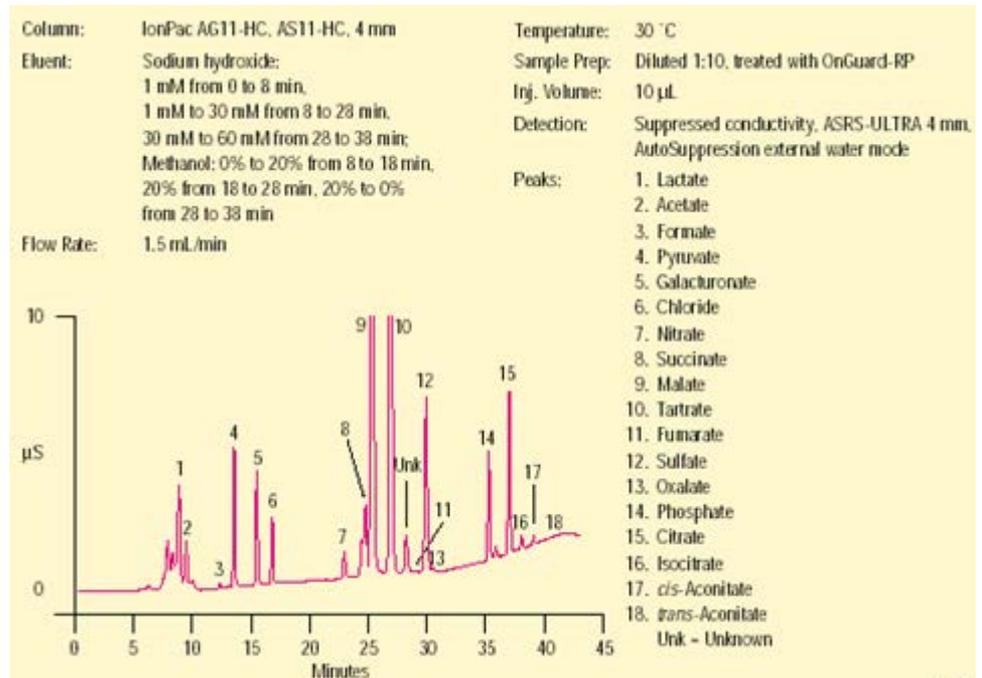
Determinazione degli anioni

Anioni

Gli anioni inorganici presenti nel vino sono principalmente **fosfato**, importante nella fermentazione del mosto, e **solfato**, prodotto dall'ossidazione dell'anidride solforosa; in misura minore sono presenti **borato**, **silicato** e **cloruro**.

La determinazione degli anioni si effettua per cromatografia a scambio anionico con eluente carbonato/bicarbonato oppure con eluente NaOH; la rivelazione è conducimetrica.

Nella figura è riportato il cromatogramma ottenuto dall'analisi di un campione di vino rosso diluito 1:10; gli anioni sono separati insieme agli acidi carbossilici

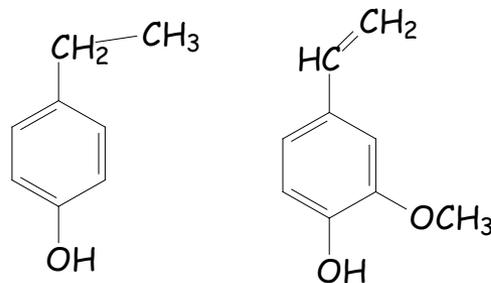
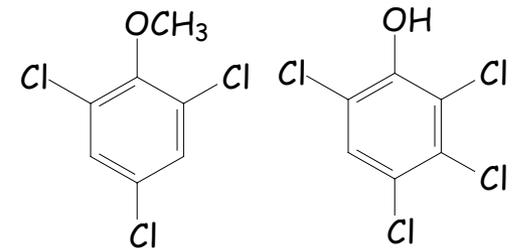


Composizione chimica: sostanze indesiderate

Determinazione Tricloroanisoli e vinil-fenoli

Nel vino sono a volte presenti sostanze che si formano in condizioni particolari e che danno al vino note organolettiche negative. Alcuni esempi di composti indesiderati sono i seguenti:

2,4,6-tricloroanisolo (TCA): è il composto responsabile del famoso gusto di tappo, avente una soglia olfattiva di ~ 5 ng/l; si forma nei tappi di sughero a seguito del trattamento di sbiancamento con ipoclorito, come il suo analogo 2,3,4,6-tetraclorofenolo.



etilfenoli (4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo) e vinilfenoli (4-vinifenolo e 4-vinilguaiacolo) si originano dagli acidi cinnamici trans-ferulico e trans-p-cumarico, con il contributo di lieviti del genere *Brettanomyces*; questi composti sono responsabili delle note fenoliche e medicinali dei vini deteriorati.

Composizione chimica: sostanze indesiderate

Determinazione Tricloroanisoli e vinil-fenoli

La determinazione del 2,4,6-tricloroanisolo nel vino si può effettuare per GC, impiegando le tecniche di arricchimento SPME, SPE oppure SBSE).

Analysis Conditions.

| | |
|-------------------|---|
| Twister | 10 mm, 55 µl PDMS |
| Column | 30 m HP 5 (Agilent), $d_i = 0.25$ mm, $d_f = 0.25$ µm |
| Pneumatics | He, $P_i = 56.6$ kPa, constant flow = 1 ml/min TDS-desorption flow = 50 ml/min (splitless) PTV-splitless time = 1 min |
| TDS Temperatures | 20°C, 60°C/min, 180°C (5 min) |
| PTV Temperatures | -150°C, 12°C/s, 280°C (5 min) |
| Oven Temperatures | 60°C (1 min), 10°C/min, 150°C, 25°C/min, 300°C (30 min) |
| Detector | MSD, 230°C / 150°C, Scan 35-350 amu, SIM m/z 212/197/169 |

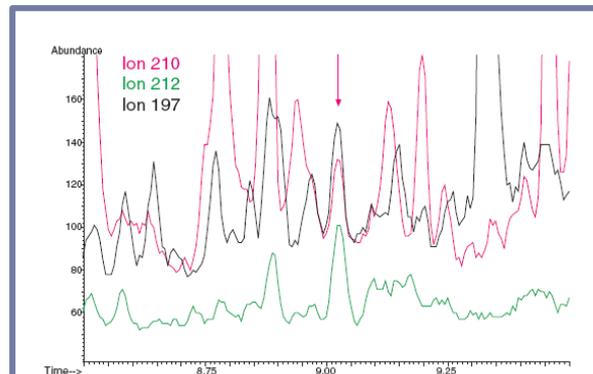


Figure 10. Selected ion monitoring chromatogram of 0.3 ng TCA per litre Welschriesling wine (300 ppq).

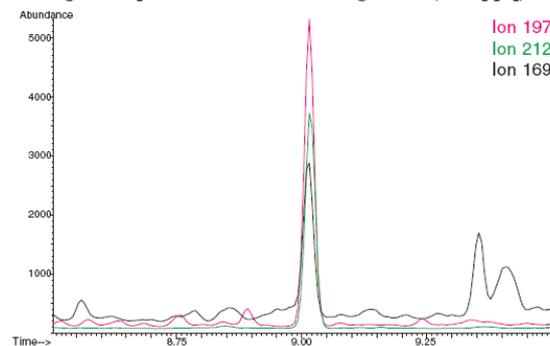


Figure 9. Selected ion monitoring chromatogram of 9.5 ng TCA per litre Riesling wine (9.5 ppt).

Corkiness in Wine - Trace Analysis of 2,4,6-Trichloroanisole by Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and Thermal Desorption GC/MS



Nell'esempio riportato a lato è dimostrato come una tecnica di estrazione per sorptione (StirBarSorptive Extraction) che utilizza un polimero organico apolare (PDMS) sia in grado di spingere la sensibilità del metodo di analisi quantitativa del TCA a livello delle ultratracce: ppt e ppq.

Composizione chimica: sostanze indesiderate

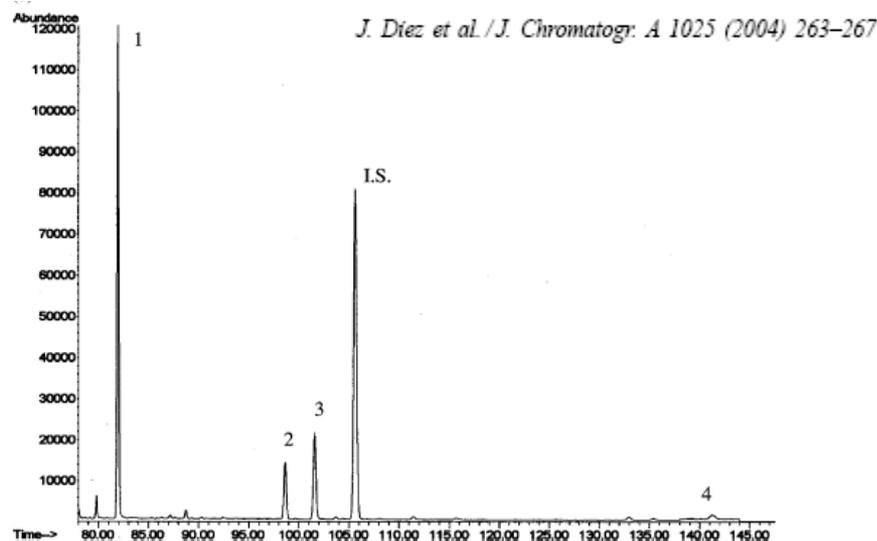


Fig. 1. Chromatograms of the SBSE extracts of (a) a red wine and (b) the same red wine spiked with the four volatile phenols. 1: 4-ethylguaiacol, 2: 4-ethylphenol, 3: 4-vinylguaiacol, 4: 4-vinylphenol. Time scale in min.

Essendo composti volatili, gli etil- e vinilfenoli si determinano per gascromatografia. L'analisi può essere effettuata sul vino tal quale mediante estrazione selettiva per sorpzione (SBSE) ovvero su frazioni ottenute mediante estrazione in fase solida SPE. Nel primo caso i vantaggi sono evidenti sia in termini di praticità di esecuzione che di limite di rilevabilità. L'esempio riportato mostra l'analisi dei vinylfenoli in vini bianchi e rossi.

Table 3
Concentrations ($\mu\text{g/l}$) of volatile phenols in different types of wine

| | 4-Ethylguaiacol | 4-Ethylphenol | 4-Vinylguaiacol | 4-Vinylphenol |
|--------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| White wine | 42 | n.d. ^a | 94 | 367 |
| Red wine-1 | 50 | 76 | 49 | 730 |
| Red wine-2 | 65 | 84 | 54 | 4385 |
| Red wine-3 | 42 | 7 | 53 | 1803 |
| Fino sherry wine-1 | 263 | 226 | 55 | 41 |
| Fino sherry wine-2 | 296 | 232 | 55 | n.d. ^a |

^a n.d.: not detected.

Composizione chimica: sostanze indesiderate

Determinazione anidride solforosa

L'anidride solforosa (SO_2) è un composto di grande importanza in enologia, in quanto, pur essendo utilizzata principalmente come antisettico, svolge anche altre funzioni: asseconda l'estrazione delle sostanze coloranti, protegge il mosto dall'ossidazione e, in generale, permette di ottenere vini più sani e serbevoli.

Essa forma composti di reazione con sostanze presenti nel vino, che in alcuni casi hanno influenza diretta sul gusto e sull'aroma; per questo si è soliti distinguere la percentuale di SO_2 libera da quella combinata. Composti che reagiscono facilmente sono gli antociani, l'acetaldeide e gli zuccheri

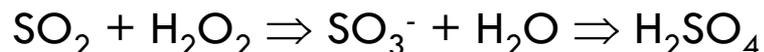
In realtà, attualmente l'impiego della SO_2 è tendenzialmente limitato all'addizione in fase di svinatura e imbottigliamento; inoltre esistono precisi limiti di legge (160 mg/l per i vini rossi e 200 mg/l per i bianchi e i rosati) dovuti al fatto che si tratta di una sostanza che può dare effetti indesiderati (cerchio alla testa).

Composizione chimica: sostanze indesiderate

Determinazione anidride solforosa

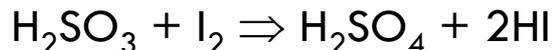
La determinazione della SO_2 si effettua per volumetria, utilizzando una titolazione acido-base oppure una titolazione redox.

Nel primo metodo, mediante una corrente di aria o di azoto la SO_2 viene fissata e ossidata per gorgogliamento in una soluzione diluita neutra di H_2O_2 :



L'acido solforico formato viene dosato con una soluzione a titolo noto di NaOH . Questo metodo determina la SO_2 totale; la frazione libera viene estratta dal vino per trascinamento a freddo (10°C).

Nel secondo metodo la SO_2 libera è dosata con titolazione iodometrica diretta:



Si dosa quindi la SO_2 combinata dopo idrolisi alcalina e la SO_2 totale per somma delle due frazioni

Adulterazioni del vino

Il vino, tra gli alimenti, è uno dei prodotti maggiormente sottoposto a frode. Vini di alta qualità o di annate particolari raggiungono prezzi elevati, diventando l'obiettivo ideale di pratiche illecite.

Nonostante la legislazione sul vino sia una tra le più complete e il vino sia tra gli alimenti maggiormente analizzati, l'entità delle frodi è talmente elevata da essere difficilmente quantificabile.

Le frodi sul vino causano un grande danno di immagine al mercato in termini di fiducia del consumatore, soprattutto nel contesto attuale in cui i prodotti dei Paesi emergenti in campo enologico (Argentina, Australia, Cile, California, Nuova Zelanda) diventano competitivi.

Fino a poco tempo fa, l'unico modo per verificare l'autenticità di un vino consisteva nell'assaggio da parte di esperti.

Attualmente, sono stati sviluppati metodi che accoppiano strumenti matematici e tecniche analitiche avanzate, permettendo così l'applicazione a studi di autenticazione e tracciabilità. Il ruolo della chimica analitica è quindi evidente e giustificato dal valore del prodotto

Adulterazioni del vino

Le principali frodi in campo enologico sono:

- ✓ Diluizione con acqua (annacquamento);
- ✓ Vini ottenuti dalla fermentazione di zuccheri di natura diversa da quelli dell'uva (pratica vietata in Italia, ma consentita in altri Paesi);
- ✓ Aggiunta di sostanze non consentite: alcool, antifermentativi, aromatizzanti, coloranti ;
- ✓ Messa in commercio di vini di qualità differente da quella dichiarata in etichetta;
- ✓ Messa in commercio di vini non conformi alle norme;
- ✓ acescenti (con acido acetico $> 1 \text{ g/l}$);
- ✓ con contenuto di anidride solforosa eccessivo;
- ✓ con gradazione alcolica inferiore a quella prevista;
- ✓ vinificato da vitigni non permessi dal disciplinare.

Adulterazioni del vino

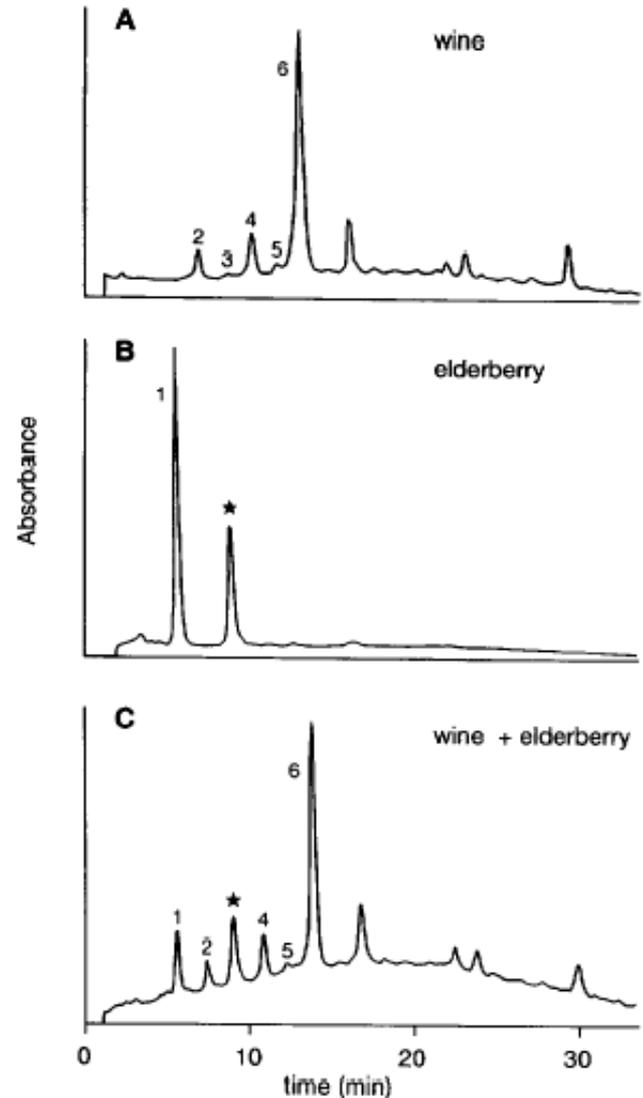
Le tecniche maggiormente utilizzate per riconoscere le frodi e le adulterazioni sono le seguenti, in ordine di importanza:

- ✓ Cromatografia: il termine riassume un insieme di tecniche di separazione, alcune delle quali sono impiegate per la determinazione di classi di composti che possono essere utilizzati nella differenziazione di prodotti alimentari.
- ✓ Analisi degli isotopi stabili nella versione Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS), tecnica che sfrutta la spettrometria di massa per evidenziare le distribuzioni isotopiche caratteristiche di materiali aventi origine diversa; in particolare sono utilizzati gli isotopi di C, H, O, N, Sr e Pb;
- ✓ Risonanza Magnetica Nucleare (NMR): si tratta di una tecnica potentissima per la differenziazione di prodotti alimentari di origine diversa o ottenute con procedimenti diversi;
- ✓ Spettrometria di massa con plasma induttivamente accoppiato (ICP-MS): si tratta di una tecnica elementare, in grado di determinare quasi tutti gli elementi del sistema periodico in concentrazioni estremamente basse;

Adulterazioni del vino

✓ Cromatografia. A titolo di esempio è interessante vederne l'applicazione nel rilevamento di pigmenti antocianici di provenienza estranea in vini rossi per esaltarne le note violacee.

Gli antociani sono presenti in molti frutti a bacca colorata (ribes, mirtillo, ciliegia, fragola, uva); estratti antocianici sono impiegati nell'industria alimentare come coloranti naturali, ma il loro impiego nel vino è ovviamente vietato. Il riconoscimento si basa sul fatto che nell'uva sono presenti 5 antocianine di base (cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina e petunidina) aventi soltanto residui di glucosio. L'identificazione di antocianine con altri residui zuccherini indica l'impiego di estratti di frutti diversi, come nel caso riportato dove si identifica l'aggiunta di estratto di bacca di sambuco (elderberry in inglese), che contiene cianidina con un residuo di sambubioside, uno zucchero caratteristico del sambuco.



Adulterazioni del vino

✓ Analisi degli isotopi stabili - Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) e Risonanza Magnetica Nucleare (NMR).

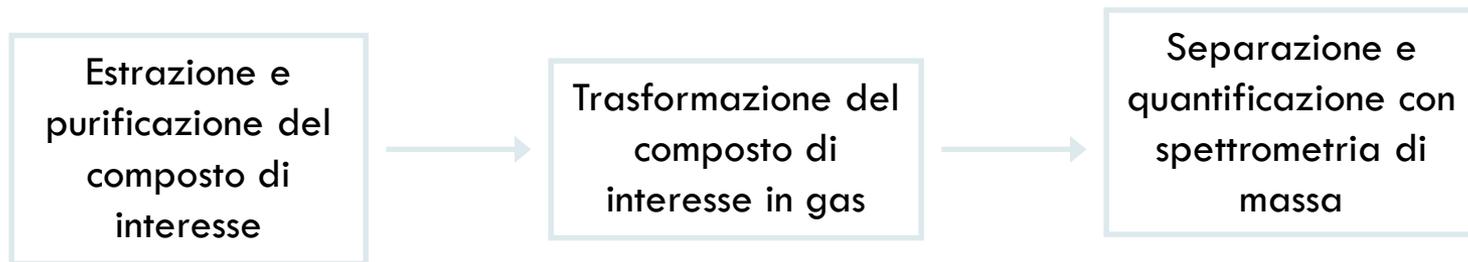
La quantificazione del rapporto da due isotopi dello stesso elemento ha potenzialità notevoli nello stabilire se due oggetti chimicamente simili hanno provenienza diversa, in relazione alla differenza delle materie prime. Fenomeni di vario tipo influenzano la distribuzione isotopica degli elementi nelle materie prime, determinando differenze nei prodotti finali che possono essere rivelate dalle tecniche di analisi isotopica.

L'analisi degli isotopi stabili è molto importante soprattutto negli studi di autenticità degli alimenti e quindi del vino. Essa, sulla base dei differenti rapporti isotopici, permette di riconoscere molecole, presenti in alimenti, aventi la stessa struttura chimica ma provenienti da materie prime diverse o elaborate con processi diversi, per esempio per sintesi biologica o industriale. Si possono così discriminare gli aromi naturali (es. vanillina) da quelli di sintesi, l'acido acetico proveniente dalla fermentazione acetica da quello ottenuto industrialmente, i salmoni selvatici da quelli di allevamento (in base ad un lipide caratteristico), l'aggiunta di zuccheri diversi da quelli presenti naturalmente, l'annacquamento del latte, la provenienza geografica di alimenti.

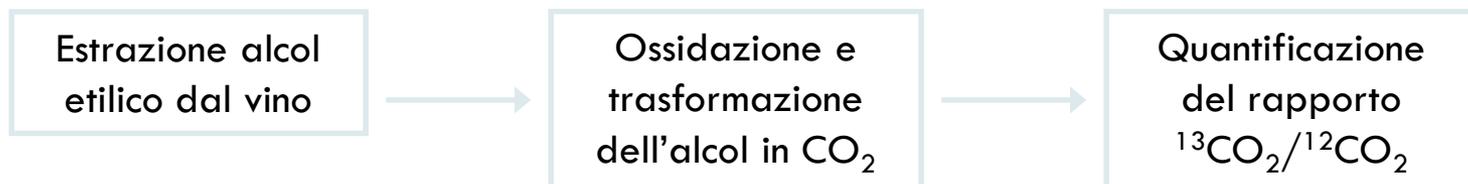
Adulterazioni del vino

I rapporti isotopici degli elementi leggeri (H, O, C, N, S) sono misurati con la tecnica Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) mediante trasformazione in gas puri.

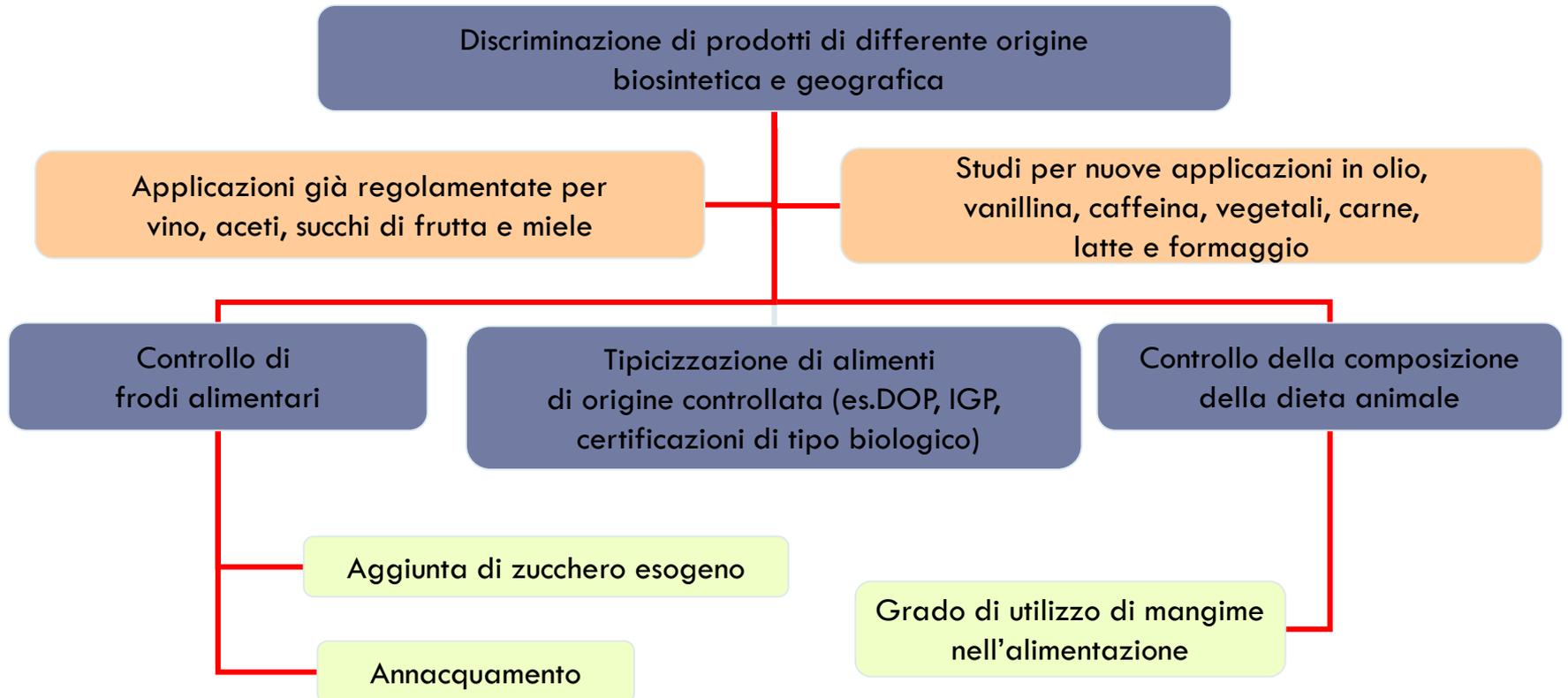
Per effettuare la misura con la IRMS è necessario convertire l'elemento di interesse nel campione in forma gassosa



Esempio: determinazione del rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ nel vino (alcol etilico)



Adulterazioni del vino



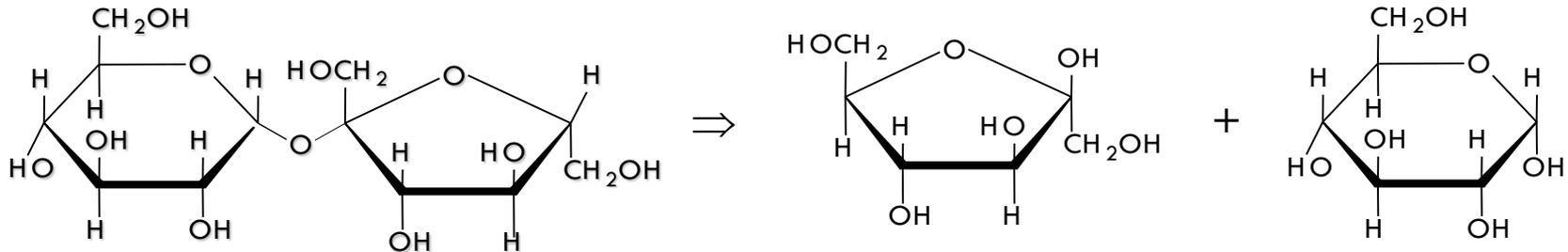
Adulterazioni del vino

La ricerca di sofisticazioni in enologia si può effettuare con le tecniche isotopiche:

- ✓ sofisticazione del vino per aggiunta di zuccheri diversi da quelli presenti nell'uva (bietola, canna, mais), una pratica illecita in Italia
- ✓ annacquamento del vino

Inoltre si può stabilire con discreta approssimazione la zona di provenienza di un vino.

L'aggiunzione di saccarosio ai mosti genera rapidamente per idrolisi fruttosio e glucosio, zuccheri già presenti nell'uva e quindi indistinguibili:



Le molecole di fruttosio e glucosio introdotte fraudolentemente hanno però una traccia della loro origine, nascosta nella distribuzione isotopica degli elementi che li costituiscono (carbonio, idrogeno e ossigeno). Questa distribuzione è diversa a seconda dell'origine del saccarosio o del trattamento cui è stato sottoposto.

Adulterazioni del vino

Le proporzioni degli isotopi stabili nei vari composti sono approssimativamente quelle medie esistenti sulla terra, tuttavia le piccole deviazioni dalla media sono la chiave per differenziare un campione dall'altro

Per poter mettere in risalto le differenze tra le distribuzioni isotopiche di un elemento in due campioni diversi è necessaria una tecnica in grado di misurare masse atomiche e molecolari con grandissima accuratezza e precisione. La tecnica in questione è la spettrometria di massa.

I rapporti isotopici sono usualmente espressi in termini di valori δ che esprimono le deviazioni, in parti per mille, da un materiale di riferimento:

$$\delta X = \left(\frac{R_{\text{campione}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000$$

o l'espressione equivalente:

$$\delta X = \left(\frac{R_{\text{campione}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \right) \times 1000$$

$\delta X > 0$ indica un arricchimento dell'isotopo pesante nel campione rispetto allo standard

$\delta X < 0$ indica un impoverimento dell'isotopo pesante o un arricchimento dell'isotopo leggero rispetto allo standard.

dove R = rapporto massa isotopo pesante/massa isotopo leggero (es. $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$)

Adulterazioni del vino

| Elemento | Isotopi stabili | Abbondanza naturale media (%) | Valori dei rapporti standard | Standard di riferimento internazionale |
|----------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|---|
| Idrogeno | ^1H | 99.985 | $^2\text{H}/^1\text{H} =$ | V-SMOW (Vienna –Standard Mean Ocean Water) |
| | ^2H | 0.015 | 0.000316 | |
| Carbonio | ^{12}C | 98.892 | $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} =$ | V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite) Carbonato di calcio fossile |
| | ^{13}C | 1.108 | 0.0112372 | |
| Azoto | ^{14}N | 99.6337 | $^{15}\text{N}/^{14}\text{N} =$ | AIR (Azoto dell'aria) |
| | ^{15}N | 0.3663 | 0.007353 | |
| Ossigeno | ^{16}O | 99.7587 | $^{18}\text{O}/^{16}\text{O} =$ | V-SMOW (Vienna –Standard Mean Ocean Water) |
| | ^{18}O | 0.2039 | 0.0039948 | |
| Zolfo | ^{32}S | 95.02 | $^{34}\text{S}/^{32}\text{S} =$ | V-CDT (Canyon Diablo Troilite) |
| | ^{34}S | 4.22 | 0.0450045 | |

Adulterazioni del vino

La possibilità di differenziare due campioni in base all'analisi isotopica è legata al fenomeno di **frazionamento isotopico** che avviene nelle materie prime, ovvero nella deviazione dalla distribuzione isotopica naturale degli elementi in conseguenza a fenomeni biogeochimici naturali o artificiali.

Gli elementi principali attraverso cui è possibile valutare possibili adulterazioni del vino sono quelli contenuti nelle molecole chiave del metabolismo dell'uva: acqua e anidride carbonica.

Elementi come idrogeno, carbonio ed ossigeno avranno un frazionamento isotopico differente che è funzione dell'area geografica (latitudine e longitudine influiscono sul ciclo di evaporazione dell'acqua), dal tipo di ciclo vegetativo della specie vegetale (assorbimento e traspirazione dell'acqua) ed infine dal tipo di metabolismo del glucosio (nella barbabietola e nella vite ad esempio prevale il Ciclo di Kelvin a differenza della canna da zucchero).

Adulterazioni del vino

Al termine del ciclo sintetico si producono molecole di glucosio che hanno un contenuto isotopico correlato a quello dell'acqua e dell'anidride carbonica impiegate, nonché del ciclo fotosintetico seguito. La successiva fermentazione alcolica che trasforma il glucosio ad alcol etilico modifica solo in parte i rapporti isotopici (maggiormente per D/H), per cui essi si ritrovano nelle molecole di alcol etilico prodotte.

Una mappatura dei rapporti isotopici, o meglio dei frazionamenti isotopici, per regione geografica può quindi aiutare ad interpretare i dati sperimentali ottenuti analizzando i vini nelle varie annate di produzione.

Adulterazioni del vino

| Regioni | D/H ppm | $\delta C_{\text{‰}}$ | $\delta O_{\text{‰}}$ |
|----------------|---------|-----------------------|-----------------------|
| Abruzzo | 102.93 | -24.93 | 5.14 |
| Basilicata | 103.92 | -25.39 | 5.43 |
| Calabria | 103.22 | -26.61 | 6.67 |
| Campania | 102.40 | -26.37 | 3.34 |
| Emilia-Romagna | 101.18 | -26.89 | 1.72 |
| Friuli-V.G. | 101.74 | -25.81 | 1.43 |
| Lazio | 103.09 | -25.77 | 4.80 |
| Liguria | 101.01 | -26.04 | 2.02 |
| Lombardia | 100.19 | -26.50 | 1.12 |
| Marche | 101.52 | -26.42 | 2.61 |
| Molise | 102.69 | -26.12 | 5.30 |
| Piemonte | 99.96 | -26.52 | 0.72 |
| Puglia | 103.47 | -24.87 | 6.75 |
| Sardegna | 103.27 | -25.51 | 6.34 |
| Sicilia | 104.21 | -25.32 | 7.54 |
| Trentino A.A. | 100.88 | -26.96 | 0.52 |
| Toscana | 101.74 | -25.91 | 4.15 |
| Umbria | 101.78 | -26.79 | 3.65 |
| Veneto | 101.81 | -26.06 | 1.00 |

D/H e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ misurati nell'etanolo
 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ misurato nell'acqua

Adulterazioni del vino

| Rapporto isotopico | Influenzato da | Può determinare |
|---|---------------------------|---|
| $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, D/H | Metabolismo (C3, C4, CAM) | Aggiunta illecita di zucchero di canna e/o barbabietola |
| $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, D/H | Origine dell'acqua | Annacquamento |
| $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, D/H | Sintesi chimica | Aggiunta di sostanze di sintesi |
| $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, D/H, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ | Origine geografica | Caratterizzazione di prodotti ad origine protetta e controllata |

Adulterazioni del vino

La contraffazione dovuta all'aggiunta di zuccheri di canna o bietola è relativamente semplice da identificare, in base al rapporto isotopico D/H. Il valore dovuto allo zucchero presente naturalmente nel vino è 98-102 ppm; valori superiori indicano addizione di zucchero di canna e mais, mentre valori inferiori indicano addizione di zucchero di bietola.

La misura è effettuata normalmente con la tecnica di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

L'aggiunta di una miscela equivalente di zuccheri di canna e bietola non modifica il rapporto isotopico del deuterio, ma è comunque evidenziabile dall'aumentare del rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

L'annacquamento del vino è rivelabile in base al rapporto $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$: infatti l'acqua esterna ha un contenuto in ^{18}O minore dell'acqua del vino e farà diminuire di conseguenza il valore del rapporto isotopico misurato. La misura è effettuata normalmente con una tecnica di Spettrometria di Massa.

Adulterazioni del vino

Metodi ufficiali

Le potenzialità dell'analisi isotopica sono tali che nel corso degli ultimi anni alcuni metodi di analisi sono diventati ufficiali al livello nazionale ed europeo.

- i. Il Regolamento CEE 2676/90 (determinazione dei metodi comunitari di analisi da utilizzare nel settore del vino) prevede la rivelazione dell'aumento del titolo alcolimetrico di mosti e vini, ottenuto con addizione fraudolenta di saccarosio, mediante analisi NMR del rapporto D/H
- ii. Il Regolamento CEE 822/97 (modifica del Regolamento precedente) prevede la determinazione del rapporto isotopico $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ dell'acqua contenuta nei vini per identificare il possibile fraudolento annacquamento di un vino
- iii. Il Regolamento CE 440/2003 (modifica del Regolamento precedente) prevede la determinazione del rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dell'etanolo nei vini e nei mosti mediante tecnica IRMS per identificare l'addizione fraudolenta di miscele di saccarosio da bietola e canna.

Adulterazioni del vino

Banche dati

Per avere un campione statistico rappresentativo di tutta la produzione viticola italiana è necessario effettuare un'indagine su tutto il territorio nazionale. A questo scopo sono state costituite, a partire dal 1987, col patrocinio del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali - Ispettorato Centrale per la Repressione delle Frodi, le Banche Dati su campioni di vino sicuramente genuini e provenienti da tutta Italia.

Ogni anno vengono raccolti circa 500 campioni di uva da tutte le regioni italiane e per ogni prelievo viene compilata una scheda con le principali informazioni del vigneto; dati relativi alla produzione (kg per ceppo, resa per ettaro) eventuale irrigazione, piovosità. Tali uve vengono successivamente vinificate in laboratorio, ottenendo il vino da analizzare

Nel caso del Rapporto isotopico del deuterio, la Banca Dati Italiana è stata formalmente validata da una Commissione della Comunità Europea, che si avvale del contributo tecnico del Joint Research Centre di Ispra.

Adulterazioni del vino

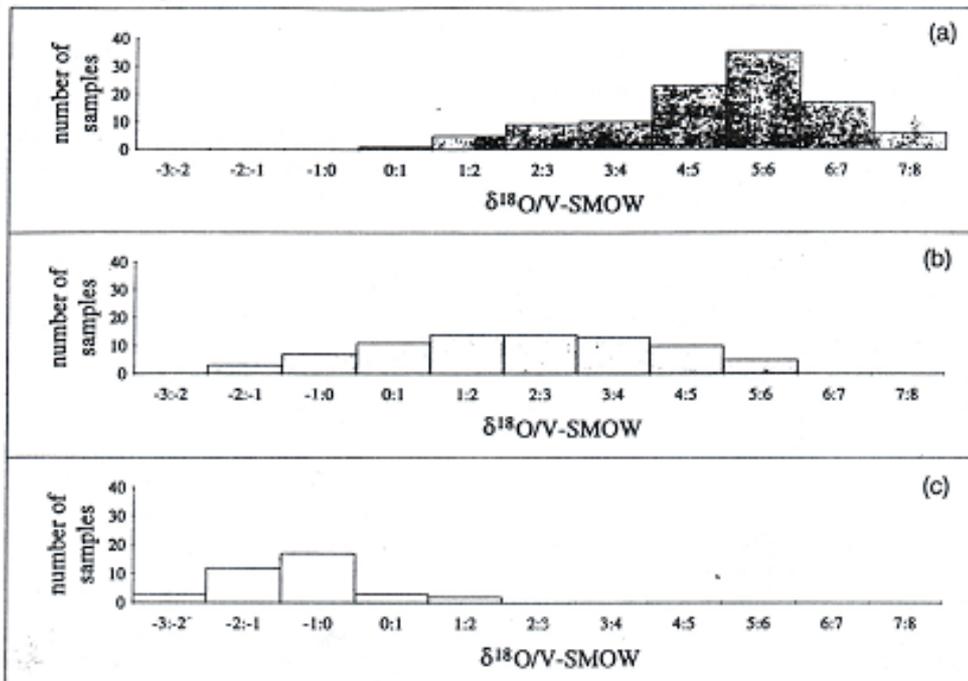
Banche dati

A livello europeo, dal 1990 esiste un database di vini che raccoglie dati da campioni di provenienza certa vinificati in Europa, secondo le indicazioni del Regolamento UE 2676/90. Oltre ai dati dei valori D/H originariamente previsti, attualmente il database comprende anche valori di $\delta^{13}\text{C}$ dell'etanolo e di $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua di vino. Siccome le possibilità di adulterazione comprendono l'utilizzo di mosti rettificati, zuccheri e prodotti vari da paesi del terzo mondo, si stanno raccogliendo dati anche da vini provenienti da questi paesi.

Adulterazioni del vino

Determinazione
dell'origine
geografica

Oltre all'utilizzo nell'identificazione di sofisticazioni, l'analisi isotopica è impiegata nella caratterizzazione dal punto geografico dei prodotti enologici. Uve cresciute in zone climatiche diverse daranno vini in cui C, H e O (presenti in etanolo e acqua) avranno subito frazionamenti isotopici conseguentemente diversi



Nella figura a fianco sono riportati i valori di $\delta^{18}\text{O}$ per vini provenienti da:

- a) Paesi europei caldi (Spagna, Portogallo)
- b) Paesi europei temperati (Francia, Italia)
- c) Paesi europei freddi e umidi (Germania, Austria)

Le differenze risultano essere significative.

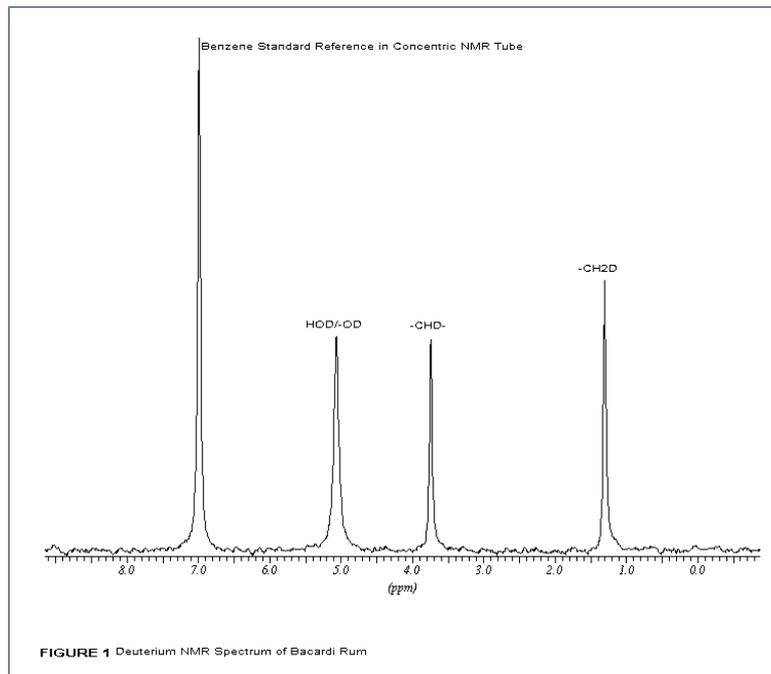
Adulterazioni del vino

The Application of Site-Specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR) to the Analysis of Alcoholic Beverages

<http://chemeducator.org/sbibs/s0003005/spapers/35gal897.htm>

Una tecnica alternativa alla IRMS ma più specifica e sensibile per rivelare aggiunte fraudolente di zucchero da barbabietola nei vini, è la cosiddetta SNIF-NMR (Site Specific Natural Isotope Fractionation – Nuclear Magnetic Resonance). Tale tecnica è in grado di valutare il rapporto D/H nei siti specifici della molecola, in questo caso dell'etanolo.

I rapporti isotopici al sito metilico (D/H)_I e metilenico (D/H)_{II} hanno infatti una distribuzione differente nell'etanolo derivante dalla fermentazione di zucchero di uva rispetto a quello di barbabietola (difficilmente discriminabile dalle tecniche di massa).



In SNIF-NMR experiments with ethanol, a defined parameter, R , is frequently used to describe the relative deuterium distribution in the ethyl fragment of the molecule

$$R = \frac{3(\text{II})}{(\text{I})}$$

I) and II) represent the peak heights for the corresponding deuterium methyl (I) and methylene (II) signals relative to the height of the internal standard.

Adulterazioni del vino

The Application of Site-Specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR) to the Analysis of Alcoholic Beverages

<http://chemeducator.org/sbibs/s0003005/spapers/35gal897.htm>

If there was no isotope fractionation, and the deuterium was distributed statistically, the ratio of deuteration at site (I) to site (II) should be 3:2, which corresponds to an R value of 2.0. Values of R greater than 2 indicate deuterium enrichment in the methylene site (II) with respect to the methyl site (I). The value of R varies according to the fermentation process and the sugar used. Water present during the fermentation has a significant effect on the deuterium content of the methylene site, while the sugar determines the isotope concentration at the methyl site.

The R value alone is adequate for discerning some, but not all, sugar sources. The relative deuterium concentration, C, can be used to provide additional information about samples.

$$C = \frac{(I) + (II)}{(s)K}$$

(I) and (II) are the peak heights of the methyl and methylene sites respectively; (s) is the peak height of the external standard.

Adulterazioni del vino

To account for the fact that not all samples have equal ethanol concentrations, a correction factor, f , must be employed. For example, a sample of pure ethanol would have a correction factor of 1.00, while a 40% ethanol sample would have a correction factor of 0.40. (Government regulations require that the proof listed on the label be accurate within 1%.) Ethanol samples from the same source (i.e., sugar cane grown at one location) should have similar R and C values. Ethanol from different sources (e.g., sugar cane vs potato) or different locations (e.g., Germany vs France) should have R and C values that can be readily discerned from one another. A plot of the relative site-specific ratios of deuterium, R , versus the relative deuterium concentration, C , for the previously listed samples is illustrated in Figure.

The Application of Site-Specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR) to the Analysis of Alcoholic Beverages

<http://chemeducator.org/sbibs/s0003005/spapers/35gal897.htm>

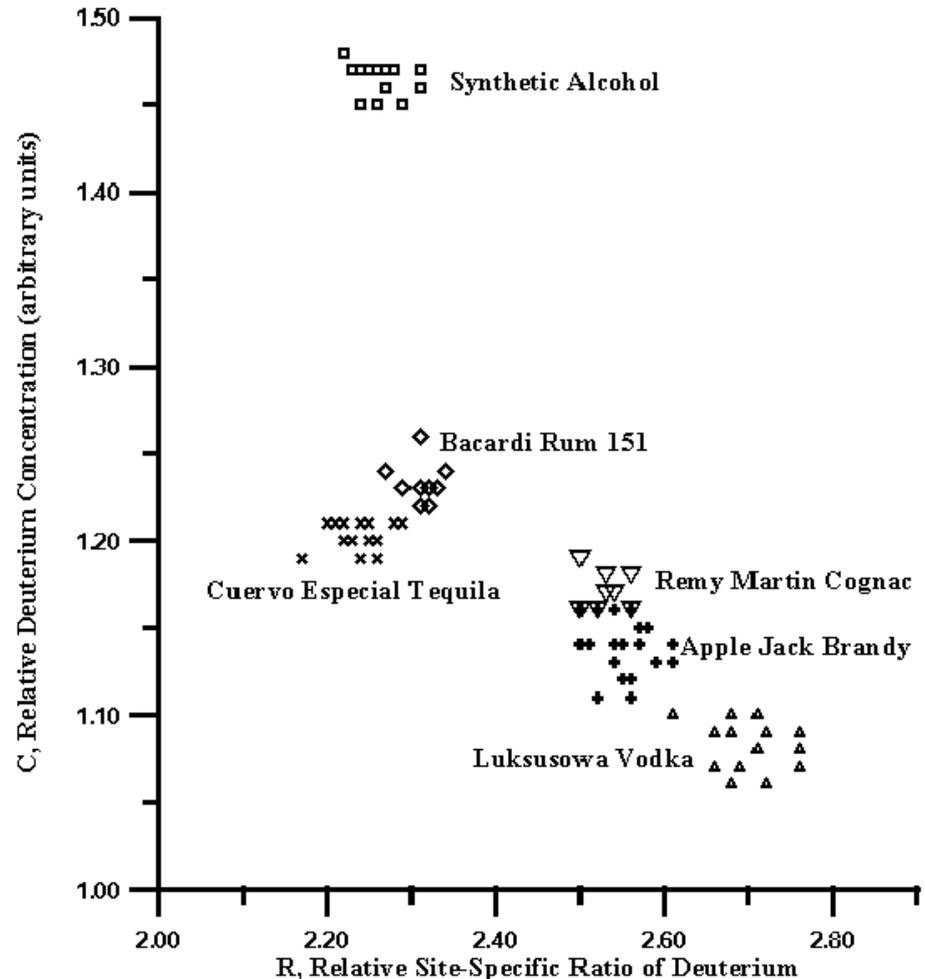


FIGURE 2. Deuterium in Ethanol