

Nuovi metodi di analisi del colore dei vini rossi

ANDREA VERSARI*, FABIO CHINNICI, GIUSEPPINA PAOLA PARPINELLO, SERGIO GALASSI

INTRODUZIONE

Se oggi parliamo di ‘nuovi metodi di analisi’ è anche grazie al lavoro iniziato negli anni '50 - '60 da ricercatori di tutto il mondo come Somers (AU), Ribéreau-Gayon, Glories (FR), Amerine, Berg, Ough, Singleton (USA), Cantarelli e Peri (IT). Il colore dei vini rossi è un elemento importante dal punto di vista sensoriale e commerciale ed è riconducibile alla presenza di sostanze coloranti di natura polifenolica, in particolare gli antociani ed i loro derivati polimerici (Figura 1). I pigmenti polimerici sono una classe molto eterogenea di composti accomunati dal fatto che sono resistenti alla decolorazione da SO₂ ed alle variazioni di pH. Alcuni di questi precipitano con le proteine - si tratta dei polimeri con elevato peso molecolare (>5; LPP), mentre quelli con basso peso molecolare (<5) non interagiscono con le proteine (SPP). Questi composti sono importanti perché sono strutture stabili che conservano il colore nel tempo.

Lo studio della maturità fenoliche delle uve, della diffusione degli antociani nel mosto durante la macerazione e la loro interazione con altri composti del vino durante l'affinamento sono aspetti di notevole importanza per l'enologo. In tale contesto, la disponibilità di adeguati metodi di analisi costituisce un requisito base per lo studio delle sostanze coloranti dei vini (Versari et al. 2008a).

E' noto che gli antociani sono i responsabili del colore dei vini rossi e mediante lo spettrofotometro è possibile misurare l'intensità colorante a 520, 420 e 620 nm (Figura 2). Lo spettro di un vino rosso nasconde altre informazioni utili, infatti è il risultato del contributo dei vari composti polifenolici presenti nel vino. Per scoprire le informazioni contenute nello spettro è necessario il ricorso a tecniche analitiche più evolute come l'analisi HPLC e FTIR. L'HPLC è la cromatografia liquida ad elevata prestazione che consente di separare e quantificare diversi polifenoli dei vini. Il campione di vino passa attraverso una colonna dove i composti vengono separati nei singoli picchi. Le analisi dei polifenoli di solito durano 40-60 minuti. L'FTIR è una tecnica di spettroscopia che analizza l'energia assorbita dalle vibrazioni molecolari nello spettro del medio infrarosso. I tempi di analisi sono molto rapidi: in due minuti si analizza un campione.

* relatore ed autore corrispondente: prof. Andrea Versari (Email: andrea.versari@unibo.it)
Corso di Laurea in Viticoltura ed Enologia, Università di Bologna, Piazza Goidanich 60, Cesena, 47023, Italia

RISULTATI E DISCUSSIONE

Un primo obiettivo è stato quello di migliorare le condizioni di separazione degli antociani al fine di identificare e quantificare non solo gli antociani monomeri ma anche altri composti di addizione degli antociani, ad esempio le vitisine (Chinnici et al. 2009). In questo modo sono stati identificati e quantificati mediante spettro a fotodiodi e rivelatore di massa più di 50 composti antocianici presenti nei vini novelli (Figura 3). Il cromatogramma mostra alcune vitisine ed altri composti derivati che insieme rappresentano circa il 5% del contenuto di antociani totali. I risultati di questo studio sono stati presentati alla conferenza *Wine Active Compounds* tenutasi in Francia nel 2008 (Chinnici et al. 2008).

Nell'analisi dei polifenoli uno dei problemi che si incontrano in HPLC con l'uso di colonne PR-C₁₈ è la difficoltà di separare i composti polimerici dai monomerici. Solitamente i composti polimerici coeluiscono sotto quelli monomerici creando problemi di identificazione e quantificazione ad entrambe le classi di composti (Versari et al. 2008b). Per risolvere questo problema sono state sperimentate diverse condizioni operative (tipo di colonna, flusso, eluente, temperatura). Terminata la verifica preliminare, due metodi HPLC – uno facente uso di una colonna in fase inversa classica RP-C₁₈, e l'altro di una colonna in fase inversa polimerica PLRP – sono stati confrontati per verificare la loro capacità di separare i pigmenti polimerici dei vini rossi. La Figura 5 mostra il cromatogramma di un vino rosso analizzato con i due metodi HPLC in cui sono state evidenziate le zone di eluizione dei pigmenti polimerici. Si nota come nel caso delle colonne RP-C₁₈ tali composti eluiscono tra 40 e 63 minuti, provocando un innalzamento della linea di base. Invece, nel caso delle colonne polimeriche PLRP è ben visibile un picco isolato a circa 66 minuti che rappresenta i pigmenti polimerici i quali – in questo caso – non interferiscono con la determinazione di altri composti. I risultati ottenuti con i due metodi HPLC sono in buon accordo tra di loro ($R^2 = 0,97$) a conferma della validità dell'approccio sperimentale. Appare evidente che le colonne polimeriche PLRP consentono un notevole miglioramento nella determinazione dei pigmenti polimerici.

L'analisi spettrofotometrica dei pigmenti polimerici dei vini rossi si basa su due presupposti: (i) la SO₂ decolora quasi totalmente gli antociani monomeri e solo parzialmente i pigmenti polimerici; (ii) il colore dei pigmenti polimerici è meno sensibile alle variazioni di pH. Con l'utilizzo della nuova colonna PLRP è stato possibile isolare in un singolo picco tutti i pigmenti polimerici del vino. A questo punto è stato messo a punto un nuovo metodo HPLC per la determinazione in HPLC dei pigmenti polimerici resistenti alla SO₂ (mediante l'aggiunta di SO₂ alla fase mobile). La Figura 6 mostra il cromatogramma iniziale (A) una prova intermedia (B) ed il risultato finale (C) in cui l'effetto decolorante è completo (Versari et al. 2007a). In questo modo è possibile visualizzare e misurare entrambe le componenti: i pigmenti polimerici totali e quelli resistenti alla SO₂. I risultati dell'HPLC sono stati confrontati con quelli del *metodo Adams* ed ancora una volta è stata riscontrata una buona corrispondenza tra i due metodi. Nei diversi vini analizzati i pigmenti polimerici sono stati parzialmente decolorati in quantità variabile da un minimo del 5% ad un massimo del 22%.

L'uso della SO_2 nella fase mobile in HPLC per decolorare i pigmenti del vino è stato preconizzato da Piergiovanni nel 1986 che lo hanno applicato allo studio della frazione monomericamente del vino Barbera. Nel metodo HPLC da noi proposto l'uso della SO_2 è mirato alla determinazione dei pigmenti polimerici nei vini mediante iniezione diretta del campione e la validità dei risultati è stata verificata confrontandoli con quelli di due metodi spettrofotometrici: (i) il metodo *Boulton* che prevede l'aggiunta di un eccesso di SO_2 al vino tal quale – che decolora gli antociani monomeri e parte dei polimeri - quindi la lettura di assorbanza a 520 nm, (ii) ed il metodo *Adams* che prevede l'aggiunta di SO_2 al campione di vino prima e dopo averlo trattato con una proteina in grado di rimuovere i pigmenti polimerici e successiva differenza delle due letture a 520 nm. La correlazione tra HPLC ed il metodo *Boulton* è ottima ($r = 0,99$) così come quella tra HPLC ed il metodo *Adams* (SPP+LPP) ($r = 0,95$) a conferma che il confronto tra questi risultati è coerente basandosi sul presupposto che tutti i metodi utilizzano SO_2 per decolorare parte dei pigmenti e determinare solo quelli resistenti alla decolorazione.

Settanta vini Sangiovese della Romagna – per ovvie ragioni di importanza economica del prodotto – sono stati selezionati per caratterizzarne la frazione polimerica con il *metodo Adams* che consente di quantificare due classi di pigmenti polimerici: quelli a basso e quelli ad elevato peso molecolare. Il rapporto tra pigmenti polimerici ad elevato e basso peso molecolare (LPP/SPP) trovato nei vini Sangiovese (intervallo 0,15–2,78) mostra valori simili a quelli riportati per vini Pinot nero (0,14–2,20), Cabernet Sauvignon (0,18–3,93), e Syrah (0,28–1,71) (Versari et al. 2007b). I pigmenti resistenti alla SO_2 contribuiscono in proporzione variabile al valore del colore totale, da un minimo del 54% per i vini più giovani (annata 2002) fino ad un massimo del 72% per i vini imbottigliati da tre anni (annata 2000).

Un altro aspetto che abbiamo investigato sui vini italiani è quello della copigmentazione degli antociani. Per copigmentazione si intende una interazione tra antociani colorati e composti (fenolici) non colorati che produce un aumento della colorazione dei vini rossi. È un fenomeno tipico dei vini giovani. A tal scopo sono stati analizzati 124 vini rossi imbottigliati tra i quali Sangiovese (70 campioni), Cabernet Sauvignon ($n = 13$), Nero d'Avola ($n = 10$), Merlot ($n = 9$), Marzemino ($n = 7$), Negroamaro ($n = 6$), Aglianico ($n = 5$) e Cannonau ($n = 4$), provenienti da diverse regioni d'Italia. Questo studio preliminare ci ha consentito di confrontare i valori di copigmentazione tra i vini e risultano particolarmente elevati nel Marzemino mentre sono modesti nel Sangiovese (Figura 7) (Versari et al. 2007b).

Infine, considerati i tempi di analisi richiesti per l'analisi HPLC si è pensato di utilizzare una tecnica spettroscopica per ridurre i tempi di analisi. L'FTIR è una tecnica rapida, in 2 minuti si acquisisce lo spettro del campione, e multiparametrica - ovvero è potenzialmente in grado di analizzare contemporaneamente molti composti a condizione che il sistema venga inizialmente calibrato. In questo studio preliminare, il numero di campioni è limitato ma la tipologia dei vini è stata diversificata per coprire un intervallo di concentrazione più ampio possibile e verificare la robustezza del metodo (Versari et al. 2003, 2006). La Figura 8 mostra la correlazione tra analisi FTIR e *metodo spettrofotometrico Adams* per la determina-

zione dei pigmenti polimerici a basso (SPP) ed elevato peso molecolare (LPP) nei vini rossi. La correlazione è buona ($R^2 > 0,955$), con un errore medio di predizione migliore nel caso degli SPP (RMSECV = 8,5%) rispetto agli LPP (RMSECV = 12,5%). In conclusione, questa indagine preliminare ha dimostrato la potenzialità della tecnica FTIR per la determinazione dei pigmenti polimerici nei vini rossi. Ulteriori analisi sono necessarie per implementare la banca dati e migliorare le prestazioni dello strumento.

CONCLUSIONI

In conclusione, le osservazioni fatte dal Paronetto nel 1979 circa le difficoltà (e l'importanza) dell'analisi dei polifenoli sono ancora attuali. In particolare la struttura dei prodotti di reazione può risultare molto complessa ed i meccanismi delle reazioni sono poco conosciuti. Pertanto è importante proseguire nella messa a punto di metodi di analisi sempre più performanti e nel contempo sviluppare sia metodi rapidi e non distruttivi per esigenze di processo, che metodi analitici in grado fornire informazioni chimiche più dettagliate.

Ringraziamenti

I risultati di seguito presentati sono il frutto di una collaborazione con i ricercatori dell'Università di Davis, California, dove è stata svolta parte della sperimentazione.

BIBLIOGRAFIA

- CHINNICI F., SONNI F., NATALI N., GALASSI S., RIPONI C. "Composition pigmentaire de vins obtenus par macération carbonique: caractérisation et corrélations avec la couleur". International Conference Wine Active Compounds, 27-29 March 2008, Beaune, France.
- CHINNICI F., SONNI F., NATALI N., GALASSI S., RIPONI C. (2009). Colour features and pigment composition of Italian carbonic macerated red wines. *Food Chemistry* 113, 651–657.
- VERSARI A., BOULTON R., THORNGATE J. (2003). The Prediction of the Color Components of Red Wines using FTIR, Wine Analyses and the Method of Partial Least Squares. In: Red Wine Color. Revealing the Mysteries, American Chemical Society, ACS Symposium Series 886, Eds. A. Waterhouse, J. Kennedy, pp. 53-67 (2004). Convegno: Uncovering the Mysteries of Red Wine Pigments, New Orleans, Louisiana, 23-24 Marzo 2003.
- VERSARI A., BOULTON R.B., PARPINELLO G.P. (2006). Effect of spectral pre-processing methods on the evaluation of the color components of red wines using Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Italian Journal of Food Science* 4, 427–435.
- VERSARI A., BOULTON R.B., PARPINELLO G.P. (2007a). Analysis of SO₂-resistant polymeric pigments in red wines by High-Performance Liquid Chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture* 58, 4, 523–525.
- VERSARI A., PARPINELLO G.P., MATTIOLI A.U. (2007b). Characterization of polymeric pigments and color components of commercial red wines by using selected UV-Vis spectrophotometric methods. *South African Journal of Enology and Viticulture* 28, 1, 6–10.
- VERSARI A., PARPINELLO G.P., GALASSI S. (2008a). Metodi di analisi del colore dei vini rossi: antociani, pigmenti polimerici e copigmentazione. *Enotecnico* 5, 93–102.
- VERSARI A., BOULTON R.B., PARPINELLO G.P. (2008b). A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. *Food Chemistry* 106, 1, 397–402.

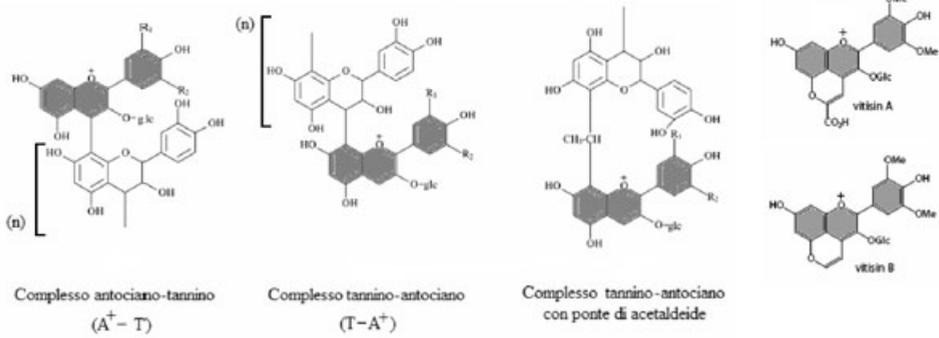


Figura 1. Esempi di struttura di pigmenti polimerici ed altri complessi con antociani colorati.

Figura 2. Esempio di spettro UV-Vis di vini rossi.

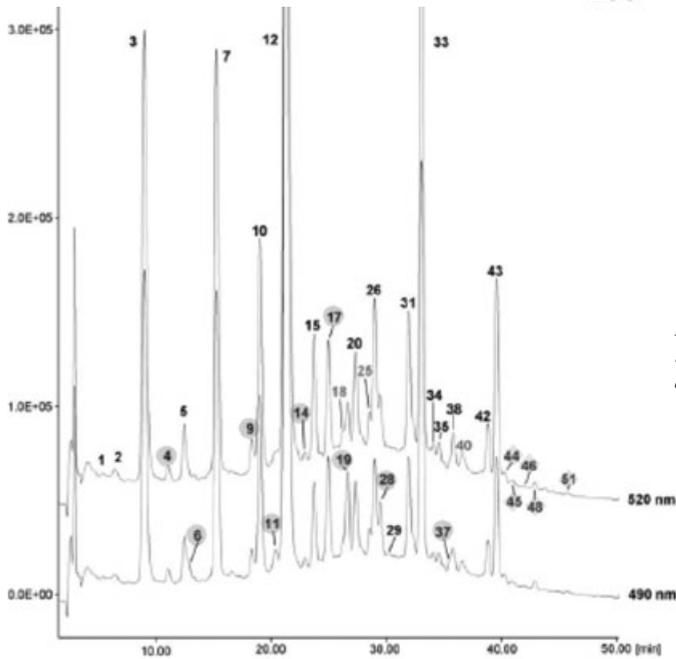
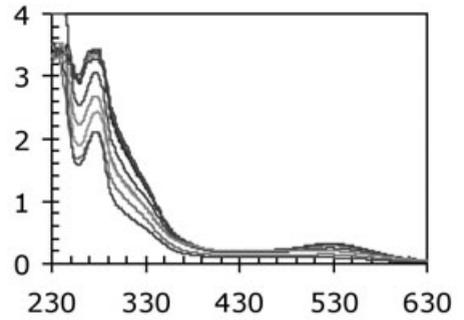


Figura 3. Cromatogramma degli antociani di un vino novello. Sono evidenziati i derivati antocianici.

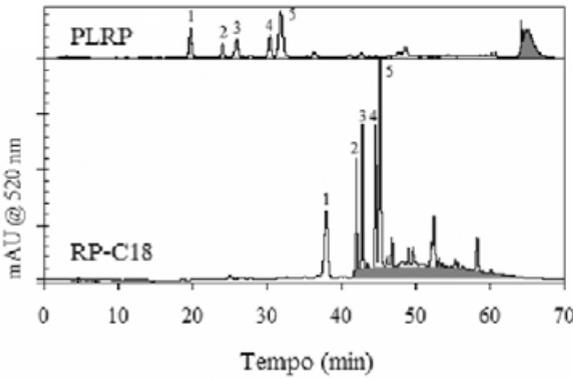


Figura 4. Cromatogramma HPLC di un vino rosso monitorato a 520 nm utilizzando la colonna RP-C18 (in basso) e quella polimerica PLRP (in alto). L'area colorata (in rosso) indica i pigmenti polimerici. I picchi 1-5 indicano i principali antociani monomeri dei vini rossi: Delfinidina 3-glucoside (Dp-3g); Cianidina 3-glucoside (Cy-3g); Petunidina 3-glucoside (Pr-3g); Peonidina 3-glucoside (Pn-3g); Malvidina 3-glucoside (Mv-3g).

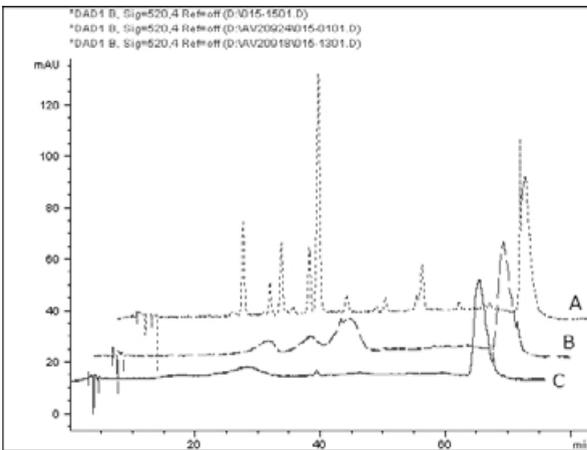


Figure 6. Cromatogramma di un vino rosso in cui è visibile il profilo di controllo senza SO₂ (A), il campione con aggiunta di SO₂ solo al vino prima dell'analisi HPLC (B), e con aggiunta di SO₂ sia al vino che agli eluenti HPLC (C).

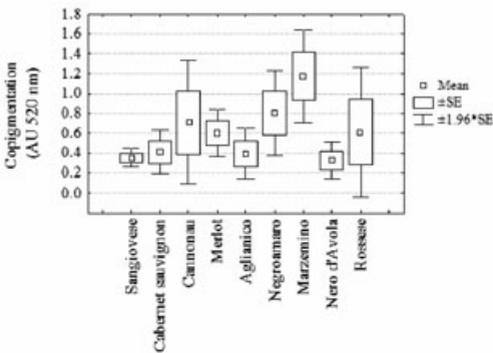


Figura 7. Valori di copigmentazione riscontrati in 124 vini rossi italiani.

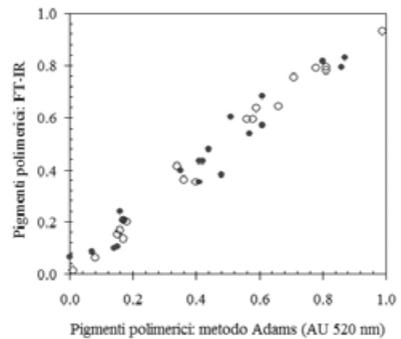


Figura 8. Correlazione tra FTIR e metodo Adams per la determinazione dei polimeri a basso (—) ed elevato peso molecolare (—).