

DOCUMENTO
TECNICO

T. M. Pellicanò
N. Russo
B. Spalletta

***Teresa M. Pellicanò**
*** Nino Russo**
**** Barbara Spalletta**

* Dipartimento di Chimica, Università della Calabria (UNICAL), Arcavacata di Rende (CS)

** Consorzio Agricolo Scavigno - Aziende Agricole Odoardi, Nocera Terinese (CZ)

ANALISI HPLC/ ELSD DI ACIDI ORGANICI PRE E POST-FERMENTATIVI DURANTE LA MATURAZIONE E FERMENTAZIONE

Nell'ambito dei controlli enologici riveste particolare importanza l'analisi degli acidi organici pre- e post-fermentativi in quanto dalla loro natura e contenuto è possibile monitorare i processi fermentativi. Nel presente lavoro vengono mostrati i risultati del monitoraggio di tali composti in uve calabresi utilizzando un metodo HPLC con rivelatore a diffusione di luce (ELSD).

Introduzione

È noto come gli acidi organici fissi pre- e post-fermentativi contribuiscano in modo determinante alla composizione, alla stabilità microbiologica e chimico-fisica ed alle qualità sensoriali dei vini (Ryan & Dupont, 1973; Coppola & Starr, 1986; Fuleki, Pelayo, & Palabay, 1993; Romero & Munoz, 1993). Dalla loro natura e contenuto è possibile monitorare i processi fermentativi (Klampfl, Buchberger, &

Haddad, 2000) e ottenere informazioni legate all'origine della materia prima, alla crescita microbiologica, alle tecniche enologiche ed eventuali alterazioni.

Tali composti giocano un ruolo determinante durante la maturazione degli acini (Phillip & Nelson, 1973; Wang, Gonzalez, Gbur, & Aselage, 1993; Lamikanra, Inyang, & Leong, 1995; Perez, Olias, Espada, Olias, & Sanz, 1997) infatti, ad esempio, l'evoluzione degli acidi tartarico e malico negli acini è utile per

controllare il loro processo di maturazione mentre nel caso del vino, il monitoraggio degli acidi organici permette di controllare l'acidità durante i differenti passaggi del processo di vinificazione.

Tradizionalmente la loro determinazione si basa sull'utilizzo della cromatografia in fase inversa su colonne analitiche C-18 con rivelazione UV a 210 nm (Garcia, Sanchez, Martin, & Cabezudo, 1993), chemiluminescenza (Perez-Ruiz, Martinez-Lonzano, Tomas,

Tab. 1 - Campionatura analizzata mediante metodo HPLC/ELSD

Vitigni (sigla)	n° campioni uva	n° campioni mosto	totale
Magliocco (SH)	5	7	12
Greco Nero (GN)	6	9	15
Gaglioffo (G)	7	8	15
Cabernet Sauvignon (CS)	9	9	18
Nerello Cappuccio (NC)	10	13	23
Cabernet Franc (CF)	10	17	27
Merlot (M)	11	8	19
	58	71	129

& Martin, 2004), cromatografia a scambio ionico (IEC) con soppressione, su resina scambiatrice (Lourdes Morales, Gustavo Gonzales, & Troncoso, 1998) e recentemente elettroforesi capillare (Castineira, Pena, Herrero, & Garcia-Martin, 2002; Esteves, Lima, Lima, & Duarte, 2004).

Il rivelatore evaporativo a diffusione di luce (ELSD) attualmente trova una vasta applicazione in tutti i campi della cromatografia liquida, compresa l'analisi GPC, ed oltre alla maggiore sensibilità il suo maggior vantaggio è la compatibilità con i gradienti per cui è possibile migliorare la separazione di classi di composti quali i carboidrati.

Il segnale misurato si basa sulla luce diffusa dalle particelle dell'analita e consta di tre fasi: nebulizzazione, evaporazione e rivelazione (Dreux, La Fosse, & Morin-Allory, 1996; Yong, & Dolan, 2004). L'eluato cromatografico ed il gas nebulizzante (N₂ o aria) vengono miscelati insieme nel nebulizzatore per formare un aerosol che entra in un tubo riscaldato (*drift tube*) dove la fase mobile evapora lasciando libere le particelle dei soluti non volatili. Ogni analita rimasto esiste come micro-particelle private del solvente che entrano nella cella ottica del rivelatore, dove diffondono il raggio luminoso emesso da un filamento al tungsteno; questa diffusione, raccolta da fibre ottiche e rivelata da un fotomoltiplicatore, dà luogo ad un segnale proporzionale alla concentra-

zione dell'analita (Megoulas, & Koupparis, 2004).

Il metodo HPLC in fase inversa sviluppato si avvale dell'utilizzo del rivelatore a diffusione di luce (ELSD) ed ha permesso di valutare la distribuzione di diversi acidi organici quali: L-(+)- tartarico, citrico, L-(-)-malico, succinico e fumarico in campioni di uve rosse e mosti durante il processo di maturazione e fermentazione. I campioni provengono da sette varietà di vitigni (autoctoni ed alloctoni) caratteristici delle Doc Calabresi Scavigna e Savuto.

Materiali e metodi

Gli standard degli acidi L-(+)- tartarico, citrico, L-(-)-malico, succinico e fumarico e i solventi utilizzati: acido trifluoroacetico (TFA) e H₂O sono stati reperiti fra quelli in commercio.

Le soluzioni standard sono state preparate alla concentrazione di 4000 mg/L in acqua bi-distillata ottenuta mediante sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, Ma, USA) e conservate a -4 °C fino al momento dell'analisi. Differenti diluizioni, preparate in un intervallo compreso tra 2 e 4000 mg/L, sono state utilizzate per i test di calibrazione. Prima dell'analisi HPLC/ELSD tutte le soluzioni sono state opportunamente filtrate.

Campionatura e preparazione. Come riportato in Tab. 1 un totale di 129 campioni (uve e mosti), ottenuti da sette diverse varietà di vitigni, so-

no stati analizzati per valutare la distribuzione dei diversi acidi organici durante il processo di maturazione e di fermentazione.

Delle sette varietà di uva quattro sono tipiche del territorio lamentino nello specifico Magliocco (SH), Greco Nero (GN), Gaglioffo (G) e Nerello Cappuccio (NC) mentre le ultime tre appartengono a varietà alloctone quali Cabernet Sauvignon (CS), Cabernet Franc (CF) e Merlot (M). L'intera campionatura proveniva dai vigneti dell'"Azienda Agricola Odoardi" sita in Nocera Terinese e si riferisce alla vendemmia del 2005.

Le uve, a partire dal 23/08/2005 e fino a completa maturazione, sono state campionate settimanalmente da 13 grappoli rappresentativi di ogni filare. Per ogni prelievo sono state registrate le condizioni climatiche e questo è stato identificato con una lettera dell'alfabeto.

Dagli acini totali ne sono stati prelevati 400; questi sono stati privati della polpa, del vinacciolo, del raspo e della buccia e conservati a -80 °C fino al momento dell'analisi. Gli acini residui di ogni prelievo sono stati conservati in aliquote e conservati a -80 °C.

La polpa su cui è stata effettuata la determinazione analitica è stata omogeneizzando e filtrata; una aliquota pari ad 1 ml è stata diluita a 100 ml con acqua (HPLC grade) e filtrata su filtro GMF Whatman da 0.45 µm prima dell'analisi HPLC/ELSD.

I campioni di mosto, otte-

Tab. 2 - Prestazioni del metodo analitico

Acidi organici	Rt+DS	y = ax+b	R ²	Precisione [§] (mean±sd)	Recupero %	LOD (mg/L)*
L-(+)-tartarico	7.380±0.09	1801.3x + 6992,7	0.9999	10.2±0.33	102	0.8
L-(-)-malico	8.040±0.11	1849.1x + 117569	0.9997	9.0±0.40	90	0.11
citrico	8.923±0.06	3271.6x + 56562	0.9995	8.8±0.38	88	0.15
succinico	10.087±0.08	1187.5x + 4992	0.9991	9.9±0.51	99	0.12
fumarico	11.727±0.12	1861.5x + 11725	0.9992	9.9±0.44	99	0.19

* definito come rapporto segnale/rumore S/N=3 - § definita come rsd% di dieci ripetizioni

nuti dalle varietà di uva considerate, sono stati prelevati giornalmente fino alla fine della fermentazione alcolica (svinatura). In questo caso è stata effettuata una diluizione 1:50 del campione e prima della determinazione analitica una filtrazione di filtro da 0.45 µm GMF Whatman.

Analisi HPLC/ELSD. Le analisi sono state effettuate utilizzando un sistema HPLC Shimadzu serie vp dotato di due pompe LC-10 AT vp, un system controller SCL-10Avp, un degasser GT-154, un forno CTO-10Avp, un iniettore manuale SIL-10AF con loop di 50 µL. Si è operato in condizioni isocratiche di H₂O (0.01 % TFA pH=2.30), usando una colonna RP-C18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm) con diametro delle particelle di 5 µm, termostata a 40 °C, munita di precolonna dello stesso materiale. L'ana-

lisi cromatografica è stata condotta ad una velocità di flusso pari a 0.8 ml/min ed ha permesso di eseguire l'analisi in tempi brevi (15 min). Il volume di campione iniettato era pari a 20 µL. Il rivelatore ELSD-LT è stato settato alle seguenti condizioni: nebulizzazione alla pressione gas carrier (N₂) di 300 KPa; evaporazione a 60°C; rivelazione a gain 8. I dati sono stati raccolti mediante CLASS-Vp 7 Software (Shimadzu, Italia).

Performances analitiche. In Tab. 2 sono riportate le prestazioni del metodo HPLC/ELSD proposto. Le curve di calibrazione sono state ottenute preparando le soluzioni di carboidrati standard in un intervallo pari a 2-4000 mg/L. Il limite di rivelabilità strumentale teorico è stato calcolato utilizzando l'espressione 3σ/S. Il recupe-

ro è stato effettuato su campioni di uve aggiunti, a differenti livelli, di quantità note di ciascun composto considerato. Le analisi sono state effettuate in triplicato. I risultati ottenuti variano dal 88 % al 102 %.

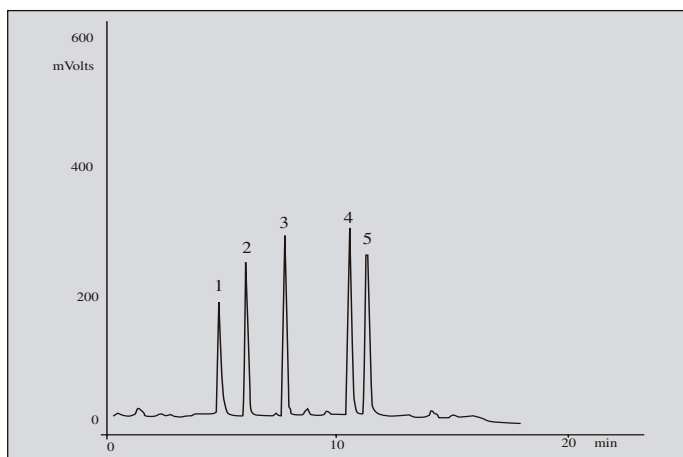
Risultati e discussione

Le Figg. 1 e 2 mostrano il profilo ottenuto per la miscela standard e per un campione di mosto analizzati con il metodo proposto. Il contenuto di acidi organici fissi pre- e post-fermentativi delle sette varietà di uve relativo alla prima settimana di prelievo, al momento della vendemmia e della svinatura è riportato nelle Tabb. 3-5. I dati raccolti, paragonabili alla letteratura, evidenziano che i campioni di uva analizzati

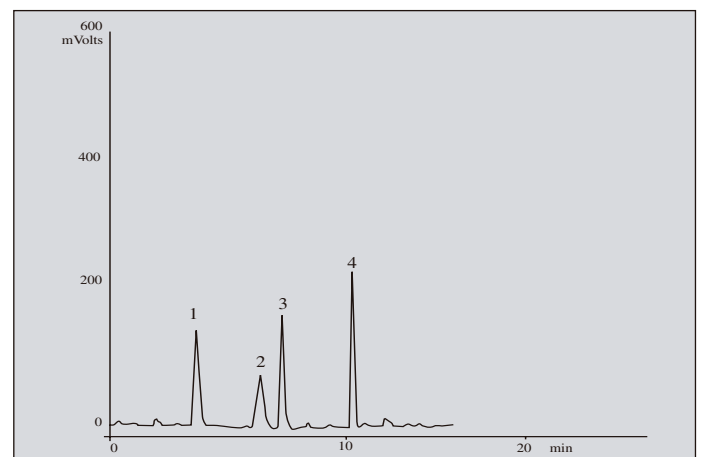
presentano un andamento qualitativo simile nel contenuto di acidi organici dal primo prelievo fino alla vendemmia.

La distribuzione di acidi organici nelle polpe mostra una predominanza di acido tartarico (8.09-5.22 g/L) e malico (9.27-2.49 g/L) seguiti dall'acido citrico (0.3-0.08 g/L). Nei campioni di mosto gli intervalli di concentrazione risultano: acido tartarico (2.06-5.70 g/L), acido malico (1.91-2.07 g/L), acido citrico (0.04-0.2 g/L) ed acido succinico (1.90-2.42 g/L).

Al momento della prima settimana di prelievo (Tab. 3) le uve da cv. *Magliocco* presentavano i valori più alti di acido tartarico (9.16 g/L), malico (10.38 g/L) e citrico (0.7 g/L); al contrario per le uve da vitigni *Nerello Capuccio* sono stati trovati i valori più bassi di tartarico e ci-

Fig. 1 - Cromatogramma HPLC/ELSD della miscela di acidi organici standard

1) acido L-(+)-tartarico, 2) acido L-(-)-malico, 3) acido citrico, 4) acido succinico, 5) acido fumarico

Fig. 2 - Cromatogramma HPLC/ELSD di un campione di mosto

1) acido L-(+)-tartarico, 2) acido L-(-)-malico, 3) acido citrico, 4) acido succinico

Tab. 3 - Contenuto di acidi organici (g/L) nelle uve al momento del primo prelievo ^a

Varietà	acido citrico	acido tartarico	acido malico	acido succinico	acido fumarico
Magliocco A	0.7 ±0.012	9.16 ±0.012	10.38 ±0.016	n.d	n.d
Gaglioffo A	0.6±0.010	8.76±0.021	9.57±0.013	n.d	n.d
Nerello Cappuccio A	0.2±0.007	6.34±0.008	8.84±0.012	n.d	n.d
Greco Nero A	0.5±0.010	7.13±0.006	8.61±0.012	n.d	n.d
Cabernet Sauvignon A	0.4±0.008	7.67±0.010	8.83±0.014	n.d	n.d
Cabernet Franc A	0.4±0.009	8.50±0.007	10.10±0.010	n.d	n.d
Merlot A	0.3±0.010	9.10±0.009	8.57±0.013	n.d	n.d
Minimo	0.2	6.34	8.57		
Massimo	0.7	9.16	10.38		
Media	0.4	8.09	9.27		

^a media±DS dello stesso campione analizzato in triplicato

Tab. 4 - Contenuto di acidi organici (g/L) nelle uve al momento della vendemmia ^a

Varietà	acido citrico	acido tartarico	acido malico	acido succinico	acido fumarico
Magliocco E	0.6±0.009	7.28±0.006	2.19±0.012	n.d	n.d
Gaglioffo F	0.5±0.011	5.18±0.005	2.19±0.011	n.d	n.d
Nerello Cappuccio L	0.09±0.008	5.08±0.006	1.87±0.007	n.d	n.d
Greco Nero G	0.4±0.012	7.16±0.008	2.77±0.008	n.d	n.d
Cabernet Sauvignon I	0.3±0.010	4.03±0.010	3.40±0.013	n.d	n.d
Cabernet Franc L	0.06±0.010	3.56±0.009	2.88±0.013	n.d	n.d
Merlot M	0.07±0.007	4.25±0.009	2.14±0.010	n.d	n.d
Minimo	0.06	3.56	1.87		
Massimo	0.6	7.28	3.40		
Media	0.3	5.22	2.49		

^a media±DS dello stesso campione analizzato in triplicato

trico mentre il campione di uve *Merlot* presentava il valore più basso di acido malico. Per nessuna varietà di uva, sono stati ritrovati gli acidi succinico e fumarico.

Alla data della vendemmia (Tab. 4) i tre acidi maggiori cominciano a diminuire fino a valori medi di 0.3 g/L (citrico), 5.22 g/L (tartarico) e 2.49 g/L (malico). I valori più alti di acido L-(+)-tartarico sono stati trovati anche in questo caso, per le polpe da cv. *Magliocco* seguite dalle cv. *Greco Nero* e *Gaglioffo*. I campioni di uva *Cabernet Sauvignon* e *Nerello Cappuccio* presentavano, rispettivamente, il valore più alto (3.40 g/L) e più basso (1.87 g/L) di acido L-(-)-malico.

Come riportato in Tab. 5 il campione ottenuto da uve di varietà *Magliocco* presenta il valore più alto di acido tartarico (5.70 g/L). Per il mosto da *Cabernet Sauvignon*, come visto per le uve, è stato trovato il valore più alto di acido malico pari a 2.07 g/L mentre il campione di *Gaglioffo* presentava il valore più basso (1.91 g/L). L'acido succinico è presente in tutti i campioni di mosto analizzati in concentrazioni comprese tra 1.90 g/L e 2.42 g/L mentre la concentrazione di acido fumarico è inferiore ai limiti di rivelabilità strumentali.

Dall'analisi degli andamenti degli acidi L-(+)-tartarico e L-(-)-malico nei campioni di uva relativi ai sette

vitigni analizzati si evince che, come ci si aspettava, l'acido malico diminuisce nel corso della maturazione sia per effetto della diluizione per ingrossamento dell'acino sia perché viene metabolizzato dalle stesse cellule che lo contengono.

La variazione di acido malico è correlata anche alle condizioni climatiche infatti, uve coltivate in regioni dal clima mite tendono ad avere un contenuto di acido malico più basso rispetto quelle cresciute in regioni fredde (Ribereau-Gayon, Dubourdiou, Doneche, & Lonvaud, 1998). L'acido tartarico si accumula durante il primo periodo di sviluppo dell'acino; viene degradato solo

molto lentamente, di conseguenza la sua concentrazione (per acino) rimane relativamente stabile, in diverse condizioni ecologiche e culturali. In fase di fermentazione (vinificazione) il tenore di acido tartarico diminuisce per via della precipitazione tartarica, processo che comporta il legame dell'acido con il potassio e successiva precipitazione del composto formatosi. Dai dati ottenuti si evince che la varietà di uva autoctona *Magliocco* presenta il più alto contenuto in acidi organici rispetto l'intera campionatura.

Considerazioni conclusive

In questo lavoro è stato utilizzato un metodo HPLC con rivelatore evaporativo a diffusione di luce (ELSD) per la determinazione di acidi organici pre- e post-fermentativi in campioni di uve rosse e mosti durante il processo di maturazione e fermentazione. I campioni provengono da sette varietà di vitigni (autoctoni ed alloctoni) caratteristici delle Doc Calabresi Scavigna and Savuto.

Le applicazioni effettuate mostrano che il metodo proposto si è rivelato preciso, veloce e sensibile per cui può essere adatto per le analisi di routine.

Riassunto

Viene utilizzato un metodo HPLC/ELSD per la determinazione di acidi organici pre- e post-fermentativi in campioni di uve e mosti durante il processo di maturazione e fermentazione. I campioni provengono da sette varietà di vitigni (autoctoni ed alloctoni) caratteristici delle Doc Calabresi Scavigna and Savuto.

Dai risultati ottenuti si evince che l'acido L-(+)-tartarico è l'acido maggiormente presente nei campioni di polpa e mosto con valori medi compresi tra 8.09 g/L e 5.22 g/L; seguono l'acido L-

Tab. 5 - Contenuto di acidi organici (g/L) nei mosti al momento della svinatura ^a

Varietà	acido citrico	acido tartarico	acido malico	acido succinico	acido fumarico
Magliocco 7	0.2±0.010	5.70±0.08	2.03±0.021	2.42±0.014	n.d.
Gaglioffo 8	0.09±0.010	4.64±0.010	1.91±0.016	1.90±0.006	n.d.
Nerello Cappuccio 13	0.06±0.008	4.21±0.008	2.02±0.012	2.03±0.009	n.d.
Greco Nero 9	0.05±0.007	5.47±0.009	2.02±0.008	2.10±0.012	n.d.
Cabernet Sauvignon 9	0.08±0.012	3.29±0.017	2.07±0.010	2.22±0.012	n.d.
Cabernet Franc 17	0.04±0.008	2.06±0.012	2.02±0.006	2.09±0.016	n.d.
Merlot 8	0.05±0.009	3.81±0.013	1.96±0.017	1.92±0.008	n.d.
Minimo	0.04	2.06	1.91	1.90	
Massimo	0.2	5.70	2.07	2.42	
Media	0.08	4.17	2.00	2.10	

^a media ±DS dello stesso campione analizzato in triplicato

(-)-malico (9.27-2.49 g/L) e l'acido citrico (0.4-0.08 g/L). Il metodo HPLC/ELSD sviluppato si è rivelato preciso, veloce e sensibile per cui può essere adatto per le analisi di routine.

Bibliografia

Castineira, A., Pena, R. M., Herrero, C., Garcia-Martin, S. (2002). Analysis of organic acids in wine by capillary electrophoresis with direct UV detection. *J. of Food Composition and Analysis*, 15, 319-331.

Coppola, E. D. (1984). Use of HPLC to monitor juice authenticity. *Food Techn.*, 38, 88-91.

Coppola, E. D., Starr, M. S. (1986). Liquid chromatographic determination of major organic acids in apple juice and cranberry juice cocktail. *J.A.O. A.C.*, 69, 594-597.

Dreux, M., La Fosse, M., Morin-Allory, L. (1996). LC GC Int. 9, 148.

Esteves, V. I., Lima, S. S. F., Lima, D. L. D., Duarte, A. C. (2004). Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. *Anal. Chim. Acta*, 513, 163-167.

Fuleki, T., Pelayo, E., Palabay, R. (1993). Carboxylic acid composition of authentic varietal and commercial grape juices. *J.A.O. A.C.*, 76, 591-600.

Gherardi, S., Saccani, G., Trifir, A., Calza, M. (1995). Use of ion chromatography for organic acid determination in fruit juices. *Fruit Processing*, 7, 206-212.

Klampfl, C. W., Buchberger, W., Haddad, P. R. (2000). Determination of organic acids in food samples by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 881, 357-364.

Lamikanra, O., Inyang, I., Leong, S. (1995). Distribution and effect of grape maturity on organic acid content of red Muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 3026-3028.

Masar, M., Kaniansky, D., Bodor, R., Johnck, M., Stanislawski, B. (2001). Determination of organic acids and inorganic anions in wine by isotachopheresis on a planar chip. *J. Chromatogr. A*, 916, 167-174.

Mecca, F., Andreotti, R., Veronelli, L. (1979). Componenti organici degli aceti di vino, L'aceto, Aeb., Brescia, 21.

Megoulas, N. C., Koupparis, M. A. (2004). Enhancement of evaporative light scattering detection in high-performance liquid chromatographic determination of neomycin based on highly volatile mobile phase, high-molecular-mass ion-pairing reagents and controlled peak shape. *J. Chromatogr. A*, 1057, 125-131.

Perez, A. G., Olias, R., Es-

pada, J., Olias, J. M., Sanz, C. (1997). Rapid determination of sugars, non-volatile acids and ascorbic acid in strawberry and other fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3545-3549.

Perez-Ruiz, T., Martinez-Lozano, C., Tomas, V., Martin J. (2004). High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. A*, 1026, 57-64.

Philip, T., Nelson, F. E. (1973). A procedure for quantitative estimation of malic acid and tartaric acids of grape juices. *J. of Food Science*, 38, 18-20.

Romero, E. G., Munoz, G. S. (1993). Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 655, 111-117.

Ryan, J. J., Dupont, J. A. (1973). Identification and analysis of the major acids from fruit juices and wines. *J. Agric. Food Chem.*, 21, 45-49.

Yong, C. S., Dolan, J. W. (2004). LC GC Eur. 17, 192

Wang, T., Gonzalez, A. R., Gbur, E. E., Aselage, J. M. (1993). Organic acid changes during ripening of processing peaches. *Journal of Food Science*, 58, 631-632.