

DOCUMENTO
TECNICO

**Giacomo Dugo
Daniele Giuffrida
Roberto Magnisi
Fortunato Vilasi
Teresa M. Pellicanò
Giovanna L. La Torre**

*Dipartimento di Chimica
Organica e Biologica,
Università degli Studi
di Messina, Facoltà di Scienze
MM. FF. NN. - Messina*



G. Dugo

DETERMINAZIONE HPLC/MS DI COMPOSTI ANTIOSSIDANTI IN VINI SICILIANI DA DESSERT

La Sicilia vanta la produzione di diversi vini da dessert e da aperitivo: il più famoso è il Marsala seguito dal Moscato di Pantelleria e la Malvasia di Lipari. Questo lavoro intende effettuare indagini preliminari sul contenuto di sostanze polifenoliche presenti in diversi campioni di vino da dessert siciliani, mediante applicazione di un metodo HPLC/MS con interfaccia elettrospray (ES⁻).

Introduzione

Con il termine vini da dessert si intendono tutti i vini che in genere vengono serviti alla fine del pasto, solitamente insieme al dolce, e che spesso sono liquorosi.

Fra questi, il Marsala, di origini antichissime, è il più famoso vino liquoroso italiano e deve la sua fama a quelle caratteristiche dovute alle proprietà del terreno, alle tecniche di vinificazione, tramandate da padre in figlio, ed al caldo tepore delle terre

siciliane. Esso si ottiene da uve della cultivar Grillo, Cataratto, Inzolia, Perricone rosso e Nerello Mascalese (per la versione rubino), coltivate in zone tipiche della provincia di Trapani. Presenta un color ambra, con aroma caratteristico di prodotto maderizzato, di legno, vaniglia, mandorla amara, nocciole tostate e con un insieme di altre note olfattive di caldo, pieno, corposo, e forte. La produzione di questo vino (1) è storicamente legata al nome di Woodhouse, che per

primo lo introdusse nei mercati inglesi.

Il Marsala è il primo vino italiano a denominazione d'origine controllata e in base al decreto del 28/12/1984 n° 851 (2) viene distinto per caratteristiche produttive, colore e tenore zuccherino.

Oltre che per il vino Marsala la Sicilia vanta la produzione di altri vini da dessert.

L'isola di Pantelleria è conosciuta per il suo aromatico Moscato che raggiunge il suo massimo nella versione Passito forte e dolce. Il Moscato



Tab. 1 - Concentrazione dei polifenoli (mg/L) in Marsala Fine e Superiore

	Fine			Superiore	
	1	2	3	4	5
Ac. Gallico	9,29	10,37	18,09	3,08	8,62
Ac. Protocatechico	0,61	0,52	2,06	1,83	2,47
Tirosolo	6,11	5,15	22,96	6,68	23,92
Ac. Vanillico	3,95	3,89	2,43	3,33	3,27
Ac. Siringico	0,62	1,47	1,21	0,97	1,21
Ac. Caffaico	1,74	2,62	2,39	1,52	3,51
Ac. Ferulico	0,08	0,27	0,28	0,30	0,33
Ac. <i>p</i> -Cumarico	0,08	0,17	-	0,15	0,15
Procianidina B1	3,90	-	4,12	2,59	3,17
Procianidina B2	5,73	2,47	0,64	2,20	3,05
(+)-Catechina	2,96	1,76	3,66	3,90	2,83
(-)-Epicatechina	4,01	2,71	2,84	1,66	5,82
Etilgallato	1,87	3,78	3,43	2,22	4,04
Rutina	-	-	-	-	-
Isoquercitrina	6,62	7,08	-	0,87	-
Isoramnetina-3-O-glucoside	-	-	-	-	-
Kaempferolo-3-O-glucoside	-	-	-	-	-
Miricetina	-	-	-	-	-
Quercetina	1,63	4,47	-	0,24	-
Kaempferolo	0,04	0,14	-	-	-
Isoramnetina	-	0,11	-	-	-
Ramnetina	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Resveratrolo	-	-	-	0,06	0,08
<i>cis</i> -Resveratrolo	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Piceid	0,22	0,18	-	0,47	0,91
<i>cis</i> -Piceid	-	-	-	0,06	0,07

è anche la base dei rari bianchi dolci di Siracusa e Noto. Famosa è la Malvasia di Lipari che proviene da un'antica varietà di Malvasia cresciuta nelle isole Eolie (3). La produzione è concentrata nell'isola di Salina dove i vini sono noti per il loro colore arancio-ambra ed il seducente bouquet che ricorda le albicocche mature, le erbe e gli agrumi mediterranei.

Pochi sono i riferimenti bibliografici in merito agli aspetti compositivi di questa tipologia di vini; Di Stefano (4) ha studiato i componenti aromatici del Marsala, ma non è mai stata rivolta l'attenzione alla determinazione e al dosaggio della frazione polifenolica.

Questo studio è volto ad effettuare preliminari indagini e considerazioni sul contenuto di sostanze polifenoliche (catechine, flavonoidi, stilbeni, acidi fenolici e cinnamici), presenti in diversi

campioni di vino da dessert siciliani, con particolare attenzione ai vini Marsala Doc.

Allo scopo è stato utilizzato un metodo HPLC/MS a fase inversa con interfaccia elettrospray (ES⁻) che, senza pretrattamento del campione, permette di riconoscere in appena 60 minuti 24 diversi polifenoli appartenenti alle diverse classi di acidi fenolici, flavonoidi, flavanoli e stilbeni (5-7).

Parte sperimentale

Reagenti e standard. I solventi utilizzati: acetonitrile e H₂O per HPLC sono stati acquistati dalla Carlo Erba. Gli standard di: acido formico, (-)-epicatechina, (+)-catechina, acido gallico, acido 3,4-diidrossibenzoico (acido protocatechico), acido 4-idrossi-3-metossibenzoico (acido vanillico), acido 4-

idrossi-3,5-dimetossibenzoico (acido siringico), acido 3,4-diidrossicinnamico (acido caffeaico), acido 4-idrossi-3-metossicinnamico (acido ferulico), acido 4-idrossicinnamico (acido *p*-cumarico) e tirosolo (2-(4-idrossifenil)etilalcol) sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich. Gli altri composti fenolici: procianidina B1, procianidina B2, etilgallato, quercetina, isoquercitrina (quercetina-3-O-glucoside), kaempferolo, kaempferolo-3-O-glucoside, ramnetina, isoramnetina, isoramnetina-3-O-glucoside, rutina (quercetina-3-O-rutinoside) e miricetina sono stati acquistati da Extrasynthese.

Le soluzioni standard sono state preparate dissolvendo 100 mg di ciascun standard in una miscela di acqua (pH=3 per acido formico) /metanolo (90:10).

La soluzione standard di *cis*-resveratrolo è stata ottenuta irradiando a 366 nm una soluzione metanolica di *trans*-resveratrolo per 120 min (6). Tutte le soluzioni sono state conservate a -4 °C e protette dalla luce. Prima di essere iniettate, tutte le soluzioni sono state filtrate attraverso un filtro da 0.45mm (GMF Whatman).

Campioni. Sono stati analizzati 23 campioni di vino da dessert siciliani così suddivisi: 7 vini Marsala tipo Riserva, 3 vini Marsala tipo Soleiras, 3 vini Marsala tipo Superiore, 2 vini Marsala tipo Fine, 2 vini Zibibbo (di cui uno ottenuto secondo le tradizionali tecniche di appassimento al sole e l'altro, sperimentale, ottenuto con tecniche di deumidificazione in ambiente chiuso), 2 vini Malvasia (di cui uno ottenuto secondo le tradizionali tecniche di appassimento al sole e l'altro, sperimentale, ottenuto con tecniche di deumidificazione in ambiente chiuso) e 4 vini liquorosi.

I campioni sono stati conservati al buio a 4°C. L'analisi è stata condotta senza alcun'estrazione né purificazione del campione: un'aliquota è stata filtrata attraverso un filtro Whatman di 0.45mm,



Tab. 2 - Concentrazione dei polifenoli (mg/L) in Marsala Riserva

	6	7	8	9	10	11	12
Ac. Gallico	9,84	11,59	13,27	17,19	10,59	12,41	10,13
Ac. Protocatechico	2,17	2,79	2,97	2,59	3,40	1,91	1,77
Tirosolo	11,95	17,91	27,03	31,55	31,30	20,47	20,90
Ac. Vanillico	1,37	1,90	0,48	0,91	1,30	1,37	1,85
Ac. Siringico	0,48	0,93	0,60	0,83	0,70	0,64	0,89
Ac. Caffeico	0,96	0,94	0,97	0,72	0,62	0,68	0,63
Ac. Ferulico	0,30	0,36	0,28	0,56	0,40	0,33	0,20
Ac. <i>p</i> -Cumarico	0,03	-	0,04	-	-	-	-
Procianidina B1	4,48	-	-	-	-	2,54	-
Procianidina B2	-	-	-	1,71	3,23	2,33	-
(+)-Catechina	4,51	4,05	-	5,19	5,11	4,74	4,26
(-)-Epicatechina	3,73	7,08	-	11,24	10,52	9,18	3,39
Etilgallato	1,97	1,92	2,65	4,11	2,12	2,33	0,71
Rutina	-	-	-	-	-	-	-
Isoquercitrina	-	-	-	-	-	-	-
Isoramnetina-3-O-glucoside	-	-	-	-	-	-	-
Kaempferolo-3-O-glucoside	-	-	-	-	-	-	-
Miricetina	-	-	-	-	-	-	-
Quercetina	-	-	-	-	-	-	-
Kaempferolo	-	-	-	-	-	-	-
Isoramnetina	-	-	-	-	-	-	-
Ramnetina	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Resveratrolo	0,09	0,10	-	-	-	-	-
<i>cis</i> -Resveratrolo	0,09	0,08	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Piceid	0,12	0,19	-	-	0,11	-	-
<i>cis</i> -Piceid	0,06	0,04	-	-	-	-	-

prima dell'analisi HPLC.

Nelle tabelle di seguito riportate e nel testo si è ommesso il nome dei produttori e dei prodotti; in loro vece i singoli vini sono stati designati con numeri progressivi, dividendo i campioni per tipologie.

Analisi HPLC/MS. Le analisi sono state effettuate utilizzando un sistema HPLC Shimadzu dotato di due pompe LC10-AD, un system controller SCL-10A, un iniettore Rheodyne (model 7725i) con loop di 5 mL, un rivelatore a fotodiodi (DAD) SPD-M10Avp con cella semi-micro. Le lunghezze d'onda d'esercizio erano comprese tra 200 e 600 nm.

È stata utilizzata una colonna Supelco Discovery C18 (15 mm x 2.1 mm), con dimensione delle particelle di 5 µm, avente una precolonna dello stesso materiale. La fase mobile era composta di

due solventi: acido formico in acqua (pH=3, solvente A) e acido formico in acetonitrile (pH=3, solvente B): 0.01-20.00 min 5% B isocratico; 20.01-50.00 min, 5-40% B; 50.01-55.00 min, 40-95% B; 55.01-60.00 min 95% B isocratico. Il flusso era di 0.2 ml/min e le analisi sono state condotte a 20 °C.

Tale sistema è stato accoppiato ad un rivelatore MS Shimadzu 2010 equipaggiato con interfaccia elettrospray (ESI). Quest'ultima è stata usata con ionizzazione negativa, a diverse tensioni di frammentazione. L'azoto è stato usato come gas nebulizzante.

L'acquisizione MS con l'interfaccia ESI è stata eseguita nelle seguenti condizioni: probe high voltage, 4 kV; flusso del gas nebulizzante (N₂), 4.5 L/min; curved desolvation line (CDL) voltage, 10 V; temperatura del CDL, 250 °C; tipo di acquisizione,

SCAN, 50-700 m/z e deflector voltage a -20 e -80 V. Per la ricerca di particolari ioni si è lavorato in SIM (Selected Ion Monitoring).

Risultati e discussioni

I risultati relativi al contenuto dei singoli polifenoli rilevati in 23 campioni di vino da dessert, suddivisi in varie tipologie secondo la varietà, sono riportati nelle Tab. 1-5.

I dati evidenziano che, tra i polifenoli semplici (tirosolo, etil gallato, acidi benzoici e cinnamici), l'acido gallico ed il tirosolo sono i composti più ragguardevoli di questa frazione.

Particolarmente interessante risulta il tenore di tirosolo; infatti, i dati riportati per i vini Marsala analizzati (Tab. 1-3) mostrano che questo composto in media è presente in tali campioni con valori pari a 20 mg/L e, comunque, mediamente superiore rispetto agli altri vini dolci presi in esame.

Tra i vini Marsala tipo Riserva (Tab. 2) i campioni 9 e 10 mostrano il tenore più alto in tirosolo (31.55 mg/L e 31.30 mg/L rispettivamente) tanto che questi valori risultano confrontabili con dati riscontrati in vini rossi Siciliani del commercio (6).

Dall'analisi dei dati riportati in Tab. 1 emerge che per i vini Marsala del tipo Fine e Superiore il contenuto in tirosolo risulta più basso nei campioni 1, 2 e 4 (6.11 mg/L, 5.15 mg/L, 6.68 mg/L rispettivamente).

Questi stessi tre campioni rappresentano inoltre una singolarità tra i vini di tipo Marsala; in essi è stata riscontrata, infatti, la presenza di isoquercitrina e quercetina, non dosabili altresì nei restanti campioni di uguale tipologia.

Riguardo al contenuto in resveratrolo, emerge che in questo gruppo di vini Marsala il *cis*-resveratrolo risulta assente in tutti i campioni, mentre sono presenti in tracce il *trans*-resveratrolo ed il *cis*-piceid.



Tab. 3 - Concentrazione dei polifenoli (mg/L) in vini Marsala di tipo Soleras

	13	14	15
Ac.Gallico	15,55	13,43	19,49
Ac. Protocatechico	3,25	2,84	3,50
Tirosolo	21,01	20,09	19,73
Ac. Vanillico	2,49	3,44	3,95
Ac. Siringico	0,87	0,82	1,42
Ac. Caffeoico	1,86	1,11	1,93
Ac. Ferulico	0,32	0,31	0,25
Ac. <i>p</i> -Cumarico	0,04	-	0,21
Procianidina B1	-	-	3,37
Procianidina B2	-	-	2,54
(+)-Catechina	5,58	6,89	1,63
(-)-Epicatechina	-	10,83	3,98
Etilgallato	3,26	3,20	6,05
Rutina	-	-	-
Isoquercitrina	-	-	-
Isoramnetina-3-O-glucoside	-	-	-
Kaempferolo-3-O-glucoside	-	-	-
Miricetina	-	-	-
Quercetina	-	-	-
Kaempferolo	-	-	-
Isoramnetina	-	-	-
Ramnetina	-	-	-
<i>trans</i> -Resveratrolo	-	-	0,15
<i>cis</i> -Resveratrolo	-	-	-
<i>trans</i> -Piceid	-	-	0,89
<i>cis</i> -Piceid	-	-	0,09

Tab. 4 - Concentrazione dei polifenoli (mg/L) in vini Zibibbo e Malvasia

	Zibibbo		Malvasia	
	Deumidificato 16	Tradizionale 17	Deumidificato 18	Tradizionale 19
Ac.Gallico	19,14	17,76	4,46	5,89
Ac. Protocatechico	2,81	2,80	3,41	3,72
Tirosolo	11,60	16,39	23,60	23,46
Ac. Vanillico	1,24	1,35	1,86	4,55
Ac. Siringico	4,64	4,50	1,03	0,94
Ac. Caffeoico	2,08	2,05	2,74	0,73
Ac. Ferulico	0,35	0,39	0,47	0,32
Ac. <i>p</i> -Cumarico	0,18	0,15	0,10	0,12
Procianidina B1	3,57	3,74	3,62	4,15
Procianidina B2	3,82	3,75	1,54	1,17
(+)-Catechina	3,21	3,76	1,86	4,09
(-)-Epicatechina	2,15	2,41	1,01	1,34
Etilgallato	1,25	0,93	2,63	2,44
Rutina	-	-	-	0,15
Isoquercitrina	0,51	0,55	-	0,75
Isoramnetina-3-O-glucoside	-	-	-	-
Kaempferolo-3-O-glucoside	-	-	-	-
Miricetina	-	-	-	-
Quercetina	1,01	0,97	3,83	4,26
Kaempferolo	0,04	0,05	0,13	0,14
Isoramnetina	0,03	0,04	0,08	0,09
Ramnetina	-	-	-	-
<i>trans</i> -Resveratrolo	0,05	0,04	0,05	0,04
<i>cis</i> -Resveratrolo	-	-	-	0,07
<i>trans</i> -Piceid	0,31	0,28	0,47	0,15
<i>cis</i> -Piceid	-	0,05	0,08	0,09

Il *trans*-piceid è presente in quantità maggiore soprattutto nel campione 5 (0.91 mg/L), mentre è assente (sotto il limite di rivelabilità) nel campione 1.

Tra le tipologie di Marsala considerate, quello Riserva (Tab. 2) presenta un contenuto medio in (-)-epicatechina più alto rispetto le altre tipologie con punte massime per i campioni 9, 10 e 11. Interessante risulta il contenuto di tale composto per il campione 14 (10.83 mg/L), infatti, tra i Marsala tipo Soleras (Tab. 3), questo è l'unico campione in cui è stato dosato in quantità maggiori.

L'analisi dei dati riportati in Tab. 3 mette in evidenza, inoltre, che all'interno di questo stesso gruppo solo per il campione 15 è stato possibile dosare il *trans*-resveratrolo (0.15 mg/L), il *cis*-piceid (0.09 mg/L) ed il *trans*-piceid (0.89 mg/L).

Come si evince dalle Tab. 1-3, relative alle diverse tipologie di vini Marsala, poco rappresentati e molto spesso assenti (sotto il limite di rivelabilità) risultano, invece, i flavonoidi; essi, infatti, sono stati dosati solamente, sebbene in piccole concentrazioni, nei campioni di Marsala Fine, che ha un tempo di invecchiamento di un anno.

A differenza dei Marsala, nei campioni di vino liquorosi (Tab. 5), Zibibbo e Malvasia (Tab. 4) è stata riscontrata la costante presenza di flavonoidi quali quercetina, kaempferolo e isoramnetina. In particolare, il vino da desert 23, ottenuto da uve di cv. Nero d'Avola e non invecchiato, mostra il contenuto più alto di questi composti, unitamente ad un più elevato contenuto in polifenoli totali.

La composizione della frazione polifenolica dei vini passiti Zibibbo e Malvasia (Tab. 4) non subisce una sostanziale modificazione in relazione ai due diversi processi di produzione che prevedono o le tradizionali tecniche di appassimento al sole o la deumidificazione in ambiente chiuso.



Tab. 5 - Concentrazione dei polifenoli (mg/L) in vini liquorosi

	20	21	22	23
Ac. Gallico	4,25	3,32	8,87	77,44
Ac. Protocatechico	2,56	1,56	2,45	2,14
Tirosolo	11,55	10,71	13,12	14,55
Ac. Vanillico	2,50	2,57	2,14	3,18
Ac. Siringico	2,46	3,03	1,40	1,41
Ac. Caffeico	2,09	2,35	3,48	2,77
Ac. Ferulico	0,38	0,38	0,36	0,39
Ac. <i>p</i> -Cumarico	0,09	0,07	0,10	0,31
Procianidina B1	3,72	1,25	4,60	10,05
Procianidina B2	-	2,54	-	1,28
(+)-Catechina	10,67	5,46	-	17,83
(-)-Epicatechina	-	5,52	-	10,97
Etilgallato	-	-	0,56	13,33
Rutina	0,37	0,37	-	1,66
Isoquercitrina	5,46	5,05	5,73	5,36
Isoramnetina-3-O-glucoside	-	-	-	0,31
Kaempferolo-3-O-glucoside	-	-	-	1,08
Miricetina	-	-	-	3,74
Quercetina	1,26	1,61	1,71	8,21
Kaempferolo	0,05	0,05	-	0,20
Isoramnetina	0,04	0,04	-	0,13
Ramnetina	-	-	-	-
<i>trans</i> -Resveratrolo	0,02	-	-	0,67
<i>cis</i> -Resveratrolo	-	-	-	0,04
<i>trans</i> -Piceid	0,09	0,09	-	0,88
<i>cis</i> -Piceid	-	-	-	0,14

Considerazioni conclusive

L'uso di una tecnica analitica in cui un HPLC è stato accoppiato ad uno spettrometro di massa, grazie alle informazioni fornite dal confronto con i tempi di ritenzione, i pesi molecolari ed eventuali frammentazioni con quelli di campioni autentici, ha consentito la raccolta di una prima serie d'informazioni sul profilo polifenolico dei vini da dessert siciliani.

In particolare è emerso che i vini maggiormente invecchiati presentano un contenuto in polifenoli a volte minore di quelli più giovani.

Ciò conferma, come prevedibile, che a causa dell'invecchiamento i composti fenolici subiscono generalmente un processo di degradazione.

Il *cis*-resveratrolo risulta assente in quasi tutti i campioni, mentre *trans*-resveratrolo ed il *cis*-piceid, quando

presenti, lo sono a concentrazioni molto basse.

Dopo una prima caratterizzazione di questa tipologia di vini sono auspicabili ulteriori indagini al fine di verificare la velocità di degradazione dei composti fenolici al procedere dell'invecchiamento. ■

Riassunto

Sono state condotte indagini e considerazioni preliminari sul contenuto di sostanze polifenoliche (catechine, flavonoidi, stilbeni, acidi fenolici e cinammici), presenti in diversi campioni di vino da dessert siciliani, con particolare attenzione ai vini Marsala D.O.C.

Allo scopo è stato utilizzato un metodo HPLC/MS a fase inversa con interfaccia elettrospray (ES-) che, senza pretrattamento del campione, permette di riconoscere in appena 60 minuti 24 diversi polifenoli appartenenti alle diverse classi di acidi

fenolici, flavonoidi, flavanoli e stilbeni.

I dati evidenziano che, tra tutti i polifenoli, l'acido gallico ed il tirosolo sono i composti prevalenti. In particolare è emerso che i vini maggiormente invecchiati presentano valori a volte minori di quelli più giovani.

A differenza dei Marsala, nei campioni di vino Zibibbo e Malvasia è stata riscontrata la costante presenza di flavonoidi quali quercetina, kaempferolo e isoramnetina; inoltre, la composizione della frazione polifenolica di questi vini passiti non subisce una sostanziale modificazione in relazione ai due diversi processi di produzione adottati.

Parole chiave: vini dessert, polifenoli, HPLC/MS

Bibliografia

1. S. Mondini – Il Marsala – Ed. F.lli Ottavi, Casale Monferrato, (1922)

2. Nuova disciplina del vino Marsala. G. Uff. n° 347 del 19/12/1984

3. G. Bambara "Relazione illustrativa per l'uso della denominazione di origine controllata del vino Malvasia delle Lipari"- Cantina sperimentale di Milazzo (ciclost. in proprio) (1972)

4. R. Di Stefano "Studio della composizione chimica e dei composti volatili del marsala vergine. Nota I" Vignevini 12 (1985) 39-46.

5. G. Dugo. "Determination of the polyphenolic content in Sicilian wines by LC-MS techniques" Drugs Exptl Res. (accettato per la pubblicazione) 2003.

6. B.C. Trela, A.L. Waterhouse. "Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability" J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 1253-1257.

7. G. L. La Torre, M. Saitta, F. Vilasi, T. Pellicanò, G.mo Dugo. "Direct liquid chromatographic analysis of phenolic compounds in Sicilian wines with PDA and MS detection" Anal. Chim. Acta (inviato per la pubblicazione) 2003.

