

DOCUMENTO  
TECNICO

**Andrea Versari**  
**Giuseppina P. Parpinello**  
**Sergio Galassi**

*Corso di Laurea in Viticoltura  
ed Enologia, Dipartimento  
di Scienze degli Alimenti,  
Università di Bologna - Cesena*

*Da sinistra:  
G. P. Parpinello,  
A. Versari,  
S. Galassi*

## METODI DI ANALISI DEL COLORE DEI VINI ROSSI: ANTOCIANI, PIGMENTI POLIMERICI E COPIGMENTAZIONE

In questo lavoro vengono rappresentati alcuni dei più recenti metodi di analisi utili per lo studio delle componenti del colore dei vini rossi. Il lavoro è frutto di una lunga collaborazione tra i ricercatori del gruppo di enologia dell'Università di Bologna e quelli della University of California, Davis (Usa) dove è stata condotta parte dell'attività di ricerca.

### Premessa

Il colore dei vini rossi rappresenta una caratteristica 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 (Fig. 1). Lo studio della composizione antocianica delle uve, della loro diffusione nel mosto durante la macerazione e la loro interazione con altri composti del vino durante la

conservazione sono aspetti di notevole importanza per l'enologo. In tale contesto, la disponibilità di adeguati strumenti di analisi rappresenta un prerequisito fondamentale per lo studio delle sostanze coloranti dei vini (Paronetto, 1977).

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; a loro va un sentito ringraziamento. Lo studio è

stato realizzato con il finanziamento della borsa di studio per l'estero Marco Polo (AV), il Stephen Sinclair Scott Endowment (RBB), ed il contributo delle cantine che hanno fornito i campioni di vino per le analisi: Atlas Peak, Mondavi, Trefethen, Saintsbury, UC Davis experimental winery (California).

Per chiarezza di esposizione i risultati verranno presentati in quattro note:

1. applicazione del *metodo Adams* per l'analisi spettrofotometrica dei pigmenti poli-

merici a basso ed elevato peso molecolare nei vini rossi;  
2. sviluppo di un metodo

HPLC per la determinazione dei pigmenti polimerici nei vini rossi;  
3. confronto tra metodi

HPLC e spettrofotometrici per la determinazione dei pigmenti polimerici nei vini rossi;

4. messa a punto di una metodica rapida FT-IR per la predizione dei pigmenti polimerici nei vini rossi.

## 1. APPLICAZIONE DEL METODO ADAMS PER L'ANALISI SPETTROFOTOMETRICA DEI PIGMENTI POLIMERICI A BASSO ED ELEVATO PESO MOLECOLARE NEI VINI ROSSI

### Introduzione

La misura oggettiva del colore e delle sue componenti chimiche nei vini rossi è da sempre di grande interesse per il settore enologico. In questo contesto, la disponibilità di nuove metodiche analitiche rappresenta un valido supporto per comprendere più a fondo l'evoluzione dei composti fenolici ed il loro contributo alle caratteristiche sensoriali dei vini rossi di qualità (Montedoro et al. 1986; Ribéreau-Gayon & Glories, 1986).

L'analisi spettrofotometrica dei pigmenti polimerici dei vini rossi si basa su due presupposti: (i) la SO<sub>2</sub> 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. Per primi Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965) hanno proposto di acidificare il campione a pH <1, quindi aggiungere SO<sub>2</sub> al vino per decolorare gli antociani monomeri. Questo principio è stato poi ripreso e sviluppato anche da altri ricercatori (Somers & Evans, 1977; Di Stefano et al. 1989; Boulton et al.

1999). Recentemente, il prof. Adams ed il suo staff hanno messo a punto un nuovo metodo spettrofotometrico per l'analisi dei pigmenti polimerici dei vini basato sull'effetto combinato della precipitazione selettiva dei polimeri ad opera di una proteina (albumina) e l'effetto decolorante della SO<sub>2</sub> (Harbertson et al. 2003).

Il metodo Adams consente la determinazione di due classi di pigmenti resistenti alla decolorazione con SO<sub>2</sub>: (i) i polimeri a basso peso molecolare (small polymeric pigments: SPP) che non precipitano con l'albumina, (ii) e quelli ad elevato peso molecolare (large polymeric pigments: LPP) che vengono precipitati dall'albumina. Con questo approccio Adams e coll. hanno dimostrato che tali pigmenti polimerici sono già presenti nelle uve durante la maturazione ed osservato che il loro contenuto è influenzato dalle condizioni di fermentazione e conservazione del vino.

Lo scopo della presente indagine è quello di caratterizzare alcuni vini rossi italiani in relazione a specifiche componenti del colore,

tra cui i pigmenti polimerici a basso (SPP) ed elevato peso molecolare (LPP). A tal scopo è stata adottato il metodo Adams, recentemente introdotto nel settore enologico (Versari et al. 2007a).

### Materiali e metodi

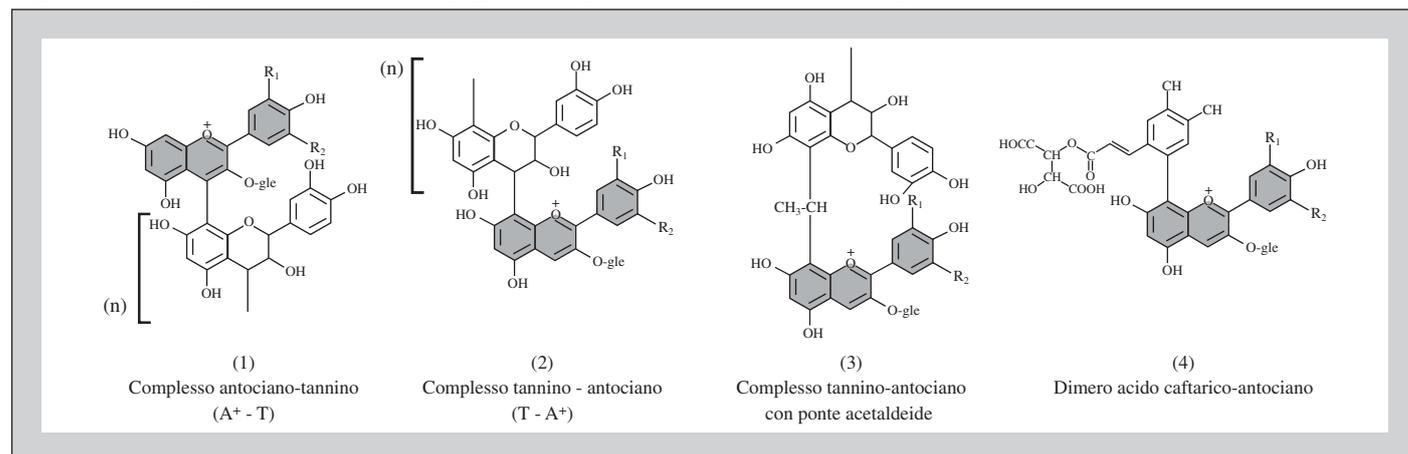
**Vini.** Sono stati analizzati 124 vini rossi imbottigliati in commercio tra i quali Sangiovese (70 campioni), Cabernet Sauvignon (n = 13), Nero d'Avola (n = 10), Merlot (n = 9), Marzemino (n = 7), Negroamaro (n = 6), Aglianico (n = 5) e Cannonau (n = 4). Su ogni vino sono stati determinati i seguenti parametri: colore totale, pigmenti resistenti alla SO<sub>2</sub>, pigmenti polimerici a basso ed elevato peso molecolare seguendo i protocolli disponibili in bibliografia e di seguito riassunti (Fig. 2).

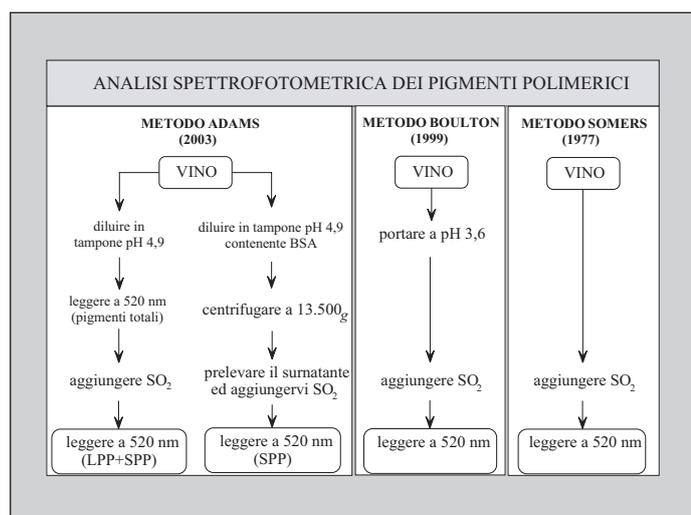
**Metodo Boulton.** I vini sono stati filtrati su membrana PTFE da 0,45 µm (Acrodisc CR, 25 mm, Pall Corporation, Corvina, CA) e portati a pH 3,6 per eliminare l'effetto del pH sul colore dei vini e consentire un confronto più attendibile. Per la deter-

minazione del colore totale, a 2 mL di campione filtrato e con il pH normalizzato sono stati aggiunti 20 µL di acetaldeide (sol. 10%) e dopo 45 minuti è stata misurata l'assorbanza a 520 nm (il valore finale tiene conto della necessità di eventuali diluizioni del campione). Per la determinazione dei pigmenti resistenti alla SO<sub>2</sub>, ad altri 2 mL di vino sono stati aggiunti di 160 µL di SO<sub>2</sub> (sol. al 5%) per decolorare gli antociani monomeri e dopo 10 minuti si misura l'assorbanza a 520 nm (Boulton et al. 1999).

**Metodo Adams.** La misura dei pigmenti polimerici a basso (SPP) ed elevato peso molecolare (LPP) è stata condotta su 40 vini sangiovese dell'Emilia-Romagna. Per ogni campione si preparano due aliquote: per la prima si preleva 1 mL di tampone acido acetico/NaCl (portato a pH 4,9 con NaOH) al quale si aggiungono 500 µL di vino, all'occorrenza diluito con 'tampone enologico' (etanolo 12%, bitartrato di potassio 5 g/L, pH 3,3). Sul campione così preparato si aggiungono 80 µL di soluzione di metabisolfito di potassio (0,36 M) e dopo 10 minuti si misura l'assorbanza a 520 nm (lettura A) che fornisce la lettura

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



**Fig. 2 - Schema dei metodi di analisi spettrofotometrica dei pigmenti polimerici dei vini**

dei pigmenti polimerici totali. La seconda aliquota consiste di 1 mL di tampone acido acetico/NaCl (pH 4,9) contenente 1 mg/mL di albumina (BSA in polvere, Sigma, Milano) al quale si aggiungono

500 µL di vino, opportunamente diluito con 'tampone enologico'.

Dopo 15 minuti si centrifuga il campione a 13.500 g x 5 minuti, quindi si preleva il surnatante al quale si ag-

giungono 80 µL di soluzione di metabisolfito di potassio (0,36 M) e si misura l'assorbanza a 520 nm (lettura B) che fornisce la stima dei polimeri a basso peso molecolare.

I polimeri ad elevato peso molecolare si ricavano dalla differenza delle due letture: (A - B). I risultati sono espressi in Unità di Assorbanza (AU) riferite ad 1 cm di percorso ottico e corrette per le eventuali diluizioni del campione (Harbertson et al. 2003).

## Risultati e discussione

Sui campioni sono stati determinati il colore totale ed i pigmenti resistenti alla SO<sub>2</sub> mediante il metodo Boulton (Tab. 1).

I vini presentano un differenza significativa nei valori del colore totale, mentre il

contenuto in pigmenti resistenti alla SO<sub>2</sub> - per quanto variabile tra i vini - non è risultato significativamente diverso al test di Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Il colore totale è massimo nei vini Marzemino ed Aglianico, mentre i vini Cabernet Sauvignon presentano il maggior contenuto medio di pigmenti resistenti alla SO<sub>2</sub>. In base ai parametri del colore presi in considerazione, questi tre vini presentano delle caratteristiche migliori per un eventuale affinamento. Da un'indagine bibliografica è emerso che i vini analizzati presentano un contenuto in pigmenti resistenti alla SO<sub>2</sub> paragonabile a quello di altri vini Canadesi (Mazza et al. 1999) e Spagnoli (Gomez-Plaza et al. 1999).

I 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 (Tab. 2). 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) (Harbertson et al. 2003). I pigmenti resistenti alla SO<sub>2</sub> 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). Il metodo Adams (SPP+LPP) e quello Boulton misurano entrambi i pigmenti polimerici resistenti alla SO<sub>2</sub> e tra loro si è riscontrata una buona linearità ( $R^2 = 0,82$ ). Il metodo Adams presenta però il vantaggio di consentire la determinazione di due classi di pigmenti polimerici: SPP e LPP.

Per quanto ci sia un generale consenso circa l'aumento dei pigmenti polimerici

**Tab. 1 - Colore totale e pigmenti resistenti alla SO<sub>2</sub> presenti in 128 vini rossi Italiani**

Vini	N. campioni	Colore totale	
		Media ±SD (AU 520 nm)	Pigmenti resistenti alla SO <sub>2</sub> Media±SD (AU 520 nm)
Sangiovese	70	4,17±1,3	2,36±1,0
Cabernet Sauvignon	13	5,01±2,5	3,25±2,2
Cannonau	4	3,71±0,9	1,65±0,8
Merlot	9	4,70±1,6	2,09±1,0
Aglianico	5	7,10±2,9	3,03±0,9
Negroamaro	6	4,51±1,2	2,29±0,8
Marzemino	7	7,50±1,5	1,91±0,4
Nero d'Avola	10	3,68±1,2	1,85±0,6

**Tab. 2 - Pigmenti polimerici a basso (SPP) ed elevato peso molecolare (LPP) determinati in 40 vini Sangiovese di Romagna**

Anno	N. vini	LPP		SPP	
		Media ±SD (AU 520 nm)	Media±SD (AU 520 nm)	Media±SD (AU 520 nm)	Media±SD (AU 520 nm)
2003	1	0,33		0,71	
2002	14	1,09±0,4		0,99±0,3	
2001	14	1,21±0,3		1,15±0,3	
2000	8	1,64±0,4		1,18±0,4	
1999	3	1,35±0,2		1,11±0,2	

nel vino con il procedere della conservazione, nel nostro caso non è possibile trarre considerazioni conclusive in quanto si tratta di vini di produttori diversi per i quali non è noto il contenuto iniziale in pigmenti polimerici.

Inoltre, è noto che il contenuto in pigmenti polimerici è influenzato da diversi

fattori, tra i quali le condizioni climatiche, ambientali, di fermentazione e conservazione del vino.

## Riassunto

Nel presente lavoro sono stati caratterizzati 124 vini rossi italiani (Sangiovese, Cabernet Sauvignon, Nero d'Avola, Merlot, Marzemi-

no, Negroamaro, Aglianico e Cannonau) in relazione a specifiche componenti del colore, tra cui i pigmenti polimerici a basso (SPP) ed elevato peso molecolare (LPP).

A tal scopo è stata adottato il metodo *Adams*, recentemente introdotto nel settore enologico. Il colore totale è massimo nei vini Marzemi-

no ( $7,5 \pm 1,5$  AU 520 nm) ed Aglianico ( $7,10 \pm 2,90$  AU 520 nm), mentre i vini Cabernet Sauvignon presentano il maggior contenuto medio di pigmenti resistenti alla  $SO_2$  ( $3,25 \pm 2,16$  AU 520 nm). Nei vini Sangiovese il rapporto tra pigmenti polimerici ad elevato e basso peso molecolare (LPP/SPP) varia da 0,15 a 2,78.

## 2. SVILUPPO DI UN METODO HPLC PER LA DETERMINAZIONE DEI PIGMENTI POLIMERICI NEI VINI ROSSI

### Introduzione

Il colore dei vini rossi giovani è principalmente dovuto agli antociani liberi non polimerizzati (monomeri) ed al fenomeno della copigmentazione che consiste nella loro interazione con altri composti polifenolici (Boulton, 2001). Durante la fermentazione ma soprattutto durante la fase di conservazione/affinamento, gli antociani monomeri si combinano principalmente con i flavonoidi per formare dei pigmenti polimerici che conferiscono stabilità al colore dei vini (Fig. 1) (Somers, 1971; Ribéreau-Gayon, 1982; Cheyner et al. 2006; Kennedy et al. 2006).

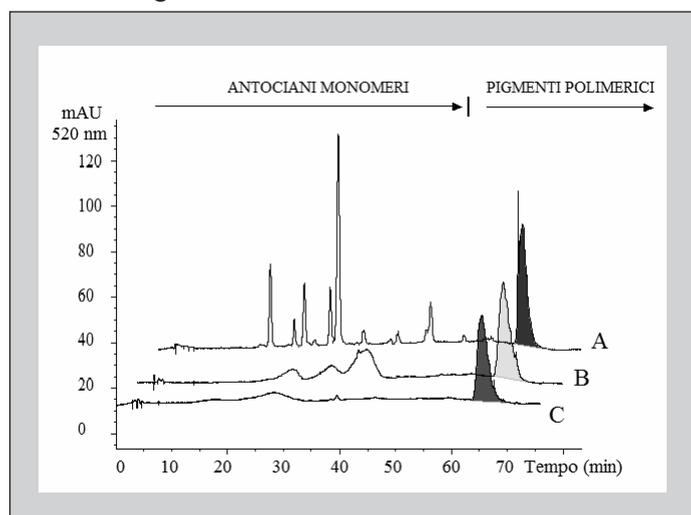
La formazione e l'evoluzione dei pigmenti polimerici nei vini presentano delle complessità che richiedono

continui approfondimenti conoscitivi. In questo contesto si avverte la necessità di sviluppare nuove tecniche analitiche per quantificare i pigmenti polimerici dei vini rossi. In passato Somers ed Evans (1974) hanno proposto una serie di misure spettrofotometriche per determinare gli antociani totali ed i pigmenti polimerici nei vini rossi. La procedura originale si basava su due presupposti: (i) la  $SO_2$  decolora solo gli antociani senza alcun effetto sui pigmenti polimerici; e (ii) il colore dei pigmenti polimerici aumenta di  $\frac{2}{3}$  a seguito della acidificazione. In seguito Bakker et coll. (Bakker et al. 1986) hanno dimostrato mediante cromatografia liquida (HPLC) che anche i pigmenti polimerici venivano decolorati parzialmente dalla  $SO_2$ , pertanto

era necessario rivedere i metodi spettrofotometrici per non incorrere in una loro sottostima. Purtroppo i tradizionali metodi HPLC non erano in grado di separare i pigmenti polimerici dagli antociani monomeri ed entrambe le classi di composti coeludevano (Singleton & Trousdale, 1992). Recentemente, Peng e coll. hanno proposto un metodo HPLC che consente di separare i pigmenti polimerici dagli antociani monomeri utilizzando delle colonne polimeriche (Peng et al. 2002). Tale metodo HPLC è stato da noi modificato nel presente studio per analizzare i pigmenti polimerici resistenti alla decolorazione con  $SO_2$  mediante l'aggiunta della  $SO_2$  nella fase mobile (Versari et al. 2007b).

trati su membrana PTFE da  $0,45 \mu m$  (Acrodisc CR, 25 mm, Pall Corporation, Corvina, CA) e portati a pH 3,6 prima di essere analizzati confrontando due metodi analitici: (i) il metodo spettrofotometrico Boulton con aggiunta di  $160 \mu L$  di  $SO_2$  (sol. al 5%) a 2 mL di campione per decolorare gli antociani monomeri (Boulton et al. 1999), e (ii) mediante un nuovo metodo HPLC proposto da Peng et coll. (2002) da noi modificato con l'aggiunta di  $SO_2$  alla fase mobile. I campioni sono stati analizzati con un sistema HPLC (HP1100, Palo Alto, CA) provvisto di un rivelatore a spettro di fotodiodi, un iniettore da  $20\text{-}\mu L$  ed un autocampionatore. Per la separazione dei pigmenti polimerici è stata utilizzata una colonna polimerica PLRP-S (Polymer Laboratories, Amherst, MA) provvista di precolonna ed operante a  $30^\circ C$ . È stato utilizzato un gradiente binario con due eluenti: (A), acqua acidificata con 1,5% di acido fosforico (96%) e (B), eluente A (20%) + acetonitrile (80%). Entrambe le fasi mobili sono state aggiunte di  $100 \text{ mg/L}$  di  $SO_2$  per mantenere l'effetto di decolorazione sugli antociani. I campioni di vino sono stati analizzati in duplicato, ovvero sia prima che dopo l'aggiunta di  $SO_2$  alle fasi mobili. Il programma di eluizione prevede il condizionamento iniziale della colonna con 92% di eluente A (quindi 8% di B). In seguito, si passa al 73% di A (tempo: 55 minuti), quindi si mantiene per 4 minuti il 73% di A (tempo: 59 minuti), poi si

**Fig. 3 - Cromatogramma di un vino rosso in cui è visibile il profilo di controllo senza  $SO_2$  (A), il campione con aggiunta di  $SO_2$  solo al vino prima dell'analisi HPLC (B), e con aggiunta di  $SO_2$  sia al vino che agli eluenti HPLC (C)**



### Materiali e metodi

**Vini.** Sono stati analizzati venti vini rossi 'giovani' tra i quali due Sangiovese, quattro Merlot, due Cabernet Sauvignon, un Cabernet Franc nove Pinot Nero, un Cagnulari ed un Cannonau. Al momento dell'analisi i vini erano imbottigliati da 11-23 mesi, e sono stati scelti per coprire un ampio intervallo di intensità colorante ( $DO_{520 \text{ nm}} = 0,1\text{--}10$  AU). La presenza di due campioni con uno scarso contenuto in pigmenti polimerici è riconducibile al fatto che erano presenti due vini Pinot nero ottenuti senza contatto con le bucce.

**Analisi dei pigmenti polimerici.** I vini sono stati fil-

raggiunge il 30% di A (tempo: 64 minuti), ed infine si mantiene per 5 minuti il 30% di A (tempo: 69 minuti), prima di ricondizionare la colonna per la successiva analisi. Gli spettri UV-Vis sono stati acquisiti tra 200 e 800 nm, i cromatogrammi monitorati a 520 nm, ed i pigmenti polimerici quantificati come area del picco (per mancanza di standard certificati di tali composti).

## Risultati e discussione

La Fig. 3 mostra l'analisi cromatografica di un vino rosso in cui è visibile il profilo di controllo senza SO<sub>2</sub> (A), il profilo con aggiunta di SO<sub>2</sub> solo al vino prima dell'analisi HPLC (B), e con aggiunta di SO<sub>2</sub> sia al vino che agli eluenti HPLC (C). Il picco visibile a 66,0 minuti rappresenta i pigmenti polimerici del vino, e l'effetto di decolorazione è completo solo quando si aggiunge SO<sub>2</sub> sia al vino che agli eluenti (Fig. 3, C). Pertanto senza l'aggiunta di SO<sub>2</sub> nella fase mobile (A) vengono determinati i pigmenti polimerici totali, mentre con l'aggiunta di SO<sub>2</sub> alla fase mobile è possibile analizzare i pigmenti polimerici resistenti

alla decolorazione (C). 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<sub>2</sub> nella fase mobile in HPLC per decolorare i pigmenti del vino è stato preconizzato da Piergiovanni et coll. (1986) che lo hanno applicato allo studio della frazione monomeric del vino Barbera. Nel metodo HPLC da noi proposto l'uso della SO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> al vino tal quale – che decolora gli antociani monomeri e parte dei polimeri – quindi la lettura di assorbanza a 520 nm (Somers & Evans, 1977), (ii) ed il metodo *Adams* che prevede l'aggiunta di SO<sub>2</sub> 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 (Harbertson et al. 2002). La correlazione tra HPLC ed il metodo *Boulton* è ottima ( $r = 0,99$ ), ma il valore positivo dell'intercetta (0,31 AU) indica chiaramente che il metodo spettrofotometrico tende sovrastimare il contenuto in pigmenti polimerici nei vini probabilmente a seguito della presenza di altri composti colorati resistenti alla SO<sub>2</sub> (es. dimero acido cafarico-antociano) ma non certo di natura polimerica (Fig. 4). La correlazione tra HPLC ed il metodo *Adams* (SPP+LPP) è buona ( $r = 0,95$ ) a conferma che il confronto tra questi risultati è coerente basandosi sul presupposto che tutti i metodi utilizzano SO<sub>2</sub> per decolorare parte dei pigmenti e determinare solo quelli resistenti alla decolorazione.

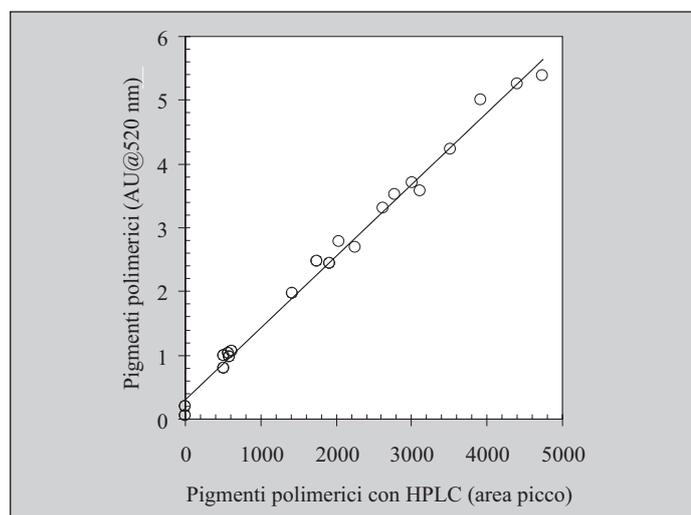
In conclusione, l'aggiunta di SO<sub>2</sub> alla fase mobile di un

preesistente metodo HPLC ha consentito di implementare l'analisi dei pigmenti polimerici nei vini rossi distinguibili in due classi: (A) pigmenti polimerici totali (senza SO<sub>2</sub> nella fase mobile), e (B) pigmenti polimerici resistenti alla decolorazione (con aggiunta di SO<sub>2</sub> alla fase mobile ed a campione). Ovviamente, per differenza (A-B) si ottiene la frazione di pigmenti polimerici decolorati dalla SO<sub>2</sub>. In considerazione dell'importanza tecnologica e sensoriale dei pigmenti polimerici, si ritiene che la disponibilità di un metodo analitico in grado di determinare varie classi di tali pigmenti rappresenti un utile supporto il lavoro degli operatori.

## Riassunto

Questo studio riporta i dettagli di un metodo HPLC per l'analisi dei pigmenti polimerici totali dei vini rossi, ed un protocollo innovativo per la determinazione in HPLC dei pigmenti polimerici resistenti alla SO<sub>2</sub> (mediante l'aggiunta di SO<sub>2</sub> alla fase mobile). Con questo metodo sono stati analizzati 20 vini ottenuti da uve Pinot nero, Merlot, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sangiovese, Cagnulari e Cannonau. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con due metodi spettrofotometrici: (i) il metodo *Boulton* che prevede l'aggiunta di un eccesso di SO<sub>2</sub> al vino portato a pH 3,6, quindi la lettura di assorbanza a 520 nm dei pigmenti resistenti alla decolorazione; (ii) il metodo *Adams* che prevede l'aggiunta di SO<sub>2</sub> 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 di assorbanza a 520 nm. Esiste una buona correlazione tra il valore dei pigmenti polimerici trovato con questo nuovo metodo HPLC e quello fornito dal metodo *Boulton* ( $r = 0,99$ ) e quello *Adams* ( $r = 0,95$ ).

**Fig. 4 - Correlazione tra pigmenti polimerici di 20 vini rossi analizzati con il nuovo metodo HPLC e mediante il metodo spettrofotometrico Boulton (○). Entrambi i metodi prevedono l'uso di SO<sub>2</sub> per decolorare i vini**



### 3. CONFRONTO TRA METODI HPLC E SPETTROFOTOMETRICI PER LA DETERMINAZIONE DEI PIGMENTI POLIMERICI NEI VINI ROSSI

## Introduzione

Gli antociani sono pigmenti presenti nelle bucce delle uve dalle quali vengono estratti durante la macerazione/vinificazione.

Il colore di un vino rosso tende a modificarsi nel tempo ed è il risultato di vari fattori, tra i quali (i) il tipo e la quantità di antociani presenti, (ii) il pH, (iii) la dose di SO<sub>2</sub>, e (iv) la presenza di copigmenti (Boulton et al. 1998; Riberau-Gayon et al. 2003). Nonostante il colore di un vino si possa misurare facilmente con uno spettrofotometro, correlare il colore di un vino con la sua composizione chimica presenta delle complessità che richiedono specifiche considerazioni ed appropriate valutazioni analitiche. Per l'analisi dei polifenoli nei vini sono stati proposti diversi metodi, alcuni dei quali in spettrofotometria (Riberau-Gayon & Stonestret, 1965; Pompei, 1971; Somers & Evans, 1977; Di Stefano et al. 1989; Boulton et al. 1999; Harbertson et al. 2002, 2003), altri in cromatografia

(Nagel & Wulf, 1979; Baldi & Romani, 1992; Singleton & Trousdale, 1992; Kennedy & Waterhouse, 2000; Vrhovsek et al. 2001; Peng et al. 2001, 2002). Ogni metodo di analisi presenta vantaggi e limitazioni, ed il confronto tra dati analitici ottenuti con metodi diversi richiede attenzione.

L'obiettivo di questo lavoro è quello di confrontare diversi metodi di analisi spettrofotometrici ed HPLC per la determinazione dei pigmenti polimerici dei vini rossi (Versari et al. 2007c).

## Materiali e metodi

**Vini.** Sono stati analizzati 20 vini rossi giovani tra i quali due Sangiovese, quattro Merlot, due Cabernet Sauvignon, un Cabernet Franc nove Pinot Nero, e Cagnulari ed un Cannonau. Al momento dell'analisi i vini erano imbottigliati da 11-23 mesi, e sono stati scelti per coprire un ampio intervallo di intensità colo-

rante (DO 520 nm = 0,1-10 AU). La presenza di due campioni con uno scarso contenuto in pigmenti polimerici è riconducibile al fatto che erano presenti due vini Pinot nero ottenuti senza contatto con le bucce.

**Analisi dei pigmenti polimerici.** I vini sono stati filtrati su membrana PTFE da 0,45 µm (Acrodisc CR, 25 mm, Pall Corporation, Corvina, CA) e quindi analizzati con i seguenti metodi:

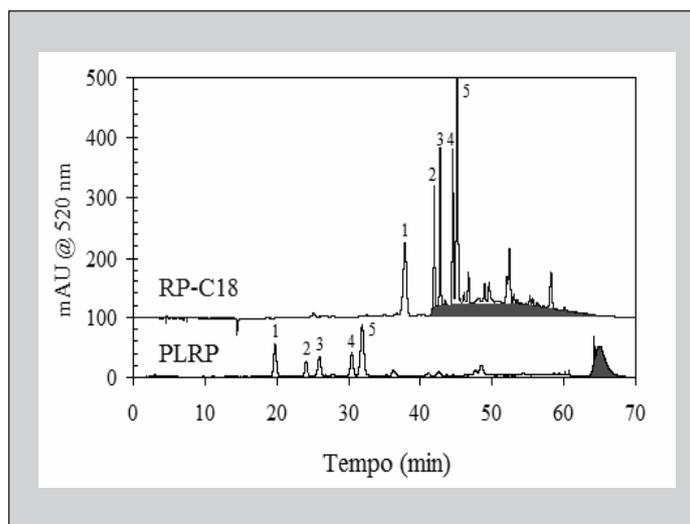
1. *metodo spettrofotometrico Somers:* a 2 mL di campione sono stati aggiunti 160 µL di SO<sub>2</sub> (sol. al 5%) per decolorare gli antociani monomeri, quindi si misura l'assorbanza a 520 nm (Somers & Evans, 1977);
2. *metodo spettrofotometrico Boulton:* a 2 mL di campione portato a pH 3,6 sono stati aggiunti 160 µL di SO<sub>2</sub> (sol. al 5%) per decolorare gli antociani monomeri, quindi si misura l'assorbanza a 520 nm (Boulton et al. 1999);
3. *metodo spettrofotometrico Adams:* Per ogni campione si preparano due aliquote: per la prima si preleva 1 mL di tampone acido acetico/NaCl (portato a pH 4,9 con NaOH) al quale si aggiungono 500 µL di vino, all'occorrenza diluito con 'tampone enologico' (etanolo 12%, bitartrato di potassio 5 g/L, pH 3,3). Sul campione così preparato si aggiungono 80 µL di soluzione di metabisolfito di potassio (0,36 M) e dopo 10 minuti si misura l'assorbanza a 520 nm (lettura A) che fornisce la lettura dei pigmenti polimerici totali. La seconda aliquota consiste di 1 mL di tampone acido acetico/NaCl (pH 4,9) contenente 1 mg/mL di albumina (BSA in polvere, Sigma, Milano) al quale si aggiungono 500 µL di vino, opportunamente diluito con 'tampone enologico'. Dopo 15 minuti si centrifuga il campione a 13.500 g x 5 minuti, quindi si preleva il surnatante al quale si aggiungono 80 µL

di soluzione di metabisolfito di potassio (0,36 M) e si misura l'assorbanza a 520 nm (lettura B) che fornisce la stima dei polimeri a basso peso molecolare. I polimeri ad elevato peso molecolare si ricavano dalla differenza delle due letture: (A - B). I risultati sono espressi in Unità di Assorbanza (AU) riferite ad 1 cm di percorso ottico e corrette per le eventuali diluizioni del campione (Harbertson et al. 2003);

4. *metodo RP-HPLC:* utilizzando la colonna in fase inversa (RP-C<sub>18</sub>) ed il protocollo proposto da Donovan et al. (1988);
5. *metodo PLRP-HPLC:* utilizzando le condizioni riportate da Peng e coll. (2002);
6. *metodo PLRP-HPLC con SO<sub>2</sub>:* che si basa sul metodo proposto da Peng et coll. (2002) modificato con l'aggiunta di SO<sub>2</sub> alla fase mobile. I campioni sono stati analizzati con un sistema HPLC (HP1100, Palo Alto, CA) provvisto di un rivelatore a spettro di fotodiodi, un iniettore da 20-µL ed un autocampionatore.

Per la separazione dei pigmenti polimerici è stata utilizzata una colonna polimerica PLRP-S (Polymer Laboratories, Amherst, MA) provvista di precolonna ed operante a 30°C. È stato utilizzato un gradiente binario con due eluenti: (A), acqua acidificata con 1,5% di acido fosforico (96%) e (B), eluente A (20%) + acetone (80%). Entrambe le fasi mobili sono state aggiunte di 100 mg/L di SO<sub>2</sub> per mantenere l'effetto di decolorazione sugli antociani. I campioni di vino sono stati analizzati in duplicato, ovvero sia prima che dopo l'aggiunta di SO<sub>2</sub> alle fasi mobili. Il programma di eluizione prevede il condizionamento iniziale della colonna con 92% di eluente A (quindi 8% di B). In seguito, si passa al 73% di A (tempo: 55 minuti), quindi si mantiene per 4 minuti il

**Fig. 5 - Cromatogramma HPLC di un vino rosso monitorato a 520 nm utilizzando la colonna RP-C<sub>18</sub> (in alto) e quella polimerica PLRP (in basso)**



L'area evidenziata 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)

73% di A (tempo: 59 minuti), poi si raggiunge il 30% di A (tempo: 64 minuti), ed infine si mantiene per 5 minuti il 30% di A (tempo: 69 minuti), prima di ricondizionare la colonna per la successiva analisi. Gli spettri UV-Vis sono stati acquisiti tra 200 e 800 nm, i cromatogrammi monitorati a 520 nm, ed i pigmenti polimerici quantificati come area del picco (per mancanza di standard certificati di tali composti).

## Risultati e discussione

**Confronto tra metodi HPLC (n. 4 e 5).** Due metodi HPLC – uno facente uso di una colonna in fase inversa classica RP-C<sub>18</sub>, 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.

In entrambe le metodiche non è stata usata SO<sub>2</sub>. La Fig. 5 mostra il cromatogramma di un vino rosso analizzato con i due metodi HPLC in cui sono state evidenziate le zone di eluizione

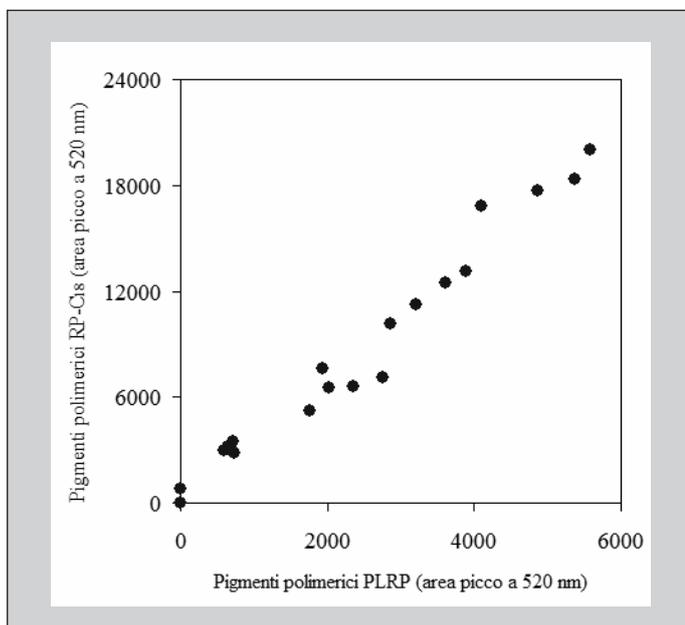
dei pigmenti polimerici. Si nota come nel caso delle colonne RP-C<sub>18</sub> tali composti eluiscono tra 40 e 63 minuti, provocando un innalzamento della linea di base. Invece, nel caso delle colonne polimerica PLRP è ben visibile un picco isolato a circa 66 minuti che rappresenta i pigmenti polimerici 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 ( $R^2 = 0,97$ ) (Fig. 6) a conferma della validità dell'approccio sperimentale. Inoltre, precedenti studi hanno dimostrato la natura polifenolica e polimerica del picco a 66 minuti (Peng et al. 2001, 2002). Appare evidente che le colonne polimeriche PLRP consentono un notevole miglioramento nella determinazione dei pigmenti polimerici.

**Confronto tra metodo PLRP-HPLC (n. 6) e metodi spettrofotometrici (n. 1-3).** La misura spettrofotometrica dei pigmenti polimerici dei vini rossi si basa sul presupposto che la SO<sub>2</sub> decolora quasi totalmente gli antociani monomeri e

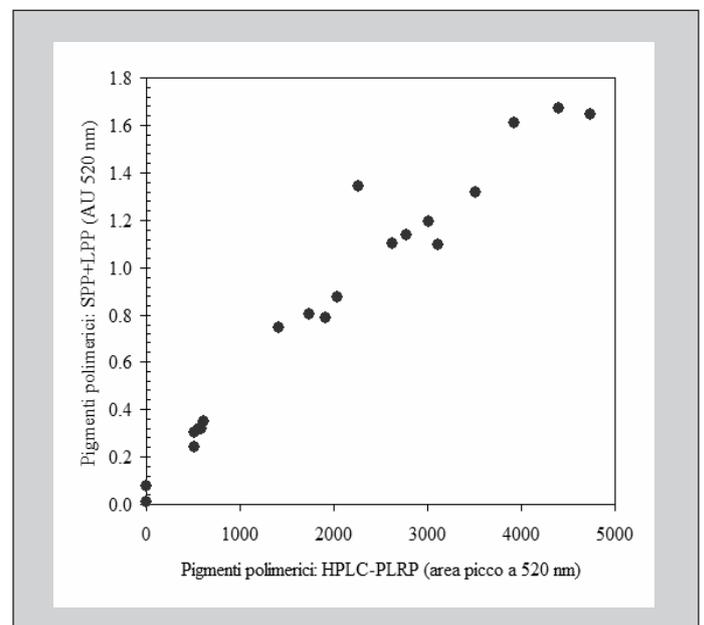
solo parzialmente i pigmenti polimerici. Pertanto per confrontare in maniera razionale i dati ottenuti con un metodo spettrofotometrico ed uno HPLC è necessario utilizzare in entrambi i casi la SO<sub>2</sub>. A tal scopo è stato sviluppato un nuovo metodo HPLC (n. 6) descritto in dettaglio in una precedente sezione di questo articolo. La somma dei pigmenti a basso ed elevato peso molecolare (SPP + LPP) determinati con il metodo Adams mostra una buona linearità ( $R^2 = 0,95$ ) con il picco a 66 minuti ottenuto con l'analisi HPLC utilizzando la colonna polimerica PLRP e l'aggiunta di SO<sub>2</sub> alla fase mobile (Fig. 7). Questo risultato conferma la natura polimerica del picco eluito a 66 minuti con la colonna PLRP.

Il nuovo metodo PLRP-HPLC con aggiunta di SO<sub>2</sub> nella fase mobile ha mostrato una buona corrispondenza con il metodo Somers ( $R^2 = 0,992$ ) ma ha evidenziato un valore di intercetta (Y) pari a 0,3 AU, ad indicare che il metodo Somers tende a sovrastimare i pigmenti polimerici resistenti alla SO<sub>2</sub>. Un simile risultato

**Fig. 6 - Correlazione pigmenti polimerici determinati in HPLC con colonna RP-C<sub>18</sub> e colonna PLRP. I dati si riferiscono alla misura delle aree rilevate a 520 nm**



**Fig. 7 - Correlazione tra i pigmenti polimerici determinati in (i) PLRP-HPLC con aggiunta di SO<sub>2</sub> alla fase mobile e (ii) mediante metodo spettrofotometrico Adams (SPP+LPP)**



era prevedibile ed è riconducibile alla presenza di composti colorati a basso peso molecolare resistenti alla decolorazione (es. vitisine) che in HPLC vengono separati dai pigmenti polimerici mentre nell'analisi spettrofotometrica creano interferenza.

## Riassunto

Vengono confrontati diversi metodi HPLC e spettrofotometrici per la determinazione dei pigmenti polimerici nei vini.

In tutti i metodi viene misurata l'assorbanza a 520 nm che, come è noto, è la

lunghezza d'onda di riferimento per l'analisi dei pigmenti colorati dei vini rossi (antociani).

Tra i metodi HPLC sono state prese in considerazione sia colonne in fase inversa (RP-C<sub>18</sub>) che colonne polimeriche (PLRP). Viene discusso l'effetto dell'uso

di SO<sub>2</sub> durante la preparazione del campione per determinare due classi di pigmenti polimerici (la somma dei quali fornisce i pigmenti polimerici totali): (i) quelli che si decolorano (ii) quelli resistenti alla decolorazione con SO<sub>2</sub>.

#### 4. MESSA A PUNTO DI UNA METODICA RAPIDA FT-IR PER LA PREDIZIONE DEI PIGMENTI POLIMERICI NEI VINI ROSSI

## Riassunto

La spettroscopia nel medio infrarosso (FT-IR) è stata utilizzata per determinare i pigmenti polimerici nei vini rossi.

Lo studio è stato condotto su 20 vini che coprivano un ampio intervallo di colore: da 0 a 10 unità di assorbanza (AU a 520 nm).

Sui campioni sono state eseguite le analisi di confronto mediante il metodo *Adams* che consente di determinare i pigmenti polimerici a basso (SPP) ed elevato peso molecolare (LPP). I risultati del metodo FT-IR sono stati confrontati con quelli del metodo *Adams* mediante la regressione lineare ai minimi quadrati parziali. La tecnica FT-IR consente di analizzare i pigmenti polimerici in tempi rapidi utili per un controllo di qualità.

## Introduzione

Attualmente per misurare le principali componenti del colore dei vini - antociani monomeri, pigmenti polimerici a basso ed elevato peso molecolare, copigmentazione - è necessario eseguire più determinazioni. La possibilità di utilizzare una sola tecnica analitica in grado di analizzare più parametri contemporaneamente ed in tempi rapidi rappresenta un indubbio vantaggio per l'enologo. In questo contesto si riscontra un crescente interesse verso la spettroscopia nel medio infrarosso con trasformata di Fourier (FT-IR) che misura l'assorbimento delle radiazioni elettromagnetiche di tutte le molecole presenti nel campione nell'intervallo del medio infrarosso: 2.500–10.000 nm (1000 – 4000 cm<sup>-1</sup>). Tale tecnica viene già utilizzata

con successo nel settore enologico per l'analisi di diversi componenti del vino, tra i quali etanolo, acidità totale, estratto secco, glicerolo, copigmentazione (Kupina & Shrikhande, 2003; Versari et al. 2003; Patz et al. 2004).

Questo articolo descrive la messa a punto di un metodo FT-IR per l'analisi dei pigmenti polimerici a basso ed elevato peso molecolare nei vini rossi (Versari et al. 2006).

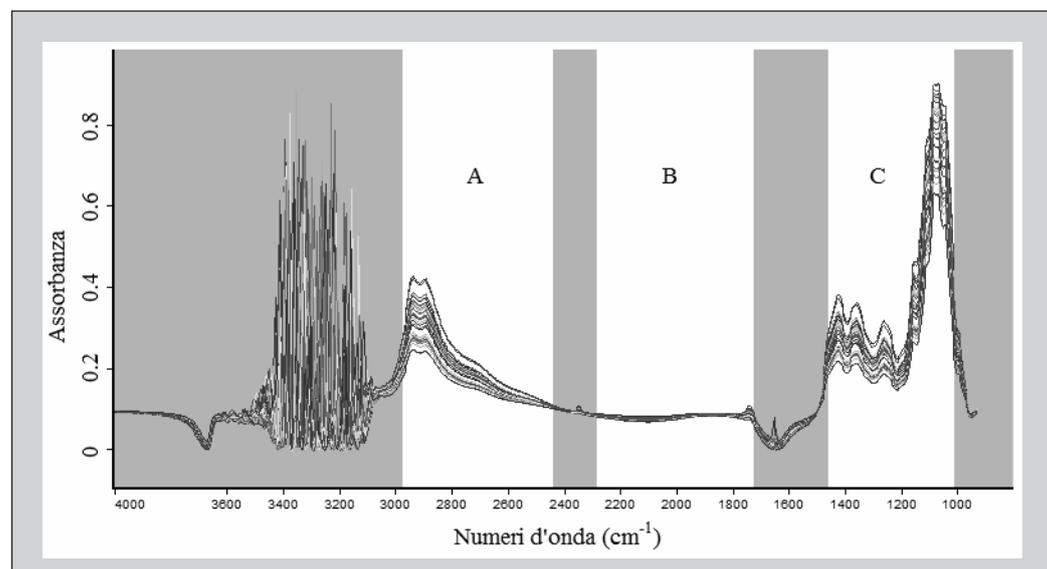
## Materiali e metodi

**Vini.** Sono stati analizzati 20 vini rossi giovani tra i quali due Sangiovese, quattro Merlot, due Cabernet Sauvignon, un Cabernet Franc nove Pinot Nero, un Cagnulari ed un Cannonau. Al momento dell'analisi i vini erano imbottigliati da 11-

23 mesi, e sono stati scelti per coprire un ampio intervallo di intensità colorante (DO 520 nm = 0.1–10 AU). La presenza di due campioni con uno scarso contenuto in pigmenti polimerici è riconducibile al fatto che erano presenti due vini Pinot nero ottenuti senza contatto con le bucce.

**Analisi dei pigmenti polimerici.** I vini sono stati filtrati su membrana PTFE da 0,45 µm (Acrodisc CR, 25 mm, Pall Corporation, Corvina, CA) e quindi analizzati per determinare i pigmenti a basso (SPP) ed elevato peso molecolare (LPP) utilizzando il metodo spettrofotometrico *Adams*. Per ogni campione si preparano due aliquote: per la prima si preleva 1 mL di tampone acido acetico/NaCl (portato a pH 4,9 con NaOH) al quale si aggiungono 500 µL di vino, all'occorrenza diluito con 'tampone enologico' (etanolo 12%, bitartrato di potassio 5 g/L, pH 3,3). Sul campione così preparato si aggiungono 80 µL di soluzione di metabisolfito di potassio (0,36 M) e dopo 10 minuti si misura l'assorbanza a 520 nm (lettura A) che fornisce la lettura dei pigmenti polimerici totali. La seconda aliquota consiste di 1 mL di tampone acido acetico/NaCl (pH 4,9) contenente 1 mg/mL di albumina (BSA in polvere, Sigma, Milano) al quale si aggiungono 500 µL di vino, opportunamente diluito con 'tampone enologico'. Dopo 15 minuti si centrifuga il campione a 13.500 g x 5 minuti, quindi si preleva il surnatante al quale si aggiungono 80 µL di soluzione di metabisolfito di po-

**Fig. 8 - Esempio di spettri FT-IR di vini rossi. Regioni spettrali utili: (A) 2971–2435 cm<sup>-1</sup>; (B) 2280–1717 cm<sup>-1</sup>; (C) 1540–1000 cm<sup>-1</sup>**



tassio (0,36 M) e si misura l'assorbanza a 520 nm (lettura B) che fornisce la stima dei polimeri a basso peso molecolare. I polimeri ad elevato peso molecolare si ricavano dalla differenza delle due letture: (A - B). I risultati sono espressi in Unità di Assorbanza (AU) riferite ad 1 cm di percorso ottico e corrette per le eventuali diluizioni del campione (Harbertson et al. 2003).

**Analisi FT-IR.** I campioni sono stati analizzati mediante WineScan FT120 (FOSS, Hilleroed, Danimarca) che acquisisce lo spettro nell'intervallo 5012-926  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 8). Data la natura multivariata dello spettro FT-IR, alcuni composti presenti in soluzione creano delle interferenze tali da coprire le informazioni spettrali di altri composti. Per questo motivo, le due regioni 1582-1697  $\text{cm}^{-1}$  e 2791-3626  $\text{cm}^{-1}$  sono state escluse a causa delle interferenze determinate dall'assorbimento dell'acqua, mentre la regione 3626-5011  $\text{cm}^{-1}$  è stata considerata di scarsa utilità ai fini analitici. Tra le rimanenti regioni spettrali potenzialmente utili (Fig. 8, A-C), l'intervallo spettrale 1540-1000  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 8, C) è risultato il più importante ai fini di questa sperimentazione ed è stato sottoposto ad analisi multivariata.

**Elaborazione multivariata.** Per l'elaborazione statistica dei dati si è fatto ricorso ad una calibrazione multivariata molto utilizzata nel campo del medio infrarosso, il cosiddetto modello ai minimi quadrati parziali (Partial Least Squares, PLS) (Todeschini, 1998). Il modello PLS ottenuto è stato valutato mediante validazione interna (cross validation) e stima dell'errore quadratico medio di cross-validazione (RMSECV: Root Mean Squares Error of Cross Validation) (Opus 5.5, Bruker Optics, Milano).

## Risultati e discussione

La strumentazione FT-IR, per funzionare correttamente, necessita di una adeguata e preventiva calibrazione di taratura con un metodo di riferimento. In questa fase i campioni vengono analizzati con entrambe le tecniche (FT-IR e metodo di riferimento) ed i dati confrontati tra loro. Solitamente le calibrazioni FT-IR forniscono risultati migliori quando sono sviluppate su vini con le stesse caratteristiche e si basano su molti campioni. In questo modo si può arrivare ad ottenere una calibrazione, ad esempio, per il solo Sangiovese di Romagna. 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.

La Fig. 9 mostra la correlazione tra analisi FT-IR e metodo spettrofotometrico Adams per la determinazione dei pigmenti polimerici a basso (SPP) ed elevato peso molecolare (LPP) nei vini rossi. La correlazione è soddisfacente ( $R^2 \geq 0,955$ ), 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 a dimo-

strato la potenzialità della tecnica FT-IR per la determinazione dei pigmenti polimerici nei vini rossi. Ulteriori analisi sono necessarie per implementare la banca dati e migliorare le prestazioni dello strumento. ■

## Bibliografia

Bakker J., Preston N.W., Timberlake C.F. (1986). The determination of anthocyanins in aging red wines: comparison of HPLC and spectral methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 121-126.

Baldi A., Romani A. (1992). Studio su alcuni composti polifenolici in uve, mosti, vini della Toscana. *Enotecnico* 28, 105-119.

Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. (1998). Principle and practices of winemaking. Aspen Publ., Gaithersburg, MD, USA.

Boulton R., Neri R., Levensgood J., Vaadia M. (1999). Copigmentation of anthocyanins in Cabernet Sauvignon and Merlot wines from the Napa valley of California. In: Lonvaud-Funel, A. (Ed). *Proc. 6th Symposium International d'Enologie, Tec. & Doc. Publ., Paris, France.* pp. 35-38.

Boulton R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 67-87.

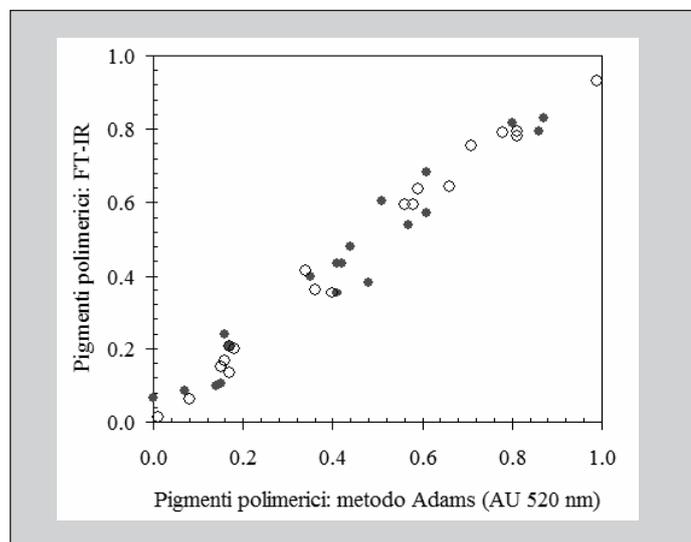
Cheyrier V., Dueñas-Paton M., Salas E., Maury C., Souquet J.-M., Sarni-Manchado P., Fulcrand E. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 298-305.

Di Stefano R., Cravero M.C., Gentilini N. (1989). Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *Enotecnico* 5, 83-89.

Donovan J.L., Meyer A.S., Waterhouse A.L. (1988). Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *J. Agric. Food Chem.* 46, 1247-1252.

Gomez-Plaza E., Gil-Munoz R., Lopez-Roca J.M.,

**Fig. 9 - Correlazione tra FT-IR e metodo Adams per la determinazione dei polimeri a basso (○) ed elevato peso molecolare (●)**



- Martinez A. (1999). Color and phenolic compounds of a young red wine as discriminating variables of its aging status. *Food Res. Int.* 32, 503–507.
- Harbertson J.F., Kennedy J.A., Adams D.O. (2002). Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot Noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 54–59.
- Harbertson J.F., Picciotto E.A., Adams D.O. (2003). Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wine using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 301–306.
- Kennedy J.A., Waterhouse A.L. (2000). Analysis of pigmented high-molecular-mass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 866, 25–34.
- Kennedy J.A., Saucier C., Glories Y. (2006). Grape and wine phenolics: History and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 239–248.
- Kupina S.A., Shrikhande A.J. (2003). Evaluation of a Fourier transform infrared instrument for rapid quality-control wine analyses. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 131–134.
- Mazza G., Fukumoto L., Delaquis P., Girard P., Ewert B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4009–4017.
- Montedoro G.F., Bertuccioli M., Clementi S. (1986). I composti fenolici: evoluzione e loro importanza sulle caratteristiche organolettiche dei vini rossi. *Enotecnico* 10, 985–990.
- Nagel C.W., Wulf L.W. (1979). Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of merlot and Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 111–116.
- Paronetto L. (1977) *Polifenoli e Tecnica Enologica*. Edagricole, Bologna.
- Patz C.-D., Blicke A., Ristow R., Dietrich H. (2004). Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Anal. Chim. Acta* 513, 81–89.
- Peng Z., Hayasaka Y., Iland P.G., Sefton M., Höj P., Waters E.J. (2001). Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis Vinifera*) seeds by reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 49, 26–31.
- Peng Z., Iland P.G., Oberholster A., Sefton M.A., Waters E.J. (2002). Analysis of pigmented polymers in red wine by reversed phase HPLC. *Aust. J. Grape Wine Res.* 8, 70–75.
- Piergiovanni L., Volonterio G., Scibona A. (1986). Studio della frazione antocianica: modificazioni nel corso dell'invecchiamento di un vino Barbera. *Ind. Bevande* 6, 203–208, 217.
- Pompei C. (1971). An assay of different phenolic fractions in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 22, 55–58.
- Ribéreau-Gayon P., Stonestreet E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 9, 2649–2652.
- Ribéreau-Gayon P. (1982). The chemistry of red wine color. In: *The Chemistry of Winemaking*. A.D. Webb (Ed.), pp 50–87. American Chemical Society, Advanced Chemistry Series, USA.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y. (1986). La tipicizzazione dei vini rossi: caratteri chimici ed organolettici. *Enotecnico* 10, 545–550.
- Riberau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2003). *Trattato di Enologia*. Vol. 2. Edagricole, Bologna.
- Somers T.C. (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* 10, 2175–2186.
- Somers T.C., Evans M.E. (1974). Wine quality: Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. *J. Sci. Food Agric.* 25, 1369–1379.
- Somers T.C., Evans M.E. (1977). Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO<sub>2</sub>, and “chemical age”. *J. Sci. Food Agric.* 28, 279–287.
- Singleton V.L., Trousdale E.K. (1992). Anthocyanin-tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 63–70.
- Todeschini R. (1998). *Introduzione alla Chemiometria*. Ed. Edises, Napoli.
- 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. *Ital. J. Food Sci.* 4, 427–435.
- Versari A., Parpinello G.P., Mattioli A.U. (2007a). Characterization of polymeric pigments and color components of commercial red wines by using selected UV-Vis spectrophotometric methods. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 28, 1, 6–10.
- Versari A., Boulton R.B., Parpinello G.P. (2007b). Analysis of SO<sub>2</sub>-resistant polymeric pigments in red wines by High-Performance Liquid Chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 4, 523–525.
- Versari A., Boulton R.B., Parpinello G.P. (2007c). A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. *Food Chem.* 106, 1, 397–402.
- Vrhovsek U., Mattivi F., Waterhouse A.L. (2001). Analysis of red wine phenolics: Comparison of HPLC and spectrophotometric methods. *Vitis*, 40, 87–91.