



Università degli Studi di Firenze

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA APPLICATA

**Studio di fattibilità sull'uso di tecniche analitiche
accoppiate all'analisi multivariata per
discriminare tra vini di origine diversa e di vari
vitigni**

*Feasibility study on the use of analytical techniques
coupled with multivariate analysis to discriminate
between wines of different origin and various varieties*

Tesi di

DEVID CIANTINI

Relatore: Dott. Fabrizio Machetti

Correlatore: Dott. Farida Furini

Ringraziamenti

Prima di tutto, i miei ringraziamenti vanno al professor Fabrizio Machetti e alla dottoressa Farida Furini per la pazienza, il tempo e le competenze che hanno gentilmente messo a mia disposizione durante il periodo di tirocinio e di stesura della tesi.

Grazie al Consorzio Vino Chianti Classico e a tutti i dipendenti del laboratorio che, sempre gentilissimi e disponibili, hanno reso il periodo di tirocinio-tesi una bella esperienza di lavoro e un bel ricordo.

Grazie a Patrizia e Giampaolo per i loro consigli riguardo la stesura di tale testo.

Grazie ai parenti che mi hanno sostenuto e agli amici che mi hanno distratto.

Grazie a Claudia che con il suo amore e il preziosissimo sostegno esplicito, è stata fonte di inesauribile energia.

Grazie infinite ai miei genitori, che, sempre augurandosi il meglio per me, hanno consentito tutto ciò. Mai han fatto pesare qualche insuccesso, sempre mi hanno incoraggiato e confortato.

Grazie a Devid per non aver mai mollato ed essere arrivato in fondo al percorso, senza venir meno al principio che consiglia di finire sempre ciò che si comincia.

INDICE

ABBREVIAZIONI	pag. 1
SCOPO DELLA TESI	pag. 3
1 - INTRODUZIONE	pag. 5
1.1 - Il vino	6
1.2 - Classificazione dei vini di qualità	7
1.3 - Disciplinare DOCG Chianti Classico	8
1.4 - I vitigni	9
1.5 - Vino e salute	10
2 - DESCRIZIONE DEGLI ANALITI	pag. 12
2.1 - Metalli	12
2.2 - Anioni	16
2.3 - Polifenoli (strutture e proprietà)	17
2.4 - Il colore dei vini	24
3 – PROVENIENZA DEI VINI CAMPIONE	pag. 30
4 - PARTE SPERIMENTALE	pag. 35
4.1 - Metodo per antociani	35
4.2 - Metodo per gli anioni	40
4.3 - Metodo per i metalli	44
4.4 - Metodi spettrofotometrici	49
5 - METODI STATISTICI	pag. 54

6 - RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 58
6.1 - Costituzione della banca dati	58
6.2 - Caratterizzazione viticolturale	60
6.3 - Caratterizzazione territoriale	74

CONCLUSIONI	pag. 85
--------------------	---------

APPENDICE A – STRUMENTAZIONI

APPENDICE B – METODO PER ANTOCIANI ALL’HPLC

APPENDICE C – METODO PER ANIONI AL CI

APPENDICE D – METODO PER METALLI ALL’ICP-OES

BIBLIOGRAFIA

ABBREVIAZIONI

DOCG	Denominazione di origine controllata e garantita
IGT	Indicazione geografica tipica
OIV	Office International de la Vigne et du Vin
HDL	Lipoproteine ad alta densità
LDL	Lipoproteine a bassa densità
GAE	Acido Gallico Equivalente
AAS	Spettrofotometria di assorbimento atomico
R ²	Coefficiente di correlazione
CRM	Certified Reference Material
PCA	Analisi delle componenti principali
PCn	Componente principale n-esima
LDA	Analisi discriminante lineare
D3g	Delfinidina-3-glucoside
C3g	Cianidina-3-glucoside
P3g	Petunidina-3-glucoside
Pe3g	Peonidina-3-glucoside
M3g	Malvidina-3-glucoside
Pe3ag	Peonidina-3-acetilglucoside
M3ag	Malvidina-3-acetilglucoside
Pe3cg	Peonidina-3-cumarilglucoside
M3cg	Malvidina-3-cumarilglucoside
VQPRD	Vino di qualità prodotto in regione determinata
VT	Vino da tavola

OCM	Organizzazioni comuni di mercato
HPLC	High performance liquid chromatography
C.I.	Cromatografia ionica
ICP-OES	Inductively coupled plasma – optical emission spectrometry

Scopo della tesi

Nel tempo, a fronte del riscontrato incremento delle frodi in campo enologico, tra gli organismi di certificazione del settore, si è fatta sempre più forte la necessità di avere a disposizione un metodo diretto in grado di stabilire “cosa c’è in bottiglia”.

Questo lavoro di tesi succede e affina un altro studio che si prefiggeva di individuare marcatori chimici, in vini etichettati DOCG Chianti Classico, che potessero essere sfruttati per garantirne l’origine. Lo studio si è concentrato sull’analisi dei metalli, ritenuti dalla letteratura, indicativi della zona d’origine.

Alla luce di tutto ciò, si vuole estendere il problema, individuando un metodo per accertare l’origine del prodotto, non solo del Chianti Classico, ma anche di altre denominazioni italiane, in particolare su quelle Toscane. Ogni denominazione è regolata da un disciplinare di produzione, in cui, tra le altre prescrizioni, vi è l’indicazione sulle varietà di uve da utilizzare. Alcuni disciplinari prevedono la possibilità di vinificare solo da uve monovitigno (es. Brunello di Montalcino), per cui accanto all’analisi degli elementi inorganici, si sono effettuate analisi sugli antociani, legati alla genetica della pianta e perciò indicativi del tipo di uva vinificata. Anche nel caso in cui i disciplinari prevedano più di un vitigno, la base ampelografica resta monovarietale per una buona percentuale; da qua la necessità di integrare il lavoro precedente con le analisi degli antociani frazionati.

Il primo obiettivo è costituire una banca dati relativa ad un nutrito gruppo di vini di varie denominazione e provenienze, tramite le analisi di routine effettuate in

laboratorio. Tale banca dati può poi rappresentare la base per un'analisi statistica multivariata che possa condurre alla determinazione di marcatori chimici che permettano la caratterizzazione territoriale e viticolturale.

Questo lavoro di tesi si svilupperà:

1. per la caratterizzazione viticolturale , sull'analisi degli antociani;
2. per la zonazione, sulle analisi degli anioni e dei metalli.

Cap.1 – Introduzione

1.1 – IL VINO

Il vino, secondo la vigente legislazione, è il “prodotto ottenuto esclusivamente dalla fermentazione totale e parziale di uve fresche, pigiate e non, o di mosti d’uva”. (Reg. CE 479/08, legge quadro sull’OCM, attuata dai Reg. CE 606/09 e 607/09).

Da un punto di vista chimico, il vino è una soluzione idro-alcolica e acida molto complessa, in cui sono presenti molte molecole di varia natura. Alcune di queste preesistono nel mosto, altre invece prendono origine durante il processo fermentativo. Le sostanze formate solo in seguito alla fermentazione includono:

- I. Etanolo e alcoli superiori;
- II. Acidi volatili (essenzialmente acido acetico);
- III. Acidi fissi (lattico, succinico ...);
- IV. Aldeidi;
- V. CO₂.

Tra le sostanze preesistenti troviamo invece:

- I. H₂O (il costituente più abbondante);
- II. Acidi fissi (tartarico, malico e citrico);
- III. Polifenoli (tannini, antociani ...);
- IV. Sostanze azotate (proteine, enzimi e nitrati);
- V. Glucidi (esosi e pentosi);
- VI. Polisaccaridi (pectine),
- VII. Sostanze minerali.

(V. Sciancalepore, *Industrie agrarie. Olearia, enologica ...*, pp.302)

La preesistenza già nelle uve di antociani e sostanze minerali, contribuisce allo scopo della tesi. Se così non fosse la distribuzione degli elementi analizzati dipenderebbe,

non tanto dalla provenienza geografica, quanto dalla particolare fermentazione avvenuta.

Come ben sapranno gli intenditori, il gusto del vino e, per associazione diretta, la sua composizione, hanno una forte dipendenza dal clima, dall'età del vitigno, dal tipo di vitigno, ma soprattutto dal terreno di coltivazione.

La diversa composizione chimica quantitativa di un vino, causa dell'estremamente grande varietà di vini conosciuti, è dovuta in primis ai fattori già citati; a questi successivamente si aggiungono la diversità nelle tecniche di vinificazione, di invecchiamento e altri trattamenti enologici a cui può essere sottoposto il vino. Tali trattamenti, vengono in ogni caso regolamentati dai disciplinari.

1.2 – CLASSIFICAZIONE DEI VINI DI QUALITÀ

Non essendo tutti i vini uguali tra loro, a livello normativo è stato necessario classificarli in modo efficace. Per questa ragione, a livello europeo, esiste una normativa (Reg. CE 479/08, legge quadro sull'OCM, attuata dai Reg. CE 606/09 e 607/09), che chiarisce l'importanza relativa delle varie denominazioni. La piramide dei vini di qualità è quella riportata in figura 1.

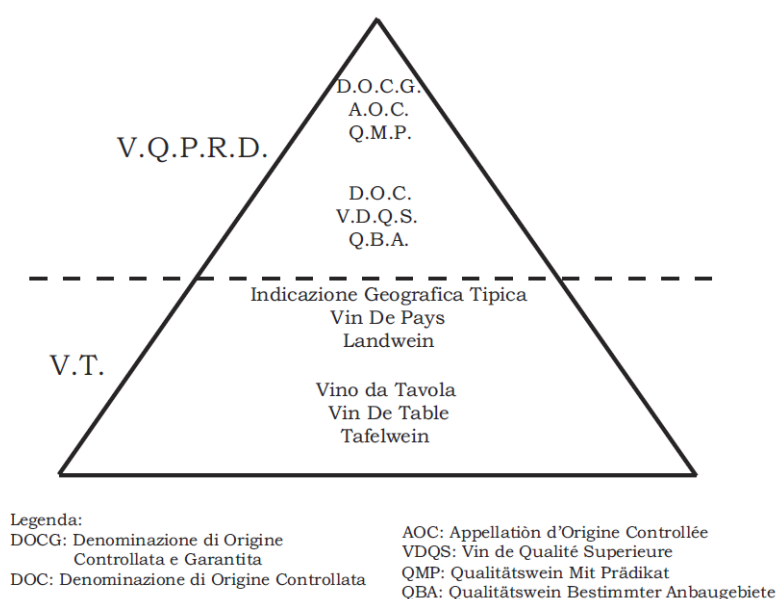


Figura 1

Questa prevede una prima distinzione in “Vino di Qualità Prodotto in Regione Determinata” (VQPRD) e “Vino da Tavola” (VT). I vari paesi hanno diverse denominazioni e ulteriori suddivisioni tra prodotti di diverse categorie. Nella figura 1 sono riportate le denominazioni per Italia, Francia e Germania; ordinate dall’alto verso il basso, dal vino di maggior pregio a quello di minor pregio. In questo modo appare evidente quali vini siano da salvaguardare nei confronti di quali altri vini; sicuramente, infatti, non saranno economicamente convenienti frodi su un vino IGT con un DOC o DOCG, ma l’inverso.

1.3 - DISCIPLINARE DOCG CHIANTI CLASSICO

È innegabile che il legame tra caratterizzazione territoriale-viticolturale e denominazione corrispondente sia inscindibile. Lo dimostra il fatto che ogni denominazione d’origine possiede dei regolamenti dettagliati detti disciplinari, che tutti i vini appartenenti devono rispettare.

Ad esempio, si riporta il disciplinare della DOCG Chianti Classico, essendo questa la denominazione da cui è scaturito questo lavoro di tesi.

Tale regolamento si sviluppa in 8 articoli che, attraverso una minuziosa descrizione dei confini e delle caratteristiche ammissibili per il territorio di coltivazione, mettono in chiaro l’imprescindibilità della provenienza del vino; dopo di che devono anche essere rispettate tante altre direttive, che integrano le condizioni e i requisiti necessari perché un vino possa vantare la D.O.C.G. Chianti Classico.

- ✓ Art. 1 “La denominazione Chianti Classico è riservata al vino rosso che risponde alle condizioni e ai requisiti stabiliti nei seguenti articoli.”
- ✓ Art. 2 “Il vino Chianti Classico deve essere ottenuto da uve prodotte nella zona descritta all’articolo 3 e provenienti da vigneti aventi la seguente composizione ampelografica: sangiovese dall’80 % fino al 100 %. Possono inoltre concorrere alla produzione le uve a bacca rossa provenienti da vitigni

idonei alla coltivazione nella regione Toscana nella misura massima del 20% della superficie iscritta all'Albo Vigneti.” Ad esempio: Canaiolo, Colorino, e quelli “internazionali”, come il Cabernet Sauvignon e il Merlot.

- ✓ Art. 3 “La zona di produzione del vino Chianti Classico è la zona delimitata con decreto interministeriale 31 luglio 1932....”. Tale zona, per dare una sintetica illustrazione, è delimitata come in figura 2:

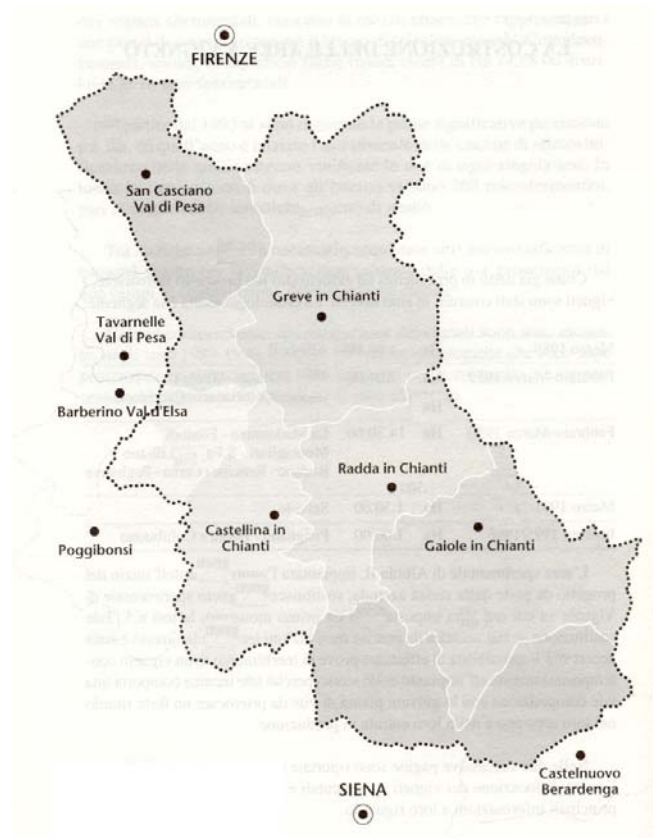


Figura 2

- ✓ Art. 4 In questo punto si stabiliscono le caratteristiche dei vigneti come: altitudine, pendenza, età, produzione massima, resa dell'uva ecc...
- ✓ Art. 5 Questo articolo descrive dettagliatamente le pratiche di vinificazione, conservazione e invecchiamento consentite.
- ✓ Art. 6 “Il vino a denominazione di origine controllata e garantita Chianti Classico, all'atto dell'immissione al consumo, deve rispondere alle seguenti caratteristiche:
- limpidezza: limpido;

- colore: rubino che può divenire talvolta secondo l'origine intenso e profondo;
 - odore: note floreali di mammole e giaggiolo unite ad un tipico carattere di frutti rossi;
 - sapore armonico, asciutto (con un massimo di 4 g/l di zuccheri riduttori), sapido, buona tannicità che si affina col tempo al morbido vellutato;
 - titolo alcolometrico volumico complessivo minimo: 12 % vol. ; per la "Riserva" 12,50 % vol. ;
 - acidità totale minima: 4,5 g/l;
 - estratto non riduttore: 23 g/l. ”
- ✓ Art. 7 Questo articolo regola il marchio e l'etichettatura.
- ✓ Art. 8 Questo articolo impone limiti sui recipienti: bordolesi e fiaschi toscani.

(Consorzio Chianti Classico, *Disciplinare della DOCG*, 2010)

1.4 - I VITIGNI

Le caratteristiche del vino sono direttamente correlate al vitigno d'origine, oltre che all'ambiente in cui la vite viene coltivata. Attualmente nel mondo sono 10000 i vitigni descritti e coltivati, ma solo 10 di questi coprono il 20 % della superficie vitata mondiale. In Italia ci sono ben 355 vitigni autoctoni. Il trebbiano è il vitigno da cui si ricava la maggior quantità di vino. Il sangiovese (vite antichissima di origine autoctona toscana, il cui nome deriva da "sangue di giove") è il più coltivato in Italia e copre il 10% della superficie vitata nazionale. Insieme al Cataratto bianco siciliano, Trebbiano toscano, Montepulciano e il Barbera, costituisce il 30% delle coltivazioni. Nel resto del mondo il più diffuso è l'Airen e a seguire il Granacha (spagna-francia) e il Carignano (spagna-francia). (P.Cabras et.al., *Chimica degli alimenti*, pag. 531)

Poiché la maggior quota di antociani si trova nella buccia dell'uva e la restante si suddivide tra vinacciolo e polpa del chicco, la composizione antocianica del vino rosso

dipende fortemente dal tipo di uva, quindi dal vitigno. In altri termini la componente antocianica ha considerevole dipendenza dalla genetica della pianta.

1.4 - VINO E SALUTE

Il vino è da sempre, LA, bevanda. Esiste da molti millenni, e fino a qualche decennio fa era giudicato addirittura nobile e importante quanto l'acqua.

Molti sono stati gli studi volti a definire il rapporto tra vino e salute. Uno dei primi fu quello decennale svolto dall'organizzazione sanitaria californiana "Kaiser Permanente", la quale si occupò più precisamente del rapporto tra mortalità per disturbi cardiaci e il consumo di alcol. Lo studio sopra citato ha dimostrato che il tasso di mortalità è minimo per il gruppo di persone che consumava due unità di alcol al giorno, mentre gli astemi e i consumatori assidui hanno presentato tassi elevati. Per unità di alcol (drink) si intende 17,5 ml di etanolo (cioè 145 ml di vino o 350 ml di birra). La curva ad U è stata studiata e confermata da molti studi, ma vale per le bevande alcoliche in generale e non solo per il vino. Ancora oggi non risulta chiaro il meccanismo con cui l'alcol agisca aumentando il livello sanguigno delle HDL (trasportatrici del colesterolo dai tessuti al fegato) a sfavore delle LDL (trasportatrici del colesterolo dal fegato ai tessuti), impedendo quindi l'otturazione dei vasi sanguigni.

Tra le argomentazioni in favore del consumo specifico del vino troviamo il cosiddetto "Paradosso francese", un programma che illustrò come i francesi vantassero un tasso di mortalità per disturbi cardiovascolari nettamente inferiore a quello degli americani seppure la loro dieta fosse altrettanto ricca di grassi e colesterolo. L'unica differenza sostanziale nelle alimentazioni era il consumo di vino. Il contributo del vino, specialmente quello rosso, nella prevenzione delle patologie cardiache si focalizza sull'indagine dei composti fenolici. Questi composti, notoriamente antiossidanti in vitro, e da assumere regolarmente con le diete raccomandate dai salutisti, di certo non agiscono allo stesso modo in vivo. In ogni caso, anche non conoscendone i meccanismi, e non essendo ancora provati i loro effetti positivi, sembra crescere il

consenso generale sulle loro proprietà benefiche per il corpo umano. (Y.Margalit, *Elementi di chimica del vino*, pp.341-345)

In medicina, l'uso di matrici alimentari ricche di antocianine viene spesso ricordato per la cura di patologie infiammatorie come l'artrite e per le terapie dei disordini circolatori; tutto ciò in seguito alle loro proprietà antiossidanti, antiradicali, antiinfiammatorie, antivirali, antinfettive, antiallergiche, antiemorragiche, antiaggreganti e antiproliferative. Essi, inoltre, contrastano la ritenzione idrica e i disturbi della retina di natura ipertensiva o diabetica.

Per tali ragioni, ai flavonoidi viene attribuito il nome Vitamina P, o C2, perché se vengono assunti in associazione con vitamina C agiscono sinergicamente, cioè gli effetti positivi di entrambe le vitamine si moltiplicano. Le funzioni salutari di tali composti sono giustificate anche dal fatto che già nella pianta intervengono proprio per difenderla dagli attacchi esterni e partecipano alla fotosintesi clorofilliana.

Cap.2 – Descrizione degli analiti

I componenti inorganici dei vini sono generalmente meno studiati di quelli organici e questo perché possono sembrare di minore importanza dal punto di vista biochimico e fisiologico. In realtà, anche le sostanze minerali hanno una grande importanza in enologia, infatti, alcune sono necessarie per un buon andamento della fermentazione alcolica, altre hanno influenza sugli equilibri ossidoriduttivi dei vini. Piccole quantità di metalli possono incidere sulla chiarificazione del vino e sul suo profumo; altri, infine, hanno importanza per il valore alimentare del vino.

(Garoglio, *Enciclopedia vitivinicola mondiale Vol 3*, pp. 336)

2.1 - METALLI

L'analisi dei metalli è fondamentale:

1. a causa delle proprietà tossiche e di bioaccumulo che molti di essi posseggono;
2. perché sono catalizzatori;
3. perché influiscono sui caratteri organolettici;
4. perché possono provocare precipitazioni indesiderate nel vino.

Alcuni metalli sono indispensabili per l'organismo umano, ma solo se assunti consapevolmente con la dieta e a dosi ben definite, mentre possono diventare dannosi o tossici a dosi superiori (Mn, Cr, Co ...). Altri sono invece sempre indesiderabili (Pb, Cd, Ba ...). Il bioaccumulo dei metalli pesanti, dovuto alla maggiore velocità di assunzione rispetto alla velocità di detossificazione, interferisce con l'anabolismo proteico e conduce alla sintesi di enzimi denaturati biologicamente inattivi.

Il contenuto in sostanze minerali dei vini è inferiore a quello dei mosti d'origine; ciò è dovuto alla precipitazione del bitartrato di potassio e del tartrato di calcio e alla

sottrazione dei minerali necessari al metabolismo dei lieviti. In ogni caso, la loro presenza nel vino ha due origini: o vengono catturati dalla vite dal terreno di coltivazione delle uve, o in misura certo minore, dovuti ad inquinamento. Questa seconda fonte è causata dall'utilizzo di recipienti e macchinari in metallo o dalla collocazione delle viti in siti soggetti ad inquinamento esterno.

Nel vino, i cationi si possono classificare in 2 gruppi: il primo raggruppa quelli con concentrazione media compresa tra 1 mg/l e 1 g/l, ovvero K, Na, Fe, Ca, Mg e Li; il secondo gruppo comprende i metalli con concentrazione media tra 1 mg/l e 1 µg/l come Al, Ni, Mn, Cu, Zn, As, Rb, Pb. Gli altri metalli sono presenti in tracce.

- POTASSIO. Nonostante la sua abbondante precipitazione come bitartrato, il potassio superando il g/l costituisce circa il 75% dei cationi presenti in un vino. La sua concentrazione è solitamente compresa tra 400 e 1950 mg/l.
- SODIO. A differenza del potassio, il sodio tende ad aumentare dal mosto al vino a causa dell'aggiunta di SO₂ sotto forma di Na₂SO₃ o Na⁺HSO₃⁻, che, essendo sali molto solubili, determinano un considerevole apporto di tale metallo, il quale compromette il sapore e la qualità del vino. Il contenuto medio di Na non supera i 100 mg/l.
- MAGNESIO. La sua concentrazione è solitamente compresa tra 50 e 170 mg/l. E' presente in quantità maggiore del calcio perché i suoi sali sono tutti solubili e non diminuisce durante la fermentazione.
- MANGANESE. Il manganese è presente in tutti i vini in piccole quantità: da 1 a 3 mg/l. La sua concentrazione è legata al suo contenuto nel terreno della zona da cui l'uva proviene, ma aumenta se sono stati eseguiti trattamenti della vite con fungicidi come i ditiocarboammati.
- ARGENTO. Lo si trova solitamente in concentrazione tra 1 e 10 µg/l. E' presente in uve in cui è stato eseguito il trattamento antigrandine.
- COBALTO. Lo si trova solitamente in concentrazione tra 1 e 10 µg/l. È indispensabile perché fa parte della vitamina B12 (cobalamina) e stimola la captazione tiroidea dello iodio.

- **CROMO.** Lo si trova solitamente in concentrazione tra 10 e 100 µg/l, ma c'è possibilità di contaminazione da parte dei contenitori, concimi e atmosfera. Il terreno ne contiene normalmente da 0,1 a 1 ppm; come trivalente o esavalente. Il primo è essenziale perché riduce il colesterolo e influenza il metabolismo lipidico e glucidico. Cr⁶⁺ invece è pericoloso perché attraversa le membrane plasmatiche e tende a ridursi a Cr³⁺ comportandosi da ossidante.
- **MOLIBDENO.** La presenza di Mo nel vino è dovuta alla sua concentrazione nel terreno. Svolge prevalentemente funzioni catalitiche, specialmente nel metabolismo azotato. Essendovi antagonismo tra Mo e Cu, Mo e Mn, Mo e Al, riduce la tossicità di questi metalli.
- **TITANIO.** Si trova nel vino in piccole concentrazioni e la sua presenza deriva dal terreno. Sembra che qualsiasi intervento artificiale non comporti un aumento della concentrazione di questo elemento.
- **VANADIO.** Lo si trova solitamente in concentrazione tra 1 e 10 mg/l. Contribuisce alla regolazione della pompa Na-K delle cellule e di enzimi del metabolismo.
- **WOLFRAMIO.** Si trova solitamente in tracce.
- **ZIRCONIO.** Si trova solitamente in tracce.
- **FOSFORO.** Si trova, per la maggior parte, sotto forma di fosfato alcalino o alcalino-terroso ed in minor parte, come fosforo organico (acido glicero-fosforico). Nel mosto, il fosfato inorganico è fondamentale per l'alimentazione dei lieviti e per il decorso della fermentazione alcolica. È in relazione alle caratteristiche del terreno e del vitigno. Il fosforo organico aumenta durante l'invecchiamento e ne sono ricchi i vini di maggior pregio, infatti migliora il profumo, l'aroma e la finezza del vino.
- **SILICIO.** Lo si trova solitamente in concentrazione tra 1 e 10 mg/l.
- **BARIO.** Lo si trova solitamente in concentrazione tra 10 e 100 µg/l.
- **BERILLIO.** Lo si trova solitamente in concentrazione minore di 1 µg/l.

- LITIO. La sua bassa concentrazione nel vino deriva dalla presenza dell'elemento nel terreno.
- RUBIDIO. Lo si trova solitamente in concentrazione tra 100 e 1000 µg/l.
- STRONZIO. Lo si trova solitamente in concentrazione tra 100 e 1000 µg/l.
- ALLUMINIO. Lo si trova solitamente in concentrazione tra 100 e 1000 µg/l. Non ci sono prove della tossicità di questo metallo.
- BORO. Esplica i suoi effetti sulle reazioni di tipo ossidativo (catalasi, polifenolossidasi, perossidasi), attivando la sintesi della clorofilla e la produzione di zucchero. E' inoltre molto importante nel trasporto dei glucidi, in quanto, complessandosi con essi, attraversa con facilità le membrane cellulari. Influisce sul trasporto e sulla mobilità del calcio nelle piante. Promuove la sintesi della lignina a partire dai fenoli; infatti, in carenza di boro, si ha un notevole accumulo di fenoli non trasformati in lignina. Il suo limite legale nel vino è 80 mg/l.
- NICHEL. La fonte di approvvigionamento di questo elemento nel vino non è ancora chiara, tuttavia, nel tempo, non varia la sua concentrazione.

(Garoglio, *Enciclopedia vitivinicola mondiale Vol 3*, pp. 337)

(V.Sciancalepore, *Industrie agrarie. Olearia, enologica...*, pp.310)

(Y.Margalit, *Elementi di chimica del vino*, pp.57)

In questo lavoro di tesi, sono stati esclusi metalli anche importanti come Fe, Ca, Cu ecc.. mentre sono stati scelti gli elementi sopra descritti sulla base di:

- ✓ ampia variabilità causata da eventuali trattamenti correttivi consentiti;
- ✓ possibilità di zonazione dimostrata da lavori precedenti.

2.2 - ANIONI

La determinazione degli anioni è importante, in quanto, accanto ai metalli, costituiscono la componente minerale del vino. La loro concentrazione può rivelare se esso ha subito annacquamento o meno. Ne sono stati analizzati 3, che sono i più presenti nel vino.

- **NITRATI.** Durante la fermentazione i nitrati non subiscono variazioni e i lieviti non li utilizzano come fonte di azoto. Neppure la fertilizzazione con concimi azotati in vigna influisce sul quantitativo di nitrati presenti. Il valore medio di nitrati si attesta quindi sia nel mosto che nel vino tra 10 e 20 mg/l. Il loro limite legale è 20 mg/l.
- **CLORURI.** Il loro tenore, espresso in cloruro di sodio, generalmente è inferiore a 50 mg/l. In particolari territori può superare il g/l, ma il limite legale è fissato a 500 mg/l.
- **SOLFATI.** Il vino contiene allo stato naturale, cioè proveniente dall'uva senza alcun tipo di trattamento, solo piccoli tenori di SO_4^{2-} (tra 100 e 400 mg/l). Ma fonti considerevoli di SO_4^{2-} sono: il CuSO_4 nebulizzato sulle viti durante la maturazione dell'uva, e in seconda battuta, l' SO_2 addizionata ai mosti (come NaHSO_3) durante la fermentazione. Quest'ultima, sebbene sia lievemente tossica per l'uomo, viene impiegata per diversi motivi:
 - è un antisettico;
 - inibisce l'ossidazione non enzimatica che porta all'imbrunimento;
 - facilita la solubilizzazione delle sostanze coloranti dalle bucce;
 - e funziona da antiossidante producendo proprio SO_4^{2-} .

Il limite legale è comunque fissato a 2 g/l (Legge Collavini-Preda del 2006).

(P.Ribèreau et. al., *Trattato di enologia II*, pp.90)

(Y.Margalit, *Elementi di chimica del vino*, pp.47,261)

2.3 - I POLIFENOLI

Tra i composti organici che maggiormente caratterizzano il vino, i più importanti sono quelli fenolici; sono infatti responsabili del colore, dell'astringenza, dell'amaro, e in parte anche del gusto del vino. I fenoli rivestono anche un ruolo importante durante l'invecchiamento. Nella vinificazione, il loro comportamento chimico è assai sensibile a diversi fattori, quindi si trovano in uno stato di continua evoluzione.

Dopo i carboidrati e gli acidi, i composti fenolici rappresentano il gruppo più numeroso tra i costituenti dell'uva. La quantità totale di fenoli nell'uva dipende dal vitigno e dalle condizioni climatiche. Il contenuto medio degli acini è 4 g/Kg nei vitigni bianchi e 5,5 g/Kg nei vitigni rossi; di cui il 65% situato nel vinaccioli, il 30% nelle bucce e il restante 5% nella polpa.

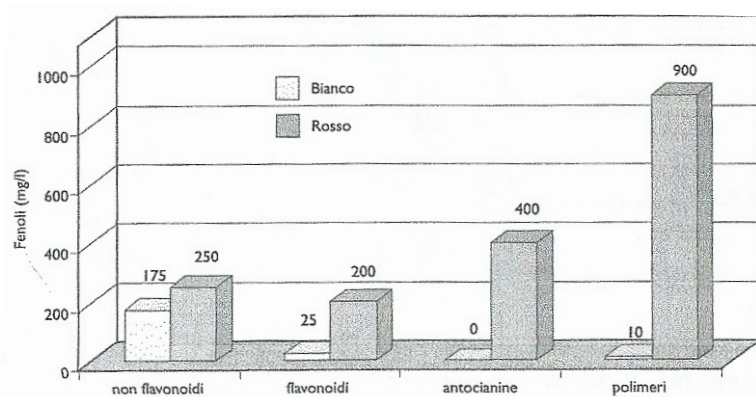


Figura 3. Contenuti fenolici in uva nera e bianca

(Y.Margalit, *Elementi di chimica del vino*, pp.48,49)

La classificazione dei polifenoli è complessa e non univoca: autori diversi presentano classificazioni simili ma non uguali a seconda del contesto in cui è inserita.

La solubilità di queste sostanze aumenta progressivamente nel corso della fermentazione, poiché favorita dalla presenza di alcol, dall'acidità del mosto, dall'innalzamento della temperatura e dallo svolgimento di CO₂ (la quale aumenta la permeabilità delle cellule della buccia). Il tenore di queste sostanze nel vino, dipende quindi, sia dal tipo di uvaggio, sia dal sistema di vinificazione. Il contenuto di polifenoli nei vini rossi (di cui l'80-90% sono flavonoidi) è in media 1,5 g/l, variando

tra i limiti di 1 e 2 g/l come GAE (equivalenti di acido gallico, che è la molecola polifenolica con la maggiore concentrazione nel vino). I vini rosati possono contenerne 400-800 mg/l, dei quali il 40-60% sono flavonoidi; infine nei vini bianchi si trovano dai 100 ai 400 mg/l (vedi fig. 3).

Il gruppo costituente comune a questa ampia classe di composti, come indica il nome è il fenolo, l'alcol aromatico più semplice. Esso è una sostanza antiossidante in virtù della sua struttura, infatti, gli elettroni sono delocalizzati come in figura 4:

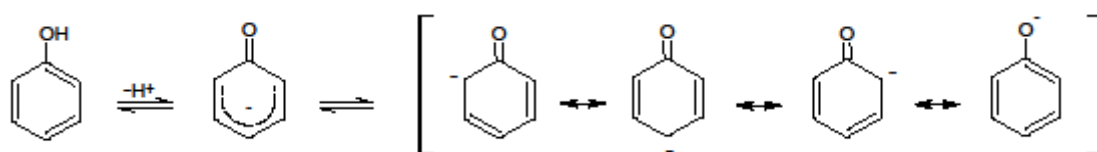


Figura 4

La delocalizzazione rende molto più acido l'idrogeno fenolico di uno alcolico (pKa 9,9 contro 16-18), e rende le posizioni orto e para più reattive alla sostituzione elettrofila.

Nel vino sono anche presenti difenoli e trifenoli come :

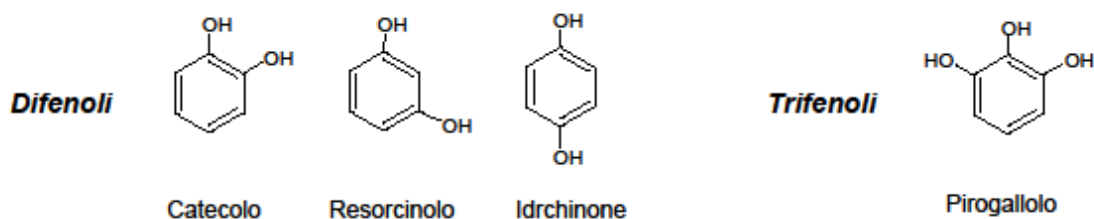


Figura 5

In base alla struttura i polifenoli del vino si possono classificare in tre macrogruppi:

1. C6-C1, derivati dal gruppo *idrossibenzoico*.

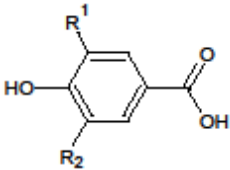
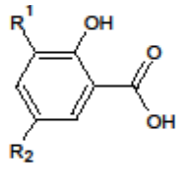
o-idrossibenzoico			p-idrossibenzoico		
					
Composti	R1	R2	Composti	R1	R2
Acido p-idrossibenzoico	H	H	Acido salicilico	H	H
Acido pirocatechico	H	OH	Acido o-pirocatechico	OH	H
Acido gallico	OH	OH	Acido gentisico	H	OH
Acido vanillico	H	OCH ₃			
Acido siringico	OCH	OCH ₃			
	3				

Tabella 1 o

Tabella 2

2. C6-C3, il gruppo *cinnamico*. Questa categoria presenta la struttura dell'acido cinnamico, il cui gruppo acido in soluzione si trova esterificato con zuccheri:

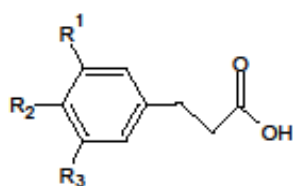


Figura 6

Composti	R1	R2	R3
Acido cinnamico	H	H	H
Acido p-cumarico	OH	H	H
Acido caffeico	OH	OH	H
Acido ferulico	OH	OCH ₃	H
Acido sinaptico	OH	OCH ₃	OCH ₃

Tabella 3

3. C6-C3-C6, il gruppo dei *flavonoidi*. Il termine flavonoidi, introdotto nel 1952 da Geissman e Hinreiner, dal latino significa giallo, ma indica generalmente la struttura di due anelli aromatici legati tra loro da una catena C3, che nella maggior parte dei casi è chiusa dall'ossigeno per formare un eterociclo (vedi fig. 7).

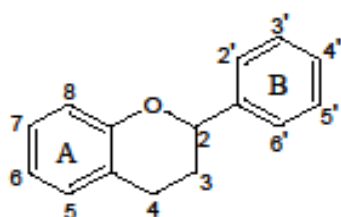


Figura 7

Le prime due categorie vengono anche definite *non flavonoidi*; ciò rende l'idea di quanto la terza categoria sia più importante. E' proprio ai flavonoidi che appartengono gli antociani.

Le caratteristiche dei differenti gruppi flavonoidi dipendono principalmente dell'eterociclo centrale, che consente la seguente classificazione dei sottogruppi flavonoidi:

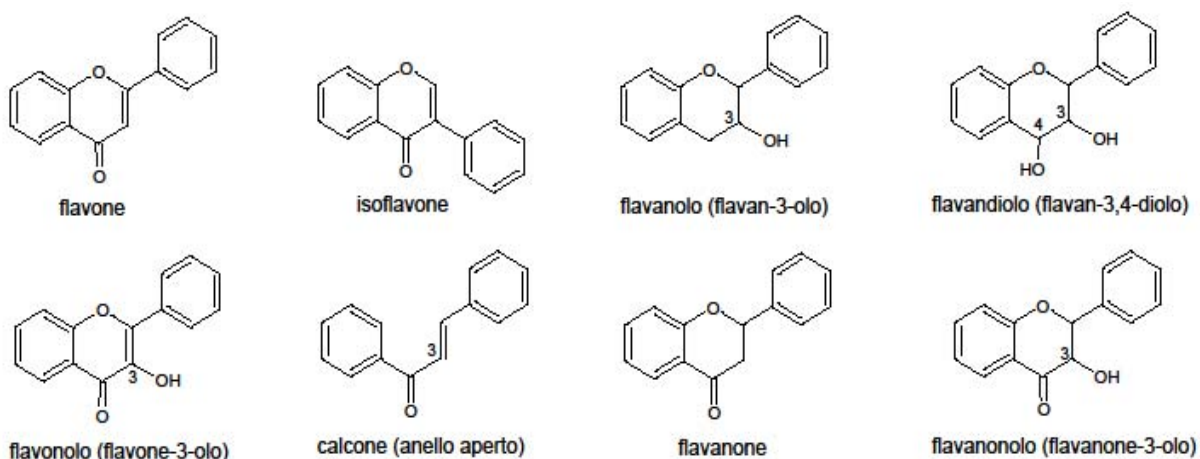


Figura 8

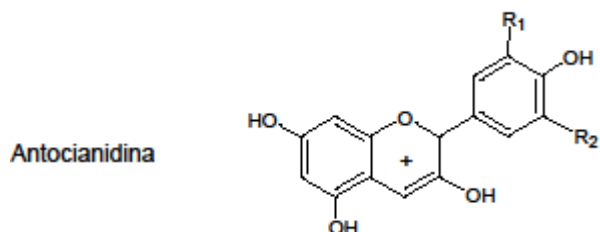


Figura 9

Composti	R1	R2
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Tabella 4

Le antocianidine sono l'unico gruppo cationico tra i flavonoidi; ciò le rende uniche per caratteristiche chimiche. L'anello centrale è chiamato ione pirilio, ma poiché appartiene al gruppo dei flavonoidi è meglio conosciuto come ione flavilio. Il catione ossonio coinvolto è stabilizzato per risonanza della carica. Questa delocalizzazione è descritta dalle formule tautomeriche di Ingold, che coinvolgono gli ossigeni in posizione 2, 4 e 4' (vedi fig.10):

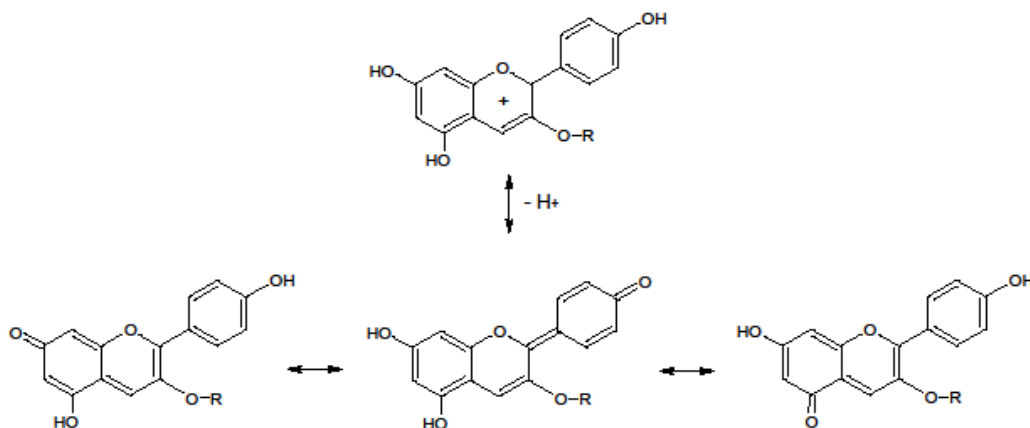


Figura 10

(Yair Margalit, *Elementi di chimica del vino*, p.103-121)

La struttura del catione flavilio si può considerare un ibrido di risonanza delle forme ossonio (fig. 11.a e 11.b) e delle forme carbonio (fig. 11.c e 11.d). Tuttavia, poiché l'ossigeno ha una minor tendenza del carbonio ad assumere una carica positiva, è probabile che il contributo delle strutture (c) e (d) sia superiore. Tra (a) e (b) la forma più stabile è la (a) perché contiene un sistema di legami naftalenoidi contro il sistema chinonico della struttura (b).

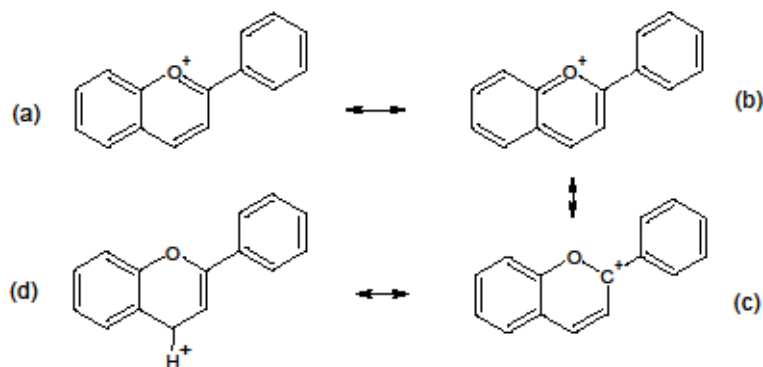


Figura 11

(P.G.Garoglio, *Enciclopedia vitivinicola mondiale Vol.3*, pp. 110,111)

L'antociano (o antocianina) non è nient'altro che un'antocianidina, sulla quale è legato, all'ossidrile in posizione 3, uno zucchero. Si parla sempre di antociani e non di antocianidine, perché tali molecole si trovano nel vino, molto più abbondantemente e frequentemente glicosilate, cioè come eterosidi. Il legame formato è del tipo C-O-C tra carboni idrossilati. Oltre alla posizione 3, le antocianidine possono essere glicosilate in posizione 5 o 7, o più raramente in due di queste (vedi fig. 12 e 13). Per quanto riguarda lo zucchero, questo è con maggior incidenza D-glucosio, altrimenti può essere: L-ramnosio, L-arabinosio o D-galattosio. Il carbonio coinvolto, dello zucchero, è sempre quello β -anomero.

malvidina-3-glucoside

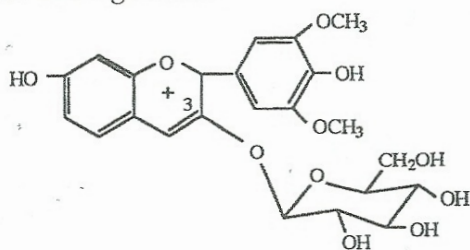


Figura 12

malvidina-3,5-diglucoside

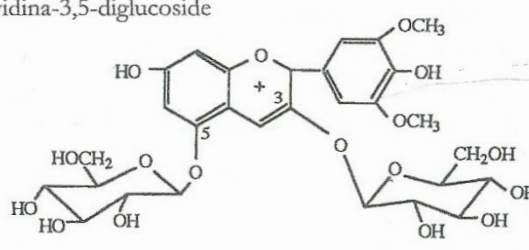
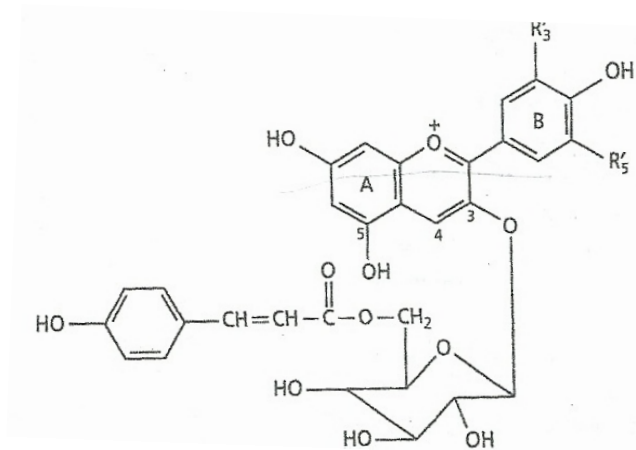


Figura 13

I flavonoidi liberi dallo zucchero sono anche detti agliconi. La glicosilazione conferisce agli antociani maggiore solubilità in acqua e rafforza la loro stabilità contro l'ossidazione enzimatica. L'idrolisi acida restituisce l'aglicone e lo zucchero. Talvolta lo zucchero legato all'aglicone si trova acilato con acetile o con un derivato dell'acido cinnamico (vedi fig. 14).



(Antociano-3-monoglucoside acilato con acido p-cumarico) Figura 14

(Trattato di enologia II, P.Ribèreau, fig. pag 146)

Un ultimo gruppo di composti polifenolici importanti sono i *tannini*. Con questo termine generico, si indicano i polimeri dei composti fenolici vegetali con particolari caratteristiche chimico-fisiche: solubilità in acqua, P.M. compreso tra 500 e 3000 g/mol e la capacità di interagire con proteine e poliammidi. Proprio quest'ultima proprietà li rende celebri per conferire al vino astringenza, essi, infatti, provocano la precipitazione della ptialina, la proteina lubrificante della saliva.

In base alla capacità di idrolizzarsi sono divisi in due categorie: *tannini idrolizzabili*, (copolimeri dell'acido gallico unito agli zuccheri), e *tannini condensati* costituiti da flavonoidi polimerizzati (circa 10 monomeri nel vino) tramite legami C-C e di difficile idrolisi. Dei tannini condensati fanno parte anche le proantocianidine, cioè tannini composti di antocianidine, le quali sono legate tra loro dalle posizioni 4, 6, 8 e possono essere liberate in particolari condizioni termiche e acide. Questo equilibrio ne regola la concentrazione in soluzione.

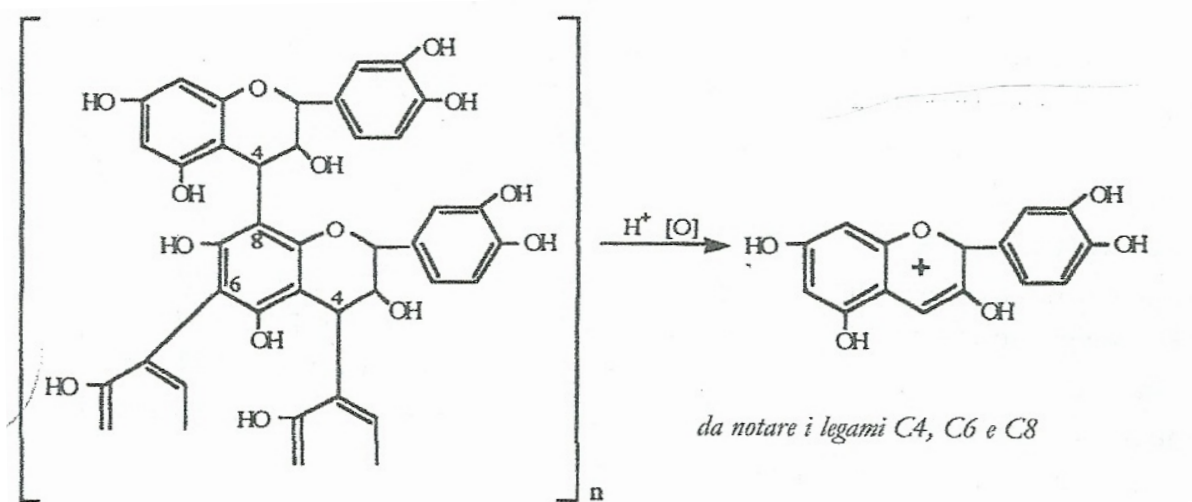


Figura 15

2.4 - IL COLORE DEI VINI

Gli antociani sono noti per essere responsabili dell'ampia gamma di colori (dal rosso al giallo) nei fiori, frutti e foglie. Nelle piante il colore dipende dal tipo di antociano presente, dalla sua forma glicosidica, dalla sua concentrazione, dalle interazioni con metalli e dal pH. In tutta la frutta si ha la predominanza di un'antocianidina; nel caso dell'uva e quindi nel vino, predomina la malvidina. Il colore di questi pigmenti nel vino è funzione della composizione del mezzo (pH, [SO₂]), e dipende dalla loro struttura molecolare e da quella delle sostanze insieme ad essa presenti. Infatti la sostituzione del ciclo B causa uno spostamento batocromico della lunghezza d'onda del massimo di assorbimento (verso il colore malva); dall'altra la glicosilazione e l'acilazione hanno un effetto ipsocromo sul colore (verso l'arancio). La presenza di altri polifenoli influenza il colore per la possibile copigmentazione.

Gli antociani sono sostanze anfotere il cui colore è fortemente influenzato dal pH. Tale dipendenza è evidenziata dagli equilibri di Brouillard in figura 16:

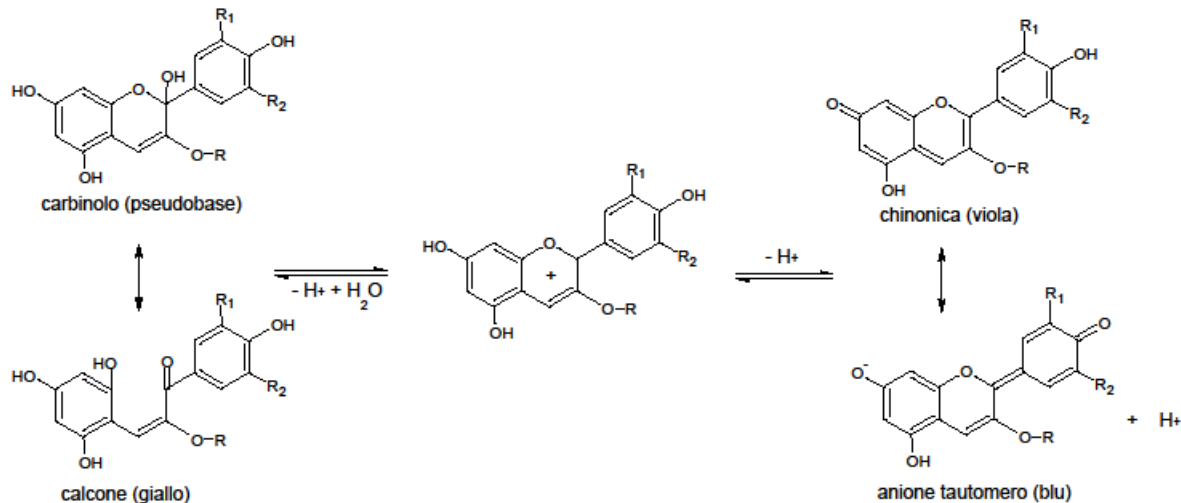


Figura 16

Il catione degli antociani partecipa a due serie di equilibri:

1. In soluzione acquosa si ha l'idratazione, cioè per addizione nucleofila forma il carbinolo, che è incolore. Questo è in equilibrio con l'anello aperto del calcione tautomero, la cui colorazione spazia dal giallo all'incolore.

2. Il secondo equilibrio (reazione acido-base) si forma tra la struttura dell'anidrobasi chinonica (viola) ed il suo tautomero anionico che è blu.

Gli antociani possono decolorarsi per riduzione o ossidazione. Un esempio è la reazione con l'anidride solforosa (vedi fig.17), che sotto forma di bisolfito (HSO_3^-) si attacca nelle posizioni (possedenti una parziale carica positiva) 2 e 4 dell'antociano:

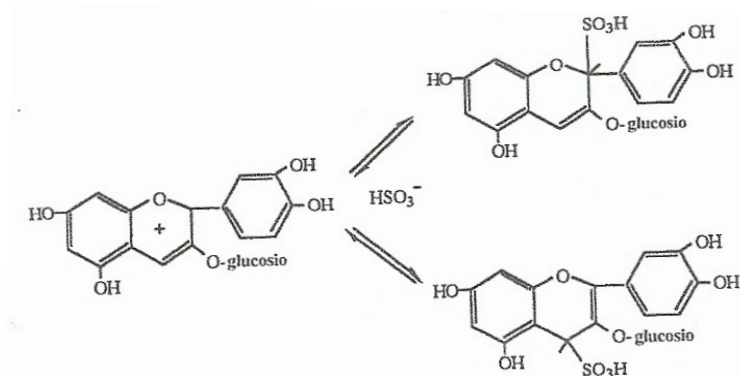


Figura 17

A pH 3,2 il 96% dell'acido solforoso ($\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) si trova sotto forma di anione HSO_3^- , perciò la decolorazione sarà molto forte.

E' evidente che il colore e l'intensità della soluzione di antociani sono notevolmente influenzati dagli equilibri del tipo di pigmento, che dipendono dal pH. Al fine di valutare la distribuzione di queste forme a diversi pH si esaminano le equazioni di equilibrio con F = flavonoidi deprotonati e F^+ = ione flavilio (antociani):

$$F^+ = F + H^+$$

$$K_a = \frac{[F][H^+]}{[F^+]}$$

$$\log K_a = \log \frac{[F]}{[F^+]} + \log [H^+]$$

$$pK_a = \log \frac{[F^+]}{[F]} + pH$$

Questa equazione consente di calcolare il rapporto tra gli antociani e i flavonoidi deprotonati ad un dato pH, conoscendo i valori di pKa. In ogni caso le soluzioni di antociani si decolorano totalmente per pH maggiori di 3,5.

(Yair Margalit, *Elementi di chimica del vino*, p.103-121)

L'esame della tabella 5, contenente le percentuali di decolorazione delle soluzioni di antociani, mostra che, se il vino rosso contenesse esclusivamente antociani liberi, esso avrebbe un'intensità di colore minima.

pH	SO ₂ libera (mg/L)	Antociani (mg/L)		
		50	100	400
3,2	0	26,9	26,9	26,9
	10	9,4	13,2	22,2
	20	4,5	7,0	17,6
	30	3,0	3,8	13,3
3,4	0	20,6	20,6	20,6
	10	8,6	11,0	17,0
	20	4,7	6,0	13,6
	30	3,2	3,8	10,5
3,8	0	12,7	12,7	12,7
	10	7,3	8,2	10,7
	20	4,9	5,6	8,8
	30	3,6	4,1	7,2
4,0	0	10,6	10,6	10,6
	10	7,0	7,5	9,1
	20	5,1	5,6	7,7
	30	3,9	4,3	6,4

Tabella 5

Gli antociani però diventano stabili, impartendo colore anche ai vini vecchi, grazie alla loro capacità di associarsi ai tannini e di copigmentare con altri composti fenolici per formare macropigmenti stabili secondo vari meccanismi. Un'altra parte relativamente piccola di antociani scompare per degradazione da temperatura, luce, ossigeno o per precipitazione come materiale colorante colloidale.

Per quanto riguarda la degradazione degli antociani a causa della temperatura, si ipotizza lo spostamento degli equilibri verso il calcione e le forme incolore. Però il colore delle soluzioni riscaldate a 100°, non riprende mai dopo raffreddamento. Maggiore è il tempo di esposizione a fonti di calore maggiore è la decolorazione.

(P.Ribèreau, *Trattato di enologia II*, p156-159)

L'intensità del colore nel vino rosso si riduce drasticamente durante la fermentazione a causa della precipitazione dei pigmenti condensati, dei complessi proteina-antociani e l'aumento di concentrazione alcolica. I solventi organici come l'alcol si oppongono alla copigmentazione indebolendo il ponte a idrogeno che stabilizza tali cromofori di associazione. E' stato inoltre provato che, nel corso dell'invecchiamento, gli antociani polimerizzano per dare polimeri rossi più stabili alla decolorazione

ossidativa e dovuta all' SO_2 . Avendo carica positiva lo ione flavilio può essere sostituito in posizione 4 da flavonoidi nucleofili per formare un dimero condensato, a sua volta, in grado di ossidarsi a dimero flavilio:

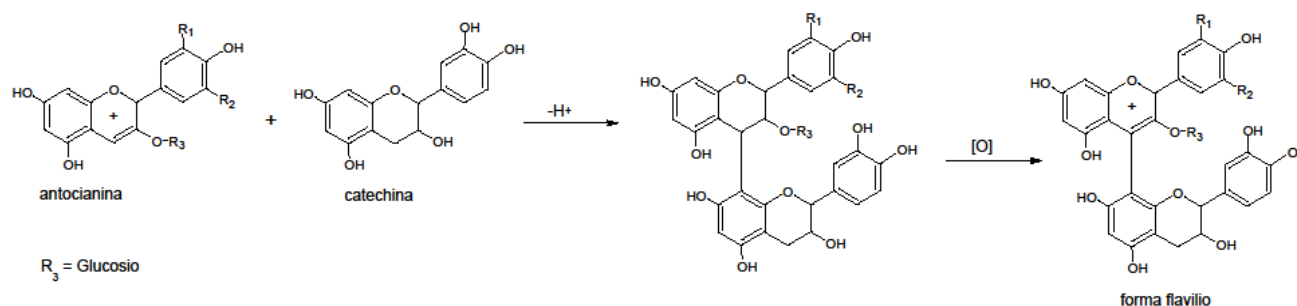


Figura 18

La distribuzione dei pigmenti può essere valutata con l'estrazione degli antociani con alcol isoamilico, il quale estrae solo i monomeri. È stato dimostrato che il colore rosso è dovuto per il 50-80% ai pigmenti polimerizzati e solo la restante percentuale agli antociani monomerici.

Un'altra conseguenza è che lo spettro di un vino invecchiato è meno sensibile a variazioni di pH; questo perché le pKa dei polimeri sono maggiori di quelle dei monomeri. La combinazione degli antociani con i tannini accresce la quantità totale dei fenoli polimerizzati nel vino, rendendoli più solubili. Tale aumento fa passare il colore rosso-mattone a rosso-marrone aumentando A_{420} a scapito di A_{520} .

Gli antociani possono dare colorazioni deviate da quelle prevedibili anche a causa di metalli come Mg^{2+} , Al^{3+} e Cu^{2+} che formano con l'anello ortodifenolico (anello B) dei complessi responsabili di un effetto batocromico.

Per tutti questi fattori possiamo stabilire che gli antociani liberi nel vino non sono stabili; diminuiscono fin dai primi mesi e spariscono nel giro di qualche anno, pur restando il vino di color rosso.

(Yair Margalit, *Elementi di chimica del vino*, p.121-127)

Assorbimento degli antociani

E' evidente dalla loro struttura molecolare, che gli antociani sono in grado di dare tutti i tipi di transizione descritti.

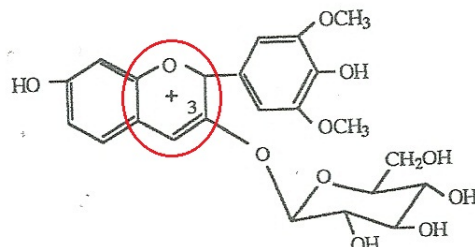


Figura 19. Malvidina-3-glucoside (Elementi di chimica del vino, p.113)

L'aspetto cromatico visibile della molecola è principalmente dovuto al suo carattere ionico, cioè è il gruppo ione flavilio (evidenziato in rosso) che costituisce il cromoforo dell'antociano (vedi fig.19).

Gli spettri UV e visibile sono importanti strumenti di studio dei pigmenti fenolici. Nello spettro visibile i pigmenti di un vino rosso presentano gli estremi di assorbanza alle lunghezze d'onda di 520 nm (massima) e 420 nm (minima). Il primo come reazione al colore rosso, il secondo al giallo-bruno. Bisogna tenere presente che se il pH è basso, gli antociani mostrano una deviazione negativa dalla legge di Lambert-Beer; se invece il pH è maggiore di 3,5 gli antociani presentano una deviazione positiva. Questo comporta che, se si è costretti a diluire la matrice per rientrare nei limiti ragionevoli di assorbanza, siamo costretti a correggere il pH. Questo spiega la preferenza dell'utilizzo di cuvette di 0,1 cm di spessore rispetto alla diluizione 1:10 del campione in cuvette da 1 cm.

Il vino giovane presenta il maggior grado di assorbanza per λ_{520} . Nel corso dell'invecchiamento, l'assorbanza a λ_{420} aumenta a discapito della precedente (vedi fig.20); il che spiega la mutazione del colore rosso vivo del vino giovane in rosso-marrone.

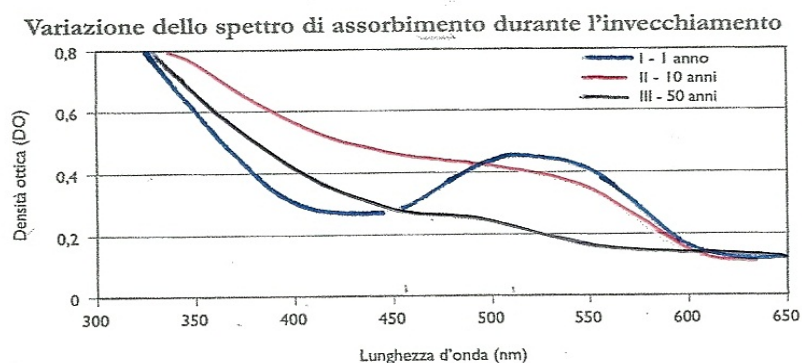


Figura 20

Nella determinazione del colore del vino è possibile individuare due utili parametri:

- I: *Intensità* del colore $\rightarrow I = A_{420} + A_{520} + A_{620}$
- T: Tonalità (o sfumatura) del colore $\rightarrow I = \frac{A_{520}}{A_{420}}$

Siccome con l'invecchiamento aumenta A_{420} e diminuisce A_{520} , la tonalità di un vino cresce fino ad un massimo di 1 circa; inoltre quando $I > 6$ il vino si può considerare intensamente colorato e viceversa per $I < 6$.

Per quanto riguarda il vino bianco, essendo privo di antociani, esso non ha uno spettro visibile significativo, soltanto lo spettro UV presenta 2 regioni di assorbanza: a 265-285 nm, peraltro presente anche nei vini rossi perché dovuta all'anello A dei flavonoidi, e a 320 nm dovuto ad esteri.

(Y. Margalit, *Elementi di chimica del vino*)

Cap.3 - Provenienza dei vini campione

Tutti i vini per la costituzione della banca dati sono stati raccolti da un'enologa che svolge l'attività prevalentemente in toscana. Essendo la promotrice della ricerca ed essendo interessata al risultato finale i campioni sono da considerare di origine certa e monovotigno.

I 115 vini campione bianchi e rossi oggetto di analisi hanno provenienza molto varia (vedi tab. 6), coprendo in questo modo la maggior parte dei vitigni coltivati in Italia e alcune fra le denominazioni italiane (vedi tab.6).

Colore	Sigla Campione		Regione	Zona/ Denominazione	Comune	Vitigno
B	LA	132	Toscana	Elba DOC	Terre del Granito	Ansonica
B	GA	129	Toscana	IGT Toscana	Strozzavolpe	Chardonnay
B	E	97	Umbria	Colli Perugini	Perugia	Grechetto
B	GA	101	Umbria	IGT Umbria	Orvieto	Grechetto
B	V	75	Toscana	Chianti	Montecarlo	Pinot b.
B	E	95	Umbria	IGT Umbria	Casale	Trebbiano Spoletino
B	V	72	Toscana	Chianti	Montecarlo	Vermentino
B	V	77	Toscana	Chianti	Montecarlo	Vermentino
B	E	51	Toscana	Maremma e Costa	Bolgheri	Vermentino
B	E	50	Toscana	Maremma e Costa	Ribolla	Vermentino
B	V	71	Toscana	Chianti	Montecarlo	Viogner
R	GA	102	Umbria	IGT Umbria	Orvieto	Ancellotta
R	GA	128	Toscana	IGT Umbria	Greppi	Cabernet F.
R	V	108	Umbria	IGT Umbria	Mercatello	Cabernet F.
R	V	70	Toscana	Chianti	Casciana Terme	Cabernet S.
R	B	20	Toscana	Chianti Classico	Greve-Dudda	Cabernet S.
R	B	35	Toscana	Chianti Classico	San Gimignano	Cabernet S.
R	GA	32	Toscana	Chianti Classico	Casole d'Elsa	Cabernet S.
R	GA	16	Toscana	Chianti Classico	Greve in Chianti	Cabernet S.
R	GA	5	Toscana	Chianti Classico	Panzano	Cabernet S.

Colore	Sigla Campione		Regione	Zona/ Denominazione	Comune	Vitigno
R	GA	10	Toscana	Chianti Classico	San Casciano	Cabernet S.
R	LA	136	Toscana	IGT Toscana	Campiglia M.ma	Cabernet S.
R	A	54	Toscana	Maremma e Costa	Castagneto Carducci	Cabernet S.
R	A	106	Umbria	Montefalco	Montefalco	Cabernet S.
R	V	74	Toscana	Chianti	Montecarlo	Cabernet S.
R	V	113	Umbria	IGT Umbria	Mercatello	Cabernet S.
R	V	68	Toscana	Chianti	Impruneta	Canaiolo
R	F	44	Toscana	IGT Toscana	Pontedera	Ciliegiolo
R	GA	31	Toscana	Chianti Classico	Casole d'Elsa	Merlot
R	A	26	Toscana	Chianti Classico	Gaiole	Merlot
R	GA	28	Toscana	Chianti Classico	Gaiole	Merlot
R	A	23	Toscana	Chianti Classico	Gaiole	Merlot
R	GA	17	Toscana	Chianti Classico	Greve in Chianti	Merlot
R	GA	7	Toscana	Chianti Classico	Panzano	Sangiovese
R	GA	8	Toscana	Chianti Classico	San Casciano	Merlot
R	B	12	Toscana	Chianti Classico	San Casciano	Merlot
R	B	34	Toscana	Chianti Classico	San Gimignano	Merlot
R	B	19	Toscana	Chianti Classico	Greve-Dudda	Merlot
R	LA	135	Toscana	IGT Toscana	Campiglia M.ma	Merlot
R	V	112	Umbria	IGT Umbria	Mercatello	Merlot
R	GA	100	Umbria	IGT Umbria	Orvieto	Merlot
R	A	53	Toscana	Maremma e Costa	Castagneto Carducci	Merlot
R	A	105	Umbria	Montefalco	Montefalco	Merlot
R	Merlot Labo		Toscana	Maremma e Costa	Bolgheri	Merlot
R	LA	133	Toscana	Maremma e Costa	Valdamone	Merlot
R	GA	3	Toscana	Chianti Classico	Panzano	Merlot
R	GA	4	Toscana	Chianti Classico	Panzano	Merlot
R	GA	137	Abruzzo	Cantina Sociale	Cantina Sociale	Montepulciano d'Abruzzo
R	GA	138	Abruzzo	Cantina Sociale	Cantina Sociale	Montepulciano d'Abruzzo
R	GA	125	Abruzzo	Sangro	Fossacesia	Montepulciano d'Abruzzo
R	F	120	Piemonte	Gattinara	Gattinara	Nebbiolo
R	F	119	Piemonte	Ghemme	Ghemme	Nebbiolo
R	F	122	Basilicata	IGT Basilicata	Potenza	Nebbiolo
R	A	117	Sicilia	IGT Sicilia	Gela	Nero d'Avola
R	GA	128 bis	Toscana	Bolgheri	Castagneto Carducci	Petit Verdot
R	B	21 bis	Toscana	Chianti Classico	Greve	Petit Verdot
R	B	21	Toscana	Chianti Classico	Greve-Dudda	Petit Verdot
R	A	26 bis	Toscana	Chianti Classico	Gaiole	Pugnitello

Colore	Sigla Campione		Regione	Zona/ Denominazione	Comune	Vitigno
R	V	110	Umbria	IGT Umbria	Mercatello	Sagrantino
R	A	103	Umbria	Montefalco	Montefalco	Sagrantino
R	E	98	Umbria	Sagrantino	San Marco	Sagrantino
R	VA	41	Toscana	Brunello Montalcino	Montalcino	Sangiovese
R	E	96	Toscana	Brunello Montalcino	Torrenieri	Sangiovese
R	E	81	Toscana	Carmignano	S.Cristina a Mezzana	Sangiovese
R	V	69	Toscana	Chianti	Casciana Terme	Sangiovese
R	V	66	Toscana	Chianti	Impruneta	Sangiovese
R	V	78	Toscana	Chianti	Montecarlo	Sangiovese
R	E	65	Toscana	Chianti	Montelupo Fiorentino	Sangiovese
R	E	64	Toscana	Chianti	S.Miniato	Sangiovese
R	E	61	Toscana	Chianti	Montespertoli	Sangiovese
R	GA	30	Toscana	Chianti Classico	Casole d'Elsa	Sangiovese
R	A	25	Toscana	Chianti Classico	Gaiole	Sangiovese
R	GA	27	Toscana	Chianti Classico	Gaiole	Sangiovese
R	A	22	Toscana	Chianti Classico	Gaiole	Sangiovese
R	B	18	Toscana	Chianti Classico	Greve Dudda	Sangiovese
R	GA	15	Toscana	Chianti Classico	Greve in Chianti	Sangiovese
R	GA	6	Toscana	Chianti Classico	Panzano	Sangiovese
R	B	11	Toscana	Chianti Classico	San Casciano	Sangiovese
R	GA	9	Toscana	Chianti Classico	San Casciano	Sangiovese
R	V	14	Toscana	Chianti Classico	San Casciano	Sangiovese
R	V	13	Toscana	Chianti Classico	San Casciano	Sangiovese
R	B	33	Toscana	Chianti Classico	San Gimignano	Sangiovese
R	V	111	Umbria	Colli Perugini	Mercatello	Sangiovese
R	LA	130	Toscana	Elba DOC	La Chiusa	Sangiovese
R	LA	131	Toscana	Elba DOC	Terre del Granito	Sangiovese
R	GA	99	Umbria	IGT Umbria	Orvieto	Sangiovese
R	E	85	Toscana	Maremma e Costa	Bolgheri	Sangiovese
R	A	52	Toscana	Maremma e Costa	Castagneto Carducci	Sangiovese
R	E	49	Toscana	Maremma e Costa	Scansano	Sangiovese
R	B	45	Toscana	Montalcino	Fauglia	Sangiovese
R	A	39	Toscana	Montalcino	Montalcino	Sangiovese
R	A	40	Toscana	Montalcino	Montalcino	Sangiovese
R	GA	36	Toscana	Montalcino	Sant'Angelo in colle	Sangiovese
R	GA	37	Toscana	Montalcino	Sant'Angelo in colle	Sangiovese
R	A	104	Umbria	Montefalco	Montefalco	Sangiovese
R	E	84	Toscana	Montepulciano	S.Biagio-Montepulciano	Sangiovese
R	E	87	Romagna	Sang di Romagna	Mercato Saraceno	Sangiovese
R	E	89	Romagna	Sang di Romagna	Mercato Saraceno	Sangiovese
R	E	88	Romagna	Sang di Romagna	Polenta di bertinoro	Sangiovese

Colore	Sigla Campione		Regione	Zona/ Denominazione	Comune	Vitigno
R	LA	134	Toscana	Suvereto	Valdamone	Sangiovese
R	GA	1	Toscana	Chianti Classico	Panzano	Sangiovese
R	GA	141	FRANCIA	/	/	Syrah
R	V	73	Toscana	Chianti	Montecarlo	Syrah
R	V	79	Toscana	Chianti	Montecarlo	Syrah
R	V	109	Umbria	Colli Perugini	Mercatello	Syrah
R	VA	118	Sicilia	IGT Sicilia	Gela	Syrah
R	GA	139	SPAGNA	/	/	Tempranillo
R	GA	128 tris	Toscana	Bolgheri	Castagneto Carducci	Teroldego
R	GA	29	Toscana	Chianti Classico	Gaiole	Teroldego
R	A	55	Toscana	Maremma e Costa	Castagneto Carducci	Teroldego
R	V	43	Toscana	Montalcino	Monte Antico	Teroldego
R	GA	140	SPAGNA	/	/	Tintorera
R	E	116	Toscana	IGT Toscana	Ribolla	Vermentino
R	F	121	Lazio	/	Aprilia	/
R	Tero Bolgheri		Toscana	Maremma e Costa	Bolgheri	Teroldego

Tabella 6

Per una visione d'insieme delle provenienze di tutti i campioni elencati, li ho orientativamente indicati sulla cartina muta d'Italia con punti diversi in base alla denominazione (vedi fig.21).

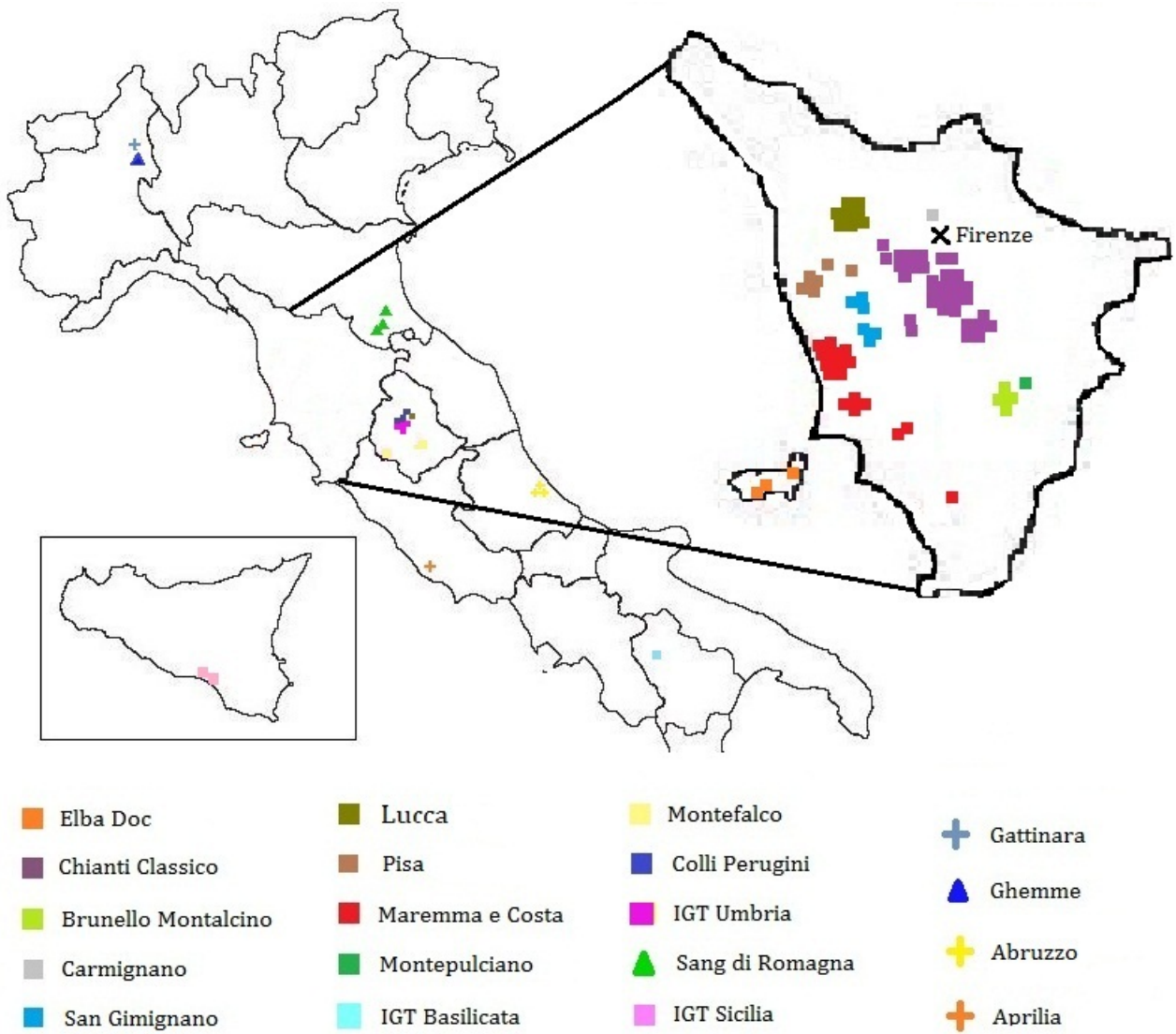


Figura 21

Cap.4 – Parte strumentale

4.1 - METODO PER GLI ANTOCIANI ALL'HPLC

Per la determinazione degli antociani nei vini rossi (vedi fig.24 pag.38) ho seguito il metodo ufficiale redatto dall'organismo competente, l'OIV (vedi appendice B); secondo il quale si deve effettuare una separazione HPLC a fase inversa in gradiente di eluizione e rivelatore UV-VIS impostato a 518nm.

Ho perciò utilizzato lo strumento descritto nell'appendice A, della casa costruttrice Thermo.

Inoltre occorre effettuare la separazione cromatografica in gradiente di eluizione. Quindi ho preparato, in due matracci da 1000 cc:

1. un eluente A (più polare) in proporzione 87:10:3 (v/v/v) di acqua distillata/acido formico/acetone nitrile;
2. un eluente B (meno polare) con la stessa composizione in proporzione 40:10:50 rispettivamente.

Pretrattamento del campione

Vini limpidi	Tal quale
Vini torbidi	Filtrazione su filtro siringa da 0,45 μm (scartando la prima parte di filtrato)

Tabella 7

Procedimento

Ho inserito 1 cc di ogni campione nel rispettivo vial, prelevato con pipetta elettronica provvista di puntale ben pulito. Una volta acceso lo strumento e avviato il programma di gestione dello stesso (“ChromQuest”) ho selezionato il metodo di interesse preimpostato e memorizzato e ho specificato il numero e la sigla dei campioni nella sequenza analitica, la posizione del primo vial nella griglia dell’autocampionatore e le altre condizioni sperimentali (vedi tab. 8). Si salva; si pone i vial nel giusto ordine nella griglia dell’autocampionatore e infine si avvia.

<i>CONDIZIONI DI ANALISI</i>				
Numero di ripetizioni per campione	2	<i>Gradiente di eluizione</i>		
		<i>Tempi (min)</i>	<i>Solvente A</i>	<i>Solvente B</i>
Volume di iniezione	50 µl	0	94	6
Flusso	0,8 ml/min	15	70	30
Temperatura	40°C	30	50	50
Tempo di analisi	45 min	35	40	60
Rilevamento	518 nm	41	94	6
Volume di lavaggio della siringa con metanolo			500 µl x 2	

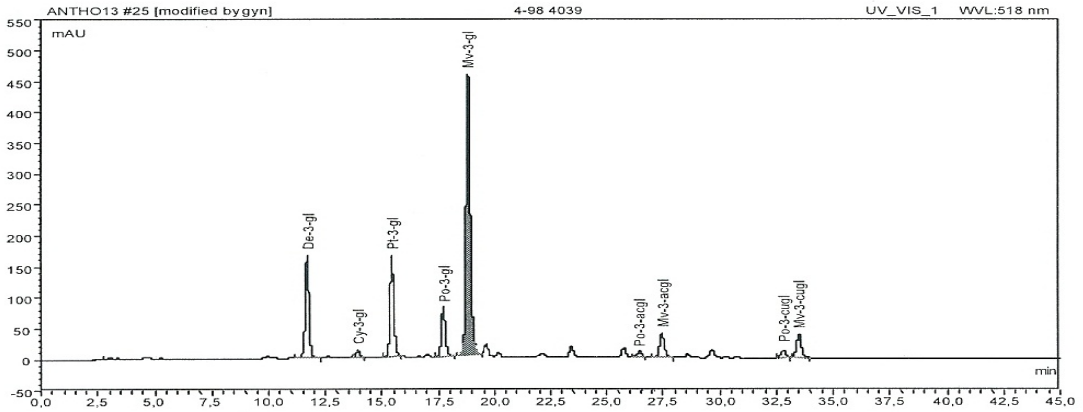
Tabella 8

Elaborazione cromatogrammi

Nelle condizioni di analisi descritte, si separano prima gli analiti più polari poi i meno polari. Si ottengono cromatogrammi (vedi fig. 23) dello stesso tipo di quello illustrato sul metodo di riferimento (vedi fig.22).

RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV
Anthocyanes

Figure 1
Séparation de 9 anthocyanes dans un vin rouge



		Pic-N°
Groupe 1: "anthocyanes-3-glucosides non acylées":	Delphinidol-3-glucoside	1
	Cyanidol-3-glucoside	2
	Petunidol-3-glucoside	3
	Peonidol-3-glucoside	4
	Malvidol-3-glucoside	5
Groupe 2: "anthocyanes-3-glucosides acétylées":	Peonidol-3-acetylglucoside	6
	malvidol-3-acetylglucoside	7
Groupe 3: "anthocyanes-3-glucosides coumarylés":	Peonidol-3-coumarylglucoside	8
	malvidol-3-coumarylglucoside	9

Figura 22

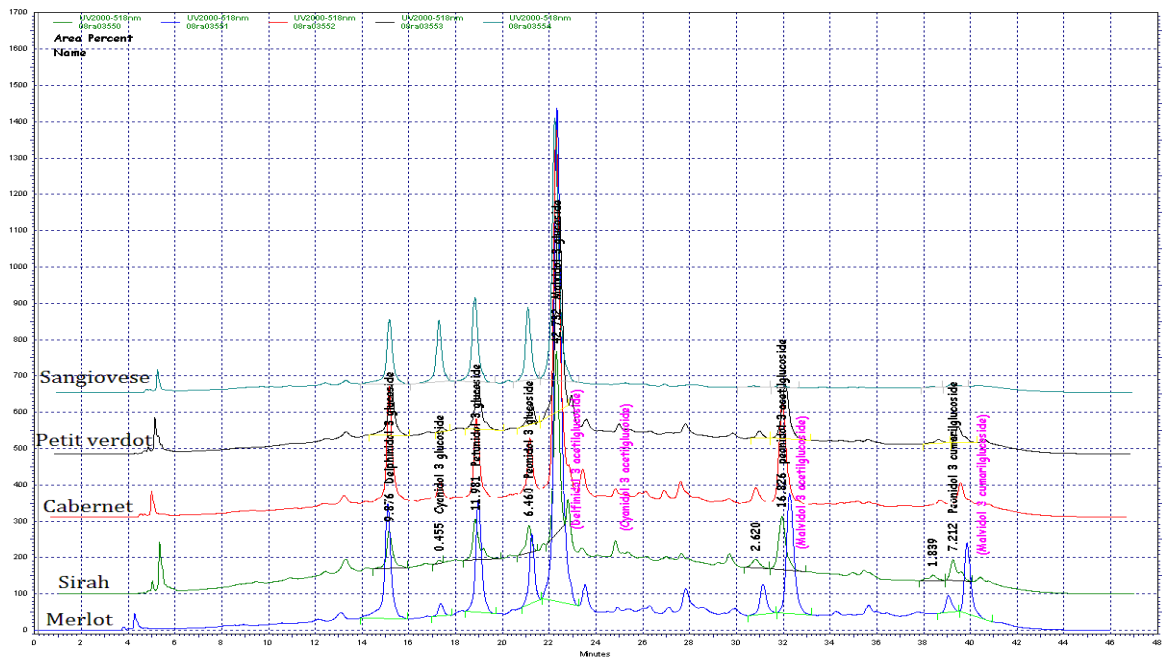


Figura 23

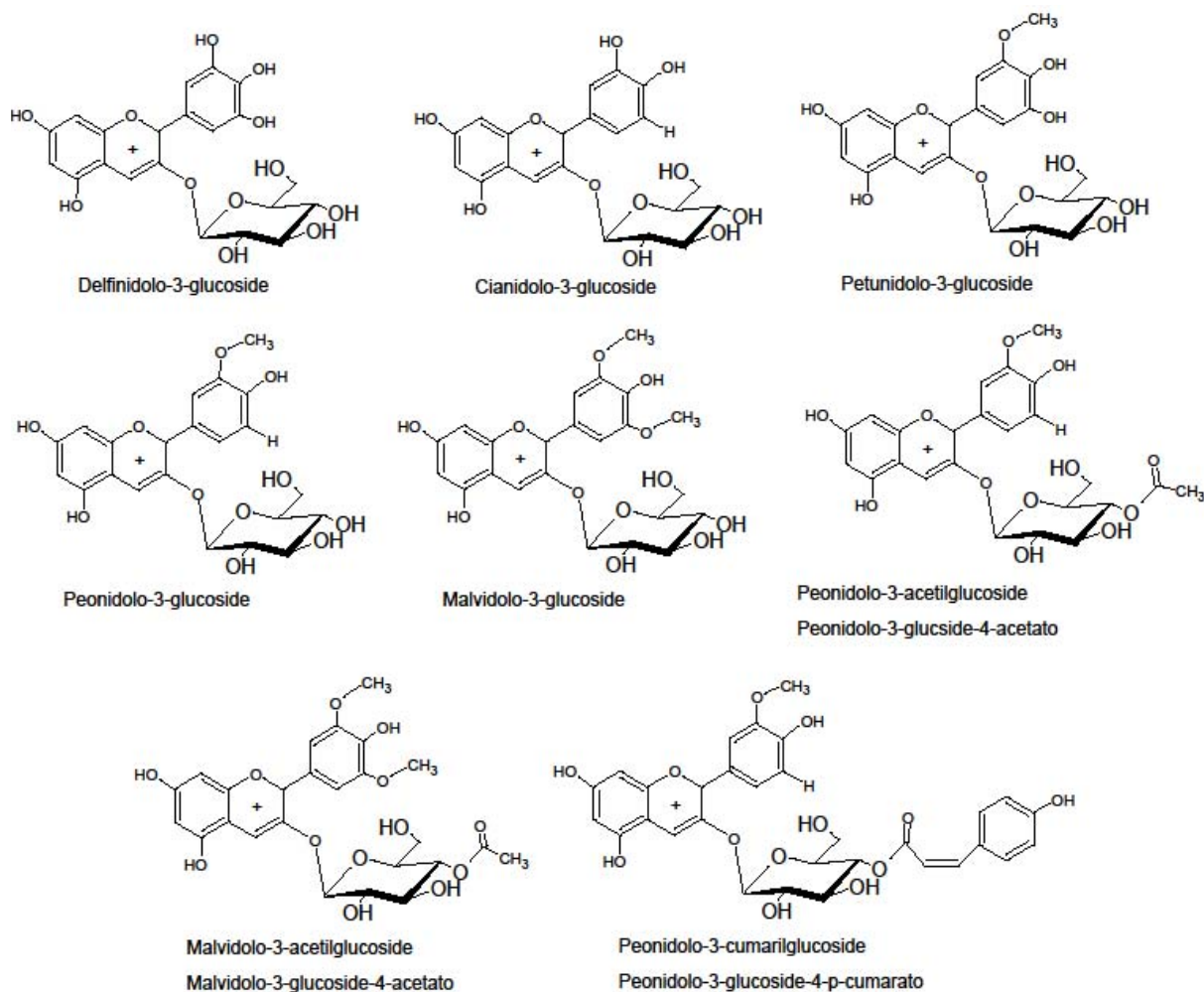


Figura 24

Si integrano i picchi con l'aiuto del software che calcola in modo automatico anche le percentuali relative degli analiti.

Osservazioni

Nell'eluente è necessario aggiungere acido formico perché questo ha l'esclusivo compito di tenere in soluzione gli antociani, in ragione della loro natura acida.

La filtrazione ha l'ovvio scopo di evitare intasamenti di tubi e soprattutto della colonna cromatografica.

Non ho usato standard di taratura per l'identificazione e la quantificazione dei picchi, in quanto non disponibili commercialmente. Per cui si effettua il riconoscimento dei

picchi degli antociani per confronto con un cromatogramma campione (quello riportato nel metodo), mentre la quantificazione dei composti è stata fatta per normalizzazione interna cioè in quantità relativa.

4.2 - METODO PER GLI ANIONI

Per questa analisi ho utilizzato il cromatografo ionico descritto in appendice A della ditta Dionex. Il metodo di riferimento è riportato nell'appendice C.

Pretrattamento del campione

Ho sottoposto i campioni a :

1. diluizione 1:10, prelevando con pipetta elettronica ben pulita con acqua deionizzata, 1 cc di vino da mettere in una provetta graduata da 10 cc ;
2. filtrazione, al momento dell'iniezione con normale siringa da 5 ml interponendo tra essa e l'iniettore del cromatografo ionico, l'apposito filtro da 0,45 μm o 0,20 μm (vedi fig.25)



Figura 25

La provetta graduata si dice falcon ed è una provetta in plastica provvista di tappo avvitabile che consente di conservare il vino diluito senza che venga inquinato, qualora servisse ripetere l'analisi in un secondo tempo.

Procedura

Una volta che lo strumento ha raggiunto l'equilibrio, ho impostato un fondo scala adeguato e i vari parametri di esercizio (vedi tab.9) nel software Dionex *Chromeleon*. Ho azzerato la risposta del rivelatore, impostato la sequenza analitica dei campioni da analizzare, e infine ho prelevato dalla falcon e iniettato nel C.I. i campioni

manualmente con la siringa.

Parametri di esercizio			
Eluente	Na ₂ CO ₃ (1,7 mM)	Corrente del rivelatore	52 mA
Colonna	Dionex 4 x 250 mm	Flusso	1 ml/min
Tempo di analisi a campione		≈ 14 minuti	

Tabella 9

L'eluente è stato preparato solubilizzando in H₂O 0,98 g di Na₂CO₃ in un matraccio da 1 litro.

Elaborazione cromatogrammi

Ho effettuato :

1. il riconoscimento degli analiti in base ai tempi di ritenzione caratteristici (vedi tab.10);
2. l'integrazione appropriata dei picchi.

Tempi di ritenzione tipici		
Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
5,5 min	8,1 min	14,5 min

Tabella 10

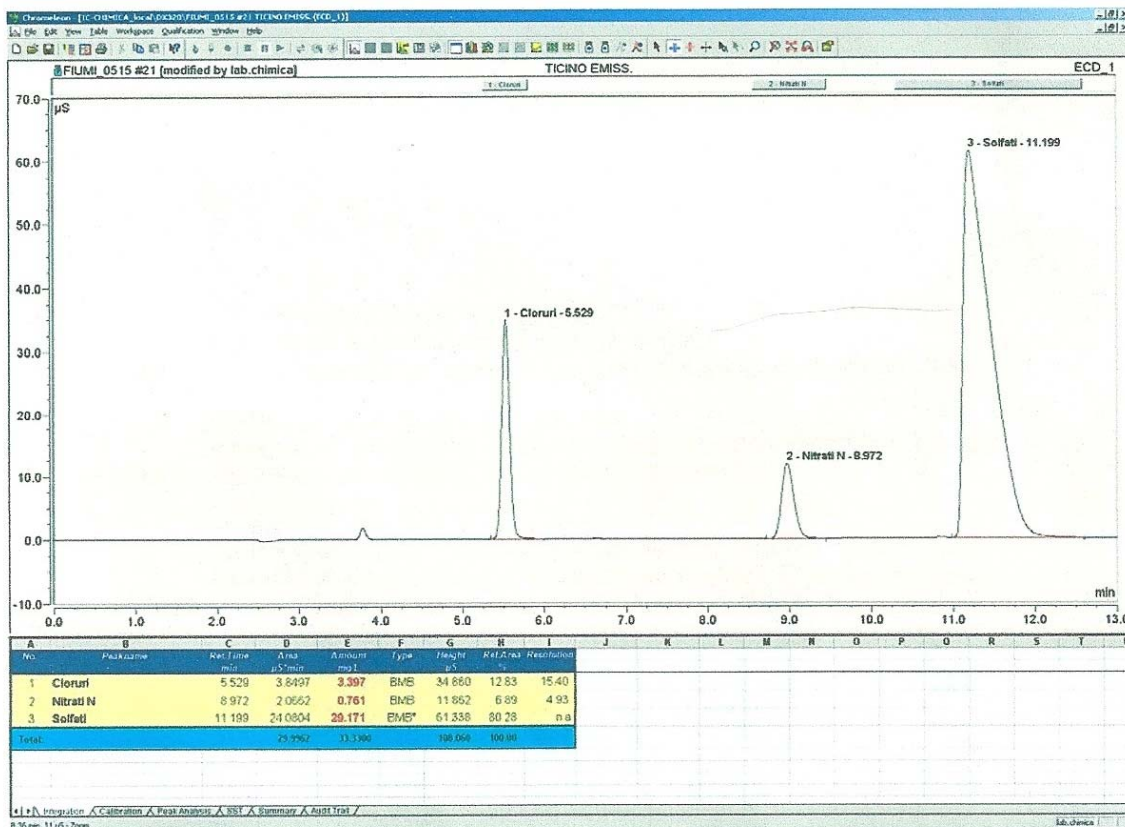


Figura 26. Videata di un cromatogramma di anioni in C.I. I dati risultanti vengono mostrati al di sotto del cromatogramma, evidenziati in giallo. Bisogna ricordarsi che il dato ottenuto prima di essere trascritto va moltiplicato per 10 a causa della diluizione iniziale.

Commenti

Le differenze tra campioni di acqua ad uso umano e i vini campione in oggetto, sono principalmente la maggiore concentrazione di sostanze organiche e possibile presenza di sospensione, oltre che una concentrazione di analiti più elevata. Tutto ciò comporta il rischio di danneggiamento delle colonne e dei sistemi idraulici; e minore risoluzione e interpretabilità dei picchi nel cromatogramma ottenuto. Per ovviare a questi problemi, il pretrattamento aggiuntivo giudicato essenziale per il metodo di routine e che ho eseguito è stata la filtrazione e la diluizione dei campioni sopra descritta.

Il riconoscimento degli analiti avviene per confronto dei tempi di ritenzione dei picchi del campione con quelli di uno standard di riferimento; mentre dall'integrazione delle

aree dei singoli picchi cromatografici si ricavano le concentrazioni degli anioni elencati.

Il metodo adottato sottolinea di fare attenzione al che la temperatura dei campioni al momento dell'iniezione sia sempre la stessa. Prescrizione rispettata in quanto i campioni sono rimasti temperatura controllata in armadio termostatico.

4.3 - METODO ICP-OES PER METALLI

Anche per l'analisi dei metalli nel vino non esiste un metodo ufficiale a cui fare riferimento, mediante ICP-OES poiché i metodi ufficiali sono tutti per analisi in AAS. Il metodo adottato è illustrato nell'appendice D. Lo strumento ICP-OES della casa costruttrice Jobin Yvone, di cui mi sono servito è descritto in appendice A.

Taratura dello strumento

Per prima cosa occorre acquistare le soluzioni standard certificate dei metalli scelti. Il consorzio Vino Chianti Classico ha messo a mia disposizione, come CRM, gli standard della *CPI International Peak Performance* (vedi tab.11), conservati in frigorifero:

	[standard]		Incertezza
Al	100	mg/l	± 0,5%
B	100	mg/l	± 0,5%
Ni	1003	mg/l	± 0,5%
Rb	1000	mg/l	± 0,5%
Mn	1000	mg/l	± 0,5%
P	1000	mg/l	± 0,5%
Si	1000	mg/l	± 0,5%
Sr	100	mg/l	± 0,5%
Na	1000	mg/l	± 0,5%
Li	1000	mg/l	± 0,5%
K	10000	mg/l	± 3µg/ml

	[standard]		Incertezza
Ag	100	mg/l	± 0,5%
Co	996	mg/l	± 0,5%
Cr	1000	mg/l	± 0,5%
Mo	100	mg/l	± 0,5%
Ti	1000	mg/l	± 3µg/ml
V	100	mg/l	± 0,5%
Zr	1000	mg/l	± 3µg/ml
Ba	100	mg/l	± 0,5%
Mg	1000	mg/l	± 0,5%
W	50	mg/l	± 0,5%

Tabella 11

Ogni standard descritto è stato diluito in modo da ottenere un intervallo di concentrazioni che possa coprire uniformemente un intervallo utile ad analizzare i campioni. Mi sono basato, perciò, sia su dati di letteratura, che sull'esperienza pregressa degli operatori del laboratorio. Nel caso di diluizioni eccessive ho preparato una soluzione a diluizione intermedia per evitare di commettere errori percentuali troppo elevati nelle soluzioni. Le diluizioni sono state eseguite per mezzo di matracci

tarati di classe A e pipette elettroniche tarate. La tabella 12 riporta, per ogni elemento le concentrazioni dei punti di taratura.

[STD]iniziale (mg/l)		STDinter m (mg/l)	RETTA DI TARATURA						Unità	R ²	λ(nm)
			STD 0	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5			
Al	100	/	0	1	2	3	4	5	mg/l	0,9977...	394,401
B	100	/	0	5	10	15	20	25	mg/l	0,9995...	249,678
Ni	1003	10	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	mg/l	0,9981...	352,454
Rb	1000	/	0	5	10	15	20	25	mg/l	0,9967...	780,023
Mn	1000	50	0	1	2	3	4	5	mg/l	0,9994...	259,373
P	1000	/	0	100	200	300	400	500	mg/l	0,9997...	213,618
Si	1000	/	0	10	20	30	40	50	mg/l	0,9998...	252,412
Sr	100	/	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	mg/l	0,9991...	407,771
Na	1000	/	0	2	4	6	8	10	mg/l	0,9970...	589,592
Li	1000	10	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	mg/l	0,9984...	670,784
K	10000	/	0	500	750	1000	1250	1500	mg/l	0,9881...	760,490
Ag	100	/	0	5	10	20	50	100	μg / l	0,9972...	338,289
Co	996	10	0	5	10	20	50	100	μg / l	0,9956...	228,616
Cr	1000	10	0	5	10	20	50	100	μg / l	0,9995...	285,563
Mo	100	5	0	5	10	20	50	100	μg / l	0,9930...	202,030
Ti	1000	10	0	5	10	20	50	100	μg / l	0,9796...	334,941
V	100	5	0	5	10	20	50	100	μg / l	0,9976...	311,838
Zr	1000	10	0	5	10	20	50	100	μg / l	0,9999...	339,198
Ba	100	/	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	mg/l	0,9983...	233,527
Mg	1000	/	0	50	100	150	200	250	mg/l	0,9369...	279,553
W	50	/	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	μg / l	0,9999...	209,475

Tabella 12

L'ultima colonna illustra le lunghezze d'onda caratteristiche a cui ho effettuato la rivelazione dell'emissione atomica.

Pretrattamento del campione

La mineralizzazione consiste nel distruggere la parte organica di una matrice complessa avvalendosi di agenti chimici come http://it.wikipedia.org/wiki/Acido_nitrico HNO₃

concentrato (o HF, HCl, H₂SO₄ anche in miscela) coadiuvati da una consistente fonte energetica.

Ho effettuato la mineralizzazione in vaso aperto sottoponendo 50 ml di vino, ad una prima evaporazione su piastra riscaldante, spinta fino all'ottenimento di circa un terzo o meno del volume iniziale del campione. Il liquido viscoso così ottenuto e lasciato raffreddare è stato acidificato per aggiunta di 1 cc di HNO₃ 65% e poi scaldato nuovamente su piastra aggiungendo acqua gradualmente, per limitare la formazione di bolle e impedire la fuoriuscita del campione dal beker contenitore. A questo punto ho lasciato digerire a caldo fino a raggiunta limpidezza. Al momento in cui il campione si è raffreddato ho riportato a volume iniziale (50ml) con acqua distillata.

Bisogna prestare molta attenzione: nella fase dell'evaporazione, se si esagera il campione può carbonizzare, e nell'aggiunta di acqua subito dopo l'attacco acido.

Procedura

Il metodo prevede le seguenti condizioni di analisi:

SPETTROFOTOMETRO		GENERATORE RF	
Parametro	Condizione	Parametro	Condizione
Lunghezza focale	1 m	Tipo di generatore	Stato solido
Reticolo	2400 righe/mm	Modalità di lettura	radiale
Risoluzione 1° ordine	0.010 nm	Frequenza	40,68 MHz
Risoluzione 2° ordine	0.005 nm	Raffreddamento	Acqua
Intervallo spettrale	160 – 800 nm	Tempo di riscaldamento	5 - 10 min
Lo strumento adotta un reticolo olografico dotato di una grande superficie in grado di captare abbastanza luce e fornire alta risoluzione anche alle basse concentrazioni: questo permette di assicurarsi dei limiti di rilevabilità così bassi.		La visione radiale consente grande sensibilità, dovuta alla enorme quantità di luce entrante poiché la fenditura principale è di 6 mm, e di minimizzare l'effetto matrice.	

Tabella 13

CONDIZIONI OPERATIVE	
Potenza del generatore RF	1000 W
Velocità di flusso del plasma gas	12 l/min
Velocità del gas ausiliario	0 l/min
Velocità di flusso di <i>sheath</i> gas	0.2 l/min
Velocità di nebulizzazione del campione	1 l/min
Pressione di nebulizzazione	2.9 bars
Flusso del campione	1 ml/min
Tipo di nebulizzatore	Concentrico di vetro
Tipo di camera di nebulizzazione	Ciclonica
Diametro iniettore	3.0 mm
Fenditure	20/15 μm
Tempo di risciacquo	15 sec
Tempo di trasferimento	10 sec
Tempo di stabilizzazione	5 sec

Tabella 14

Lo strumento è dotato di autocampionatore gestito direttamente dal software.

Gli unici accorgimenti da adottare durante il funzionamento automatico dello strumento sono:

1. che il braccio automatico riesca effettivamente a prelevare il campione;
2. il controllo della buona nebulizzazione.

Commenti

L'accensione dei diversi componenti nell'ordine corretto è importante per evitare danneggiamenti: si accende il computer, si accende l'aspiratore, se manca si aggiunge

l'acqua acidificata, si accende il generatore e infine il termostato. A questo punto lo strumento è pronto per l'avvio.

Nella tabella 12, relativa alla retta di taratura, il coefficiente di correlazione R^2 della taratura è il valore che indica quanto bene la retta approssima gli standard prodotti e misurati. Tali valori, quasi sempre sufficientemente prossimi ad uno (contenenti almeno due cifre uguali a nove dopo la virgola), garantiscono la qualità della taratura e della successiva determinazione del rispettivo metallo.

Sebbene l'utilizzo del plasma annichilisca il peso dell'effetto matrice sul risultato analitico, rimane necessario pretrattare il campione di vino facendone un'accurata mineralizzazione altrimenti l'alcol etilico presente spegnerebbe la "fiamma" dello strumento. Questo, infatti, ha una potenza di 1100 W, mentre per un vino con gradazione alcolica del 15%, sarebbe necessaria una potenza di almeno 1500 W. Questa carenza di potenza è conseguenza del fatto che l'atomizzazione è radiale e non assiale.

Salvo qualche rara eccezione (soprattutto il sodio) la maggior parte dei campioni presentano valori compresi nell'intervallo di taratura prescelto.

4.4 - METODI SPETTROFOTOMETRICI

Lo spettrofotometro utilizzato della casa costruttrice Perkin Elmer è descritto in appendice A. Questo è abbinato ad un computer che ne permette la gestione mediante il programma UV-WineLab.

Validazione dello spettrofotometro

Allo scopo di rendere quanto più possibile riproducibili e accurati i risultati delle analisi spettrofotometriche, svolte in un arco temporale esteso, ogni qual volta si riaccendeva lo strumento è stato prima di tutto necessario eseguirne la validazione. Tale procedura prevede prima un'attesa temporale dedicata al riscaldamento della lampada, dopo la quale si eseguono le misure in serie di 3 filtri standard (CRM). Le misure eseguite sia per accuratezza fotometrica che per accuratezza della lunghezza d'onda, contro aria come bianco, devono cadere in un intervallo prestabilito.

Intensita' e tonalita'

Come detto il colore del vino si stima attraverso la semplice determinazione di tre assorbanze caratteristiche all'UV (vedi pag.29).

Ho eseguito le misurazioni senza alcun pretrattamento, sul vino tal quale, in cuvette da 1 mm (che corrisponde ad una diluizione 1:10, poichè l'unità di misura del cammino ottico stabilita dalla legge di Lambert-Beer è il cm) contro un bianco di acqua. Dallo strumento si ottiene un output come quello in figura 28, in cui viene indicato: il fattore di diluizione, le assorbanze alle tre lunghezze d'onda già moltiplicate per il fattore di diluizione e la sigla del campione.

Date : 20/11/2009 Time : 14.57.20

WELLENLÄNGEN-PROGRAMM

Datum: 20/11/2009 Zeit: 14.35.55 Methode: COLORE1
Spalt: 2,00 nm
Benutzer:

Proben ID	Zyklus	Tmp°C	Faktor	420,00	520,00	620,00	nm
1	1	10,0000	7,4605	13,000	3,2991	V109	
2	1	10,0000	5,4036	9,3674	2,0895	V108	
3	1	10,0000	7,3587	13,024	2,8974	V70	
4	1	10,0000	4,8242	7,4703	1,8339	V74	
5	1	10,0000	10,259	21,049	4,5551	V43	
6	1	10,0000	2,2714	3,1399	0,6348	VA41	
7	1	10,0000	3,9560	4,9784	1,0886	18B	
8	1	10,0000	2,8583	3,7962	0,9093	45B	
9	1	10,0000	4,0245	5,5991	1,6888	8GA	
10	1	10,0000	2,4010	4,3558	0,6464	9GA	
11	1	10,0000	4,7014	8,0714	1,9199	73V	
12	1	10,0000	4,2501	7,0270	1,6778	69V	

Figura 28

Metodo per antociani totali

Gli antociani totali, At, si trovano nel vino sotto diverse forme:

1. a
 Ilo stato libero → Al
2. c
 ombinati ai tannini → Ac, una parte dei quali è decolorabile dalla SO₂ (TA)
 e l'altra no (TAT)

In sintesi: $At = Al + Ac = Al + TA + TAT$

Qualunque metodo non permette di determinare correttamente At ma solo di effettuarne una stima. (P.Ribèreau, *Trattato di enologia II*, p.75)

Tra i metodi proposti dalla letteratura quello che ho adottato è la determinazione degli antociani totali per variazione di pH, come proposto da Glories :

1. p
retrattare il vino diluendolo 1:50, o 1:100 se molto intenso, in un matraccio da 25 cc con etanolo acido ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 0,1\%$ di HCl);
2. a
attendere per 30 minuti che si abbia il riassetamento degli equilibri che coinvolgono la variazione degli antociani al variare del pH;
3. e
seguire la scansione dei campioni.

N.B. La soluzione di etanolo acido è stata preparata a partire da HCl 37%, quindi ponendo in un pallone da 500 cc 1ml di HCl e 369 ml di etanolo.

Infine per una migliore visione di insieme ho selezionato gli spettri ottenuti dal loro elenco e usato le opzioni del software per unire le curve di assorbanza di diversi campioni in un solo spettrogramma e per etichettare ogni picco con la propria lunghezza d'onda e assorbanza (vedi fig.29).

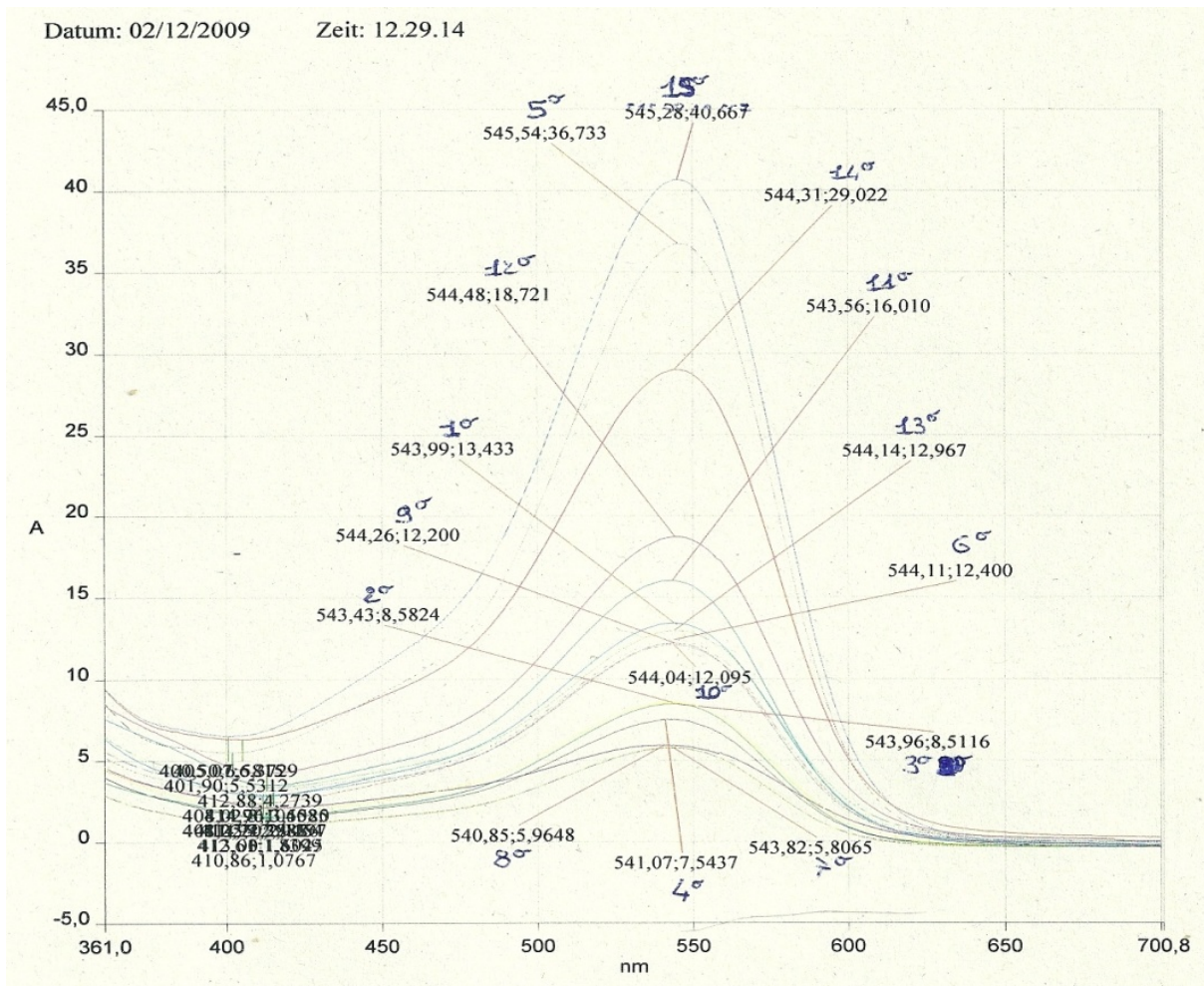


Figura 29

Per definizione l'indice di Glories corrisponde all'assorbanza della soluzione intorno a 540 nm moltiplicata per il fattore di Glorie (26,6 che rappresenta il coefficiente teorico della retta di taratura in malvina):

$$A_t = A_{540} \times 26,6$$

Non ha senso effettuare questa analisi sui vini bianchi privi di antociani.

Metodo per ipt

I metodi che permettono la valutazione dei polifenoli devono rispondere a tre criteri: devono essere rapidi, i risultati devono essere riproducibili e devono interessare la totalità delle molecole fenoliche. Tra tutti i metodi disponibili quello che meglio soddisfa tali requisiti è un indice che si basa sulla misura di assorbanza a 280 nm, caratteristica dei cicli benzenici onnipresenti nei polifenoli. Vengono in questo modo esclusi gli acidi cinnamici e i calconi, che però hanno concentrazioni bassissime e l'errore che ne deriva sull'indice calcolato (IPT, Indice dei Polifenoli Totali) è insignificante. Il nome stesso IPT indica che esso è solo un indice e come tale è una stima, cioè è espresso come numero adimensionale.

L'indice dei polifenoli totali si attesta in genere tra 20 e 100 e si calcola come segue:

$$\text{IPT} = A_{280} \times (\text{diluizione del vino})$$

Sperimentalmente ho:

1. e
seguito una diluizione 1:100 (1:20 per i vini bianchi) in matraccio da 50ml con acqua distillata, di 500 μl (2500 μl per i vini bianchi) prelevati con pipetta elettronica.
2. m
esso i vini in una cuvetta di quarzo ($b = 1 \text{ cm}$) e il bianco di acqua distillata nella cuvetta di riferimento.

Si ottiene una stampa dei dati già moltiplicati per il fattore di diluizione come quella in figura 30.

IPT

Date : 18/11/2009 Time :

WELLENLÄNGEN-PROGRAMM

Datum: 18/11/2009 Zeit: 15.14.55 Methode: IPT
Spalt: 2,00 nm
Benutzer:

Proben ID	Zyklus	Tmp°C	Faktor	280,00 nm	
1	1		100,000	84,290	prova 1
2	1		100,000	51,909	prova 2
3	1		100,000	50,583	prova 3
4	1		100,000	85,865	prova 4
5	1		100,000	49,565	prova 5

Figura 30

Cap.5 – Metodi Statistici

6.1 - STATISTICA UNIVARIATA

I dati univariati, in cui il dato sperimentale dipende da una sola variabile, viene espresso con uno scalare e una unità di misura.

Retta di taratura

Il metodo della retta di taratura permette la determinazione della concentrazione incognita di un analita per interpolazione della retta nel grafico concentrazione/risposta strumentale. Tale retta di taratura viene costruita attraverso: l'analisi di standard a diversa concentrazione (degli analiti di interesse) riportando in grafico il valore della risposta strumentale contro la concentrazione. La retta di taratura è determinata per regressione con il metodo dei minimi quadrati, riportando il coefficiente di correlazione ottenuto.

Per la determinazione della curva di taratura è necessario scegliere l'opportuna funzione matematica: il modello più semplice e più utilizzato è quello *lineare ed univariato* del tipo:

$$y = a + b \cdot x$$

In pratica, col metodo dei minimi quadrati si stima i coefficienti della funzione di regressione (a e b). Il coefficiente di correlazione stima la bontà della regressione, ovvero quanto bene i dati siano assimilabili alla funzione scelta.

$$R^2 = \frac{\sum_i [(x_i - x_m)(y_i - y_m)]}{[\sum_i (x_i - x_m)^2 \sum_i (y_i - y_m)^2]^{\frac{1}{2}}}$$

Esso indica la frazione di varianza spiegata dal modello di regressione rispetto alla varianza complessiva delle y_i sperimentali. La sua significatività dipende dal numero dei punti in gioco.

6.2 - STATISTICA MULTIVARIATA

L'analisi multivariata raccoglie una grande famiglia di tecniche matematico-statistiche che consentono l'esame simultaneo di tutte le variabili caratteristiche di un set di campioni. Pertanto, i campioni possono essere esaminati non solo per i singoli andamenti di ciascuna variabile, ma, simultaneamente, per tutte le variabili, nonostante queste siano di natura diversa tra loro. Dunque, l'analisi multivariata consente di estrarre dalla matrice dei dati raccolti la massima informazione utile, sintetizzando i dati, facilitandone l'interpretazione e classificandoli in gruppi in base a criteri di interesse per il ricercatore.

L'analisi multivariata è quindi necessaria per lo studio dei fenomeni reali, complessi e legati tra loro.

I dati grezzi, da sottoporre ad analisi multivariata, vengono esposti in una matrice formata da n righe, ciascuna delle quali corrisponde ad un campione, e da p colonne, che rappresentano le p variabili considerate. Ogni variabile viene espressa secondo l'unità di misura appropriata.

Oggi esistono diversi programmi anche gratuiti che permettono, per semplice copia della matrice dei dati e selezione di poche opzioni, di eseguire automaticamente le tecniche di analisi multivariata. Tra questi ho utilizzato sia "*Kyplot*" in versione demo, che l'espansione per Excel: "XLSTAT".

PCA

L'analisi dei componenti principali è il metodo più vecchio, conosciuto e più adottato.

La PCA è finalizzata ad estrarre la massima informazione possibile contenuta in una struttura di dati multivariati, sintetizzandola in poche combinazioni lineari delle variabili stesse. Questo metodo serve a dare una visione generale del problema e a fornire un'indicazione preliminare sul ruolo delle variabili, mettendo eventualmente in luce la possibilità di eliminarne alcune che, essendo strettamente correlate tra loro, portano informazioni simili e possono essere considerate ridondanti.

Dal punto di vista geometrico, PCA consiste in un processo di rotazione dei dati originali, effettuato in modo che il primo nuovo asse (che rappresenta la prima componente principale) sia orientato nella direzione di massima varianza dei dati, il secondo sia perpendicolare al primo e sia nella direzione della successiva massima varianza dei dati, e via via, per tutti i p nuovi assi. Il numero di questi nuovi assi (le componenti principali, PC n) corrisponde al numero di variabili originarie. Le loro direzioni, rispetto alle direzioni delle variabili originali vengono specificate dagli autovettori, che sono i versori del nuovo spazio, espressi da coefficienti (loadings) compresi tra ± 1 .

Poiché gli autovettori (componenti principali) sono gli assi relativi alle direzioni di massima varianza, in ordine decrescente, la prima componente principale sarà in grado di spiegare la maggior percentuale di varianza, la seconda ne spiega un po' meno, la terza ancora meno, e così via, fino a che le ultime componenti spiegheranno poco o nulla della varianza dei dati originali. Per questo motivo è possibile considerare solo un numero m di componenti, minore del numero di variabili originarie, semplificando nettamente l'interpretazione a prezzo della minima perdita di informazione utile.

L'autovalore, associato a ciascun autovettore, rappresenta la varianza che questo autovettore spiega della matrice di dati originali. Si osservi che la somma degli autovalori, cioè la varianza totale dei dati è pari al numero delle variabili: infatti le variabili autoscalate hanno varianza unitaria. Si considerano in pratica solo gli autovettori (componenti principali) aventi un autovalore elevato.

Il metodo PCA fornisce come risultato due matrici:

- ✓ La matrice dei *Loadings* (L). In questa matrice le colonne rappresentano gli autovettori e le righe rappresentano le variabili originali: ciò significa che, selezionato un autovettore, in ciascuna riga si trovano i coefficienti numerici che rappresentano l'importanza di ciascuna variabile originale in quell'autovettore. I loadings sono coefficienti lineari standardizzati, cioè, in PCA, la somma dei quadrati dei loadings di una componente è uguale a 1.
- ✓ La matrice degli Score (S). In questa matrice le colonne sono ancora le componenti principali mentre le righe rappresentano i campioni. Gli scores

hanno valore medio uguale a zero ma a differenza dei Loadings possono assumere valori numerici qualsiasi. Il loro valore è il risultato della combinazione lineare $S = DL$ (con $D =$ matrice dei dati). Essi rappresentano le nuove coordinate degli oggetti nello spazio delle componenti principali.

In pratica ho costruito i grafici a due dimensioni tra le componenti principali che spiegano la varianza percentuale maggiore e ci ho riportato gli score relativi ai vari campioni. Questa tecnica produce rappresentazioni grafiche molto intuitive e sfrutta la capacità interpretativa dell'occhio umano.

LDA

LDA è un metodo di classificazione, volto a verificare l'esistenza di differenze tra le classi in funzione delle variabili considerate e la formulazione di un modello che sia in grado di assegnare ciascun campione alla classe cui esso appartiene. Se il modello è stato ottenuto da un insieme di dati di cui sono note le classi con certezza, il potere predittivo del modello può essere verificato utilizzando un insieme di dati anch'essi con classe nota, i cui campioni vengono classificati dal metodo secondo il modello precedentemente calcolato. Infine, se il modello è accettato, può essere utilizzato per l'assegnazione di oggetti di classe ignota alla classe che meglio li rappresenta (Miller, 1991).

Il metodo stima un'unica matrice di covarianza pesata e calcola una funzione discriminante lineare che separa gli oggetti per ottenere la massima discriminazione possibile tra i centri delle classi e la minima tra gli oggetti appartenenti alla stessa classe.

I risultati dell'analisi possono essere visualizzati graficamente in modo analogo a quanto presentato per la PCA, ovvero rappresentando gli *scores* in uno spazio a due dimensioni individuato da due funzioni discriminanti (generalmente le prime due, che contengono la maggior parte dell'informazione).

Questo metodo si basa su solide basi matematiche e può funzionare bene anche quando la distribuzione delle variabili non è perfettamente normale.

Cap.6 – Risultati e Discussione

6.1 - COSTITUZIONE DELLA BANCA DATI

Su tutti i campioni a disposizione, sono stati determinati gli anioni, gli indici spettrofotometrici e, solo sui vini rossi, gli antociani frazionati. Per quanto riguarda i metalli, su ciascun campione sono stati analizzati 21 elementi. Di questi, alcuni sono presenti solo in tracce, per cui non risultano significativi allo scopo del lavoro e sono stati eliminati.

La tabella 15 riporta gli analiti, i loro intervalli di concentrazione presenti nei campioni di vino analizzati e le relative unità di misura.

ANALITI	UNITA' DI MISURA	INTERVALLO DI MISURA
Intensità	/	0,01 - 37,46
Tonalità	/	0,45 - 10,87
IPT	/	6,74 - 142,08
Antociani totali	mg/l	0 - 1836,25
Delfinidina-3-glucoside	/	0,000 - 14,15
Cianidina-3-glucoside	/	0,000 - 15,67
Petunidina-3-glucoside	/	0,000 - 18,95
Peonidina-3-glucoside	/	0,000 - 37,87
Malvidina-3-glucoside	/	0,000 - 78,08
Peonidina-3-acetilglucoside	/	0,000 - 4,15
Malvidina-3-acetilglucoside	/	0,000 - 27,33
Peonidina-3-cumarilglucoside	/	0,000 - 4,52
Malvidina-3-cumarilglucoside	/	0,000 - 10,73

ANALITI	UNITA' DI MISURA	INTERVALLO DI MISURA
Ag	µg/l	0,000 - 4,830
Co	µg/l	0,000 - 23,080
Cr	µg/l	0,760 - 118,750
Mo	µg/l	0,000 - 24,430
Ti	µg/l	0,000 - 20,580
V	µg/l	0,000 - 79,220
W	µg/l	0,000 - 501,750
Zr	µg/l	0,000 - 93,150
Mn	mg/l	0,21 - 3,82
P	mg/l	80,600 - 556,820
Si	mg/l	5,550 - 34,420
Ba	µg/l	0,000 - 1,180
K	mg/l	663,860 - 2353,950
Li	µg/l	0,280 - 75,910
Na	mg/l	2,590 - 49,430
Rb	mg/l	0,160 - 106,730
Sr	mg/l	0,090 - 4,010
Al	mg/l	0,000 - 0,790
B	mg/l	2,940 - 14,910
Ni	µg/l	0 - 0,27
Mg	mg/l	53,530 - 179,830
Cl ⁻	mg/l	3,08 - 217,01
NO ₄ ⁻	mg/l	0,00 - 148,40
SO ₄ ²⁻	mg/l	121,19 - 2140,00

Tabella 15

Tutti gli elementi analizzati, hanno valori coerenti con quelli noti, riportati in letteratura. In particolare per i parametri che presentano un limite legale a cui sottostare, cioè B e SO_4^{2-} (legislazione italiana e europea in vigore), i valori riscontrati ne rispettano le specifiche.

I campioni possono essere classificati in base a 2 criteri: la provenienza geografica dei vini ed il vitigno di origine. Le tabelle 16 e 17 dettagliano questi due aspetti:

ZONA VITIVINICOLA	NUMERO CAMPIONI
Chianti	41
Montalcino	5
Maremma	18
Lucca	8
Elba	3
Carmignano	1
San Gimignano	7
Abruzzo	3
Basilicata	1
Sicilia	2
Piemonte	2
Lazio	1
Emilia Romagna	3
Umbria	15
Francia	1
Spagna	2
TOTALE	113

Tabella 16

VITIGNO	NUMERO CAMPIONI
Ansonica	1
Chardonnay	1
Grechetto	2
Pinot bianco	1
Trebbiano spoletino	1
Vermentino	4
Viogner	1
Cabernet F.	2
Cabernet S.	11
Canaiolo	1
Ciliegiolo	1
Merlot	26
Montepulciano d'abruzzo	3
Nebbiolo	3
Nero D'avola	1
Petit Verdot	3
Pugnitello	1
Sagrantino	3
Sangiovese	34
Sirah	4
Tempranillo	1
Teroldego	7
Tintorera	1
TOTALE	113

Tabella 17

6.2 - CARATTERIZZAZIONE VITICOLTURALE

Come detto, la composizione antocianica del vino rosso dipende fortemente dal tipo di uva, quindi dal vitigno. Avendo trovato in letteratura (A. Baldi et.al., *Studio su alcuni composti polifenolici in uve, mosti, vini della toscana*) informazioni riguardanti la possibilità di utilizzare determinati indici, per discernere tra i vari vitigni, ho calcolato tali indici per i dati raccolti e li ho riportati in grafico l'uno contro l'altro come nel grafico 1 .

Gli indici suddetti si calcolano dai valori di concentrazione relativa dei diversi antociani, come segue:

$$\text{Antociani maggiori} = \frac{D3g + P3g + M3g}{Pe3g}$$

$$\text{Antociani minori} = \frac{P3ag + M3ag + P3cg + M3cg}{100}$$

Dove:

D3g = delfinidina-3-glucoside;

Pe3ag = peonidina-3-acetilglucoside;

C3g = cianidina-3-glucoside;

M3ag = malvidina-3-acetilglucoside;

P3g = petunidina-3-glucoside;

Pe3cg = peonidina-3-cumarilglucoside;

Pe3g = peonidina-3-glucoside;

M3cg = malvidina-3-cumarilglucoside.

M3g = malvidina-3-glucoside;

Questi indici, ottenuti dalla combinazione lineare degli analiti, sono derivati direttamente dai cromatogrammi, in quanto, la cianidina rappresenta il picco del cromatogramma più sensibile alla variazione del vitigno. Essa, infatti, assume valori più elevati nei vini a base sangiovese, per scomparire quasi del tutto nei vini ottenuti da Merlot e Cabernet, facendo posto agli antociani acilati e cumarati. La figura 23 (pag.37) mostra tale effetto su cinque cromatogrammi sovrapposti relativi a vitigni diversi.

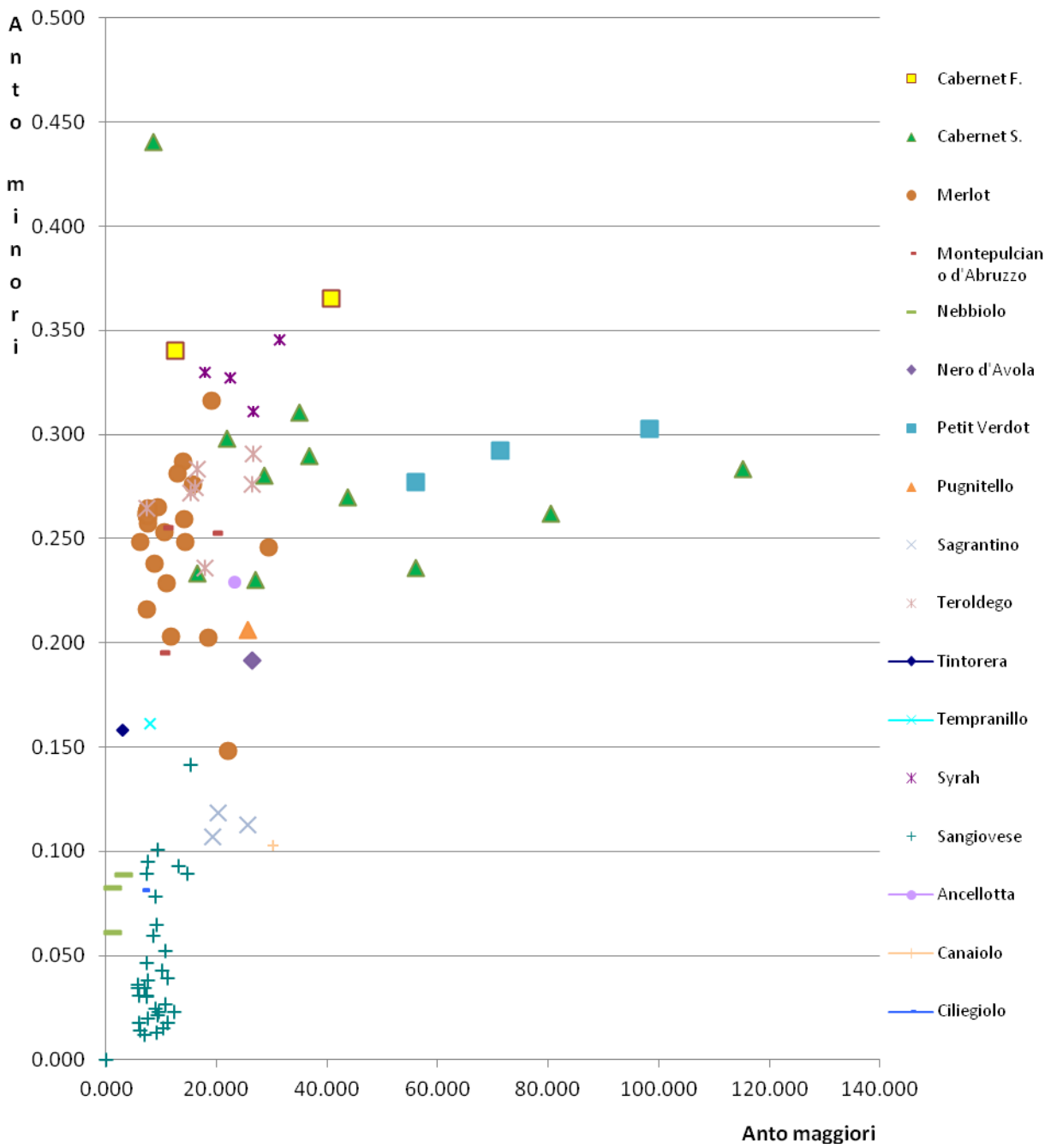


Grafico 1

L'analisi del grafico 1 consente di fare diverse considerazioni:

1. La maggior parte dei campioni di sangiovese vanno a costituire una nuvola in basso ben distinguibile dalle altre, fatta eccezione per l'unico campione di ciliegio a disposizione. Nonostante un solo campione sia insufficiente per trarre conclusioni, il ciliegio conferma la nomea di sosia del sangiovese.
2. La fama dei vini "cugini" (il Barolo, fatto prevalentemente da nebbiolo e il Chianti, fatto prevalentemente da sangiovese) è giustificata dal grafico in quanto le due nuvole di nebbiolo e sangiovese sono ben separate ma allo stesso tempo molto vicine tra loro.
3. Il cabernet sauvignon, nonostante occupi un'ampia zona del grafico evidenzia una somiglianza molto più forte al petit verdot che al Cabernet franc. Tuttavia non sembra di difficile identificazione.
4. I campioni di merlot, costituiscono una famiglia ben identificabile. Molto vicino al merlot si colloca l'ancellotta, vitigno che per intensità colorante e composizione in antociani assomiglia molto al merlot.
5. Il teroldego, si pone a ponte tra il merlot ed il cabernet, infatti rispecchia le caratteristiche di entrambi i vitigni.
6. Buona sembra la separazione che fornisce il vitigno syrah.
7. Altrettanto si può affermare del sagrantino che conta solo tre campioni ma cade in una zona poco affollata e perciò è facile da riconoscere.

In alternativa, ho riportato in grafico i valori di C3g contro la somma degli antociani minori: $P3ag + M3ag + P3cg + M3cg$ (vedi grafico 2). Il risultato permette di confermare quanto stabilito per sangiovese, nebbiolo e ciliegio nel grafico precedente, ma soprattutto di discriminare bene il cabernet sauvignon da tutti gli altri.

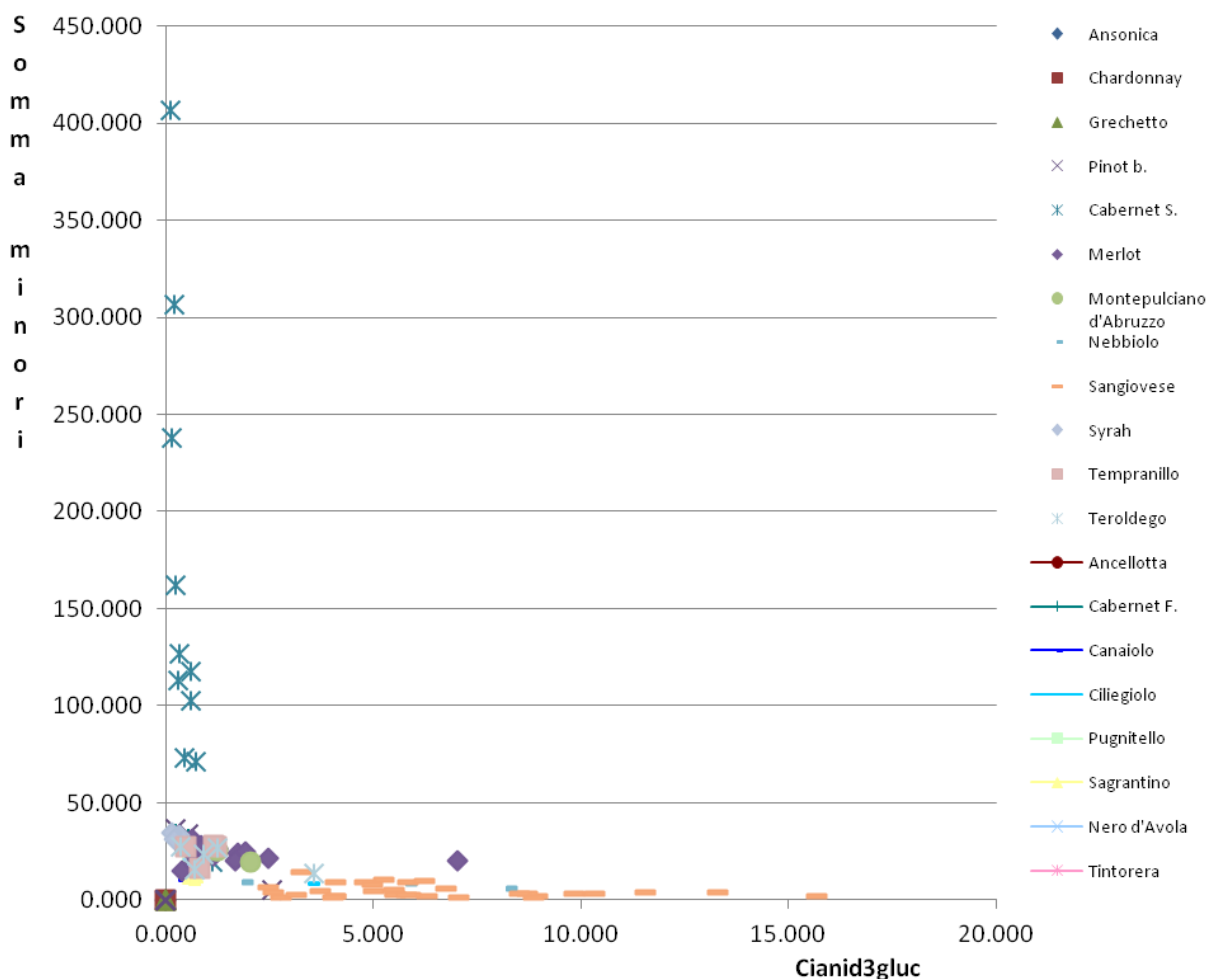


Grafico 2

Ho provato ad inserire nel grafico 1 i dati ottenuti di un vino prodotto per un consumo strettamente familiare (vedi tab.18) e di cui non si conosceva con certezza il vitigno di origine.

Colore	Sigla Campione	Regione	Comune	Vitigno
R	Devid	Toscana	San Giovanni Valdarno	?

Tabella 18

Il punto nel grafico del vino incognito si è situato ben all'interno della nuvola del sangiovese (il punto rosso nel grafico 3), dunque si può affermare con certezza che tale vino è stato prodotto a partire da uve prevalentemente sangiovese.

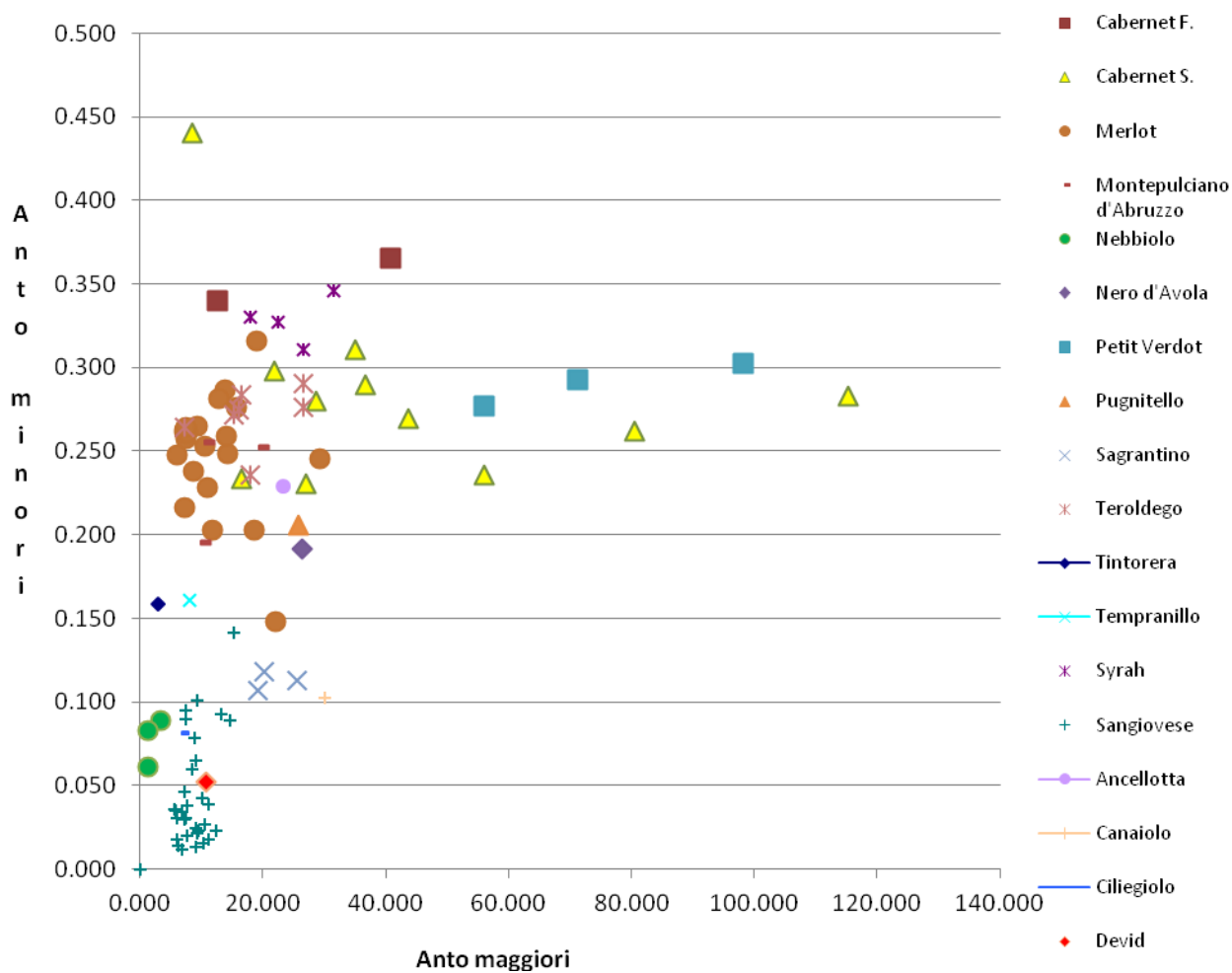


Grafico 3

Procedendo con l'analisi della matrice di correlazione (vedi tab.19) ricavata dai dati spettrofotometrici e dell'HPLC, si nota che i maggiori valori di correlazione si ottengono per le combinazioni di variabili :

- ✓ Antociani totali / Intensità (vedi grafico 4 pag.67);
- ✓ IPT / Intensità (vedi grafico 5 pag.67);
- ✓ petunidolo-3-glucoside/ delphinidolo-3-glucoside (vedi grafico 6 pag.67).

MATRICE DI CORRELAZIONE													
	I	T	IPT	AnTot	D3g	C3g	P3g	P3g	M3g	P3ag	M3ag	P3cg	M3cg
I	1,00												
T	-0,48	1,00											
IPT	0,72	-0,54	1,00										
AnTot	0,82	-0,42	0,65	1,00									
D3g	0,31	-0,51	0,44	0,19	1,00								
C3g	-0,11	-0,20	0,07	-0,20	0,64	1,00							
P3g	0,15	-0,48	0,37	0,09	0,93	0,66	1,00						
P3g	-0,04	-0,29	0,12	-0,11	0,32	0,55	0,35	1,00					
M3g	0,46	-0,75	0,62	0,49	0,49	0,13	0,53	0,19	1,00				
P3ag	0,40	-0,33	0,33	0,28	-0,03	-0,32	-0,14	0,13	0,21	1,00			
M3ag	0,55	-0,33	0,35	0,56	-0,21	-0,52	-0,34	-0,35	0,36	0,59	1,00		
P3cg	0,16	-0,28	0,21	0,09	-0,02	-0,12	-0,03	0,47	0,18	0,67	0,20	1,00	
M3cg	0,53	-0,38	0,40	0,43	-0,05	-0,50	-0,19	-0,20	0,38	0,75	0,77	0,43	1,00

Tabella 19

Tutto lo svolgimento di questo lavoro di tesi è stato fatto trascurando il fattore annata di produzione e quindi l'età del vino campione. L'età non influisce sulla composizione antocianica (che dipende solo dalla genetica della pianta), ma influisce sull'intensità e la tonalità del vino; questo perché cambiano le assorbanze a 420 nm e 520 nm. In particolare l'intensità (calcolata come somma) subisce piccole variazioni, mentre la tonalità (calcolata come rapporto) cambia consistentemente. Il fatto che l'intensità si presenti molto correlata al valore di antociani totali era prevedibile, perché l'intensità è una stima della concentrazione delle sostanze coloranti presenti, le quali sono costituite soprattutto dagli antociani. La correlazione tra l'intensità e gli IPT si spiega allo stesso modo, in quanto, gli antociani sono una classe di polifenoli. Dai grafici costruiti dalla combinazione di queste variabili si ottiene una distribuzione di punti intorno ad una retta di regressione, in cui, le nuvole relative ai diversi vitigni si susseguono percorrendo la retta (vedi grafici 5, 6, 7).

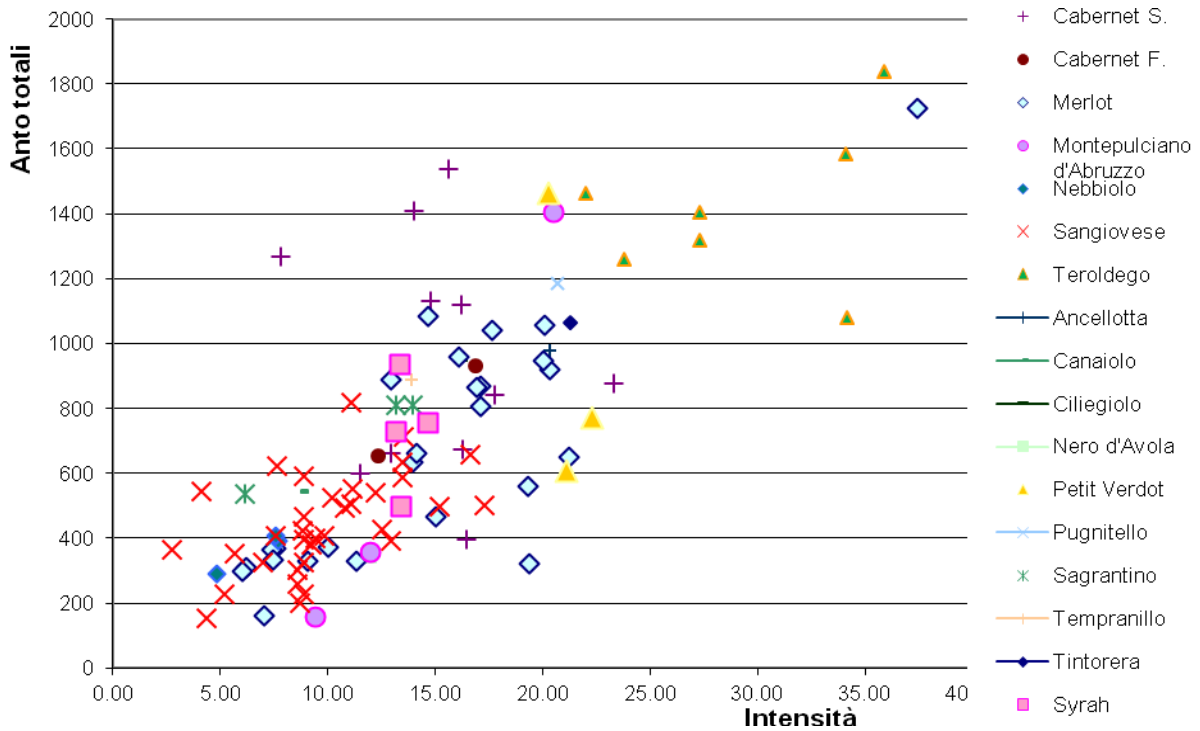


Grafico 4

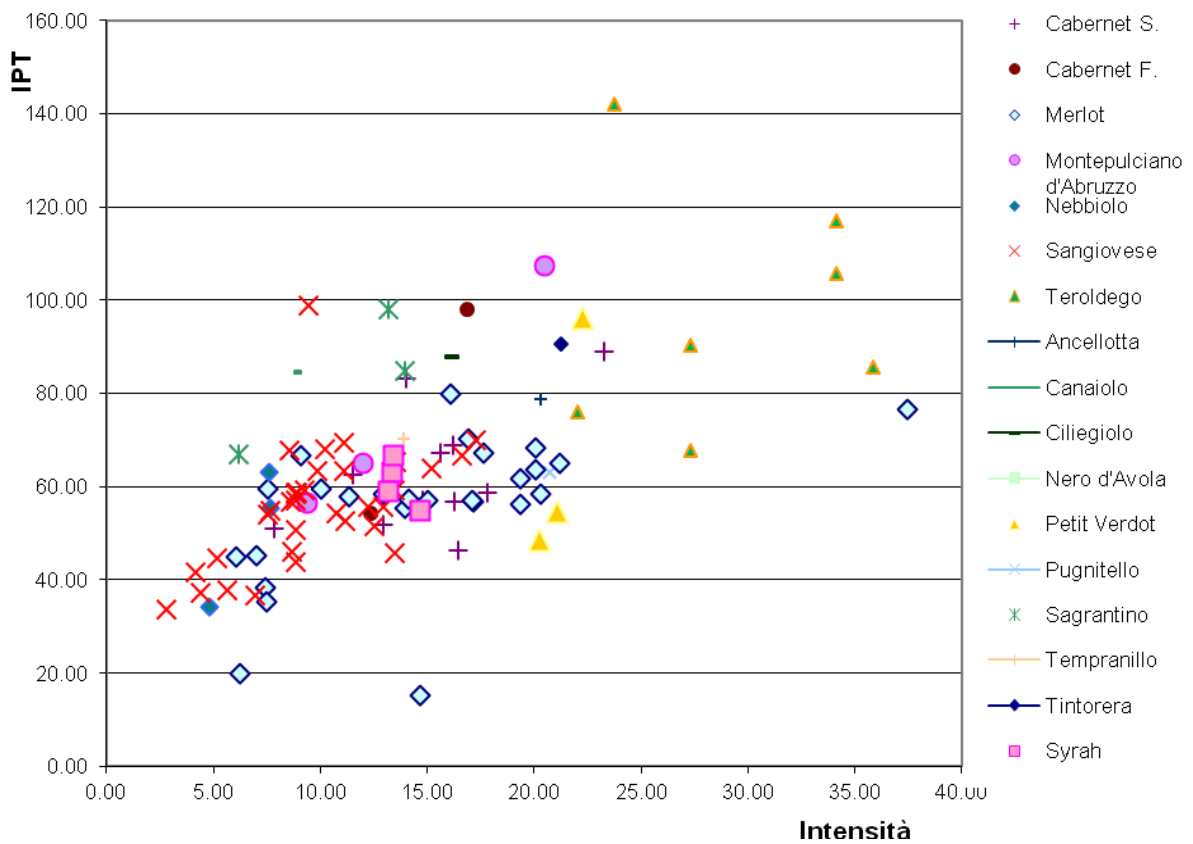


Grafico 5

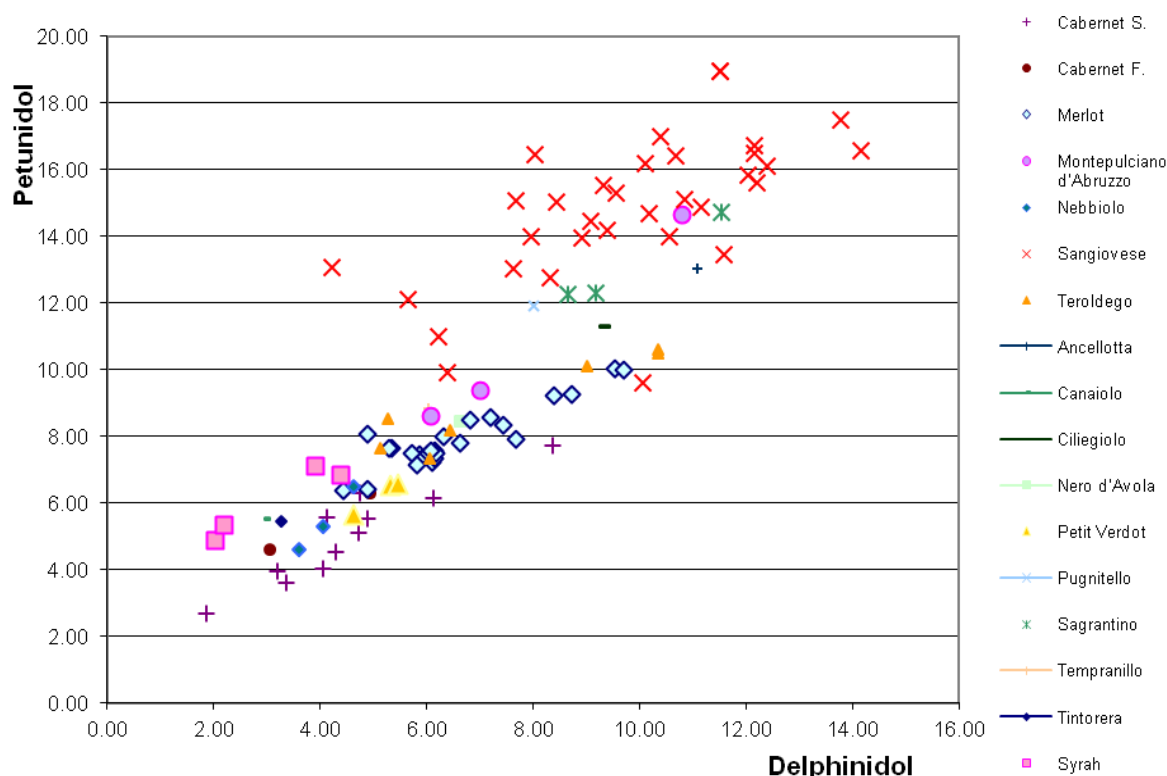


Grafico 6

Dai grafici 4 e 5 si può riconoscere bene solo il teroldego, mentre il grafico 6 è più indicativo perché mostra punti molto più raccolti vicino alla retta (correlazione maggiore), e si riconoscono meglio i diversi vitigni. Il coefficiente angolare della retta di regressione è circa 1, il che significa che in tutti i vitigni i 2 antociani considerati si trovano a concentrazione comparabile.

La famiglia maggiormente discriminata è il sangiovese nella parte alta della retta; dopo di che si riescono a distinguere anche cabernet sauvignon, syrah, nebbiolo e petit verdot.

A fianco di questo risultato, ho eseguito l'analisi multivariata sui dati spettrofotometrici e HPLC dei vini. In particolare l'analisi delle componenti principali (PCA). Dallo scree plot (vedi fig.31 pag.70) e dalla tabella 20, si deduce che già con le prime due componenti, PC1 e PC2, si spiega la variabilità totale del sistema in buona parte (65%). Ciò si può anche dedurre dai grafici 7 e 8 (pag. 72 e 73), in quanto, i campioni sono ben separati in relazione al vitigno di origine.

Come mostrato nella tabella 20, la percentuale di varianza spiegata decresce lentamente dopo le prime 4 PCn. Quindi si può concludere che le informazioni più rilevanti siano contenute nelle prime 4 componenti.

PCn	Autovalori	Varianza percentuale spiegata	Somma varianza spiegata
1	4,83	37	37
2	3,60	28	65
3	1,71	13	78
4	0,76	6	84
5	0,57	4	88
6	0,40	3	91
7	0,30	2	94
8	0,23	2	95
9	0,18	1	97
10	0,17	1	98
11	0,11	1	99
12	0,10	1	100
13	0,04	0	100

Tabella 20

Lo scree plot è il grafico (fig.31) che riporta gli autovalori corrispondenti a ciascuna componente principale in modo decrescente. Anche questo mostra che un rapporto ottimale tra numero di combinazioni lineari e varianza totale spiegata si ottiene con le prime 2 PC.

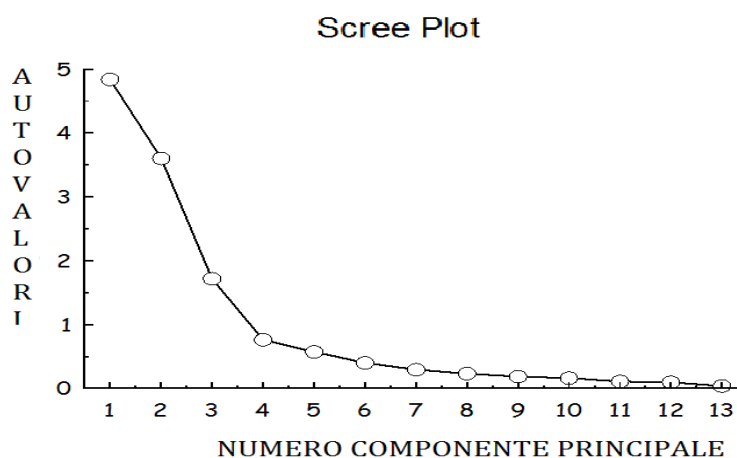


Figura 31

Nella tabella 21 sono riportati i coefficienti della combinazione lineare (Loadings) per ottenere le componenti principali. Rappresentano i coefficienti di correlazione tra le variabili di origine e le componenti principali ricavate da esse. Si fa riferimento solo alle prime 4 PCn.

LOADINGS DELLE COMPONENTI PRINCIPALI				
Variabile	PC1	PC2	PC3	PC4
Intensità	0,82	-0,07	-0,28	0,37
Tonalità	-0,75	-0,34	-0,07	0,29
IPT	0,80	0,19	-0,17	0,26
AntoTot	0,75	-0,12	-0,39	0,37
Delfin3glu	0,40	0,81	-0,11	-0,11
Cianid3glu	-0,10	0,88	0,09	0,09
Petun3glu	0,29	0,88	-0,09	-0,18
Peonid3glu	0,11	0,56	0,66	0,29
Malvid3glu	0,76	0,32	-0,10	-0,31
Peon3ace	0,63	-0,39	0,53	-0,05
Malvid 3ace	0,66	-0,61	-0,12	-0,15
Peon3cum	0,42	-0,12	0,81	0,11
Malvid3cum	0,72	-0,51	0,14	-0,25

Tabella 21

PC1 è correlata, con segno positivo, prevalentemente ad intensità, antociani totali e M3g, con segno negativo alla tonalità del vino. Questo rispecchia quanto detto per lo stretto legame che c'è tra l'intensità e l'IPT e gli antociani totali di un vino. La prima componente principale rappresenta la concentrazione totale di sostanze coloranti, soprattutto antociani, nel vino.

PC2 è connessa, positivamente, con la presenza di D3g, C3g, P3g; mentre la PC3 deve la sua presenza a Pe3cg. La seconda componente è legata alla composizione in antociani nel vino.

Già la PC4 presenta coefficienti più bassi: i massimi si hanno per l'intensità e la tonalità combinate con segno positivo, per cui fornisce la stessa informazione della PC1.

Dunque, ho realizzato il grafico 7 :

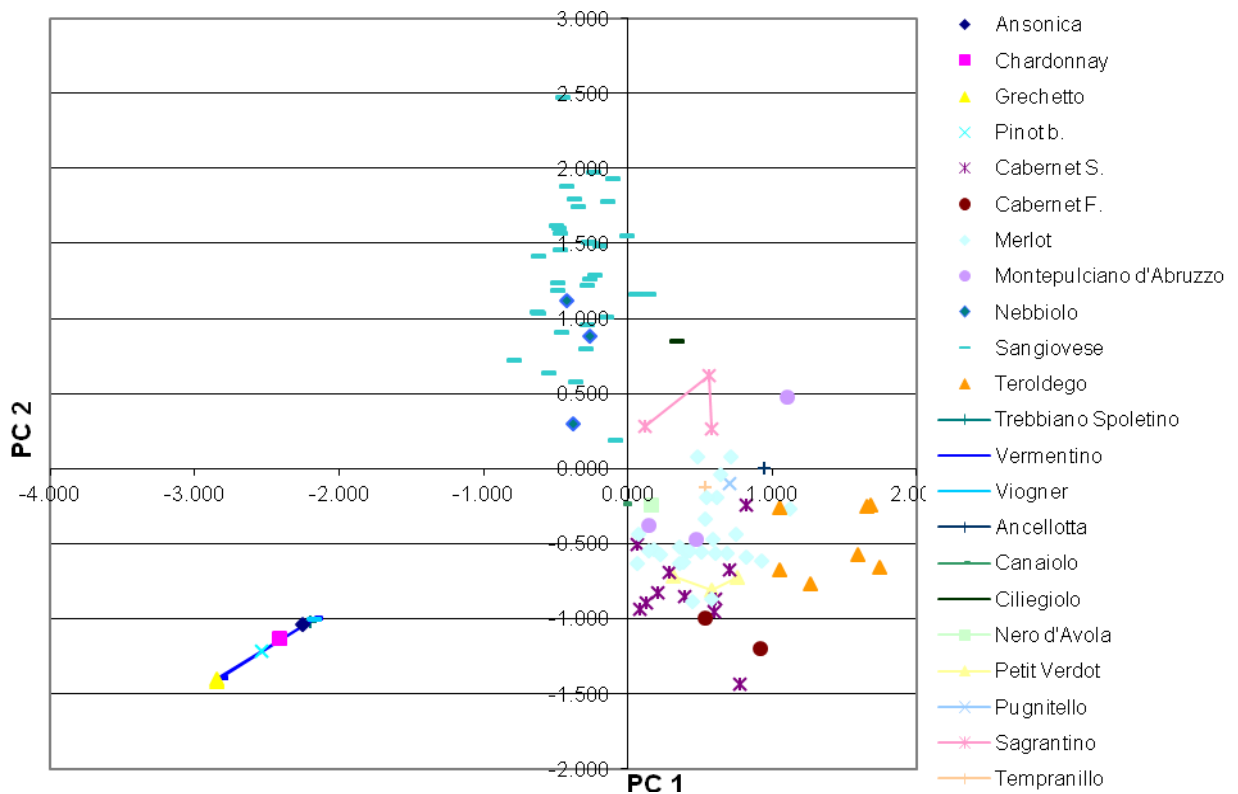


Grafico 7

In questo grafico ci si accorge che i vini bianchi si collocano molto lontano dagli altri, il che comprime i punti relativi ai vini rossi. Per interpretare l'informazione contenuta nella nuvola dei vini rossi si espande la scala costruendo lo stesso grafico, PC1 contro PC2, senza i valori dati dei vini bianchi (vedi grafico 8).

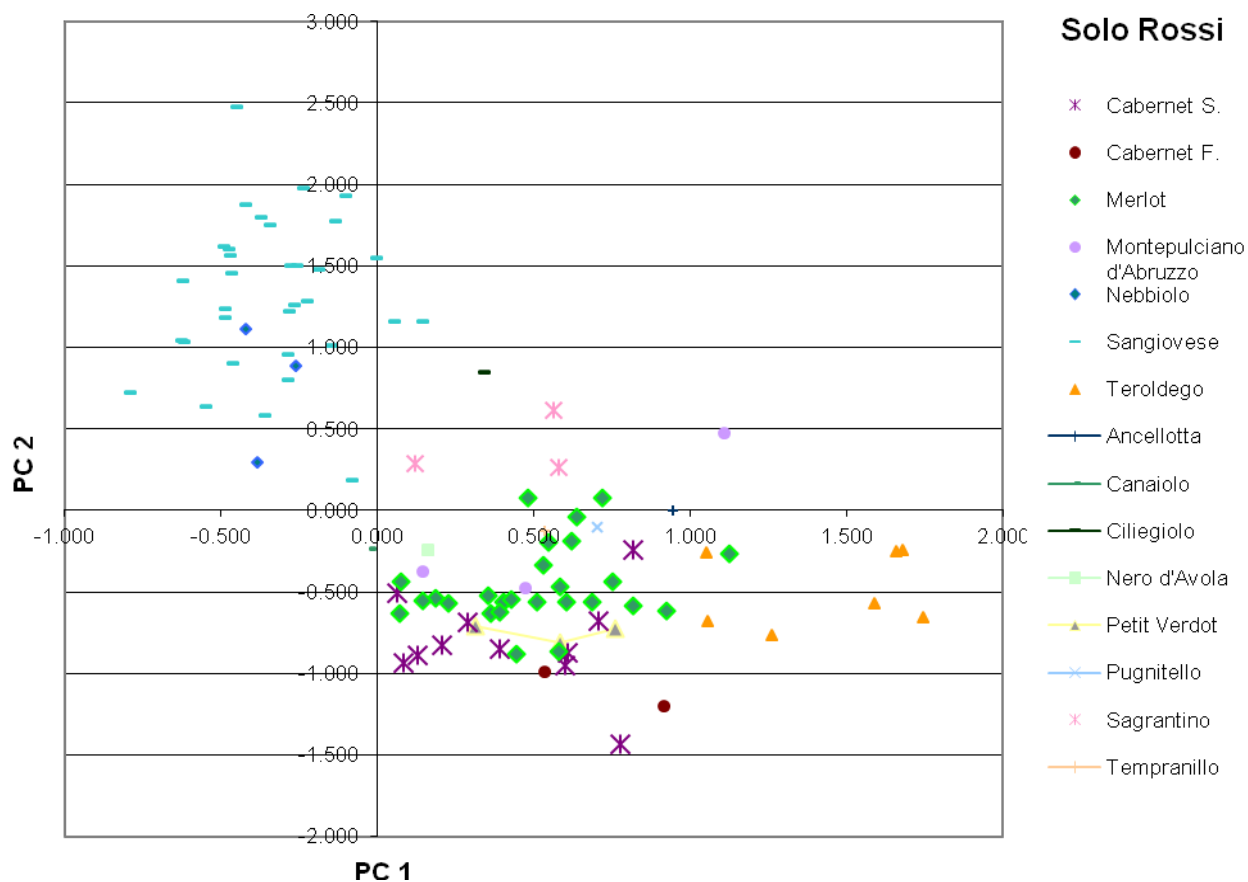


Grafico 8

Dal grafico 4 si può distinguere bene il sangiovese dal cabernet sauvignon e il merlot come negli altri casi; in più, da tutti questi, si distingue il sagrantino (vitigno pregiato) posizionatosi a ponte tra le nuvole di merlot e sangiovese, e il Teroldego nettamente a destra rispetto al Merlot.

Infine ho aggiunto ai dati nel grafico 1, 4 vini toscani tagliati in laboratorio, ognuno miscelando 2 vini monovitigno, in modo da ottenerli al 90 % in uve sangiovese (vedi tab.22).

Colore	Campione	Vitigno
R	1	Sangiovese 90%
R	2	Sangiovese 90%
R	3	Sangiovese 90%
R	4	Sangiovese 90%

Tabella 22

Come si vede nel grafico 9, il 10% di vitigno incognito fa in modo che i punti (rossi in grafico) di questi vini si collochino al limite alto della nuvola di sangiovese, cioè, spostano tali punti verso le nuvole alte. Questo convince del fatto che, se la percentuale di taglio con altri vitigni fosse maggiore del 20% (limite del disciplinare DOCG Chianti Classico), i relativi punti uscirebbero dalla zona della nuvola sangiovese.

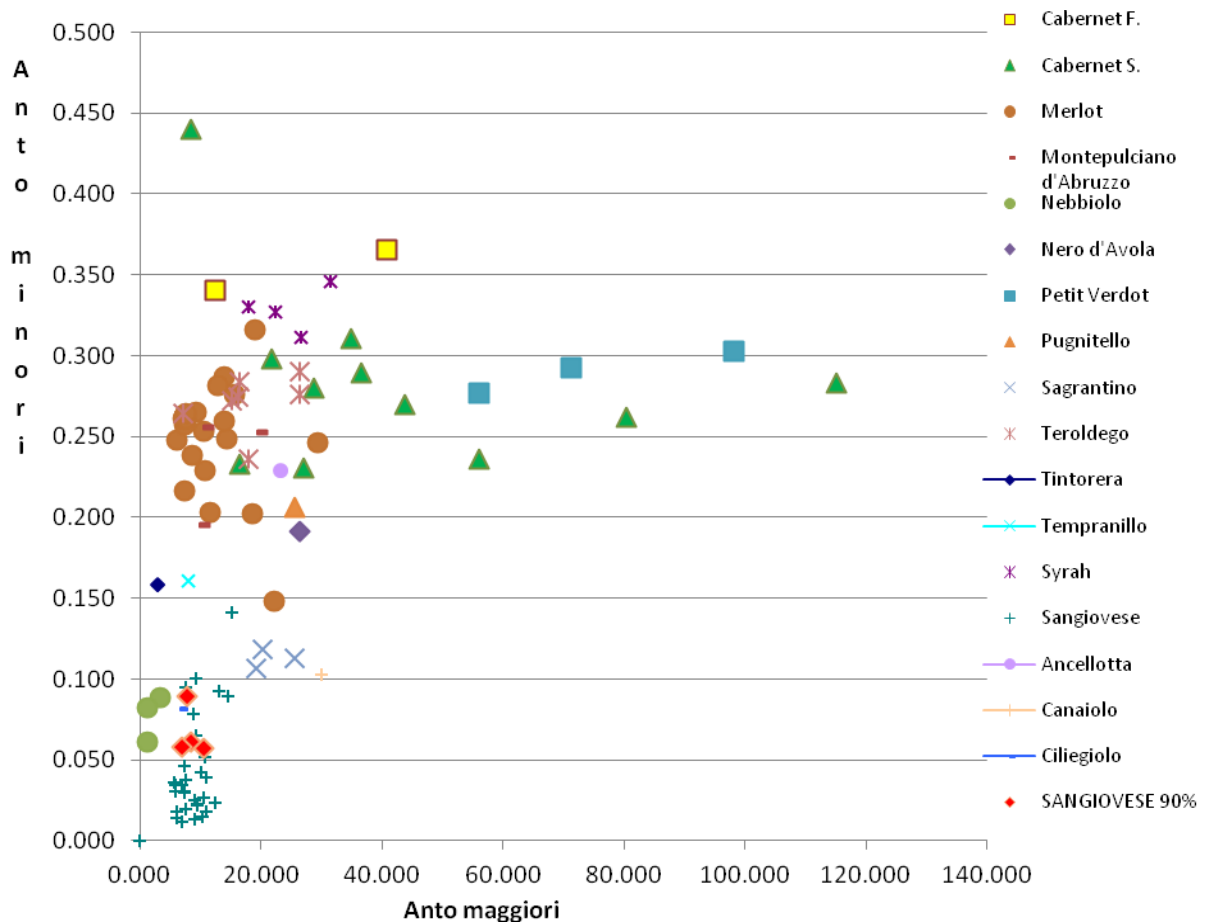


Grafico 9

6.3 - CARATTERIZZAZIONE TERRITORIALE

Per quanto concerne la zonazione, questa è stata fatta a partire dalle concentrazioni dei metalli nei vini della banca dati costruita. Quindi, ho applicato le tecniche di analisi multivariata.

Dallo scree plot (vedi fig.32) e dalla tabella 23, si deduce che con le prime 5 componenti si spiega quasi la metà della variabilità totale del sistema, quindi accettiamo di considerare queste componenti presumendo che contengano le informazioni più rilevanti.

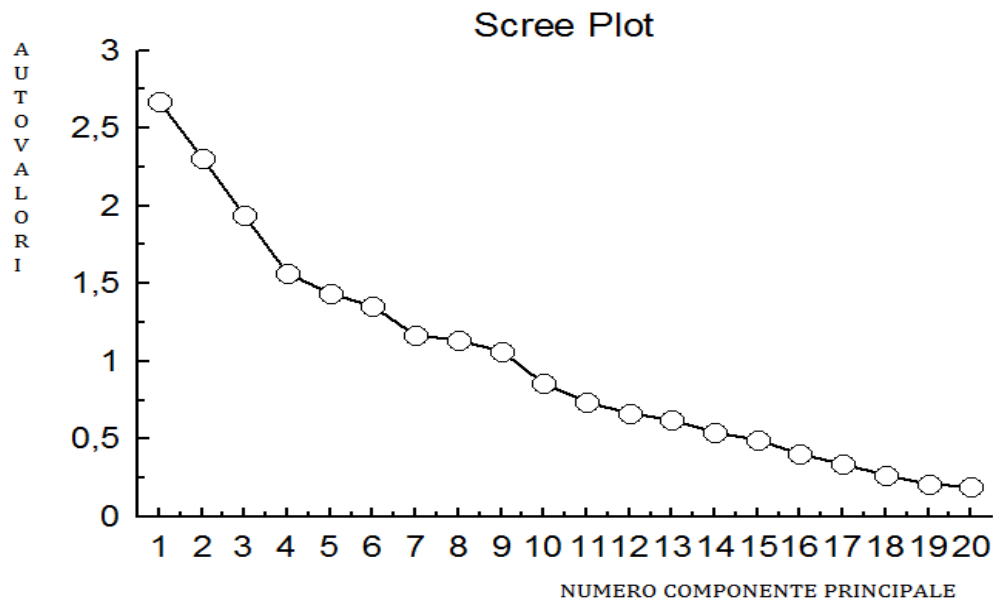


Figura 32

PCn	Autovalori	Varianza percentuale spiegata	Somma varianza spiegata
1	2,669088	12,21034	12,21034
2	2,307657	10,82746	23,0378
3	1,94103	9,195113	32,23291
4	1,570897	7,66633	39,89924
5	1,440825	6,930862	46,83011
6	1,358619	6,047541	52,87765
7	1,165876	5,78741	58,66506
8	1,133965	5,293015	63,95807
9	1,063142	5,044071	69,00214
10	0,863274	4,299991	73,30213
11	0,74145	4,01297	77,3151
12	0,668076	3,231174	80,54628
13	0,622288	3,149501	83,69578
14	0,543677	2,850804	86,54658
15	0,494201	2,402304	88,94889
16	0,403568	2,245607	91,19449
17	0,341296	1,996592	93,19108
18	0,26542	1,765923	94,95701
19	0,21226	1,477883	96,43489
20	0,19339	1,176757	97,61165
21	0,202387	0,879944	98,49159
22	0,191844	0,834106	99,3257
23	0,155089	0,674301	100

Tabella 23

Nella tabella 24 sono riportati i coefficienti della combinazione lineare (Loadings) per ottenere le componenti principali. Si fa riferimento solo alle prime 5 PCn.

Variabile	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Ag	0,00	0,26	0,45	0,19	-0,04
Co	0,01	0,27	-0,11	0,53	-0,23
Cr	0,46	0,01	-0,41	-0,43	-0,09
Mo	0,05	0,21	-0,15	-0,26	0,45
Ti	0,55	0,52	0,19	0,01	0,34
V	0,54	0,38	0,14	-0,19	0,44
Zr	-0,03	-0,07	0,45	-0,17	-0,22
Mn	0,08	0,53	-0,25	0,15	-0,18
P	0,42	-0,07	0,07	0,47	-0,43
Si	0,59	0,17	-0,27	0,11	-0,13
Ba	0,01	0,36	0,18	0,11	-0,39
K	0,73	-0,37	-0,10	-0,12	-0,22
Li	0,01	-0,38	0,07	0,48	0,44
Na	0,23	-0,02	-0,41	0,44	0,19
Rb	0,59	-0,13	0,36	-0,26	-0,31
Sr	0,12	-0,50	0,24	0,36	0,41
Al	0,49	0,50	-0,17	0,25	0,11
B	0,56	-0,55	0,12	-0,14	0,01
Ni	0,43	0,24	0,26	-0,09	-0,02
Mg	0,47	-0,35	0,02	0,18	-0,06
Cloruri	0,00	-0,17	-0,40	0,19	-0,02
Nitrati	0,20	-0,21	0,40	0,21	0,14
Solfati	-0,14	0,39	0,51	0,18	0,16

Tabella 24

Dalla tabella 23 si deduce che:

1. PC1 è correlata, con segno positivo, prevalentemente a Rb, Si, B e Ti. Quindi sono questi probabilmente i metalli più indicativi.

2. PC2 è connessa, positivamente, con la presenza di Ti e Mn e negativamente, con la concentrazione di B. Quindi Ti e B sono sicuramente molto utili alla caratterizzazione.
3. La PC3 deve la sua presenza a Zr e Ag.
4. LaPC4 e PC5 sono determinate per lo più da Co e Li la prima, e V e Li, la seconda.

Sono quindi tutte legate a micro costituenti del terreno, non influenzate da interventi antropici sul territorio e trattamenti enologici.

Riportando le componenti principali 1 e 2 in grafico, si ottiene:

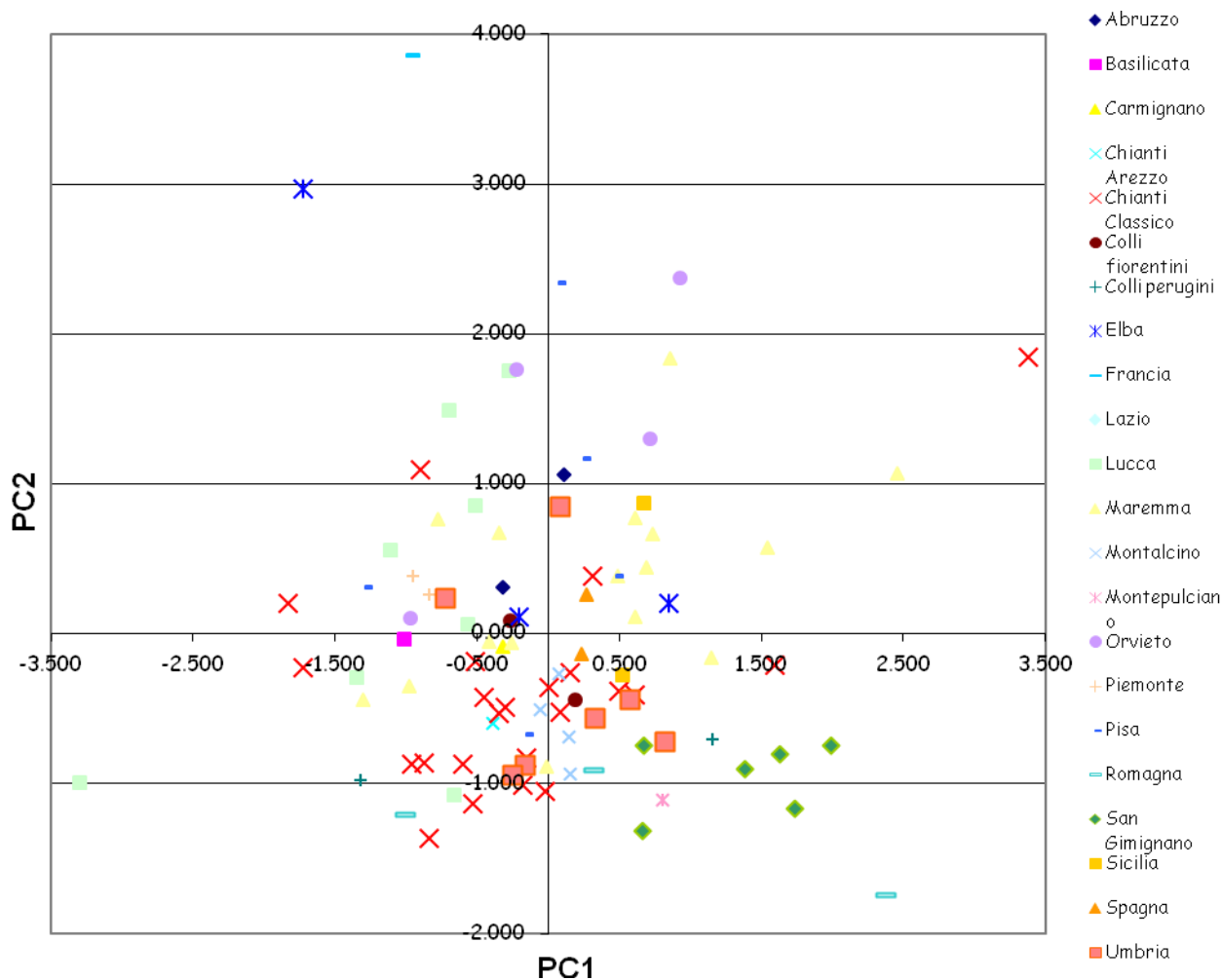


Grafico 10

Il grafico PC1/PC2, in cui son stati inseriti tutti i campioni delle relative zone, mostra la distribuzione delle famiglie da cui si può dedurre che:

1. I vini provenienti dalla zona San Gimignano, ben separati nel grafico, si posizionano, come da cartina geografica, in modo da confinare, tra l'area del Chianti e della maremma;
2. Le zone chianti (Chianti, Colli Fiorentini, Colli Aretini,) sono tutte nella stesa porzione di grafico pur essendo geograficamente molto ampie;
3. La famiglia di vini provenienti da Lucca è piuttosto dispersa nel grafico ma anche in questo caso ciò è dovuto al fatto che si parla di una zona vitivinicola molto estesa, e probabilmente eterogenea;
4. I vini maremma si collocano principalmente nel primo quadrante del grafico;
5. L'umbria ha morfologicamente caratteristiche territoriali e climatiche non molto diverse dalla Toscana infatti i punti rappresentanti i loro vini sono vicini tra loro.

Per verificare meglio quanto stabilito per i vini toscani si può riportare in grafico i valori delle PC1 e PC2, solo per i vini toscani (vedi grafico 11).

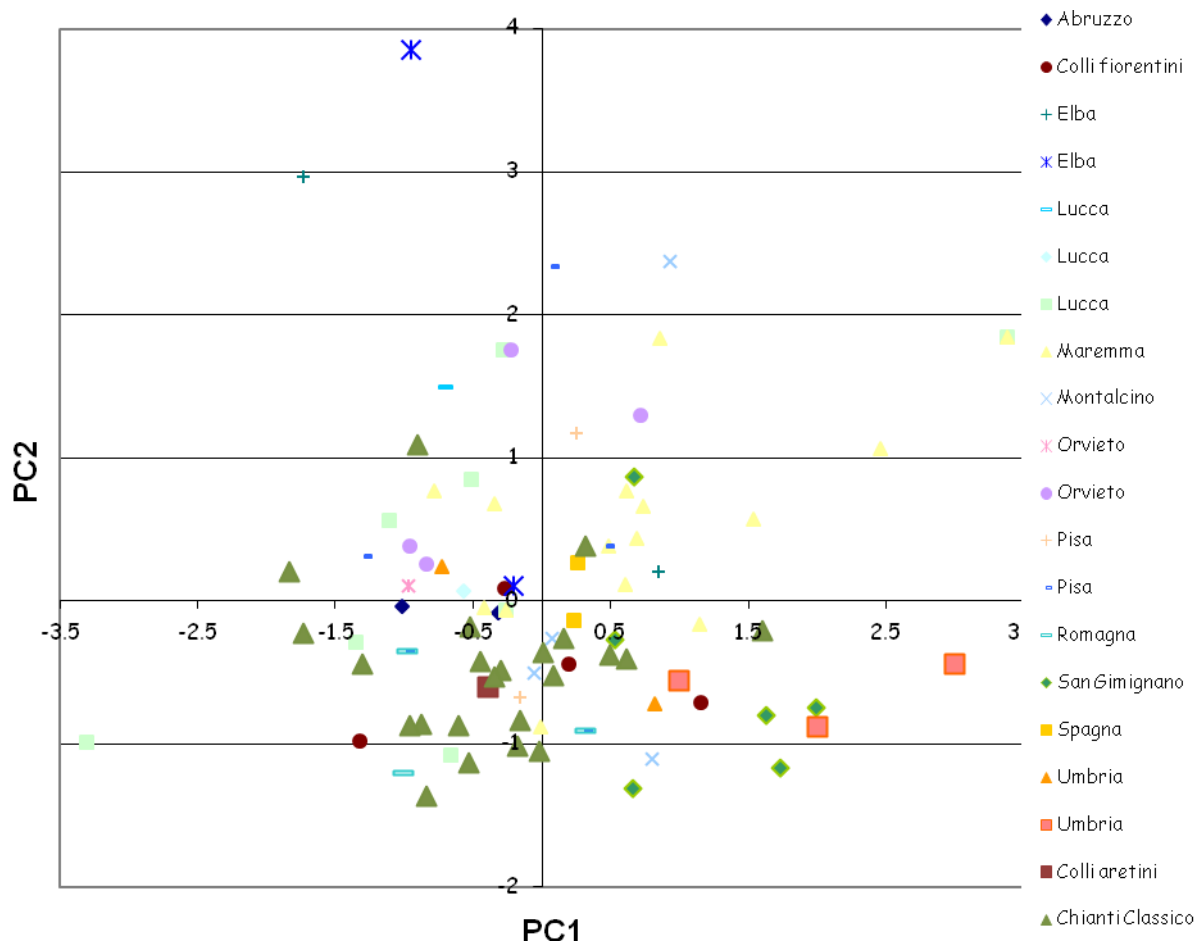


Grafico 11

Oltre alla PCA, per i metalli, ho utilizzato anche l'analisi statistica multivariata LDA (Linear Discriminant Analysis), la quale, attraverso un algoritmo matematico diverso da quello della PCA, lavora ugualmente, producendo nuove coordinate spaziali (denominate funzioni discriminanti) che ho riportato in grafici bidimensionali per l'analisi visiva.

L'elaborazione LDA fornisce la tabella 25 da cui si capisce che solo considerando le prime 5 funzioni discriminanti si riesce a spiegare il 73,98 % della varianza totale del sistema di dati di origine.

Funzione Discriminante	Autovalori	Varianza percentuale spiegata	Somma varianza spiegata
1	6,05	28,60	28,60
2	3,51	16,62	45,21
3	2,54	12,02	57,23
4	2,11	10,00	67,23
5	1,43	6,75	73,98
6	1,26	5,94	79,93
7	1,03	4,88	84,80
8	0,75	3,53	88,33
9	0,63	2,96	91,29
10	0,53	2,50	93,79
11	0,46	2,19	95,98
12	0,29	1,36	97,34
13	0,21	0,98	98,32
14	0,16	0,75	99,07
15	0,06	0,27	99,34
16	0,05	0,22	99,56
17	0,03	0,16	99,72
18	0,03	0,16	99,88
19	0,02	0,07	99,95
20	0,01	0,05	100,00

Tabella 25

Quindi, andando a vedere i valori dei coefficienti standardizzati di queste prime 5 funzioni discriminanti per le variabili in gioco (vedi tab.26) si nota che:

1. La funzione 1 è determinata fondamentalmente da Si, Rb e in misura minore dal P;
2. Alla funzione 2 contribuisce per lo più il Ni, poi Si e V;
3. La funzione 3 è determinata da B, Li e P;
4. La funzione 4 è determinata da Si e V;
5. La funzione 5 è determinata da Ti, V, P.

Coefficienti standardizzati della funzione					
Variable	Function 1	Function 2	Function 3	Function 4	Function 5
Ag	-0,158	0,342	-0,246	-0,102	0,464
Co	0,493	-0,024	-0,053	0,020	-0,281
Cr	-1,138	0,330	0,202	0,471	0,488
Mo	-0,442	0,210	0,173	0,099	0,127
Ti	-0,415	0,402	0,051	0,595	0,720
V	-0,071	0,771	0,112	-0,851	-0,600
Zr	-0,223	0,191	0,115	-0,008	0,088
Mn	0,125	-0,036	0,274	-0,530	0,249
P	-0,618	0,072	0,447	-0,186	0,585
Si	0,982	0,798	0,070	0,827	-0,018
Ba	0,372	0,006	-0,102	-0,313	0,143
K	0,131	-0,661	0,039	-0,663	-0,454
Li	0,260	0,217	-0,479	-0,048	0,222
Na	0,276	-0,236	0,350	-0,311	0,059
Rb	0,916	-0,269	-0,066	0,172	-0,350
Sr	-0,004	0,177	-0,405	-0,081	0,377
Al	0,227	-0,265	-0,089	-0,233	-0,289
B	-0,576	0,373	-0,637	0,291	-0,446
Ni	-0,268	-0,959	0,179	0,116	-0,164
Mg	-0,030	-0,169	0,170	-0,329	0,482
Cloruri	0,130	0,093	0,363	0,250	0,045
Nitrati	0,141	-0,097	-0,341	-0,186	-0,055
Solfati	-0,168	-0,122	0,282	0,097	-0,208

Tabella 26

A parte il P, sono tutti elementi non legati ad inquinamento umano, per cui sono da considerare utili per la caratterizzazione geografica.

Riportando tali funzioni in grafici bidimensionali (grafici 12, 13 e 14), si individuano le zone vitivinicole di provenienza dei vini:

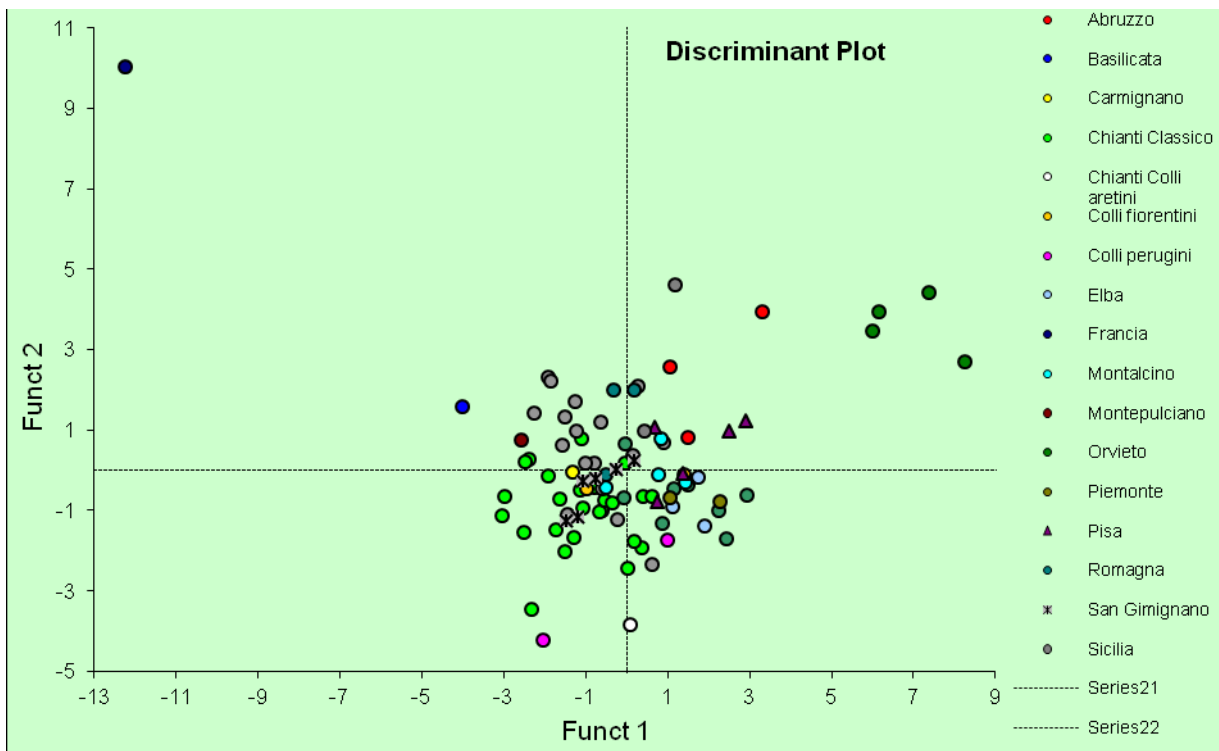


Grafico 12

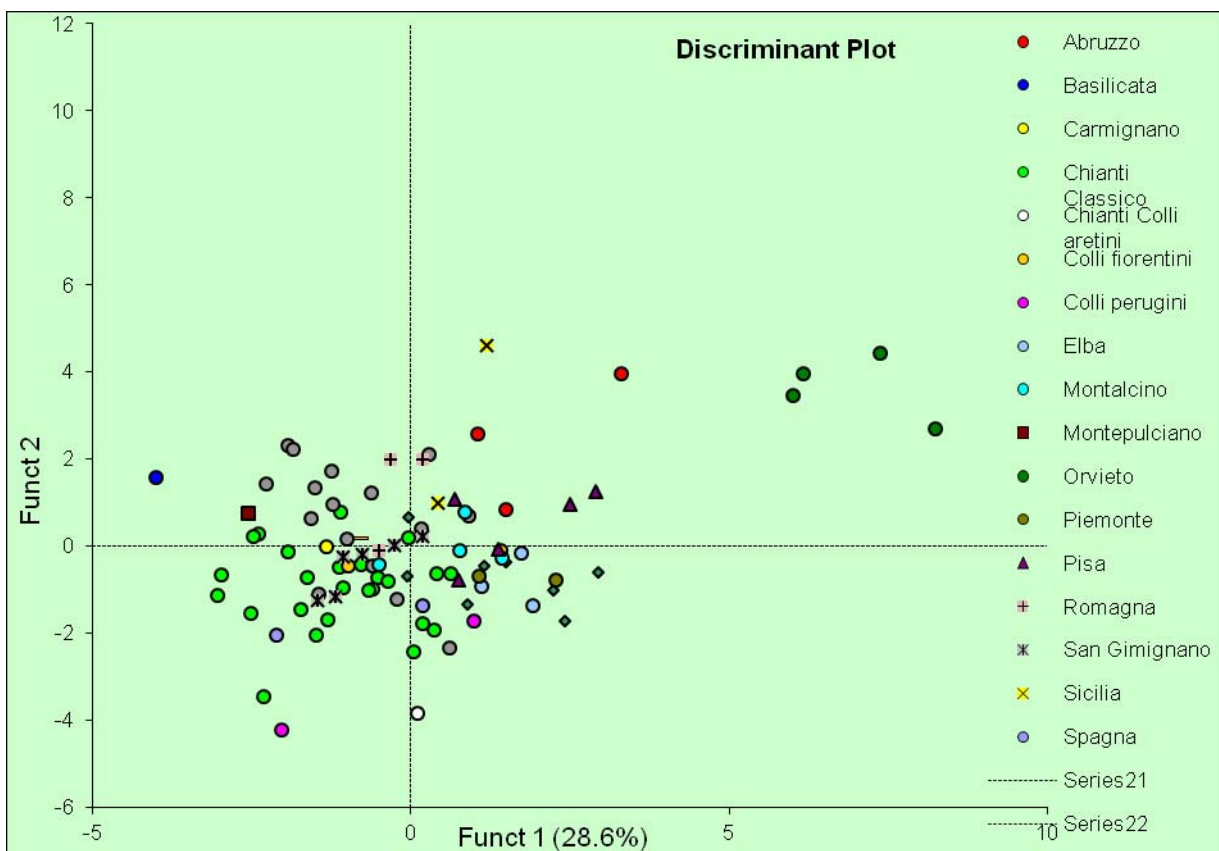


Grafico 13

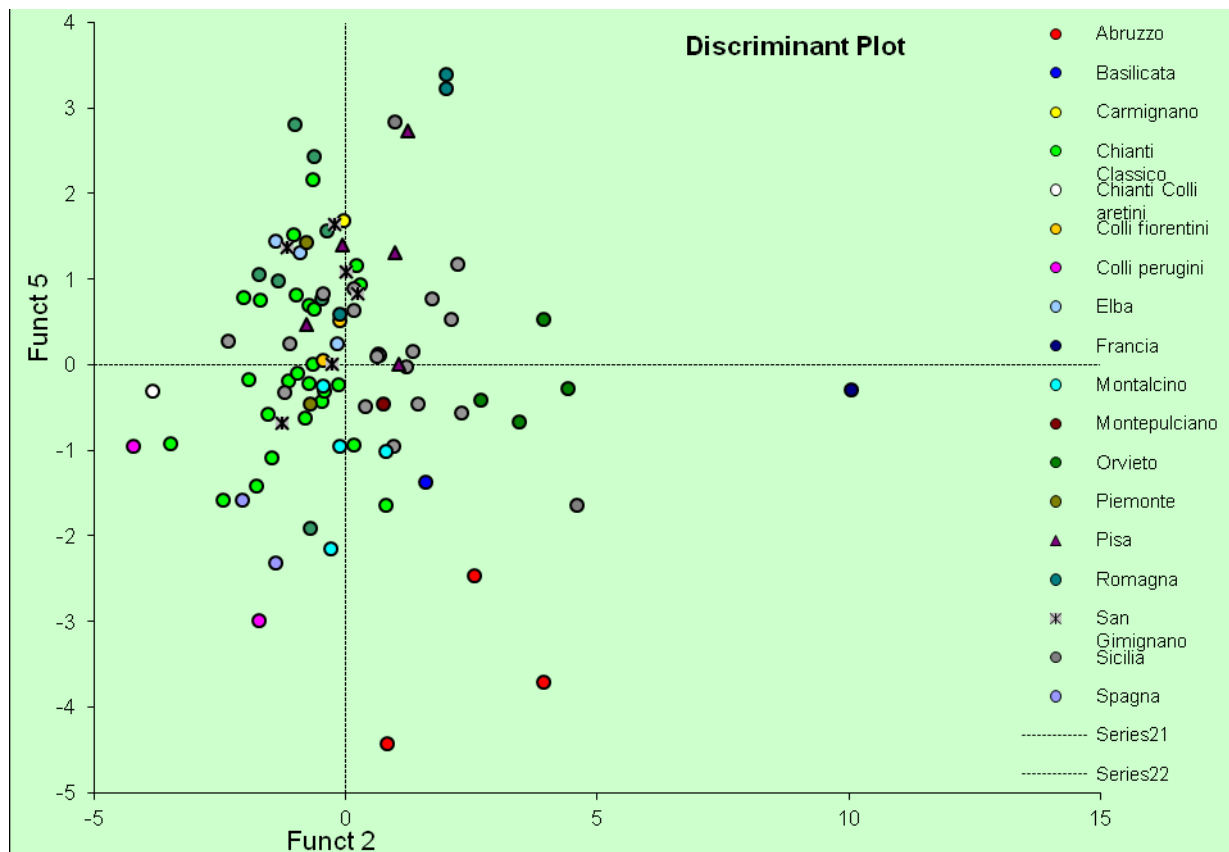


Grafico 14

Il grafico 12, che riporta le prime 2 funzioni discriminanti, rende evidente che: i vini di Orvieto sono ben riconoscibili, perché costituiscono una nuvola ben separata da tutte le altre, e il vino francese si colloca molto distante da tutti gli altri vini italiani; talmente tanto da comprimere tutti gli altri punti. Per questo motivo ho realizzato anche il grafico 13, delle stesse funzioni discriminanti, ma escludendo il vino francese.

Il grafico PC2/PC5, ci permette di discriminare bene i vini provenienti dall'Abruzzo, la Sicilia, e in più, quelli provenienti dalla Francia e da Orvieto. Per questa ragione, ad esempio, viene svelata la frode sui vini toscani tagliati con vini d'Abruzzo. Inoltre, tale grafico porta allo stesso risultato ottenuto dal grafico 11 (pag.79) dell'elaborazione PCA, cioè, distinguendo bene i vini della Maremma dai vini Chianti Classico, permette di smascherare anche la, non rara, frode di spaccio di un vino Maremmano per un Chianti Classico.

A seconda di come si realizzano i grafici bidimensionali, si possono utilizzare in modo diverso, traendone informazioni differenti e riuscendo a rivelare le frodi.

Conclusioni

Questo studio di fattibilità ha portato alla conclusione che, è possibile, attraverso le varie analisi chimiche descritte e l'analisi statistica multivariata e non, svelare frodi su un prodotto di forte interesse come il vino. Ad esempio, il Chianti classico, il quale rappresenta una denominazione di maggior pregio rispetto ad un Maremma e costa (costituito frequentemente da Merlot e Cabernet). Accade infatti che vini prodotti a partire prevalentemente da Merlo e Cabernet vengano spacciati per Chianti Classico. Sottoponendo tali vini ad analisi chimica e inserendolo nel grafico 1 questi, per come sono disposte le nuvole dei vari vitigni, cadranno senza dubbio in una zona lontana dalla popolazione del Sangiovese. Non si lascia, in questo modo, tanto spazio a dubbi.

Dunque, per quel che riguarda il riconoscimento per vitigno, si ottiene un'ottima discriminazione generale, ed in particolare, i parametri più indicativi e utili si sono rivelati gli indici calcolati sugli antociani frazionati.

Per quanto riguarda la caratterizzazione territoriale, si ottiene una discreta separazione tra le famiglie, ma qui, per raggiungere risultati migliori, nasce l'esigenza di :

- ✓ Ampliare la banca dati con campioni di annate successive;
- ✓ Integrare le analisi sui vini con quelle dei metalli del terreno nelle aree di coltivazione.

A questo scopo, i dati ottenuti dai vini campione, sono andati ad accorparsi con una banca dati sviluppata in precedenza. In questo modo, in futuro, si potrà accedere e

potranno così essere integrati con dati di altri vini (di altre annate, di altre zone ecc...).

Questo lavoro di tesi, ha portato ad individuare un valido strumento per scoprire le frodi in campo enologico; cioè, propone un valido metodo che, attraverso il riconoscimento del vitigno d'origine e della sua caratterizzazione territoriale, permette di poter garantire la denominazione riportata in etichetta

APPENDICE A - Strumentazioni

Per la creazione della banca dati su cui lavorerò il trattamento statistico, ho effettuato analisi sui vini forniti dal consorzio del chianti classico con le seguenti quattro strumentazioni, gentilmente messe a disposizione dal laboratorio del Consorzio Vino Chianti Classico.

HPLC

PRINCIPIO CROMATOGRAFICO

I metodi cromatografici sfruttano la diversa affinità delle molecole e degli ioni nei confronti di due fasi diverse, una delle quali viene immobilizzata e perciò chiamata fase stazionaria, l'altra, detta fase mobile o eluente, viene fatta scorrere in modo continuo sulla fase stazionaria. Dal momento in cui si carica la colonna cromatografica con il campione e si esegue l'eluizione della fase mobile, più a lungo viene trattenuta nella colonna una sostanza più essa sarà affine alla fase stazionaria e meno affine sarà alla fase mobile. Dunque il tempo di eluizione è caratteristico del sistema cromatografico sfruttato e della natura del campione. I meccanismi di separazione sono diversi anche se non perfettamente noti; in ogni caso risulta determinante la polarità delle due fasi. Se il sistema cromatografico è in grado di svolgere efficacemente la sua funzione, i diversi componenti della miscela si separeranno completamente. Una colonna cromatografica effettua una separazione tanto più efficace quanto più è lunga (numero di piatti teorici maggiore), sebbene il tempo di analisi aumenti notevolmente.

(R. Cozzi et.al., *Analisi chimica strumentale-Metodi cromatografici*, pp.1-3)

TECNICA HPLC

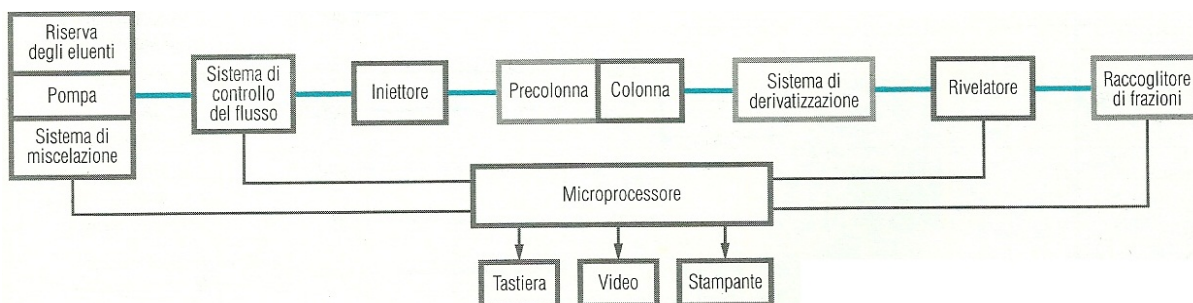
HPLC è l'acronimo di High Performance Liquid Chromatography, cioè cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni. Il nome rispecchia il fatto che in pochi minuti e a costi ragionevoli, si possono effettuare separazioni di miscele anche molto complesse ed è possibile determinare composizione qualitativa e quantitativa.

La fase mobile è un liquido a bassa viscosità, mentre la fase stazionaria è costituita da microparticelle porose rivestite da una fase liquida. La fase stazionaria è ben impaccata in una colonna lunga dai 3 ai 50 cm con un diametro interno di circa 5 mm. Le particelle hanno una granulometria molto piccola: 3-10 μm e quindi il flusso dell'eluente può essere ottenuto solo esercitando una pressione relativamente alta mediante apposite pompe.

(R. Cozzi et. al., *Analisi chimica strumentale-Metodi cromatografici*, pp.179-180)

LO STRUMENTO HPLC

Il cromatografo per HPLC può assumere diverse configurazioni a seconda che sia destinato a lavorare in condizioni isocratiche o in gradiente di eluizione, cioè con due o più solventi diversi che vengono miscelati in proporzioni differenti e prestabilite durante il corso della stessa eluizione. In generale lo schema di un HPLC lavorante in gradiente come quello a mia disposizione, è il seguente:



Riserva della fase mobile

I contenitori dei solventi sono di materiale inerte (politetrafluoroetilene) per non inquinare il solvente e di capacità tale da consentire un adeguato numero di analisi (2 litri).

Pompa

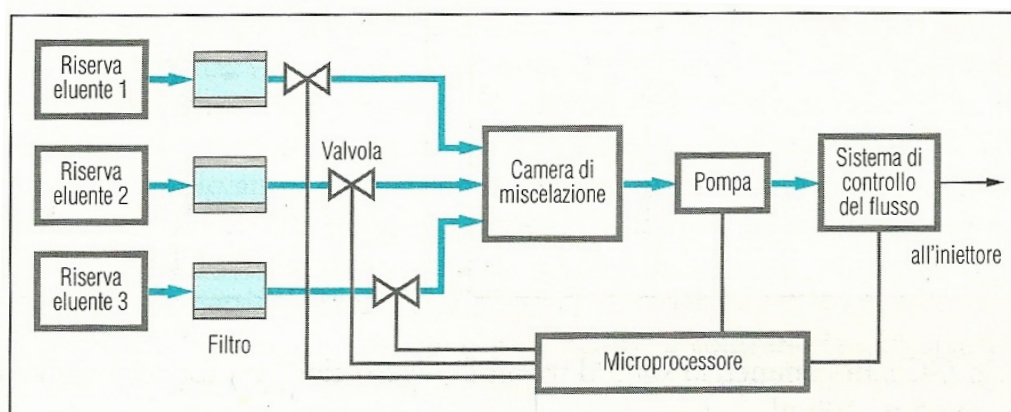
La pompa a flusso costante usata è di tipo meccanico cioè costituita da 2 pistoni che sono in ogni istante l'uno in fase di scarica e l'altro in fase di carica; per questo motivo la pompa si dice reciprocante a due pistoni. I pistoni sono fatti di acciaio inox.

Filtro

A monte dell'iniettore, allo scopo di impedire che granelli di materiali entrino in colonna, è presente un sistema di filtri con diametro di 5 μm che non provocano significative cadute di pressione.

Sistema per realizzare il gradiente di eluizione

Lo strumento a disposizione realizza la miscelazione dinamica dei due solventi tramite l'uso di una sola pompa, collegata al microprocessore, che agisce sulle valvole solenoidi relative ai vari eluenti:

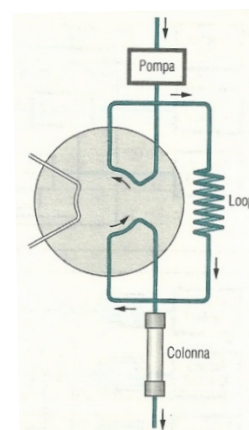


Sistema di controllo del flusso

Il controllo del flusso come della temperatura è fondamentale per la riproducibilità delle analisi. Il sistema che consente tale controllo, nello strumento utilizzato, è il flussimetro. Questo dispositivo è realizzato ponendo una pallina di plastica dentro un tubicino di vetro graduato e mantenuto in posizione verticale. La fase mobile percorre il tubicino dal basso verso l'alto mantenendo sospesa la pallina ad una certa quota. Questa quota, in relazione alla viscosità del solvente, fornisce la misura della velocità del flusso.

Sistema di iniezione

Il sistema di iniezione del campione, gestito dal braccio meccanico dell'autocampionatore, fa uso di un sistema a valvola. Con questo sistema il campione, introdotto a monte della colonna, staziona in un loop di un adatto volume finché la valvola non consente l'ingresso della fase mobile che eluisce il campione nella colonna.



Colonna e precolonna

La colonna insieme alla pompa è l'elemento fondamentale del cromatografo. La colonna utilizzata è in acciaio per resistere alle elevate pressioni di esercizio. È importante che le pareti siano internamente speculari per escludere possibili effetti parete. Il diametro interno di 4,6 mm è proporzionato alla lunghezza di 25 cm e alla dimensione della granulometria della fase stazionaria 5 μm . Queste sono le dimensioni della colonna più comune e rappresentano un buon compromesso tra capacità, consumo di eluente, velocità di analisi, risoluzione, efficienza (40000-60000 piatti teorici/m). Il riempimento è trattenuto in colonna da due setti porosi di acciaio inox sinterizzato. Quello in testa funziona da filtro, quello in fondo trattiene le particelle più piccole.

Per proteggere la colonna da sostanze inquinanti che possono essere adsorbite in modo irreversibile dal supporto, si pone una precolonna riempita dello stesso materiale, ma di granulometria più grande. Queste hanno lo stesso diametro interno

delle colonne analitiche, ma lunghezza di 3-5 cm. Se si sostituisce periodicamente la precolonna si allunga la vita delle colonne analitiche.

Rivelatore

Il rivelatore ha il compito di fornire indicazioni sulla presenza e sulla quantità di ogni componente in uscita dalla colonna. Un buon rivelatore in ogni caso deve essere robusto, pratico, maneggevole, poco costoso e soprattutto riproducibile e sensibile. Purtroppo in HPLC non è possibile adottare un rivelatore universale che abbia caratteristiche di sensibilità tali da poter essere usato per qualsiasi separazione.

Come è più comune, lo strumento a disposizione fa uso di uno spettrofotometro UV-visibile come rivelatore. In questo modo la proprietà che si sfrutta è ancora una volta l'intensa colorazione caratteristica degli antociani.

I limiti di rivelabilità sono molto bassi: 10-100 pg.

Nella scelta dell'eluente bisogna orientarsi verso solventi che non assorbono alla lunghezza d'onda del rivelatore. Lavorando in gradiente di eluizione si diminuisce gli effetti negativi di diffusione, riflessione.

Sistema di elaborazione dei segnali

Il segnale in uscita dal rivelatore, opportunamente amplificato, passa al sistema di elaborazione del segnale ovvero il software (Chromquest) di un PC. L'abbinamento di un computer allo strumento HPLC ne permette il controllo e l'impostazione in tutte le sue fasi e componenti. In particolare permette di:

1. fornire il tracciato cromatografico;
2. riconoscere i picchi in base ai tempi di ritenzione ed assegnargli un'etichetta per il successivo riconoscimento immediato;
3. integrare i picchi e visualizzarne area e altezza;
4. controllare pressione, temperatura e flussi;
5. programmare il gradiente di eluizione;

6. eseguire il lavaggio delle componenti;
7. controllare il rivelatore;
8. memorizzare diversi metodi di separazione;
9. memorizzare cromatogrammi per analizzarli in qualsiasi momento.

(R. Cozzi et.al., *Analisi chimica strumentale-Metodi cromatografici*, pp.214-228)

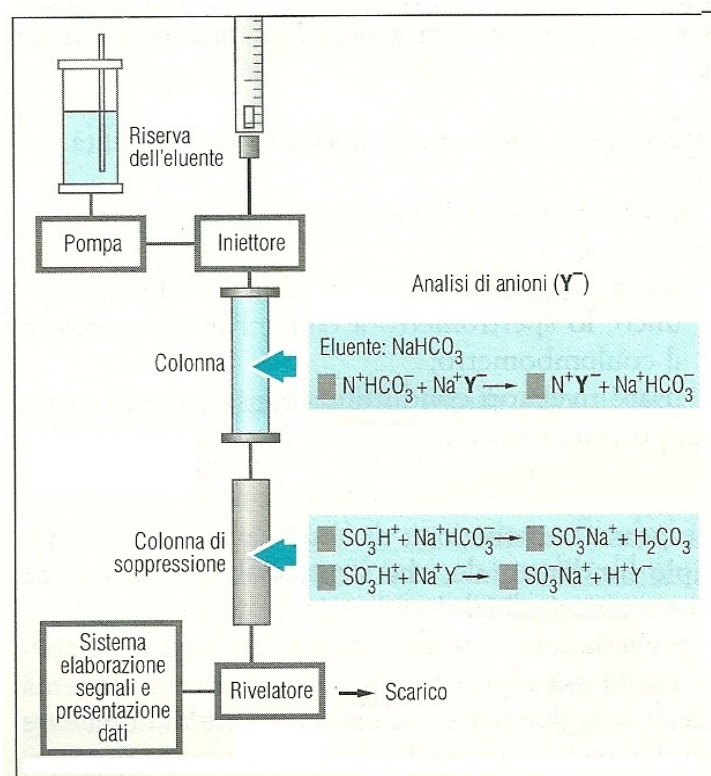
Cromatografia ionica I.C.

La cromatografia ionica sfrutta la diversa affinità degli analiti per la fase mobile e stazionaria, al pari di tutte le cromatografie. In particolare questa è una specifica tecnica HPLC, mirata alla separazione delle specie elettricamente cariche, semplici o complesse, organiche e inorganiche. Per realizzare ciò, si devono usare fasi stazionarie in grado di scambiare ioni con l'eluente, cioè degli scambiatori ionici. La tecnica che ne deriva sarebbe HPIEC (High Performance Ion Exchange Chromatography); tuttavia, al momento della rivelazione dei componenti ionici con il conduttimetro come rivelatore, si dimostra necessario amplificare il segnale degli analiti rispetto a quello dell'eluente/tampone. Per questa ragione lo strumento è dotato di un sistema di derivatizzazione chimica post-colonna, detto soppressore. Un sistema così assemblato, permette di realizzare una separazione con la tecnica strumentale definita I.C. (Ion Chromatography).

LO STRUMENTO

Si deve a Small, Stevens e Bauman (1975) l'introduzione del sistema di soppressione a due colonne, entrambe a scambio ionico ma con caratteristiche diverse. La prima ha una bassa capacità (in modo da consentire l'uso di soluzioni tampone molto diluite come eluente) e serve per separare le specie contenute nel campione. L'eluente in

uscita da questa colonna, viene poi fatto passare in una seconda colonna di soppressione chimica (detta suppressor o stripper), riempita con resine porose a scambio ionico e di elevata capacità. Questa colonna ha la funzione di abbattere drasticamente la conducibilità dovuta agli ioni del tampone, esaltando così quella dovuta agli ioni analiti. La figura sottostante mostra lo schema del dispositivo per IC.



Nell'analisi di anioni, l'elettrolita $NaHCO_3$ viene soppresso nella seconda colonna in seguito allo scambio di Na^+ con H^+ ; si forma così H_2CO_3 , che è poco dissociato. L'anione eluito entra formalmente accoppiato con uno ione Na^+ , ma lo scambia con uno ione H^+ che è nettamente più mobile. In definitiva all'uscita del sistema di soppressione la conducibilità della fase mobile viene notevolmente abbattuta, mentre di riflesso, viene esaltata la conducibilità degli ioni sottoposti ad analisi, in seguito all'accoppiamento con un controione particolarmente mobile. La conducibilità specifica di uno ione infatti è direttamente proporzionale alla sua mobilità.

Pompe

Possono essere presenti più pompe, poiché servono per mandare in colonna sia l'eluente, sia l'acqua bidistillata necessaria per la rigenerazione delle colonne. L'acqua bidistillata serve anche quando lo strumento non viene utilizzato per brevi periodi, dopo lo spegnimento infatti, per riavviare il sistema e riportare la colonna in equilibrio, occorrono molte ore. Se lo strumento non viene utilizzato per tempi brevi, si può far scorrere in colonna acqua bidistillata. Questa "ripulisce" la colonna reintegrando gli H⁺ nei siti attivi, dove potrebbero esserci rimasti alcuni ioni dell'eluente e che comprometterebbero le future separazioni. In questa maniera la colonna è sempre pronta all'uso.

Fase mobile

Le variabili da considerare per la scelta della fase mobile sono: pH e forza ionica. In particolare quando le specie da separare sono elettroliti forti, si devono usare tamponi che comportano una forza ionica elevata, mentre in presenza di elettroliti deboli si devono usare tamponi di forza minore.

Fase stazionaria

La fase stazionaria della colonna di cui si serve lo strumento utilizzato (IONPAC AS9-HC ANALYTICAL COLUMN) è costituita da polimeri di divinilbenzene ed etilvinilbenzene con macropori da 2000 Å; è operativa con eluenti a pH da 0 a 12 ed ha le seguenti caratteristiche:

Diametro particelle	Capacità (µeq/colonna)	Gruppo funzionale	Idrofobicità
9.0	190	AlchilAmmine quaternarie	Medio bassa

Rivelatore

Poiché lo scopo della cromatografia ionica è la separazione e determinazione di specie ioniche, il rivelatore principe per questa tecnica è il conduttometro in linea, che misura la conduttanza della soluzione effluente. Questo risulta essere il più comune, perché oltre ad essere il meno costoso, può essere utilizzato per lunghi periodi senza procurare problemi e il limite di rivelabilità è sufficientemente basso (dell'ordine dei mg/l) per gli ioni di interesse (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}). La natura chimica, il pH e la concentrazione delle soluzioni tampone, usate come eluenti su colonna a scambio ionico, vengono ovviamente studiate in modo da ottimizzare la separazione, ma spesso anche in modo da migliorare la difficoltosa rivelazione. Seppur si possa far uso del soppressore, i composti eluiti devono comunque avere una conducibilità elettrica significativamente diversa dall'eluente.

Software

La gestione completa di tutte le componenti del cromatografo ionico "Dionex" avviene tramite il software *Dionex Chromeleon* versione 6.8 in ambiente Microsoft Windows XP. In questo software è presente sia la parte di comunicazione e gestione dei singoli moduli cromatografici, che la parte per l'elaborazione e l'integrazione del segnale, calibrazione, controllo di qualità, organizzazione ed interrogazione del database dei dati analitici.

Meccanismo di azione dello scambio ionico

Il comportamento di uno ione durante la separazione dipende dunque dall'equilibrio che esso stabilisce con i gruppi attivi (carichi) della resina, i quali prima di introdurre il campione si trovano associati a un determinato tipo di controione. Considerando una resina anionica del tipo: Re^+X^- , quando su di essa passa una soluzione contenente ione analita Y^- , si stabilisce l'equilibrio sotto indicato, la cui costante è detta coefficiente di selettività. Questa costante esprime l'affinità della resina per un determinato ione Y^- .

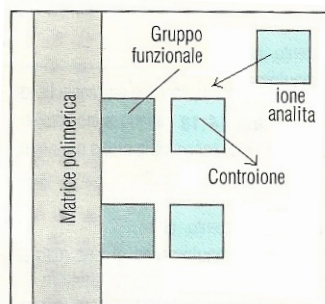


La migrazione di Y^- avviene dunque per effetto di una successione di fenomeni di adsorbimento-desorbimento sui gruppi attivi della resina. Indicando con: C_s la concentrazione di una specie anionica nella fase stazionaria, C_m la concentrazione nella fase mobile, e il rapporto tra queste come K_c coefficiente di distribuzione, si ottiene:

$$k = \frac{[Re^+Y^-][X^-]}{[[Re^+]X^-][Y^-]} = \frac{C_{s(Y^-)}C_{m(X^-)}}{C_{s(X^-)}C_{m(Y^-)}} = \frac{\frac{C_{s(Y^-)}}{C_{m(Y^-)}}}{\frac{C_{s(X^-)}}{C_{m(X^-)}}} = \frac{K_{\alpha(Y^-)}}{K_{\alpha(X^-)}} = \alpha$$

Il coefficiente di selettività fra due ioni di una resina, che coincide con il fattore di separazione α della cromatografia, è dunque pari al rapporto tra i coefficienti di distribuzione degli anioni nelle due fasi. Se il fattore di separazione è maggiore di 1, l'anione A viene trattenuto in modo selettivo rispetto all'anione B. La separazione delle bande naturalmente aumenta al crescere di α .

Le specie ioniche da separare entrano in competizione con il controione per l'interazione con i gruppi funzionali (acidi o basici) della resina.



La forza con cui una resina trattiene gli ioni da separare dipende da diversi fattori:

- ✓ In soluzioni diluite, la selettività aumenta con la carica dello ione, mentre a concentrazioni più elevate lo ione monovalente viene trattenuto con più forza degli altri;
- ✓ Gli ioni più grossi sono trattenuti di più;

- ✓ Gli ioni che allo stato idratato hanno dimensioni più grandi sono trattenuti meno di quelli più piccoli
- ✓ L'interazione fra gli ioni e la fase stazionaria si indebolisce al crescere della temperatura e quindi la selettività diminuisce.

L'efficienza della separazione dipende dalle caratteristiche geometriche della colonna (impaccamento, granulometria, dimensioni dei pori), ma anche dal coefficiente di selettività e dalla capacità di scambio della resina cioè dalla densità dei gruppi funzionali.

(R. Cozzi et.al., *Analisi chimica strumentale-Metodi cromatografici*, pp.200-207)

3.3 - ICP-OES

PRINCIPIO

Quando gli atomi di un elemento vengono eccitati, possono passare in uno stato elettronico di energia maggiore rispetto allo stato fondamentale, dopodiché, in parte possono tornare al livello energetico fondamentale, sia in modo diretto, rilasciando all'ambiente l'energia "in più" sotto forma di radiazioni elettromagnetiche, sia passando attraverso livelli energetici intermedi per via non radiante. Nel secondo caso si liberano fotoni di diversa energia. Se la sorgente eccitante fornisce molta energia gli atomi si possono anche parzialmente ionizzare, ma gli ioni formati subiscono un processo di rilassamento simile a quello atomico.

Ogni elemento è caratterizzato da uno specifico sistema di elettroni, distribuiti in ben precisi livelli di energia; perciò ognuno di essi dà uno spettrogramma riconoscibile. L'intensità delle righe spettrali dipende da diversi fattori:

- probabilità della transizione elettronica;
- dall'intensità della sorgente eccitante;
- dalla concentrazione dell'elemento nel campione.

Con il termine plasma si intende un gas elettricamente neutro (Ar), ma altamente ionizzato in cui sono quindi presenti molti ioni e elettroni in ugual numero, oltre a particelle neutre. Il plasma è quindi un ottimo conduttore elettrico.

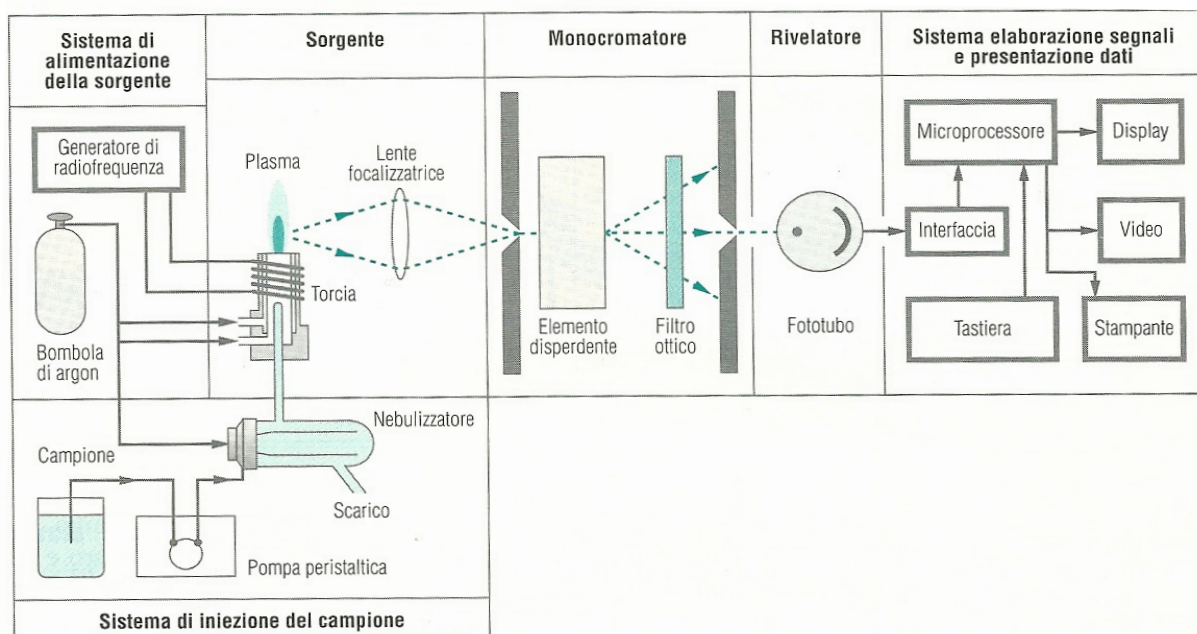
La preferenza dell'utilizzo del plasma come sorgente eccitante del campione, scaturisce soprattutto dal fatto che esso consente di lavorare con temperature mai inferiori a 6000 K, contro le temperature mai superiori a 3000 K della fiamma a combustibile. Queste temperature di esercizio permettono di eccitare una percentuale maggiore di atomi e di ottenere emissioni più intense, cioè più facilmente rivelabili e interpretabili. Altri vantaggi sono rappresentati dalla possibilità di lavorare in atmosfera inerte, buona stabilità ottica, alta riproducibilità dei processi di atomizzazione/ionizzazione ed un eccellente rapporto segnale disturbo. In aggiunta, migliori limiti di rivelabilità e intervalli di linearità per alcune specie (come Ba, Ti, P, V, U, W, Zr) che a temperature più basse formerebbero ossidi stabili.

Di contro, però, la temperatura maggiore e quindi l'eccitazione più forte accresce il numero di lunghezze d'onda emesse, aumentando la possibilità che si verifichi un'interferenza dovuta a righe d'emissione troppo vicine tra loro. Tale danno si somma al fatto che le specie chimiche isoelettroniche (ad esempio Mn^{2+} e V atomico) danno spettri di emissione molto simili.

LO STRUMENTO

La sigla ICP-OES è l'acronimo di **I**nductively **C**oupled **P**lasma – **O**ptical **E**mission **S**pectrometry, cioè: spettrometria ottica di emissione atomica con sorgente al plasma accoppiato induttivamente.

Uno spettrometro di emissione al plasma ad atomizzazione radiale, è formato dalle parti essenziali illustrate in figura:



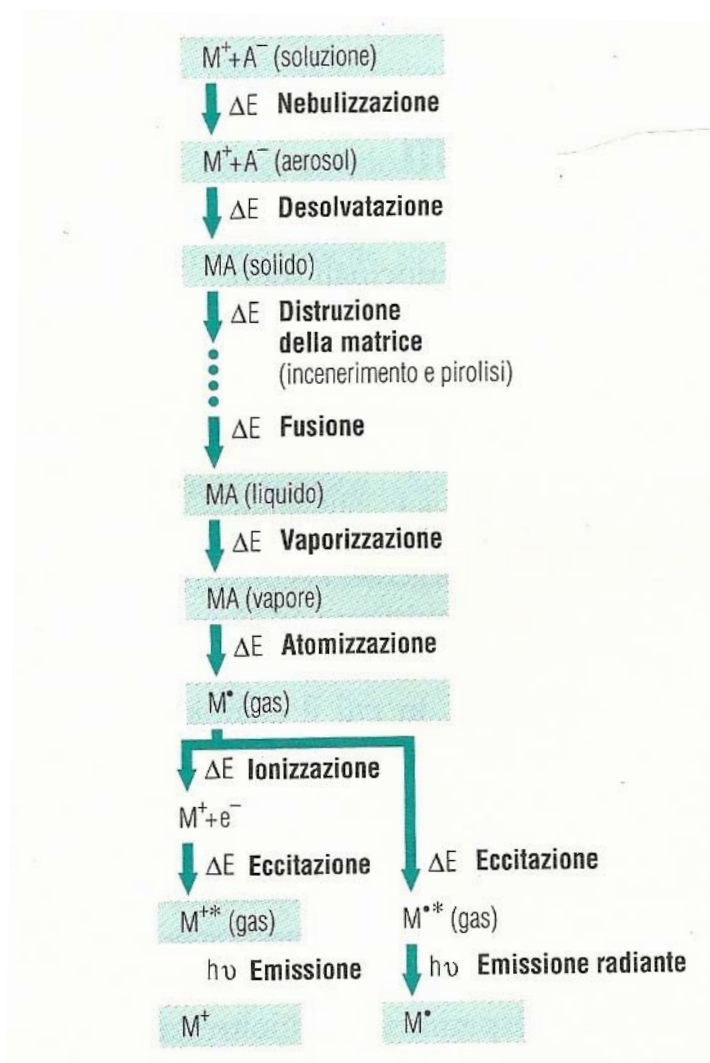
(R.Cozzi et. al., *Analisi chimica strumentale Vol.B*, pp.183-191)

Iniezione del campione

Il campione viene aspirato da un campionatore automatico e introdotto mediante il gas nebulizzatore, al centro del plasma, attraverso la regione di induzione. I campioni in soluzione, per poter essere introdotti nello strumento, sono nebulizzati in aerosol (nebbia costituita da gocce di campione molto fini) secondo il seguente processo:

- ***Desolvatazione del campione:*** l'alta temperatura del plasma permette di rimuovere il solvente dall'aerosol, trasformando il campione in microparticelle di sali.
- ***Vaporizzazione:*** le particelle di sali sono decomposte in un gas costituito da singole molecole.
- ***Atomizzazione:*** le molecole da cui è costituito il gas sono dissociate in singoli atomi.
- ***Eccitazione e ionizzazione:*** gli atomi dell'analita collidono con elettroni "ad alta energia", generando atomi eccitati, ioni ed ioni eccitati. La ionizzazione è

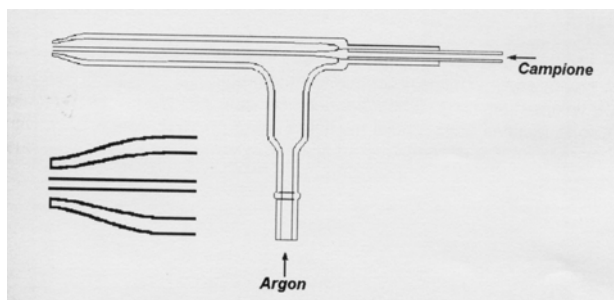
necessaria poiché per alcuni elementi le righe di emissione più intense in ICP-OES sono generate dagli ioni eccitati.



Nebulizzatore

La formazione dell'aerosol avviene mediante un dispositivo chiamato nebulizzatore. Il nebulizzatore, sfruttato dallo strumento utilizzato per questo lavoro, è pneumatico concentrico. In pratica, la soluzione viene introdotta da un tubo capillare in una zona a bassa pressione, la quale viene generata da un flusso di gas che esce ad alta velocità davanti all'estremità del capillare. La combinazione tra bassa pressione e gas ad alta velocità (controllata grazie ad un flussimetro) è in grado di trasformare la soluzione

in aerosol. Si hanno stabilità e sensibilità eccellenti. Tale nebulizzatore è in vetro, per cui fragile e soggetto all'attacco da parte di soluzioni contenenti acido fluoridrico.



(Annesa Barsotti, *Tesi di laurea: Costituzione di una banca dati...*)

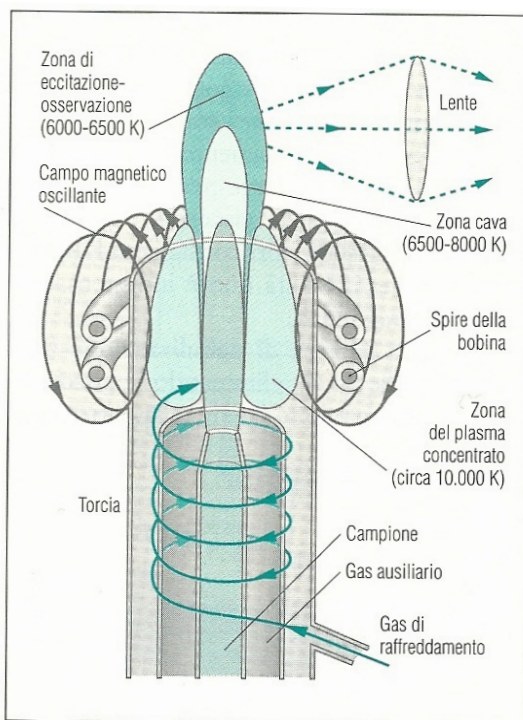
Camera di nebulizzazione

Il nebulizzatore proietta l'aerosol immediatamente nella camera di nebulizzazione allo scopo di convogliarlo poi nella torcia, eliminando le gocce più grossolane che comprometterebbero l'efficacia del plasma. Tale scopo è raggiunto obbligando il nebulizzato a seguire un particolare percorso nella camera. La camera di nebulizzazione è importante anche perché: essendo visibile dall'esterno mentre lo strumento lavora; essendo di vetro o altro materiale trasparente e resistente alla corrosione (teflon) ed essendo facilmente accessibile, risulta semplice controllare che avvenga una buona nebulizzazione. L'ICP-OES del Consorzio Vino Chianti classico si serve di una camera ciclonica in cui il nebulizzato effettua un percorso elicoidale, dunque per effetto della forza centrifuga e del contatto con le pareti esterne, le gocce più grossolane cadono in basso e vengono allontanate attraverso un canale di spurgo; contemporaneamente il nebulizzato fine prosegue verso l'alto.



Torcia

Le torcia (di 2 cm di diametro) è composta di tre tubi concentrici per i flussi di argon e per l'iniezione dell'aerosol (come nella figura sottostante). Lo spazio tra i due tubi esterni è minimo affinché il gas possa fluire a spirale e ad alta velocità (7-15 l/min). Questo assicura l'adeguato scambio termico con le pareti di quarzo della torcia: da qui il nome: *gas di raffreddamento*. Nella camicia intermedia si ha il *flusso ausiliario*, che facilita l'introduzione del campione nel plasma. Attraverso il tubo centrale detto iniettore, passa il gas che trasporta l'aerosol del campione al plasma. Nella "simil-fiamma" prodotta si distinguono tre zone: la zona cava dove arriva il campione, la zona del plasma concentrato e la zona di eccitazione-osservazione dalla quale vengono prelevate le radiazioni emesse per essere focalizzate verso il monocromatore.



(R.Cozzi et. al., *Analisi chimica strumentale Vol.B*, pp.193,194)

Una spirale di rame (la bobina di induzione) circonda la parte superiore della torcia ed è collegata ad un generatore di radiofrequenze (RF). Quando alla bobina viene applicata la potenza RF, si genera una corrente alternata che oscilla all'interno della spirale con frequenza corrispondente a quella del generatore. La corrente alternata

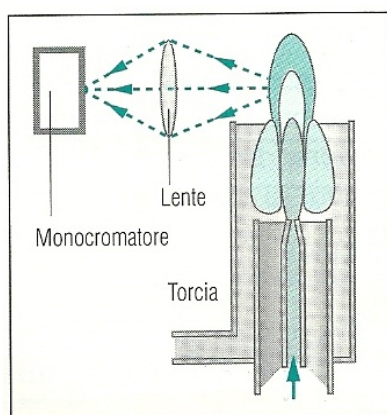
genera campi elettrici e magnetici nella parte superiore della torcia. Quando viene applicata una scintilla in modo da provocare la ionizzazione dell'argon, gli elettroni asportati vengono attratti ed accelerati dal campo magnetico della bobina. Questo processo prende il nome di accoppiamento induttivo ed è un processo a catena, perché gli elettroni accelerati, cioè "ad alta energia", collidono con altri atomi di argon provocandone la ionizzazione. La scarica è poi mantenuta all'interno della bobina di induzione dall'energia RF trasferita in continuo per accoppiamento induttivo.

L'atomizzazione radiale, rispetto a quella assiale, consente un più ampio campo di linearità, ma minore potenza e sensibilità di analisi.

(Annesa Barsotti, *Tesi di laurea: Costituzione di una banca...*)

Ottica di trasferimento

La radiazione emessa dagli atomi e dagli ioni eccitati del campione nel plasma viene acquisita tramite una lente di focalizzazione; una lente convessa o specchio concavo che mette a fuoco l'immagine del plasma sulla fenditura d'entrata del sistema per la dispersione delle lunghezze d'onda.



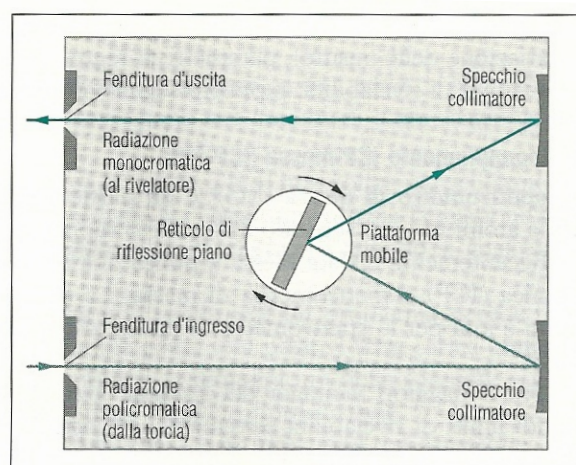
(R.Cozzi et. al., *Analisi chimica strumentale Vol.B*, pp.194)

Generatore di Radio Frequenza

Il generatore di radio frequenza è il dispositivo che fornisce la potenza (1000W) per la generazione ed il mantenimento della scarica del plasma. Attualmente i generatori operano a 40.68 MHz, perché a questa frequenza si ottiene una migliore efficienza di accoppiamento e si realizza anche una riduzione dell'intensità di emissione del fondo.

Monocromatore e rivelazione

Poiché le specie eccitate emettono a diverse lunghezze d'onda, si ottiene dal plasma l'emissione di una radiazione policromatica da separare nelle singole lunghezze d'onda che la compongono, in modo che le emissioni di ciascuna specie eccitata possono essere identificate e se ne possa misurare l'intensità. La scomposizione della radiazione policromatica viene effettuata con l'impiego di un monocromatore a reticolo di riflessione piano del tipo Czerny-Turner:



Questo dispositivo consente di raccogliere le righe di emissione di diversi elementi presenti in uno stesso campione, se il reticolo viene fatto ruotare in modo che le radiazioni emergano dalla fenditura di uscita sequenzialmente una dopo l'altra. Si effettua così un'analisi multi-elemento in modo sequenziale. Una volta isolate, le singole lunghezze d'onda vengono concentrate su una fenditura di uscita ed inviate al rivelatore fotosensibile (es. un tubo fotomoltiplicatore).

Sistema di elaborazione del segnale

La parte informatica dello strumento consente oltre alla consultazione ed interpretazione dei risultati anche l'ottimizzazione delle fasi operative:

- Scelta delle righe analitiche ;
- Correzione del disturbo di fondo ;
- Memorizzazione di più curve di calibrazione dei diversi analiti ;
- Gestione dell'autocampionatore ;
- Memorizzazione di metodi analitici ;
- Ottimizzazione di :
 - ✓ Tempo di integrazione: tempo speso nella misura dell'intensità di emissione a ciascuna lunghezza d'onda. Aumentando tale tempo, si acquista in precisione, ma si allungano i tempi di analisi e quindi i costi di esercizio;
 - ✓ Velocità di nebulizzazione: determina il tempo di permanenza degli analiti all'interno della scarica del plasma. Maggiore è il tempo di permanenza nel plasma e tanto più lungo è il tempo a disposizione dell'analita per atomizzarsi, eccitarsi ed ionizzarsi. Per cui elementi con elevato potenziale di ionizzazione dovrebbero essere trasportati a velocità ridotta;
 - ✓ Potenza del generatore RF: maggiore è la potenza applicata, più caldo diventerà il plasma e maggiore sarà la sensibilità di analisi.

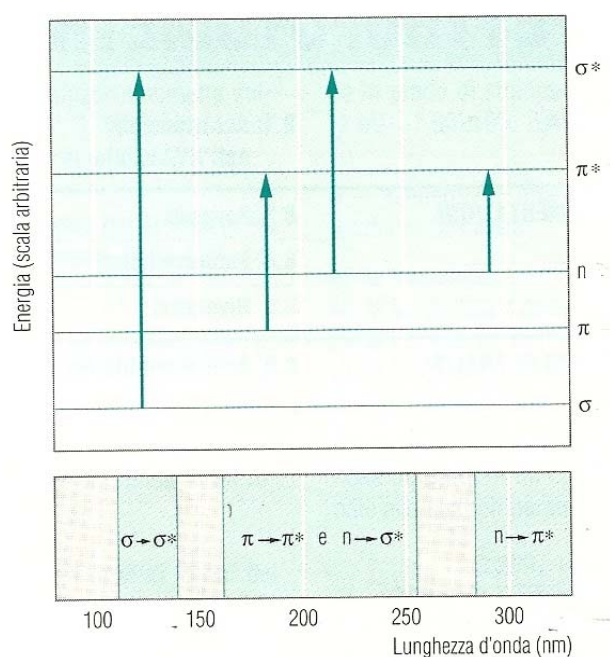
(R.Cozzi et. al., *Analisi chimica strumentale Vol.B*, pp.196-197)

3.4 - Spettrofotometria UV/Visibile

PRINCIPIO

La spettroscopia molecolare UV/visibile si basa sull'assorbimento selettivo da parte di molecole (eventualmente ionizzate) delle radiazioni con lunghezza d'onda tra 10 e 780 nm.

Per assorbimento si intende il processo dove l'energia della radiazione viene catturata dal cromoforo (gruppo funzionale, legame o sistema di legami in grado di assorbire) promuovendo allo stesso tempo un suo elettrone ad un livello energetico superiore. L'eccitazione degli elettroni di valenza richiede energie tanto più elevate quanto più grande è il dislivello energetico tra i livelli elettronici di partenza e di arrivo della transizione elettronica che deve avvenire. Le più comuni transizioni energetiche sono:



La lunghezza d'onda corrispondente alle diverse transizioni è tanto maggiore quanto minore è la differenza di energia tra gli stati coinvolti. Queste transizioni sono caratteristiche dei composti organici e inorganici che possiedono elettroni di valenza s e p.

Sapendo per certo che il colore del vino è determinato da molecole organiche, ricordo che tali composti possono subire i seguenti tipi di transizioni:

- ✓ Transizioni $\sigma \rightarrow \sigma^*$, corrispondenti alla rottura di un legame semplice e quindi richiedono energie elevate (UV);
- ✓ Transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$, tipiche dei sistemi insaturi isolati (trans. etilenica), di anelli benzenici (trans. benzenoide), di sistemi aromatici coniugati (trans. di coniugazione). Tanto più è estesa la coniugazione tanto maggiore è la lunghezza d'onda di assorbimento e l'intensità della banda.
- ✓ Transizioni $n \rightarrow \sigma^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, che coinvolgono eteroatomi con doppietti di non legame;
- ✓ Transizioni per trasferimento di carica, dovuti a veri e propri spostamenti di elettroni da una parte all'altra della molecola. I composti aromatici sostituiti presentano una banda del genere tra 220 e 370 nm.

LEGGESPERIMENTALE

La legge che descrive i fenomeni di assorbimento di radiazioni elettromagnetiche è detta legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon b C$$

dove: A = assorbanza (un numero puro);

b = cammino ottico (cm), cioè lo spessore della soluzione attraversata dalla radiazione;

C = concentrazione della specie che assorbe nella soluzione;

ϵ = coefficiente di estinzione molare (o assorbività molare) che dipende: dalla lunghezza d'onda di assorbimento (λ), dal cromoforo, dal solvente e in misura minore dalla temperatura.

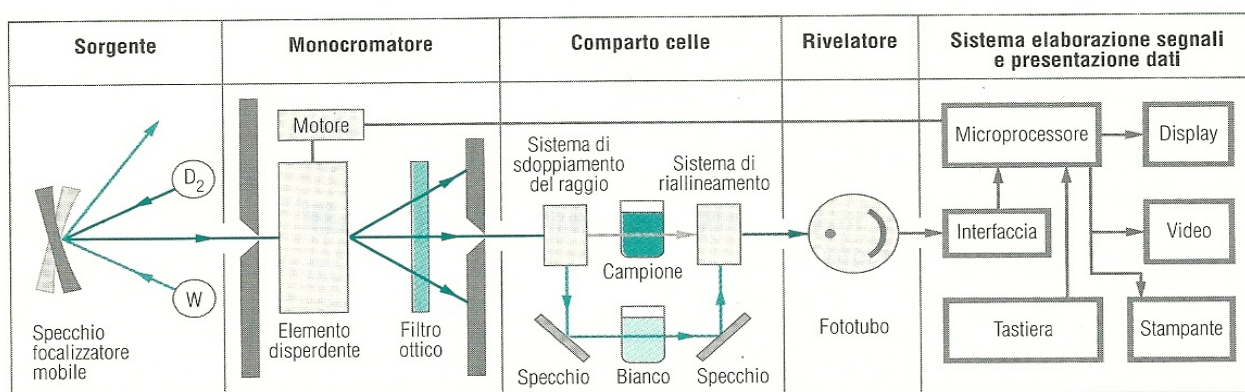
Tale legge esprime una relazione di proporzionalità diretta tra la concentrazione della specie cromofora e l'assorbidività ad una data λ . Essa quindi viene sfruttata per l'analisi quantitativa purché la soluzione assorba in modo rilevabile nell'intervallo spettrale dello strumento e purché la relazione A-C rimanga effettivamente lineare, cioè per C non elevate. In quest'ultimo caso ϵ varierebbe al variare di C.

STRUMENTAZIONE

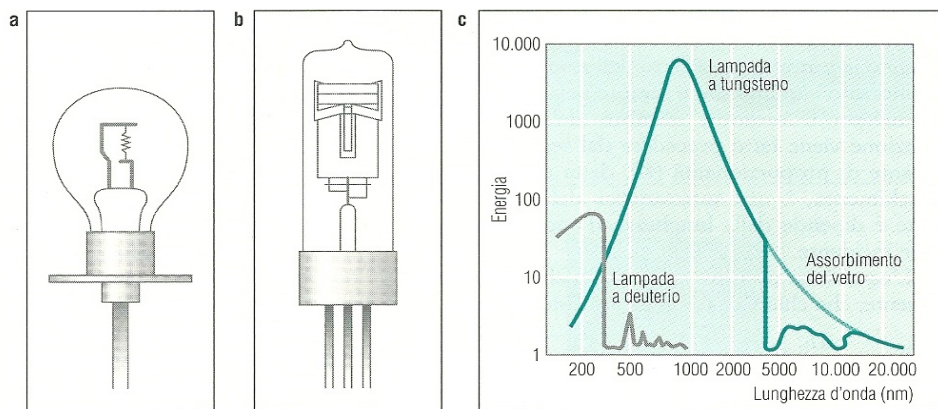
Lo strumento che permette l'analisi per assorbimento nell'UV/Visibile è lo spettrofotometro UV/visibile. Diverse sono le possibili realizzazioni di tale strumento, ma i componenti essenziali comuni a tutti gli strumenti sono:

- una *sorgente*, cioè una lampada che emette radiazioni nell'intervallo spettrale di misura;
- un *monocromatore*, che seleziona la λ più opportuna per la misura;
- un *compartimento celle o cuvette*, in cui è posto il campione;
- un *rivelatore*, che misura l'intensità della radiazione;
- un *sistema di elaborazione del segnale* (interfaccia digitale).

Nello specifico caso, al Laboratorio del Consorzio del Chianti Classico ho avuto modo di effettuare le misure necessarie a 280, 420, 520, 620 nm con uno spettrofotometro a doppio raggio composto come in figura:



- Lampade a deuterio e filamento di tungsteno auto-intercambiabili. Assieme sono in grado di coprire tutto l'intervallo di lunghezze d'onda necessario.



(a) Lampada a filamento di tungsteno; (b) lampada a deuterio; (c) Spettri di emissione delle lampade a tungsteno (a circa 3000 K) e a deuterio.

- Monocromatore a reticolo di diffrazione, cioè una superficie in alluminio incisa di sottilissime fenditure con distanza tale da interagire con la radiazione incidente;
- Cuvette a sezione quadrata di 1 cm e 0,1 cm per campioni più concentrati, in polistirene per il visibile e in quarzo per l'UV;
- Normale fotomoltiplicatore come rivelatore, in cui i fotoni del segnale elettromagnetico in arrivo colpendo una speciale superficie metallica viene convertito in flusso di elettroni e amplificato.

Si parla di strumento a doppio raggio quando nel comparto celle si verifichi lo sdoppiamento della radiazione elettromagnetica, il passaggio di questi attraverso 2 cuvette e il loro successivo riallineamento. Questo sistema, facendo passare un raggio dal campione e l'altro dal bianco, permette di tenere conto dell'inevitabile (anche se minimizzabile) assorbimento dovuto a: solvente, matrice in cui l'analita è disperso, eventuali reagenti di pretrattamento, e alle pareti della cuvetta. Il tutto nell'arco di tempo di una singola analisi.

(R. Cozzi et. al., *Analisi chimica strumentale*, p. 47-66)



RESOLUTION OENO 22/2003

HPLC-DETERMINATION OF NINE MAJOR ANTHOCYANINS IN RED AND ROSÉ WINE

THE GENERAL ASSEMBLY,

Considering Article 5, paragraph 4 of the International Convention for the Unification of Methods of Analysis and Appraisal of Wine of 13 October 1954,

Upon the proposal of the Sub-commission of the Methods of Analysis and Appraisal of Wine,

DECIDES to introduce in Annex A of the Compendium on International Methods of Analysis of Wine and Musts the following method as a Type II method:

1. FIELD OF APPLICATION

The analytical method concerns the determination of the relative composition of anthocyanins in red and rosé wine. The separation is performed by HPLC with reverse phase column and UV-VIS detection.

Many authors [3, 6-17] have published data on the anthocyanin composition of red wines using similar analytical methods. For instance Wulf et al. [18] have detected and identified 21 anthocyanins and Heier et al. [13] nearly 40 by liquid chromatography combined with mass spectrometry. The anthocyanin composition may be very complex, so it is necessary to have a simple procedure. Consequently this method only determines the major compounds of the whole anthocyanin fraction.

Member states are encouraged to continue research in this area to avoid any non scientific evaluation of the results.

2. PRINCIPLE

Separation of the five most important non acylated anthocyanins (see Figure 1, peaks 1-5) and four major acylated anthocyanins (see Figure 1, peaks 6-9). Analysis of red and rosé wine by direct separation by HPLC by using reverse phase column with gradient elution by water/formic acid/acetonitrile with detection at 518 nm [1.2].

3 REAGENTS AND MATERIAL

Formic acid (p.a. 98 %) (CAS 64-18-6);

Water, HPLC grade;

Acetonitrile, HPLC grade (CAS 75-08-8);

HPLC solvents:

Solvent A: Water/Formic acid/Acetonitrile 87 : 10 : 3 (v/v/v)

Solvent B: Water/Formic acid/Acetonitrile 40 : 10 : 50 (v/v/v)



RESOLUTION OENO 22/2003

Membrane filter for HPLC solvent degassing and for sample preparation to be analysed.

Reference products for peak identification.

The HPLC analysis of anthocyanins in wine is difficult to perform due to the absence of commercially available pure products. Furthermore, anthocyanins are extremely unstable in solution.

The following anthocyanin pigments are commercially available:

Cyanidol-3-glucoside (also couromanin chloride); M = 484.84 g/mol

Peonidol-3-glucoside; M = 498.84 g/mol

Malvidol-3-glucoside (also Oeninchloride); M = 528.84 g/mol

Malvidol-3,5-diglucoside (also Malvinchloride); M = 691.04 g/mol g/mol.

4. APPARATUS

HPLC system with:

- binary gradient pump, injection system for sample volumes ranging from 10 to 200 μ l,
- diode array detector or a UV detector with a visible range,
- integrator or a computer with data acquisition software,
- furnace for column heating at 40°C,
- solvent degassing system,
- analytical column, for example:

LiChrospher 100 RP 18 (5 μ m) in LiChroCart 250-4

guard column: for example RP 18 (30-40 mm) in a cartridge 2 mm in diameter x 20 mm long

5. PROCEDURE

5.1 Preparation of samples

Clear wines are poured directly without any preparation into the sample vials of the automatic sample changer. Cloudy samples are filtered using a 0.45 μ m membrane filter for HPLC sample preparation. The first part of the filtrate should be rejected.

Since the range of the linearity of absorption depending on the concentration of anthocyanins is large, it is possible to modulate the injection volumes between 10 and 200 μ l depending on the intensity of the wine colour. No significant difference between the results obtained for different injection volumes was observed.

5.2 Analysis

HPLC conditions

The HPLC analysis is carried out in the following conditions:

Injection Volume:	50 μ l (red wine) up to 200 μ l (rosé wine)
Flow:	0.8 ml/minute
Temperature:	40°C
Run time:	45 minutes
Post time:	5 minutes
Detection:	518 nm



RESOLUTION OENO 22/2003

Gradient elution:	Time (min)	Solvent A % (v/v)	Solvent B % (v/v)
	0	94	6
	15	70	30
	30	50	50
	35	40	60
	41	94	6

To check the column efficiency, the number of theoretical plates (N) calculated according to malvidol-3-glucoside should not be below 20,000, and the resolution (R) between peonidol-3-coumaryl glucoside and malvidol-3-coumaryl glucoside should not be lower than 1.5. Below these values, the use of a new column is recommended.

A typical chromatogram is given in Figure 1, where the following anthocyanins are separated:

Group	Anthocyanin	Peak-N°
Group 1: "Nonacylated anthocyanidin-3-glucosides":	delphinidol-3-glucoside	1
	cyanidol-3-glucoside	2
	petunidol-3-glucoside	3
	peonidol-3-glucoside	4
	malvidol-3-glucoside	5
Group 2: "Acetylated anthocyanidin-3-glucosides":	peonidol-3-acetylglucoside	6
	malvidol-3-acetylglucoside	7
Group 3: "Coumarylated anthocyanidin-3-glucosides":	peonidol-3-coumarylglucoside	8
	malvidol-3-coumarylglucoside	9

6. EXPRESSION OF RESULTS

Note that the values are expressed as relative amounts of the sum of the nine anthocyanins defined in this method.

7. FIDELITY PARAMETERS

The repeatability (r) and the reproducibility (R) values for the nine anthocyanins are given in Table 2 and depend on the amount of the peak area. The uncertainty measurement of a particular peak area is determined by the value of r and R which corresponds to the nearest value given in Table 2.



RESOLUTION OENO 22/2003

The values made up of validation data can be calculated by following the appropriate statistical rules. To calculate the total error (s_r) for example of the sum of acetylated anthocyanins, the variances (s_r^2) of specific the total error of ratios, for example, that of acetylated to coumarylated anthocyanins the square of relative errors ($=s_r/a_i$) are to be added. By using these rules, all the fidelity values can be calculated by using the data in Table 2.



RESOLUTION OENO 22/2003

Annex A

Bibliography

- [1] Marx, R., B. Holbach, H. Otteneder; Determination of nine characteristic Anthocyanins in Wine by HPLC; OIV, F.V.N° 1104 2713/100200
- [2] Holbach, B., R. Marx, M. Ackermann; Bestimmung der Anthocyanzusammensetzung von Rotwein mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). *Lebensmittelchemie* (**1997**) 51: 78 - 80
- [3] Eder, R., S. Wendelin, J. Barna; Auftrennung der monomeren Rotweinanthocyane mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Methodenvergleich und Vorstellung einer neuen Methode. *Mitt. Klosterneuburg* (**1990**) 40: 68-75
- [4] ISO-5725-2: **1994** "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility"
- [5] Otteneder, H., Marx, R., Olschimke, D.; Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC. O.I.V. F.V.N° 1130 (**2001**)
- [6] Mattivi F.; Scienza, A.; Failla, O.; Vika, P.; Anzani, R.; Redesco, G.; Gianazza, E.; Righetti, P. *Vitis vinifera - a chemotaxonomic approach: Anthocyanins in the skin. Vitis (special issue)* **1990**, 119-133
- [7] Roggero, I.P.; Larice, I.L.; Rocheville-Divorner, C.; Archier, P.; Coen, V. Composition Antocyanique des cepages. *Revue Francaise d'Oenologie* **1998**, 112, 41-48
- [8] Eder, R.; Wendelin, S; Barna, J. Classification of red wine cultivars by means of anthocyanin analysis. *Mitt. Klosterneuburg* **1994**, 44, 201-212
- [9] Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, 212, 108-112
- [10] Garcia-Beneytez, E.; Revilla, E.; Cabello, F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 215, 32-37
- [11] Arozarena, I.; Ayestarán, B.; Cantalejo, M.J.; Navarro, M.; Vera, M.; Abril, K.; Casp, A. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 214, 313-309
- [12] Revilla, E.; Garcia-Beneytez, E.; Cabello, F.; Martin-Ortega, G.; Ryan, J-M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr A* **2001**, 915, 53-60
- [13] Heier, A.; Blaas, W.; Droß, A.; Wittkowski, R.; Anthocyanin Analysis by



RESOLUTION OENO 22/2003

HPLC/ESI-MS, *Am.J.Enol.Vitic*, **2002**, 53, 78-86

- [14] Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety. *J. Sci. Food Agric*, **2000**, 80, 1909-1917
- [15] Anonymous. Bekanntmachung des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz*, **2001**, 44, 748
- [16] Burns, I.; Mullen, W.; Landrault, N.; Teissedre, P.-L.; Lean, M.E.I.; Crozier, A. Variations in the Profile and Content of Anthocyanins in Wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 4096-4102
- [17] Otteneder, H.; Holbach, B.; Marx, R.; Zimmer, M. Rebsortenbestimmung in Rotwein mittels Anthocyanenspektrum. *Mitt. Klosterneuburg*, **2002**, 52, 187-194
- [18] L.W. Wulf and C.W. Nagel; High-Pressure liquid chromatographic separation of Anthocyanins of *Vitis vinifera*. *Am.J.Enol.Vitic* **1978**, 29, 42-49



RESOLUTION OENO 22/2003

Annex B

Statistical results

METHOD PERFORMANCE STUDY AND EVALUATION

17 laboratories from 5 European Nations participated in the validation study of the method under the coordination of the German Official State Laboratory for Food Chemistry in Trier. The participants are listed in Table 3. An example of a chromatogram is presented in Figure 1 and the detailed results are given in Table 2.

The statistical evaluation followed the Resolution 6/99 and the Standard ISO 5725-1944 [4.5].

The chromatograms sent back with the results sheets fulfilled all requirements concerning the performance of the analytical column. No laboratory had to be completely eliminated, for example, because of a wrong peak identification.

The outlier values were searched using Dixon and Grubbs outlier testing according to the procedure for "Harmonised Protocol - IUPAC 1994" and the OIV Resolution OENO 19/2002. The values of s_r , s_R , r and R were calculated for 9 major anthocyanins at 5 content levels. For analytical results, the values of the closest levels should be used.

In order to have a global vision of the method performance, all the values RSD_r - et RSD_R - gathered are grouped by range of areas in the following table:

Table 1: Summary of the results of the method performance study

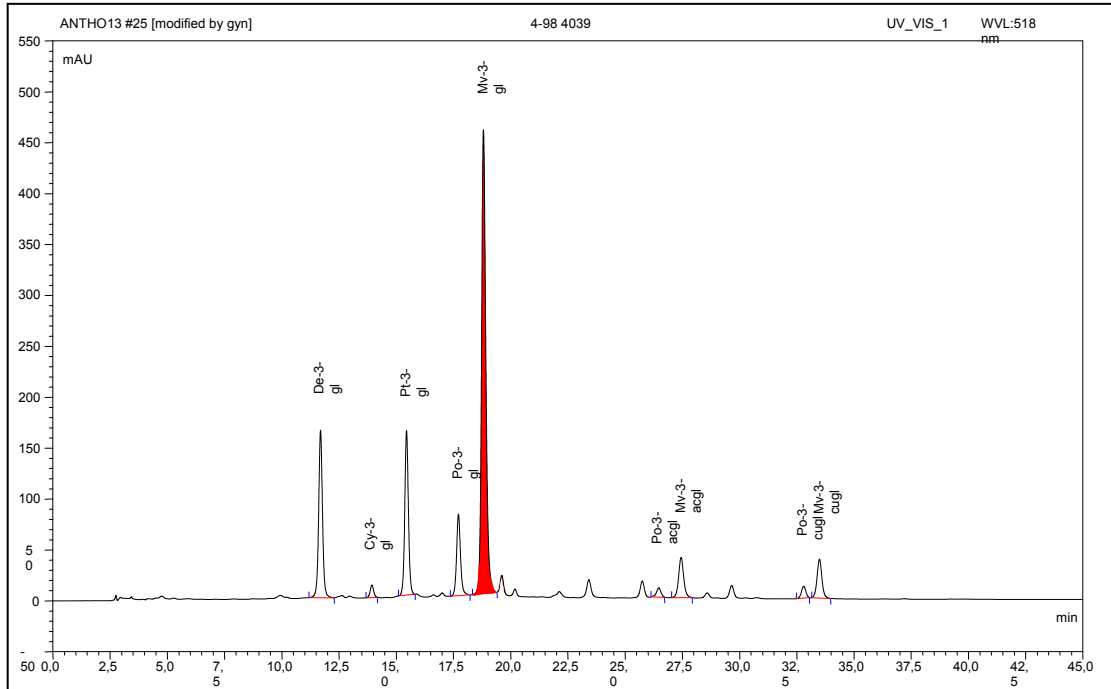
Range of relative peak areas*[%]	Range of RSD_r [%]	Range of RSD_R [%]
>0.4 – 1.0	6.8 - 22.4	20.6 - 50.9
>1.1 – 1.5	4.2 - 18.1	11.8 - 28.1
>1.5 – 3.5	2.1 – 7.7	10.6 - 15.6
>3.5 – 5.5	2.7 – 5.7	18.7 – 7.5
>5.5 – 7.5	2.4 – 3.9	6.5 - 10.0
>10 – 14	1.1 – 2.9	3.7 - 9.2
>14 – 17	1.0 - 3.9	3.2 - 5.4
>50 – 76	0.3 - 1.0	2.1 - 3.1
* independent of anthocyanin		



RESOLUTION OENO 22/2003

This leads to the conclusion that repeatabilities and reproducibilities depend on the total sum of the relative peak areas. The higher they are, the better are RSD_r and RSD_R . For anthocyanin contents close to the detection limit (e.g. Cyanidin-3-glucoside) with small relative areas (less than 1%) the RSD_r et RSD_R values can rise significantly. For anthocyanin whose relative areas are more than 1%, the RSD_r and RSD_R values are reasonable.

Figure 1: Separation of 9 anthocyanins in red wine





RESOLUTION OENO 22/2003

Table 2: Results of the method performance study

Anthocyanin	sample 1	sample 2	sample 3	sample 4	sample 5
<i>Delphinidol-3-glucoside</i>					
n	14	14	16	15	16
mean	6.75	14.14	3.45	16.68	3.54
s _r	0.163	0.145	0.142	0.142	0.108
RSD _r (%)	2.4	1.0	4.1	0.8	3.1
r	0.46	0.41	0.40	0.40	0.30
s _R	0.544	0.462	0.526	0.704	0.490
RSD _R (%)	8.1	3.3	15.2	4.2	13.8
R	1.52	1.29	1.47	1.97	1.37
<i>Cyanidol-3-glucoside</i>					
n	16	17	16	15	14
mean	2.18	1.23	0.61	1.46	0.34
s _r	0.086	0.053	0.043	0.110	0.031
RSD _r (%)	4.0	4.3	7.1	7.5	9.2
r	0.24	0.15	0.12	0.31	0.09
s _R	0.460	0.211	0.213	0.180	0.158
RSD _R (%)	21.2	17.2	34.9	12.3	46.7
R	1.29	0.59	0.60	0.50	0.44
<i>Petunidol-3-glucoside</i>					
n	15	17	16	14	15
mean	10.24	14.29	5.75	12.21	6.19
s _r	0.233	0.596	0.157	0.097	0.196
RSD _r (%)	2.3	4.2	2.7	0.8	3.2
r	0.65	1.67	0.44	0.27	0.55
s _R	0.431	0.996	0.495	0.469	0.404
RSD _R (%)	4.2	7.0	8.6	3.8	6.5
R	1.21	2.79	1.39	1.31	1.13
<i>Peonidol-3-glucoside</i>					
n	16	15	17	17	16
mean	11.88	6.23	13.75	7.44	4.12
s _r	0.241	0.166	0.144	0.232	0.174
RSD _r (%)	2.0	2.7	1.0	3.1	4.2
r	0.68	0.47	0.40	0.65	0.49
s _R	0.981	0.560	1.227	0.602	0.532
RSD _R (%)	8.3	9.0	8.9	8.1	12.9
R	2.75	1.57	3.44	1.69	1.49
<i>Malvidol-3-glucoside</i>					
n	16	15	17	16	16
mean	55.90	55.04	76.11	52.60	61.04
s _r	0.545	0.272	0.251	0.298	0.377
RSD _r (%)	1.0	0.5	0.3	0.6	0.6
r	1.53	0.76	0.70	0.83	1.06
s _R	2.026	2.649	2.291	1.606	1.986
RSD _R (%)	3.6	4.8	3.0	3.1	3.3
R	5.67	7.42	6.41	4.50	5.56
n	= N° of laboratories retained after eliminating outliers				
s _r	= standard deviation of repeatability				
RSD _r (%)	= relative standard deviation of repeatability				
r	= repeatability				
s _R	= standard deviation of reproducibility				
RSD _R (%)	= relative standard deviation of reproducibility				
R	= reproducibility				



Table 2: Results of the method performance study

Anthocyanin	sample 1	sample 2	sample 3	sample 4	sample 5
<i>Peonidol-3-acetylglucoside</i>					
n	14	16		14	16
mean	1.16	1.44		0.59	3.74
s _r	0.064	0.062		0.059	0.215
RSD _r (%)	5.5	4.3		10.1	5.8
r	0.18	0.17		0.17	0.60
s _R	0.511	0.392		0.272	0.374
RSD _R (%)	43.9	27.2		46.4	10.0
R	1.43	1.10		0.76	1.05
<i>Malvidol-3-acetylglucoside</i>					
n	16	17		17	16
mean	5.51	4.84		3.11	15.07
s _r	0.176	0.167		0.088	0.213
RSD _r (%)	3.2	3.4		2.8	1.4
r	0.49	0.47		0.25	0.60
s _R	0.395	0.366		0.496	0.617
RSD _R (%)	7.2	7.6		16.0	4.1
R	1.11	1.02		1.39	1.73
<i>Peonidol-3-coumarylglucoside</i>					
n	16	14		17	16
mean	1.26	0.90		0.89	1.32
s _r	0.130	0.046		0.060	0.058
RSD _r (%)	10.3	5.1		6.8	4.4
r	0.36	0.13		0.17	0.16
s _R	0.309	0.109		0.204	0.156
RSD _R (%)	24.5	12.2		23.0	11.8
R	0.86	0.31		0.57	0.44
<i>Malvidol-3-coumarylglucoside</i>					
n	17	17		17	16
mean	4.62	2.66		4.54	4.45
s _r	0.159	0.055		0.124	0.048
RSD _r (%)	3.4	2.1		2.7	1.1
r	0.45	0.15		0.35	0.13
s _R	0.865	0.392		0.574	0.364
RSD _R (%)	18.7	14.7		12.6	8.2
R	2.42	1.10		1.61	1.02
n	= N° of laboratories retained after eliminating outliers				
s _r	= standard deviation of repeatability				
RSD _r (%)	= relative standard deviation of repeatability				
r	= repeatability				
s _R	= standard deviation of reproducibility				
RSD _R (%)	= relative standard deviation of reproducibility				
R	= reproducibility				



RESOLUTION OENO 22/2003

Table 3: List of participants

ABC Labor Dahmen, Mülheim/Mosel	D
Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Münster	D
Institut für Lebensmittelchemie Koblenz	D
Institut für Lebensmittelchemie Speyer	D
Institut für Lebensmittelchemie Trier	D
Institut für Lebensmittelchemie und Arzneimittel Mainz	D
Labor Dr. Haase-Aschoff, Bad Kreuznach	D
Labor Dr. Klaus Millies, Hofheim-Wildsachsen	D
Labor Heidger, Kesten	D
Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Halle	D
Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau, Neustadt/Weinstraße	D
Staatliches Institut für Gesundheit und Umwelt, Saarbrücken	D
Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt, Wiesbaden	D
Laboratoire Interrégional de la D.G.C.C.R.F de Bordeaux, Talence/France	F
Unidad de Nutricion y Bromotologia, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca/Espana	E
University of Glasgow, Div. of Biochem. and Molek. Biology	UK
Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau, Klosterneuburg	A

17 Laboratories D (13); A (1); F (1); E (1); UK (1)

APPENDICE C

DETERMINAZIONE DEGLI ANIONI PER CROMATOGRAFIA IONICA

1. Principio del metodo

Gli anioni nel vino possono essere separati per cromatografia ionica su resina a scambio ionico, con soppressore e rivelatore a conducibilità.

Il dosaggio degli anioni è effettuato con il metodo dello standard esterno, analizzato nelle stesse condizioni del campione. Tale metodo permette, la valutazione del contenuto di cloruri, nitrati, fosfati, solfiti, solfati.

2. Apparecchiatura

2.1. Filtri siringa con membrana di cellulosa (0.45 μm).

2.2. Strumentazione IC: - iniettore con loop da 20 μl
 - detector a conducibilità
 - soppressore chimico
 - software di cromatografia per la gestione dello strumento

2.3. Comune vetreria da laboratorio

Condizioni operative

Colonna: IONPAC AS9 HC (250 mm x 4,6 mm, particelle di 9 μm)

Fase mobile: soluzione di Na_2CO_3 1,7 mM

Flusso della fase mobile: 1.0 ml/min

Corrente del soppressore: 52 mA

3. Reattivi

3.1. Acqua distillata per HPLC o di grado analitico equivalente

3.2. Sol. standard di cloruri

3.3. Sol. standard di nitrati

3.4. Sol. standard di solfati

4. Modalità operative

4.1. Preparazione del campione

Il vino o mosto è diluito 10 volte. A 1 ml di vino si aggiungono 9 ml di acqua e si omogeneizza. Il diluito così ottenuto, lo si passa su filtro a 0.45 µm e si inietta nel cromatografo.

4.2. Cromatografia

Si iniettano nel sistema cromatografico, in sequenza, 20 µl di soluzione di riferimento degli anioni e 20 µl del campione preparato come indicato al punto 4.1.

5. Calcoli

5.1. Analisi qualitativa

Determinare il tempo di ritenzione di ciascuno dei composti eluiti.

Gli anioni della soluzione di riferimento sono separati secondo il seguente ordine di eluizione: cloruri, nitrati, fosfati, solfiti, solfati.

5.2. Analisi quantitativa

Si misura l'area di ciascun picco e si determina la curva di taratura, riportando in grafico le aree, contro le concentrazioni degli standards. Per interpolazione, si deduce la concentrazione degli anioni nel campione, tenendo conto della diluizione effettuata.

Il calcolo è il seguente: $C_c = C_s \cdot d$

C_c = concentrazione dell'i-esimo anione nel campione espressa in mg/L

C_s = concentrazione dell'i-esimo anione, ricavata dalla retta di taratura, espressa in mg/L

d = diluizione effettuata sul campione

6. Espressione dei risultati

Il risultato si esprime in mg/L con 2 cifre decimali.

APPENDICE D

DETERMINAZIONE DEI METALLI NEI VINI

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sull'uso della spettrometria di emissione con sorgente al plasma (ICP-OES) per la determinazione di metalli nei vini e nei mosti. I vini, dopo mineralizzazione, vengono analizzati con ICP-OES e la quantificazione è effettuata con il metodo dello standard esterno, analizzato nelle stesse condizioni del campione.

2. Apparecchiatura

- ICP-OES Jobin-Yvon, dotata di autocampionatore e software di elaborazione dei dati;
- Comune vetreria da laboratorio.

3. Reattivi

- Acqua distillata per HPLC o di grado analitico equivalente;
- Sol. standard degli analiti da analizzare;
- HNO₃ al 65% per analisi di metalli in tracce.

4. Modalità operative

Scelta delle lunghezze d'onda analitiche.

Le lunghezze d'onda alle quali effettuare la determinazione dei vari analiti sono state scelte a partire da quelle consigliate dalla ditta produttrice.

Preparazione delle rette di taratura.

A partire dalle soluzioni madre, preparare per diluizione le soluzioni di riferimento alle concentrazioni desiderate avendo cura di aggiungere un volume di HNO₃

concentrato tale da avere le soluzioni finali dei vari analiti al 2% dello stesso: portare quindi a volume con acqua demineralizzata in matracci tarati da 100 ml.

Costruire la retta di taratura a 3 o, preferibilmente, a 5 livelli di concentrazione.

Si provvede a calcolare le rette di taratura riportando in grafico le concentrazioni vs le intensità

Preparazione del campione da analizzare.

Agitare il campione e trasferire 100 ml di campione in una beuta da 125 ml versare, porre il contenitore su di una piastra riscaldante e portarlo a piccolo volume (4-5 ml) lentamente avendo cura di mantenere l'ebollizione ad un livello minimo in modo da evitare schizzi con conseguente perdita di campione. Aggiungere circa un ml di HNO₃, continuare a riscaldare fino ad ottenere una soluzione trasparente evitare di fare andare a secco il campione. Trasferire la soluzione, dopo averla filtrata se necessario, in un matraccio tarato da 100 ml, aggiungere due successive aliquote di 5 ml di acqua con cui sono state lavate le pareti della beuta, lasciare raffreddare la soluzione e portare a volume con acqua. Per campioni a basse concentrazioni può essere necessario aumentare il volume iniziale di campione.

Effettuare una prova in bianco operando nelle medesime condizioni ma sostituendo il campione con una analoga quantità di acqua.

Esecuzione dell'analisi.

Accendere lo strumento, attendere circa 15 minuti per la stabilizzazione, predisporre la sequenza analitica che deve necessariamente prevedere la lettura della prova in bianco e delle soluzioni a concentrazione nota.

Interferenze

la tecnica ICP-OES presenta sia interferenze di tipo spettrale sia interferenze fisiche. Le interferenze spettrali sono di tipo additivo e sono dovute sia ad un aumento del segnale del fondo sia a sovrapposizioni più o meno parziali dei picchi di emissione di

elementi diversi. Le interferenze del primo tipo sono risolte eseguendo una scansione nella regione dello spettro di emissione dell'elemento analizzato e del campione: dalla stima del profilo di emissione è possibile scegliere se eseguire una correzione per interpolazione prima o dopo il picco o solo da un lato.

Le interferenze di tipo fisico si verificano nel processo di nebulizzazione e di trasporto del campione. Il cambiamento della tensione superficiale e della viscosità della soluzione porta ad una diversa efficienza di nebulizzazione. In questo caso l'interferenza è di tipo moltiplicativo e può portare ad una variazione positiva o negativa dell'accuratezza del dato. Per ovviare a questo inconveniente si provvede a diluire il campione.

Si possono verificare "effetti memoria" dovuti a campioni con elevata concentrazione degli elementi in esame che influenzano i valori di emissione di campioni analizzati successivamente: per ovviare a questo inconveniente si procede all'aumento dei tempi di lavaggio tra l'analisi di due campioni successivi

5. Calcoli

Analisi quantitativa

Si misura l'area di ciascun picco e si determina la curva di taratura, riportando in grafico le aree, contro il segnale strumentale degli standards. Per interpolazione, si deduce la concentrazione degli anioni nel campione, tenendo conto della diluizione effettuata.

Il calcolo è il seguente: $C_c = C_s * d$

Dove: C_c = concentrazione dell'i-esimo elemento nel campione

C_s = concentrazione dell'i-esimo elemento, ricavata dalla retta di taratura, espressa in mg/L

d = diluizione effettuata sul campione

Bibliografia

Vito Sciancalepore (2007), *Industrie agrarie olearia enologica lattiero-casearia*, UTET

Yair Margalit (2005), *Elementi di chimica del vino*, ENO-ONE,

P.Ribéreau-Gayon et al. (2007), *Trattato di enologia II*, EDAGRICOLE, Bologna

Renato Cozzi et al. (2004), *Analisi chimica strumentale. vol.B, Metodi ottici*, ZANICHELLI

Renato Cozzi et al. (2004), *Analisi chimica strumentale. vol.C Metodi cromatografici*, ZANICHELLI

Pier Giovanni Garoglio, (1973), *Enciclopedia vitivinicola mondiale vol.3*, Edizioni Scientifiche UIV, Milano

Paolo Cabras et.al. (2004), *Chimica degli alimenti*, PICCIN

Annesa Barsotti (2005), Tesi di laurea: *Costituzione di una banca dati per garantire l'origine del prodotto mediante la determinazione di elementi metallici con spettroscopia ICP-OES, nel vino, Unifi*

Regolamento CE 479/08, legge quadro sull'OCM, attuata dai Reg. 606/09 e 607/09.

Legge Collavini-Preda del 20/02/2006, *Norme nazionali per la produzione e vendita dei vini, bevande, sottoprodotti e acet*, Gazzetta Uff. n. 60 del 13/03/2006.

OIV, Recueil international des methodes d'analyses, Méthode OIV-MA-AS315-11: Détermination par CLHP de neuf anthocyanes principales dans le vin rouge et rosé, <<http://www.oiv.int/oiv/.../OIV-MA-AS315-11.pdf>>, 2007.

OIV, Recueil international des methodes d'analyses, Méthode OIV-MA-F-C1-01-LIMMAX: Limites maximales acceptable de divers elements dans le vin, 2005.

ISS - M. Ottaviani, *Banca dei metodi delle acque, Metodo per cromatografia ionica ISS.CBB.o37.REV00.pdf*,

<http://www.iss.it/site/MetodiAnaliticiAcque/Pdf/ISS.CBB.037.REV00.pdf>, 2007

Consorzio Chianti Classico, *Disciplinare della DOCG*,
<<http://www.chianticlassico.com/vino/disciplinare/>>, 2010

A. Baldi e A. Romani, *Studio su alcuni composti polifenolici in uve, mosti, vini della toscana*, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Firenze, 1992.

Miller J.N., “*Basic Statistical Methods for the Analytical Chemistry Part 2: Calibration and Regression Methods, a Review*”, *The Analyst*, 1991, 116 3-14.