

Università Cattolica
Sacro Cuore
Istituto di Enologia
Piacenza

**LA TECNICA HPLC
COME STRUMENTO DI STUDIO
E DI CONTROLLO DI QUALITA'
IN ENOLOGIA**

**1 marzo 1991
Facoltà di Agraria
Piacenza**

ATTI

In collaborazione con:

BIO-RAD

PRESENTAZIONE

Nell'ultimo decennio, in sintonia con la ristrutturazione delle cantine, il controllo di qualità ha assunto una importanza rilevante.

I progressi realizzati in questo senso sono legati anche a nuovi mezzi di indagine capaci di cogliere aspetti compositivi non rilevabili con l'analisi chimica classica.

Per le tecniche analitiche la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) sta assumendo sempre maggiore importanza per la semplicità di impiego e per l'adattabilità ai problemi di carattere enologico.

In questo contesto si inserisce la presente pubblicazione che raccoglie le relazioni svolte al seminario organizzato dall'Istituto di Enologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, il 1° marzo 1991.

Gli argomenti trattati offrono una visione scientificamente rigorosa dei concetti basilari della cromatografia ad alta prestazione ed affrontano le principali problematiche legate al suo impiego in enologia.

Mi auguro che il quaderno possa servire da aggiornamento a chi opera nel complesso settore dell'enochimica.

Osvaldo Colagrande

Direttore dell'Istituto di Enologia
Università Cattolica Sacro Cuore
Piacenza

HPLC : ASPETTI TEORICI

Enrico SCOGLIO
BIO-RAD Laboratories

RIASSUNTO

La cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni (HPLC) è sicuramente una tra le più importanti tecniche analitiche di tipo separativo.

Rispetto alla gas-cromatografia offre il vantaggio di un più ampio range applicativo, essendo utilizzabile anche per campioni non più volatili, mentre rispetto alla cromatografia su strato sottile offre la possibilità di una totale automazione con evidenti vantaggi in termini di tempo.

In questa relazione vengono trattati alcuni aspetti teorici della cromatografia con particolare riguardo alla "HPLC".

I INTRODUZIONE

1.1 CONSIDERAZIONI GENERALI

La cromatografia è un metodo fisico di separazione nel quale le componenti della miscela da separare sono distribuite tra due differenti fasi, definite fase stazionaria e fase mobile.

La fase stazionaria, o "letto cromatografico" può essere costituita da diversi materiali quali gel di silice, allumina o addirittura carta bibula; inoltre può essere impiegata in diversi modi, ad esempio impaccata in una colonna di vetro o di acciaio di diverse dimensioni, nel qual caso viene definita cromatografia su colonna, oppure stratificata su una lastra di vetro, in questo caso prende il nome di cromatografia su strato sottile.

La fase mobile è costituita da un gas o da un liquido. Nel primo caso si parla quindi di gas-cromatografia, nel secondo di cromatografia in fase liquida. L'HPLC (high performance liquid chromatography) oggetto di questa trattazione è un particolare tipo di cromatografia in fase liquida su colonna.

La separazione cromatografica è il risultato di una serie ripetuta di interazioni tra le sostanze da separare, la fase stazionaria e la fase mobile, durante il loro cammino attraverso il letto cromatografico, trascinate dalla fase mobile stessa.

1.2 DIFFERENZE TRA GAS CROMATOGRAFIA E CROMATOGRAFIA IN FASE LIQUIDA

• Gas cromatografia •

Come già accennato nella gas-cromatografia la fase mobile è un gas inerte; perché la separazione possa avvenire, è necessario che il campione venga portato allo stato vapore, questo impone alcuni limiti, che elenchiamo di seguito con le principali caratteristiche.

- a) Questa tecnica può essere impiegata solo per campioni volatili, o per campioni che non subiscano degradazioni alle temperature di vaporizzazione.
- b) La fase stazionaria deve essere stabile ad alte temperature, questo restringe il campo di utilizzo di alcune fasi stazionarie.
- c) La fase mobile è un gas inerte, quindi non partecipa attivamente alla separazione. Il suo unico ruolo è quello di trasportare le molecole attraverso la fase stazionaria; la separazione si basa quindi esclusivamente sulle interazioni tra campione e fase stazionaria.

• Cromatografia in fase liquida •

Nella cromatografia in fase liquida la fase mobile è un liquido, e l'unica condizione richiesta è che il campione da separare sia solubile in essa; questo rappresenta un enorme vantaggio in quanto permette di analizzare un grandissimo numero di sostanze scegliendo opportunamente la fase mobile e la fase stazionaria. Anche per la cromatografia in fase liquida riassumiamo le principali caratteristiche.

- a) Il campione deve essere solubile nella fase mobile.
- b) Non presenta limiti di stabilità termica del campione in quanto le separazioni avvengono a temperatura ambiente o a temperature massime di 80-90°C.
- c) In questo tipo di cromatografia la fase mobile svolge un ruolo attivo. Ciò significa che abbiamo un'altra variabile su cui agire per migliorare la separazione.
- d) Possibilità di recuperare le frazioni separate per ulteriori indagini.

- e) Disponibilit  di un grande numero di fasi stazionarie, quindi maggiori possibilit  di ottenere buone separazioni.
- f) Enorme disponibilit  di solventi adatti come fase mobile e ovviamente possibilit  di utilizzare miscele di essi.

2 ASPETTI TEORICI

2.1 IL PICCO CROMATOGRAFICO

Durante la corsa cromatografica del campione attraverso la fase stazionaria, ad opera della fase mobile, le singole componenti vengono rallentate in funzione delle interazioni che intervengono tra: fase mobile / campione / fase stazionaria.

Questo rallentamento   selettivo, cio  diverso da sostanza a sostanza. Immaginiamo di iniettare in colonna un campione contenente un solo componente, opportunamente sciolto in 10 μ l di un solvente adatto; alla fine della corsa cromatografica, ovvero alla estremit  opposta della colonna non avremo lo stesso campione non pi  sciolto in 10 μ l ma in un volume pi  grande, ma soprattutto la sua distribuzione nella fase mobile sar  di tipo gaussiano. Questo   il motivo per cui dal punto di vista grafico, cio  che noi otteniamo come risultato della cromatografia   un picco, come riportato in fig. 1.

Il picco cromatografico non   altro che l'espressione grafica della distribuzione della concentrazione del campione in un dato volume di fase mobile, e come tale pu  essere trattato da un punto di vista statistico; in altri termini ogni picco pu  essere caratterizzato dalla propria deviazione standard, quindi la larghezza del picco in ogni punto pu  essere espressa come multiplo della deviazione standard.

Fig. 2

In genere vengono utilizzati i valori di

W_i = Larghezza del picco a 60% della sua altezza, ovvero al suo flesso; corrisponde a 2σ

W_h = Larghezza del picco a met  della sua altezza; corrisponde a $2,354\sigma$

W_b = Larghezza del picco alla base ottenuta tracciando tangenti ai punti di flesso; corrisponde a 4σ

Da un punto di visto pratico   importante cercare di mantenere il valore di s il pi  basso possibile in quanto questo significa poter contenere pi  picchi cromatografici nello stesso volume di fase mobile, quindi maggiore possibilit  di separare le diverse componenti del campione.

2.2 ALTRI PARAMETRI CHE CARATTERIZZANO IL PICCO CROMATOGRAFICO

TEMPO DI RITENZIONE

Come gi  detto in precedenza, durante il processo cromatografico le sostanze vengono rallentate nella loro corsa da interazioni selettive con la fase stazionaria. Cio  significa che per percorrere tutto il volume della colonna esse impiegheranno un tempo ben definito e caratteristico di ogni sostanza. Questo tempo   definito **tempo di ritenzione**, T_r . Consideriamo ora una sostanza che non interagisca con la fase stazionaria, una sostanza cio  che percorra la colonna cromatografica alla stessa velocit  della fase mobile. Essa avr  un tempo di ritenzione definito T_0 proporzionale al volume morto della colonna. La differenza tra $T_r - T_0 = T_r'$ viene definita **Tempo di ritenzione corretto** e rappresenta la reale entit  delle interazioni del campione con la fase stazionaria. Fig. 3

Riassumendo:

T_r = Tempo di ritenzione: tempo trascorso dalla sostanza ibncolonna. Questo tempo varia da sostanza a sostanza. Due sostanze per essere separate devono avere T_r diversi.

T_0 = Tempo di ritenzione corrispondente al volume morto o al fronte del solvente: tempo necessario alla fase mobile per percorrere tutta la colonna. Corrisponde al tempo di ritenzione di una sostanza non trattenuta dalla fase stazionaria.

$T'_r = T_r - T_0$: Tempo di ritenzione corretto

FATTORE DI CAPACITA' K'

Il tempo di ritenzione, come e' facilmente intuibile, e' dipendente dal flusso della fase mobile e dalle dimensioni della colonna cioe' dal volume morto.

E' pertanto difficile comparare tempi di ritenzione ottenuti in tempi diversi o con colonne differenti. Si e' reso pertanto necessario esprimere T_r con un parametro che non risenta di queste variabili; questo valore chiamato K' o **Fattore di capacita'** si ottiene da

$$\frac{T_r - T_0}{T_0} = K' \quad (1)$$

Essendo K' un rapporto tra tempi di ritenzione non risente delle variabili flusso e volume morto.

SELETTIVITA' O FATTORE DI SEPARAZIONE

La selettivita', α descrive in termini numerici la posizione relativa di due picchi adiacenti. Per il calcolo di α vengono utilizzati i tempi di ritenzione corretti ovvero K' nel seguente modo

$$\alpha = \frac{T'_r(B)}{T'_r(A)} = \frac{K'(B)}{K'(A)} \quad (2)$$

dove :

$T'_r(B)$ = Tempo di ritenzione corretto del picco B
 $T'_r(A)$ = " " " " " " A
 $K'(B)$ = Fattore di capacita' del picco B
 $K'(A)$ = " " " " " " A

vedi Fig. 4

Poiche' a numeratore viene posto sempre il tempo di ritenzione corretto del secondo picco, α non potra' mai assumere valori inferiori a 1. Quindi per definizione $\alpha > 1$.

Per $\alpha = 1$ si hanno picchi perfettamente sovrapposti, ovvero le due sostanze non sono separate. La selettivita' e' un parametro molto importante in quanto esprime la reale capacita' del nostro sistema FASE STAZIONARIA/FASE MOBILE di discriminare due sostanze. Se non e' soddisfacente, occorre agire sulla fase mobile o sulla fase stazionaria modificandole.

RISOLUZIONE

Il fattore di separazione o selettività α esprime la posizione relativa da due picchi adiacenti, tuttavia non fornisce informazioni reali relative all'effettiva separazione tra le due sostanze. In fig. 5 sono riportati due cromatogrammi dove i K' e α sono uguali, ma che differiscono chiaramente per quanto riguarda la RISOLUZIONE.

E' evidente che la risoluzione e' influenzata sia da T_r che dalla larghezza del picco. Per convenzione la risoluzione R viene definita come il rapporto tra la distanza dei picchi adiacenti (T_r) e la media della larghezza dei picchi alla base ovvero:

$$R = \frac{T_r}{\frac{W_{b(A)} + W_{b(B)}}{2}} = \frac{2 T_r}{W_{b(A)} + W_{b(B)}} \quad (3)$$

Se i due picchi sono vicini si puo' assumere che $W_{bA} = W_{bB}$ pertanto la (3) diventa

$$\frac{2 T_r}{2 W_b} = \frac{T_r}{W_b} \quad (4)$$

Un valore di $R > 1.5$ significa una separazione completa dei due picchi sulla linea di base, mentre con valore di $R = 1$ si ha una separazione di circa il 90% ovvero si ha una sovrapposizione dei due picchi del 10% del totale della loro area. In fig. 6 per maggiore chiarezza sono riportati i parametri che determinano la risoluzione.

EFFICIENZA E NUMERO DI PIATTI TEORICI

Appare evidente l'importanza della larghezza del picco per ottenere una buona risoluzione; larghezza del picco che puo' essere espresso in funzione della deviazione standard gaussiana. La larghezza del picco (quindi σ) e' l'espressione della capacita' della colonna di apportare effetti di diluizione minimi; cioe' di mantenere le sostanze separate, disciolte in volumi molto piccoli di fase mobile. Questa capacita' e' legata al concetto di **EFFICIENZA**. In realta' l'EFFICIENZA dal punto di vista matematico non e' legata solo a σ ma anche al Tempo di ritenzione T_r e piu' precisamente

$$N = \frac{(T_r)^2}{\sigma} \quad (5)$$

dove

N = Efficienza o numero di piatti teorici

T_r = Tempo di ritenzione

σ = Deviazione standard

L uso della seconda potenza e' dettata dal fatto che da un punto di vista statistico la misura della distribuzione non e' la deviazione standard ma la varianza (σ^2).

Dal punto di vista pratico N si calcola utilizzando una delle larghezze del picco: W_h o W_b . Sostituendo alla (5) i valori rispettivamente di W_h e W_b si ottiene

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{T_r}{W_h} \right)^2 \quad (6) \quad \text{oppure} \quad N = 16 \cdot \left(\frac{T_r}{W_b} \right)^2 \quad (7)$$

per semplicità ricordiamo che:

$$W_h = 2.354 \sigma$$

$$W_b = 4 \sigma$$

L'efficienza N viene anche definita NUMERO DI PIATTI TEORICI; il concetto di piatto teorico è utilizzato nella distillazione frazionata, dove per piatto teorico si considera il sito ove avviene il passaggio di stato liquido/vapore e viceversa, ovvero il sito dove coesistono in equilibrio i due stati fisici. Nella cromatografia i piatti sono una rappresentazione teorica degli stadi di ripartizione tra fase mobile e fase stazionaria.

Come per la distillazione frazionata, anche in cromatografia il piatto teorico ha una sua dimensione fisica, dell'ordine di pochi micron, possiamo quindi parlare tranquillamente di altezza del piatto teorico H, ovvero di altezza equivalente ad un piatto teorico: HETP. In HPLC si ottengono valori di H di circa 5-30 μm .

È evidente che tanto più grande è H tanto più piccolo è N.

$$N = \frac{L}{H} \quad (8)$$

dove: N = Efficienza o numero di piatti teorici
L = Lunghezza della colonna
H = Altezza del piatto teorico

Per aumentare N occorre pertanto aumentare la lunghezza della colonna o diminuire l'altezza del piatto teorico.

La lunghezza della colonna non può essere aumentata oltre certi limiti, in quanto provocherebbe un aumento considerevole della resistenza che la fase stazionaria offre al passaggio della fase mobile, in altri termini un aumento della contropressione, con effetti negativi sulla efficienza stessa, inoltre provocherebbe un aumento del tempo di ritenzione, fenomeno non sempre desiderabile.

ALTEZZA DEL PIATTO TEORICO, PORTATA ED EQUAZIONE DI VAN DEEMTER

L'efficienza di una colonna dipende quindi dall'altezza equivalente ad un piatto teorico (HETP) che a sua volta risente di altri parametri tra i quali la velocità lineare della fase mobile.

Van Deemter per primo mise in relazione HETP con la velocità lineare e con altri parametri caratteristici della fase stazionaria e della fase mobile in una pubblicazione del 1956: J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg:

Longitudinal diffusion and resistance mass transfer as causes of nonideality in chromatography Chemical engineering Science. 5, 271-289 (1956), alla quale si rimanda per una estesa trattazione. Riportiamo l'equazione di Van Deemter (9) e il relativo diagramma fig. 7 definito curva di van Deemter.

$$HETP = 2 \cdot dp + \frac{2D_m}{u} + \frac{2W \cdot dp^2 \cdot u}{D_m} \quad (9)$$

dove:

- dp = diametro delle particelle della fase stazionaria
- u = velocità lineare della fase mobile
- D_m = grandezza legata a caratteristiche della fase stazionaria
- W = grandezza legata alla ripartizione del soluto nella fase stazionaria

Molto spesso l'equazione di van Deemter viene semplificata nel seguente modo

$$HETP = A + B + C \quad (10)$$

dove i termini A, B e C esprimono fenomeni fisici definiti:

- A : Eddy diffusion o effetto dei cammini multipli
- B : diffusione longitudinale
- C : trasferimento di massa

Come abbiamo visto l'equazione di van Deemter fornisce indicazioni sul flusso ottimale da utilizzare per ottenere un valore di HETP più basso possibile quindi efficienza (N) più elevata. Fornisce inoltre un'altra indicazione importante, mette cioè in relazione l'altezza del piatto teorico con il diametro delle particelle della fase stazionaria. Si può notare che HETP varia con il quadrato di dp , questo è il motivo che ha spinto i ricercatori ad utilizzare particelle con diametro sempre più piccolo sino ad arrivare agli attuali $3 \mu m$.

A conclusione di questa parte teorica possiamo senz'altro affermare che le tre chiavi per una separazione cromatografica sono: EFFICIENZA (N), SELETTIVITÀ (α) e CAPACITÀ (K').

Possiamo così esprimere R (Risoluzione) alla luce dei parametri sopra definiti.

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{n} + \frac{\alpha - 1}{\alpha} + \frac{K'}{1 + K'} \quad (11)$$

Questa equazione riveste una importanza notevole in quanto consente una valutazione più analitica del risultato cromatografico, condizione indispensabile per poter agire efficacemente al fine di un miglioramento della separazione.

Oltre ai parametri sin qui presi in considerazione, altri sono i fattori che possono influenzare la risoluzione e che per semplicità di trattazione non vengono approfonditi. È utile comunque citarli, almeno in modo schematico; la tab. 1 riporta i principali fattori che influenzano K' , α ed N.

3 LA COLONNA CROMATOGRAFICA - CARATTERISTICHE FISICHE

Dopo aver trattato gli aspetti teorici della cromatografia, ritengo sia necessario soffermarsi brevemente a parlare delle caratteristiche fisiche della colonna e dei relativi riempimenti, e di come queste possono influenzarne le prestazioni.

3.1 DIMENSIONI FISICHE DELLA COLONNA

La colonna per HPLC è sostanzialmente un tubo di acciaio riempito di fase stazionaria. Come tale è caratterizzato da una lunghezza e da un diametro interno.

Per quanto riguarda la lunghezza, nel capitolo precedente abbiamo visto che l'efficienza ovvero N è proporzionale alla lunghezza vedi equazione (8). Però come è già stato detto la lunghezza della colonna non può essere aumentata oltre certi limiti in quanto la contropressione generata è direttamente proporzionale alla lunghezza.

$$P = \frac{F \cdot \eta \cdot L}{\pi \cdot r^2 \cdot dp^2} \quad (12)$$

dove

P = Pressione

η = Viscosita' della fase mobile

F = Flusso della fase mobile

L = Lunghezza della colonna

r = raggio della colonna

dp = diametro delle particelle di fase stazionaria

La pressione P e' generata dalla resistenza che la fase stazionaria offre al passaggio della fase mobile. In altri termini il valore P e' la pressione che occorre applicare alla fase mobile perche' possa defluire attraverso la fase stazionaria; questo e' il motivo per cui in HPLC viene utilizzata una pompa per alta pressione. La pressione e' massima all'inizio della colonna mentre e' pressoché nulla alla fine, cio' significa che lungo la colonna si ha una caduta di pressione, per questo a volte il valore P viene indicato come ΔP , cioe' differenza di pressione ai due estremi della colonna.

La lunghezza tipica di una colonna per HPLC varia da 10 a 25 cm, ovviamente colonne piu' lunghe, a parita' di condizioni, daranno efficienze piu' elevate. In genere la lunghezza della colonna viene scelta in funzione di un altro parametro: dp (diametro delle particelle). In genere colonne con dp di $\approx 3 \mu m$ hanno una lunghezza di 10-15 cm, mentre diametri delle particelle di 5-10 μm sono compatibili con lunghezze di 15-25 cm.

Dall'equazione (12) e' evidente la dipendenza della pressione dall'altra dimensione della colonna: il raggio.

Piu' precisamente P e' funzione dell'area della sezione della colonna quindi di πr^2 .

Questo e' evidente in quanto a parita' di flusso della fase mobile, (espresso in ml/min), la sua velocita' lineare (avanzamento lungo la colonna) e' inversamente proporzionale all'area della sezione. Poiche' all'aumentare del raggio la velocita' lineare diminuisce proporzionalmente con il suo quadrato, e' evidente che si avra' un aumento di HETP cioe' diminuzione di efficienza (si veda la curva di Van Deemter).

Ad un aumento del raggio della colonna, deve pertanto corrispondere un aumento del flusso della fase mobile al fine di mantenere costante la velocita' lineare.

3.2 CARATTERISTICHE FISICHE DELLA FASE STAZIONARIA

Dal punto di vista fisico le fasi stazionarie per HPLC, sono costituite da particelle di materiale diverso (silice o polimeri sintetici) di dimensioni variabili da 3 a 10 μm . Inoltre queste particelle possono essere totalmente porose con pori di diverse dimensioni variabili da 60 Å sino a 1000 Å, oppure pellicolari dove solo uno strato esterno sottilissimo e' poroso mentre il "cuore" della particella non presenta pori. Un'altra caratteristica fisica delle particelle di fase stazionaria e' la sua "forma", essa puo' essere irregolare o sferica.

Analizziamo brevemente ognuna di queste caratteristiche

• Diametro delle particelle

Abbiamo gia' visto la relazione tra HETP e diametro delle particelle dp. L'equazione (9) ci dice che l'altezza del piatto teorico varia con il quadrato di dp; questo significa che una colonna con

impaccamento da 5 μm avra' una efficienza quattro volte piu' grande di una colonna da 10 μm .

Anche la pressione pero' sara' di quattro volte piu' elevata (12), si dovranno pertanto utilizzare flussi notevolmente ridotti.

In merito alle dimensioni delle particelle occorre aggiungere che e' di estrema importanza anche la distribuzione del diametro; in altri termini lo scostamento dal diametro medio. Tanto piu' uniforme e' il diametro delle particelle, tanto piu' elevata sara' l'efficienza. Questo e' legato al termine A della equazione di Van Deemter nella sua forma semplificata (10) cioe' alla "Eddy diffusion".

- **Porosita' e diametro dei pori**

La porosita' della fase stazionaria ne determina la "capacita' di carico" riferita al campione, in quanto questa e' funzione dell'area superficiale della fase stessa.

Fasi stazionarie con pori di dimensioni elevate presentano pero' lo svantaggio di avere un elevato "volume morto" (volume della colonna non occupato dalla fase stazionaria) ed il volume morto incide negativamente sulla efficienza.

La porosita' della colonna va scelta in funzione delle dimensioni delle molecole del campione ed in buona approssimazione, del suo peso molecolare. In genere si assume che molecole con pesi molecolari sino a 2000 possono essere separate con fasi con pori di 60-90 Å; pesi molecolari superiori richiedono pori proporzionalmente piu' grandi. E' possibile utilizzare riempimenti definiti pellicolari, in questo caso la "capacita' del carico" e' di molto diminuita, si ha pero' il vantaggio di separazioni molto veloci.

- **Forma delle particelle**

Come abbiamo gia' accennato le particelle di fase stazionaria possono essere di forma irregolare o sferica.

Le particelle di forma sferica consentono un impaccamento piu' uniforme, riducendo cosi' l'effetto dei cammini multipli o "Eddy diffusion".

Ne deriva una diminuzione del termine A dell'equazione (10) con conseguente riduzione di HETP.

FIGURA 1

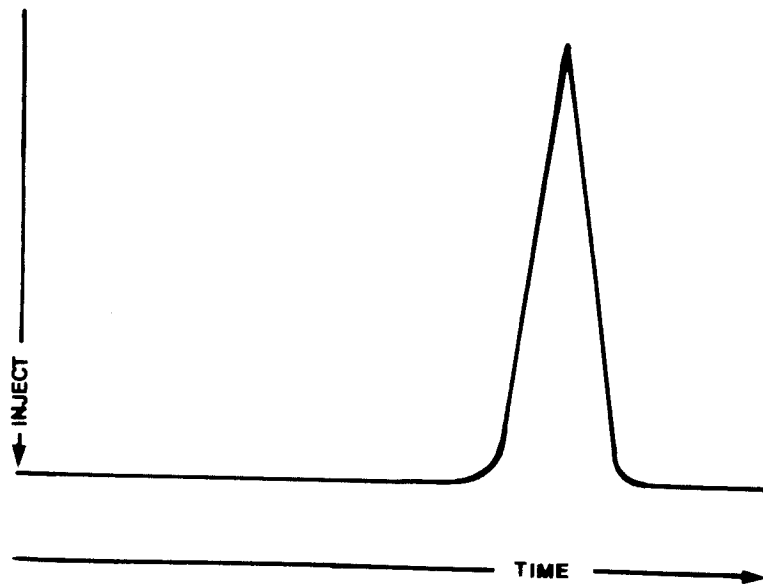


FIGURA 2

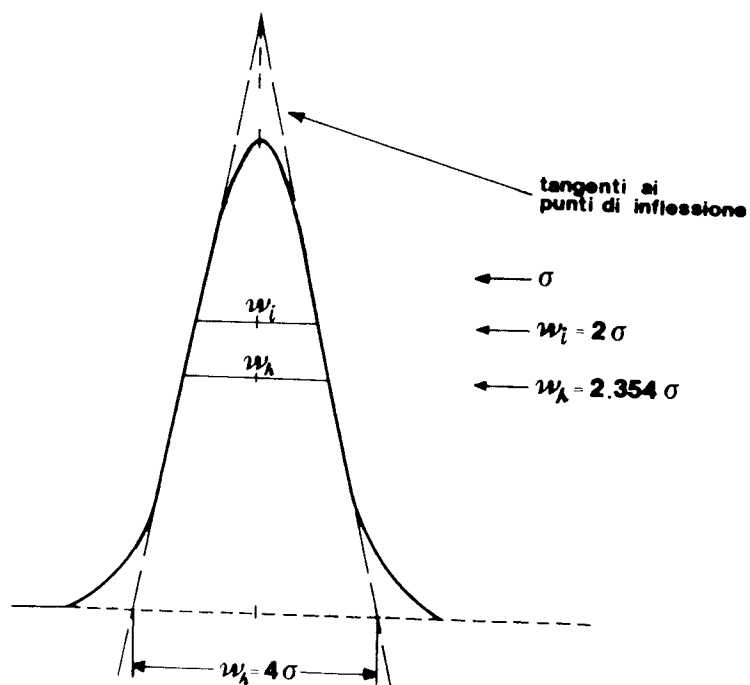


FIGURA 3

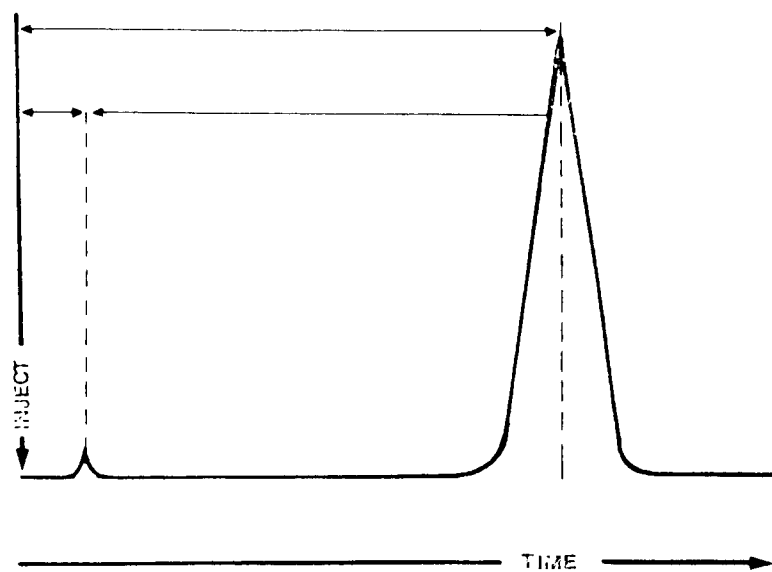


FIGURA 4

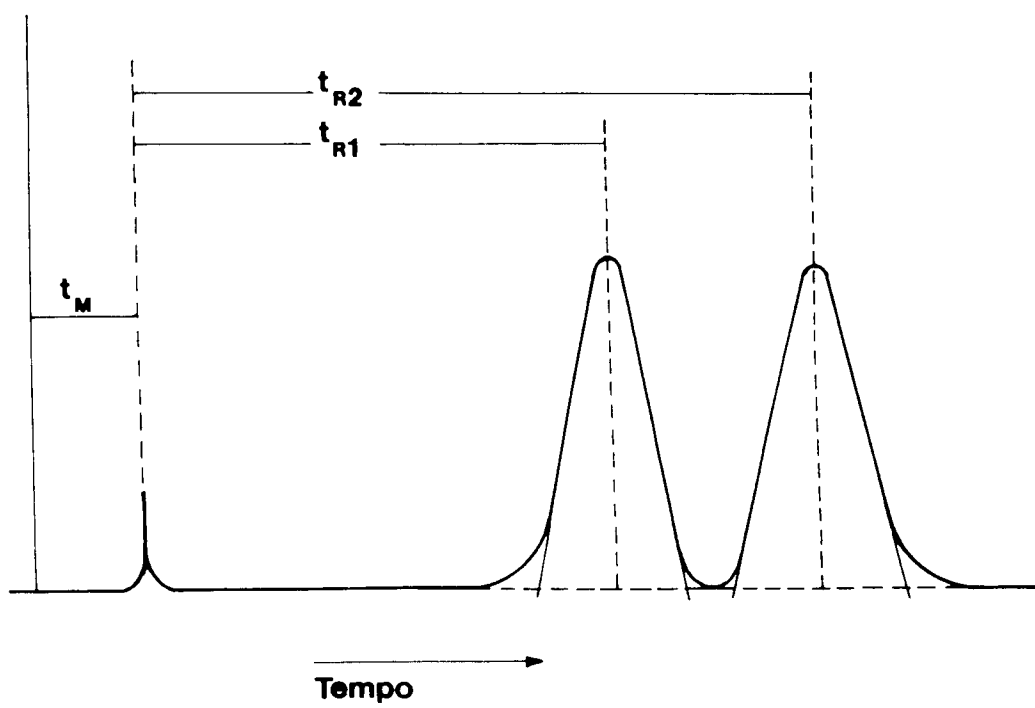


FIGURA 5

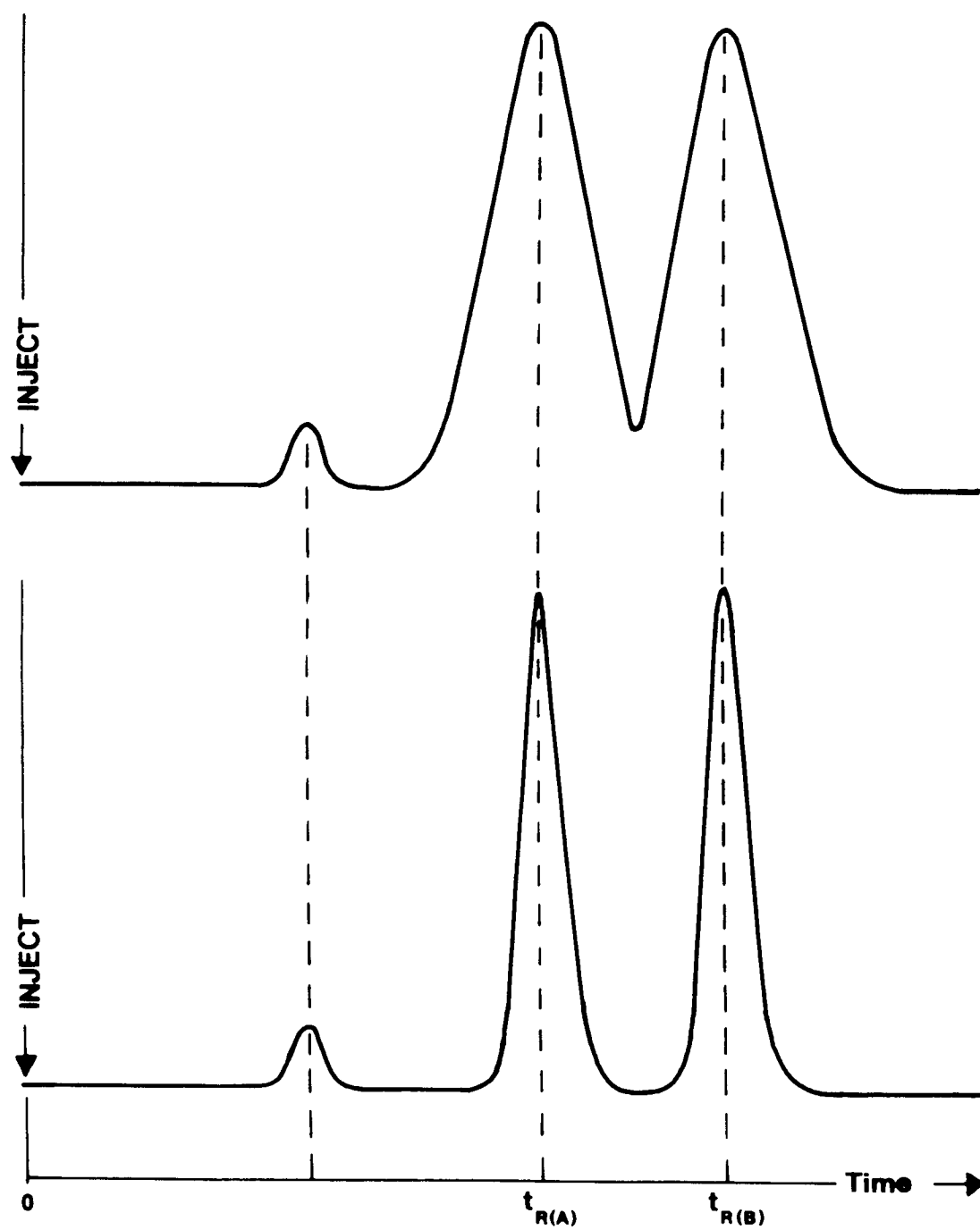


FIGURA 6

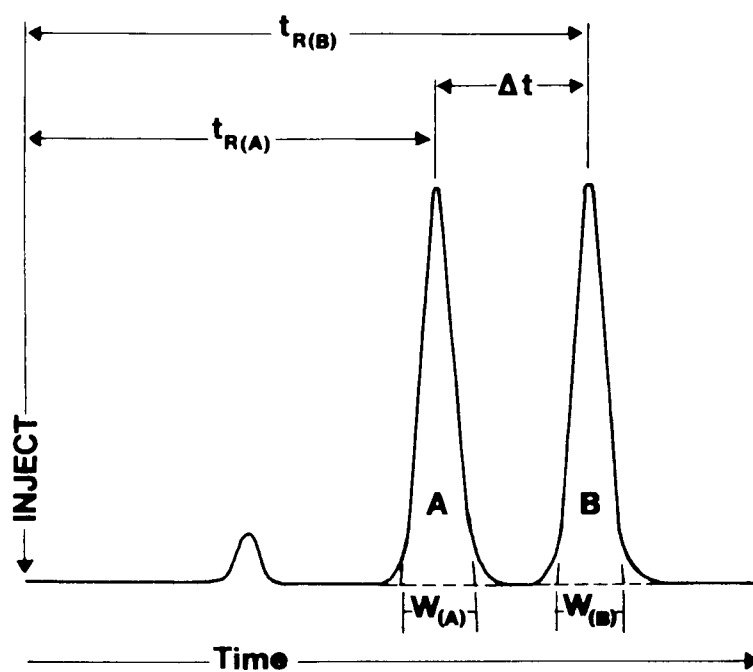
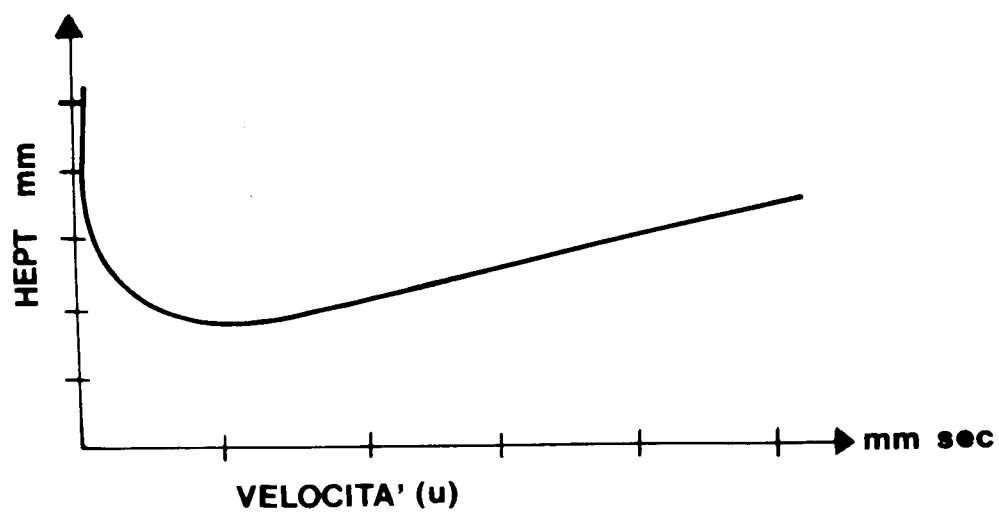


FIGURA 7



PARAMETRI CHE INFLUENZANO LA RISOLUZIONE

FASE MOBILE	K'	α	N
Potere eluotropo	+	+	0
Polarità	+	+	0
PH	+	+	0
Velocità lineare	0	0	+
Viscosità	0	0	+
FASE STAZIONARIA			
Forza di ritenzione	+	+	0
Polarità	+	+	+
DIMENSIONI COLONNA			
Dimensioni	0	0	+
Diametro	0	0	0
TEMPERATURA COLONNA	+	+	+
AMMONTARE CAMPIONE	(+)	(+)	(+)
VOLUME EXTRACOLONNA	0	0	+

+ = Influenza (positiva o negativa)
 0 = Nessuna Influenza

ESPERIENZE DI IMPIEGO DELLA TECNICA HPLC PRESSO I LABORATORI DELL'ISTITUTO DI ENOLOGIA

Angela SILVA, Cristina PIZZAROTTI
**(Istituto di Enologia, Facoltà di Agraria - Università
Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza)**

RIASSUNTO

La tecnica HPLC è impiegata presso i laboratori dell'Istituto di Enologia dall'anno 1980. L'attività svolta consiste essenzialmente nella messa a punto di metodologie che consentano di determinare componenti importanti dal punto di vista tecnologico e qualitativo e di seguire la loro evoluzione durante alcuni processi di preparazione del vino, quali, ad esempio, la macerazione e la spumantizzazione.

Le tecniche di separazione impiegate sono principalmente la cromatografia a fase inversa, la cromatografia ionica e la cromatografia di esclusione molecolare. I sistemi di rivelazione utilizzati sono quelli classici, cioè la spettrofotometria UV-visibile, la spettrofluorimetria e l'indice di rifrazione.

Nel presente lavoro vengono illustrati i metodi per la determinazione delle antocianine, degli amminoacidi, dell'acido sorbico, dell'istamina e degli acidi organici. Vengono inoltre riportati alcuni esempi di applicazione della cromatografia di esclusione per la separazione di macromolecole.

INTRODUZIONE

La cromatografia liquida ad alta prestazione è impiegata presso i laboratori dell'Istituto di Enologia dall'anno 1980. L'attività svolta consiste essenzialmente nello sviluppo di metodologie che permettano di separare e dosare componenti importanti dal punto di vista tecnologico e qualitativo e di seguire la loro evoluzione durante alcuni processi di preparazione del vino, quali, ad esempio, la macerazione e la spumantizzazione. Ultimamente particolare attenzione è stata dedicata alla possibilità di utilizzare l'HPLC per il controllo di additivi e per valutare l'evoluzione di macromolecole durante alcuni processi biologici e fisici.

Alcuni dei metodi messi a punto possono essere utilizzati nella normale pratica di laboratorio.

Le tecniche di separazione impiegate sono principalmente la cromatografia a fase inversa, la cromatografia ionica e a coppia ionica, la cromatografia di esclusione molecolare. Le linee cromatografiche impiegate sono due. Una linea è costituita da un cromatografo a doppia pompa collegato con un campionatore automatico, con rivelatori uv-visibile e spettrofluorimetrico e con un integratore per l'elaborazione dei dati (ditta Perkin-Elmer). L'altra linea è costituita da un cromatografo a doppia pompa, da rivelatori uv-visibile e ad indice di rifrazione (ditta Bio-Rad). Il sistema è gestito da personal computer che serve anche per l'elaborazione dei dati. Nella seconda linea è inserito anche un termostato che viene utilizzato, quando è necessario mantenere la colonna a temperatura controllata e costante. Il controllo della temperatura è fondamentale, soprattutto se si opera ad elevate temperature, per garantire la riproducibilità della separazione e quindi anche dei risultati.

Nel presente lavoro vengono illustrati i metodi messi a punto per la determinazione delle antocianine, degli amminoacidi, dell'acido sorbico, dell'istamina e degli acidi organici. Vengono inoltre riportati alcuni esempi di applicazione di cromatografia di esclusione per la separazione di macromolecole.

CROMATOGRAFIA A FASE INVERSA

Nella cromatografia a fase inversa vengono comunemente utilizzate le fasi legate alchiliche e feniliche con fasi mobili polari e il meccanismo di separazione è probabilmente il risultato di tre meccanismi, cioè adsorbimento, ripartizione e tensione superficiale. Questa tecnica è certamente la più sfruttata, in quanto può essere utilizzata per la separazione di numerose classi di sostanze. Presso il nostro laboratorio con la cromatografia a fase inversa vengono determinati gli antociani, gli amminoacidi, l'acido sorbico e l'istamina.

1) Antocianine

La valutazione dei composti coloranti dei mosti e dei vini (antocianine, flavonoli e flavanoli), coinvolti nei processi di macerazione e nei fenomeni d'instabilità, richiede metodi analitici sensibili e specifici, caratteristiche non possedute dalle metodiche colorimetriche comunemente impiegate che, tra l'altro, danno solo degli indici globali delle diverse classi dei componenti fenolici. L'applicazione della tecnica HPLC con l'utilizzo di colonne a fase inversa e con sistemi di rivelazione UV-visibile (1) e ultimamente con rivelazione elettrochimica (2) ha dato notevole impulso allo studio dei composti coloranti ed è prevedibile che questa tecnica possa consentire di verificare e seguire reazioni chimiche di idrolisi, di ossidazione e di polimerizzazione che coinvolgono i flavonoidi e che sono alla base delle modificazioni di colore e di gusto dei vini durante il loro iter preparativo.

Attualmente i componenti più studiati e conosciuti sono le antocianine; con la tecnica HPLC sono state separate e dosate le cinque antocianidine-3-monoglucosidi e in parte le antocianine esterificate con acidi organici (1).

Nel 1983 presso i nostri laboratori è stato messo a punto un metodo HPLC per la separazione ed il dosaggio delle cinque antocianidine-3-monoglucoside (delfinidina-, cianidina-, petunidina-, peonidina- e malvidina-3-monoglucoside) (1,3).

Prima dell'analisi cromatografica i campioni (bucce, mosto, vino) sono stati trattati come segue (fig.1):

- bucce

1 g di bucce liofilizzate è omogeneizzato con due frazioni successive da 25 ml l'una di una soluzione contenente metanolo/acqua/acido formico (49/49/2 v/v). Le due frazioni riunite sono centrifugate per circa 7 minuti a 5000 giri/min. Dal surnatante vengono prelevati 10 ml, concentrati fino a circa 5 ml con evaporatore rotante a 30 °C sotto vuoto per eliminare l'alcool presente e purificati mediante cartuccia Sep-Pak C18. I pigmenti eluiti con 8 ml della soluzione metanolo/acqua/acido formico sono concentrati sotto vuoto, ripresi con 2 ml della stessa miscela e filtrati su filtri da 0.45 µm.

- mosti e vini

I campioni di mosto e di vino, dopo concentrazione sotto vuoto con evaporatore rotante, sono purificati seguendo lo stesso procedimento utilizzato per la soluzione metanolica dell'estratto delle bucce. Il volume iniziale per i mosti è di 4 ml, mentre per i vini è di 10 ml.

Per l'analisi cromatografica viene utilizzata una colonna a fase inversa C18 con riempimento da 5 μ m, operando in gradiente di solvente. Le condizioni di analisi sono illustrate schematicamente nella figura 2. In figura 3 sono riportati, a titolo di esempio, due cromatogrammi che mostrano la separazione mediante HPLC delle cinque antocianine determinate in un mosto e in un vino. La separazione dei cinque componenti avviene in circa 10 minuti.

Le concentrazioni delle diverse antocianine presenti sono espresse in mg di malvidina-3-monoglucoside per litro e sono calcolate mediante una curva di taratura, il cui coefficiente di correlazione è pari a 0.9998. La malvidina-3-monoglucoside, sciolta in una soluzione costituita da metanolo/acqua/acido formico (49/49/2 v/v) viene impiegata per la preparazione di soluzioni standard di concentrazioni variabili da 50 a 800 mg/l.

L'affidabilità del metodo è stata valutata, verificando i seguenti parametri:

- recupero che è pari al 93%;
- ripetibilità dei risultati: la deviazione standard relativa è del 6%.

La messa a punto del metodo ci ha permesso di seguire l'andamento delle cinque antocianine durante la macerazione, la fermentazione e la conservazione, di valutare la distribuzione delle singole antocianine nelle tre varietà di uva (Barbera, Croatina e Uva rara), che compongono il vino Rosso Oltrepò Pavese, e di dare indicazioni sulla percentuale di estrazione, riferita alla composizione teorica del mosto in caso di un'estrazione completa degli antociani dalle bucce, durante la fase di macerazione (3,4).

2) Aminoacidi liberi

Nell'ambito di nostre ricerche sull'evoluzione dei componenti azotati durante la spumantizzazione, si è presentata la necessità di determinare quantitativamente gli amminoacidi presenti in vini spumanti. Abbiamo pertanto messo a punto un metodo per la determinazione degli amminoacidi mediante cromatografia liquida ad alta pressione (1,5), modificando la procedura riportata da Schmidt e altri (6). La metodologia consente di eseguire le analisi in tempi relativamente brevi e presenta limiti di rivelabilità molto buoni, perchè viene utilizzato come rivelatore uno spettrofluorimetro.

Per rendere fluorescenti i composti amminoacidi viene utilizzato, tra i diversi reattivi riportati in letteratura, il dansil (5-dimetilaminonaftalensulfonil) cloruro che permette la determinazione degli amminoacidi a livelli di concentrazione dell'ordine delle nanomoli.

La reazione di dansilazione avviene nel modo riportato di seguito.

Dansilazione

- soluzione standard di amminoacidi ottenuta sciogliendo gli amminoacidi in HCl 0,01N per avere una concentrazione di 0,2 mmol/l di ciascun composto; come standard interno è utilizzata la norleucina alla concentrazione di 5 mmol/l.
- Tampone a pH 10, costituito da una soluzione di sodio bicarbonato 0,1 M portata al pH voluto mediante NaOH 0,5 M.
- Dansil cloruro: la soluzione di lavoro è preparata, fresca ogni giorno, per diluizione di 0,1 ml di soluzione concentrata (100 g/l) a 8 ml con acetone.

200 μ l di standard posti in un vial da 3ml sono evaporati fino a secchezza. Al residuo si aggiungono 360 μ l di tampone a pH 10 e 900 μ l di soluzione di lavoro di dansilcloruro. Il vial, chiuso, è agitato e tenuto a 100 °C per 4 minuti. Dopo raffreddamento la soluzione è portata a 2000 μ l con i solventi della fase mobile (50:50 v/v).

Con la stessa procedura viene effettuata la dansilazione dei campioni di vino, addizionati preventivamente di 20 μ l di soluzione di norleucina.

Poichè il dansil cloruro ha la proprietà di reagire, oltre che con i gruppi aminici primari e secondari, con i fenoli, è necessario stabilire il pH a cui gli amminoacidi subiscono la dansilazione in modo selettivo. Con prove preliminari abbiamo potuto accertare che la reazione deve avvenire a pH 10.

L'analisi cromatografica viene fatta utilizzando una colonna a fase inversa C8 con riempimento da 10 μ m e operando in gradiente di solvente. Le condizioni di analisi sono illustrate schematicamente nella figura 4.

Gli stadi del gradiente sono cinque, di cui il terzo con comportamento non lineare. Sommando i tempi relativi alla durata di ogni singolo stadio, si osserva che la separazione degli amminoacidi viene effettuata in 52 minuti; inoltre tra un'analisi e la successiva intercorrono 15 minuti per equilibrare la colonna con la composizione iniziale della fase mobile.

In figura 5 è riportato un cromatogramma ottenuto per iniezione di un vino spumante. Gli acidi aspartico e glutammico danno luogo ad un unico picco denominato con il simbolo ASP. Non siamo riusciti ad ottenere la separazione dei due amminoacidi probabilmente perchè nelle condizioni operative impiegate manifestano comportamento chimico-fisico simile.

Per quanto concerne i tempi di ritenzione assoluti e quelli calcolati relativamente alla norleucina (standard interno) (tab.1), sperimentalmente si è notata una sensibile variazione dei tempi di ritenzione assoluta, in dipendenza del numero di analisi effettuate con la stessa colonna, mentre si è potuto constatare una buona ripetibilità dei tempi di ritenzione relativi (i coefficienti di variabilità sono compresi nell'intervallo 0,455 - 3,475%). I problemi connessi con la ripetibilità dei tempi di ritenzione sono in buona parte risolti mediante un controllo accurato del pH della fase mobile (pH della soluzione B = 2,20).

I dati sulla precisione del metodo sono riportati in tabella 2. Le determinazioni sono state fatte su otto aliquote, indipendentemente dansilate, di uno stesso campione. Come si può notare RSD % (deviazione standard relativa) è compresa tra 1,53% per la glicina e 6,75% per l'istidina.

Per verificare la risposta strumentale a diverse concentrazioni degli amminoacidi si sono costruite rette di taratura e si è calcolato il coefficiente di correlazione. Nella figura 6 sono riportate le curve di taratura per la valina e l'alanina per concentrazioni variabili da 0,5 a 2,0 nanomoli/l; i coefficienti di correlazione sono rispettivamente di 0,9996 per la valina e di 0,9995 per l'alanina.

La metodica si è dunque rivelata valida per il dosaggio degli amminoacidi liberi nei vini e presenta notevoli vantaggi rispetto alla tecnica tradizionale dell'aminoanalyser che richiede tempi più lunghi.

3) Acido sorbico

L'acido sorbico, acido 2,4-esadienoico, un antisettico utilizzato spesso in abbinamento con l'anidride solforosa, viene comunemente determinato mediante metodi spettrofotometrici, che prevedono il pretrattamento del campione e quindi allungano i tempi di analisi (7,8).

Presso il nostro istituto abbiamo messo a punto un metodo semplice e rapido che consente il dosaggio dell'acido sorbico, previa una semplice diluizione del vino.

Per l'analisi viene utilizzata una colonna a fase inversa C18 e l'eluato è monitorato a $\lambda = 256$ nm. Data l'alta assorbanza dell'acido sorbico a questa lunghezza d'onda, l'interferenza dovuta ad altri componenti è trascurabile. Nella figura 7 sono illustrate le condizioni operative e la risposta di soluzioni standard a concentrazioni differenti di acido sorbico. Come si può osservare la determinazione è completata in meno di 4 minuti e la concentrazione è calcolata mediante una curva di taratura costruita con soluzioni standards con concentrazioni di acido sorbico variabili da 1 a 20 ppm; il coefficiente di correlazione è pari a 0,99926.

Nella figura 8 è riportato un cromatogramma di un vino, addizionato di acido sorbico nella concentrazione di 200 ppm e diluito in modo da avere 5 e 20 ppm di acido sorbico.

In ambedue i casi (40 diluizioni e 10 diluizione) non esistono interferenze e la risposta è accurata. I risultati ottenuti iniettando per cinque volte lo stesso campione di vino confermano la bontà del metodo; la deviazione standard relativa è infatti del 2%.

4) Istamina

Il controllo dell'istamina, composto facente parte del gruppo delle ammine biogene, nel vino ha assunto qualche anno fa un'importanza rilevante, data la sua potenziale tossicità per l'organismo umano. Anche il nostro Istituto ha recepito questa esigenza e abbiamo condotto un'indagine tra i possibili metodi che potevano essere utilizzati per la determinazione di questo composto (9).

Le metodiche comunemente impiegate per le ammine prevedono l'isolamento e la separazione mediante cromatografia a scambio ionico, cromatografia su strato sottile, cromatografia liquida ad alta pressione e determinazione quantitativa mediante colorimetria o fluorimetria (1,9).

Il metodo da noi messo a punto per l'analisi dell'istamina nei vini prevede la purificazione del campione mediante cromatografia a scambio ionico e l'analisi mediante cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelazione spettrofluorimetrica, dopo derivatizzazione con fluoescamina (9). La fluoescamina, composto non fluorescente, reagisce in ambiente basico con l'istamina molto velocemente, dando origine ad un composto fluoroforo e questo procedimento presenta un'elevata sensibilità.

La metodica fa riferimento alla procedura applicata per la prima volta all'analisi del plasma da Gaetani e coll (10).

PRETRATTAMENTO DEI CAMPIONI DI VINO

2 ml di vino, portato a pH 6,5 con NaOH 1N, sono diluiti a 5 ml con tampone sodio fosfato 0,1 M pH 6,5.

La purificazione è fatta per eluizione su colonna a scambio cationico Dowex 50 W-X8, 200-400 mesh (2x0,3 cm) preparata in forma H⁺ con il passaggio di HCl 2N, lavata con acqua distillata ed equilibrata al momento dell'analisi con il tampone sodio fosfato 0,1 M pH 6,5.

L'eluato contenente l'istamina, acido per HCl 4N, è reso alcalino per aggiunta di Na₂CO₃ solido. Successivamente a 500 µl di questa soluzione sono aggiunti 500 µl di H₂O distillata e 500 µl di soluzione di fluoescamina (1,0 mg/ml in acetone).

La stessa procedura viene applicata alle soluzioni standard di istamina.

La separazione è effettuata su colonna a fase inversa C8 con fase mobile costituita da acetonitrile e tampone sodiofosfato contenente tetrabutylammonio bromuro, secondo le condizioni illustrate in figura 9. L'aggiunta alla fase mobile di tetrabutylammonio bromuro, come controione, è necessaria in quanto nelle reazioni tra le ammine primarie e la fluoescamina si formano derivati carbossilici.

La rivelazione è fatta mediante uno spettrofluorimetro posizionato su una λ eccitazione = 390 nm e su una λ emissione = 475 nm.

Nella figura 10 sono riportati, come esempio, i cromatogrammi ottenuti per iniezione di una soluzione standard di istamina (A) e di un campione di vino (B).

Per verificare la risposta strumentale e per dosare l'istamina si sono costruite due rette di taratura per intervalli di concentrazione da 0,1 a 2 mg/l e da 1 a 10 mg/l; la prima retta presenta coefficiente di correlazione di 0,9908, la seconda di 0,9988.

La metodica ci ha permesso di verificare che nella maggior parte dei vini esaminati l'istamina è assente o presente in concentrazioni inferiori ai limiti precauzionali consigliati (9).

CROMATOGRAFIA IONICA

La cromatografia ionica viene utilizzata presso il nostro laboratorio per la determinazione degli acidi organici ed in particolare viene usata una colonna Aminex HPX87H (Bio-Rad), che sfrutta un meccanismo di scambio ionico e di esclusione di ioni. L'acido solforico 0,03 N viene usato come eluente e la rivelazione viene fatta mediante spettrofotometro a λ = 210 nm.

Nell'analisi degli acidi organici per HPLC mediante questo sistema le maggiori interferenze sono legate alla presenza dei composti coloranti, in modo particolare le antocianine, e degli zuccheri, soprattutto se si utilizza come rivelatore l'indice di rifrazione. Nel caso della rivelazione spettrofotometrica l'interferenza è apprezzabile nel caso di mosti e di vini dolci, mentre è trascurabile per tutti gli altri vini, dato che gli zuccheri hanno un massimo di assorbimento ad una lunghezza d'onda inferiore ai 200 nm.

Per i mosti e i vini dolci è quindi necessario fare un pretrattamento, come consigliato da McCord (11) (mosto o vino portato a pH 9-10, passaggio di 2 ml del campione su colonna a scambio anionico Bio-Rex 5, eluizione della frazione acida con 2 ml di acido solforico al 10% e poi con 10 ml di acqua con la raccolta dei primi 10 ml) oppure modificare la concentrazione dell'eluente come suggerito da Schneider e Gerbi (12) per separare il fruttosio dall'acido malico.

Per ridurre l'incidenza dei componenti coloranti, le nostre prove di laboratorio ci hanno permesso di verificare che per i vini bianchi è sufficiente diluire il campione due volte, mentre nel caso dei vini rossi bisogna intervenire con quantità determinate di carbone.

Prove preliminari hanno consigliato di usare quantità di carbone non superiori a 1g/100 ml di vino per evitare perdite differenziate dei singoli acidi organici.

Le prove preliminari di pretrattamento del campione hanno inoltre evidenziato che la purificazione del campione con cartucce Sep-Pak C18 riduce notevolmente l'interferenza dei composti coloranti ma comporta una diluizione del campione che non permette una buona precisione nella determinazione di acidi organici che sono presenti in bassa concentrazione, quali acido piruvico, acido citrico e soprattutto acido acetico.

Per quanto riguarda le condizioni cromatografiche, le prove effettuate su soluzioni standard e su vini a temperature comprese tra 20 e 65 °C e con eluente acido solforico di concentrazione variabile da 0,003 a 0,03 N hanno evidenziato che le condizioni di analisi migliori sono quelle illustrate in figura 11 e precisamente: temperatura 60 °C, eluente H₂SO₄ 0,03 N, flusso 0,8 ml/min.

Durante l'analisi il rivelatore UV-visibile è collegato al rivelatore ad indice di rifrazione, allo scopo di controllare l'eventuale interferenza di zuccheri o alcoli, data l'alta risposta di questi composti al rifrattometro.

Nelle figure 12 e 13 sono riportati un cromatogramma di una soluzione standard, di un vino rosso, diluito 2 volte e trattato con carbone, e di un vino bianco diluito 2 volte. Va rilevato che non è stato possibile separare l'acido succinico dall'acido shikimico, anche variando la concentrazione dell'eluente e la temperatura e perciò il metodo non permette di dosare questo acido. Per ottenere la separazione dell'acido tartarico dall'acido α -chetoglutarico e dell'acido piruvico dall'acido malico si è dovuto utilizzare una concentrazione di acido solforico pari a 0,03N. L'acido piruvico, in particolare, può essere causa di interferenze soprattutto quando l'acido malico è presente in bassa concentrazione.

Per il dosaggio dei singoli acidi viene utilizzato il metodo dello standard interno, che è rappresentato dall'acido formico (1 g/l), composto normalmente assente nei vini. Nella calibrazione del metodo con la soluzione standard bisogna controllare che l'acido formico sia separato dall'acido fumarico, che è presente come impurezza nell'acido malico di grado analitico. In alternativa si può calcolare il fattore di risposta dell'acido malico separatamente dagli altri acidi organici, iniettando una soluzione contenente solamente acido malico ed acido formico. In ogni caso conviene controllare se l'area dello standard interno è ripetibile per evitare errori nel dosaggio.

Per verificare la risposta strumentale a diverse concentrazioni dei singoli acidi organici si sono costruite rette di taratura. In figura 14 è riportata, come esempio, la retta di taratura per l'acido tartarico. Nella stessa figura sono riportati i coefficienti di correlazione per gli altri acidi organici esaminati. Si può notare la buona linearità per gli intervalli di concentrazione considerati.

Il confronto tra il metodo HPLC e altri metodi di determinazione (enzimatici per acido citrico, malico e lattico, colorimetrico per acido tartarico e titolazione acido-base dopo distillazione per l'acido acetico) è illustrato in tabella 3. I dati dei due metodi sono in buon accordo per la maggior parte degli acidi organici. Nel caso dell'acido acetico le differenze sono più marcate, in quanto all'acidità volatile del vino contribuiscono altri acidi organici volatili che, data la loro concentrazione, non inficiano la determinazione dell'acidità volatile ma fanno sì che i valori ottenuti per HPLC siano più bassi.

Nel caso dell'acido lattico il confronto va fatto tra il valore HPLC e i dati ottenuti dalla determinazione dell'acido lattico totale (L-lattico + D-lattico).

Per quanto concerne i dati sulla precisione del metodo, le determinazioni fatte su 4 replicati dello stesso campione hanno mostrato una RSD% inferiore al 3% per l'acido tartarico, malico e lattico, 5% per acido citrico e 6% per l'acido acetico.

La metodica può quindi essere utilizzata per il dosaggio dei principali acidi organici del vino.

CROMATOGRAFIA DI ESCLUSIONE

Questa tecnica, che permette la separazione dei componenti in relazione al loro volume idrodinamico proporzionale in molti casi al peso molecolare, si è sempre più sviluppata in questi ultimi anni per lo studio di macromolecole, in alternativa alla cromatografia a bassa pressione. In campo enologico è stata utilizzata da alcuni ricercatori per la separazione e la valutazione del peso molecolare di proteine e polisaccaridi, componenti importanti per la stabilità del vino (13,14).

Presso il nostro laboratorio questa tecnica è stata applicata per controllare le modificazioni nel tempo della gomma arabica, polisaccaride impiegato per il mantenimento della limpidezza dei vini (15).

Per le prime indagini è stata utilizzata una colonna Progel-TSK vinilpolimero (Supelco) in grado di separare componenti in un ampio spettro di pesi molecolari, con fase mobile costituita da acqua addizionata di sodio azide allo 0,05% e un rivelatore ad indice di rifrazione.

Una curva di calibrazione è stata fatta con soluzioni standard di destrano, T-2000 (MW = 2 000 000), T-500 (MW = 500 000), T-70 (MW = 70 000) e T-40 (MW = 40 000). I tempi di ritenzione dei destrani con peso molecolare da 2000000 a 40000 variano da 7,04 a 8,96 minuti, come si può osservare dalla figura 15, in cui è riportato il cromatogramma dei composti T-2000 e T-40.

L'indagine effettuata sulla gomma arabica ci ha permesso di mettere in evidenza che questo polisaccaride, appena messo in soluzione, dà origine ad un unico picco composto da sostanze con un peso molecolare medio vicino a 500000 (figura 16). La conservazione di questo polisaccaride in soluzione acida per acido citrico e per SO₂ comporta nel tempo una modificazione del cromatogramma fino alla scomparsa del picco principale ed alla comparsa di picchi a tempo di ritenzione superiore e dovuti a sostanze o gruppi di sostanze con peso molecolare inferiore.

L'applicazione della cromatografia ad esclusione ci ha inoltre consentito di verificare che il processo di idrolisi può essere innescato al momento della preparazione della gomma arabica, se questo polisaccaride viene trattato con soluzioni acquose acide ad elevate temperature, al fine di diminuirne la viscosità in vista dei processi di purificazione.

Nell'ambito di nostre ricerche sulle sostanze macromolecolari, abbiamo utilizzato la cromatografia ad esclusione per studiare il comportamento dei polisaccaridi di mosti e dei vini durante alcuni processi biologici e fisici, impiegando anche colonne con intervalli di separazione di peso molecolare più ristretti e quindi più selettive.

Una prima applicazione è stata fatta per studiare il comportamento delle glicoproteine delle pareti cellulari durante l'invecchiamento delle cellule di lievito in spumante, utilizzando una colonna Bio-Sil Sec 250 (Bio-Rad) che permette la separazione di proteine in un intervallo da 10000 a 300000 e di destrani da 1000 a 100000 (16).

Attualmente stiamo utilizzando la cromatografia ad esclusione per verificare l'influenza dell'illimpidimento dei mosti per ultrafiltrazione tangenziale sulle macromolecole presenti nei mosti e nei vini.

OSSERVAZIONI CONCLUSIVE

Le esperienze fatte presso il nostro Istituto sull'uso della cromatografia liquida ad alta pressione nell'arco di un decennio permettono di affermare che questa tecnica, data la grande versatilità, può essere un notevole supporto nello studio e nella determinazione di gran parte dei componenti dei vini, grazie anche all'evolversi dei sistemi di rivelazione. Spesso, tuttavia, l'attendibilità dei metodi e la rapidità delle determinazioni, caratteristica della cromatografia liquida ad alta risoluzione, sono altamente dipendenti dal tipo e dall'efficacia dei pretrattamenti richiesti dal campione per poter effettuare l'analisi mediante HPLC.

Al momento di mettere a punto una metodica, è sempre fondamentale, come per molte determinazioni strumentali, conoscere le caratteristiche chimico-fisiche dei componenti che si intendono separare, valutare i possibili sistemi di rivelazione in base alla concentrazione dei composti e alla sensibilità del sistema per quei componenti e ipotizzare le possibili interferenze. Ciò consente di avere indicazioni sulla necessità di applicare trattamenti, sul tipo di trattamento del campione, sul tipo di colonna e sugli eluenti. Per quanto concerne l'analisi per HPLC, bisogna tenere presente che i solventi e i reagenti utilizzati devono essere il più possibile puri, tutti gli eluenti vanno filtrati e degasati prima dell'utilizzo e i campioni iniettati devono essere perfettamente limpidi e quindi vanno filtrati con membrane da 0,45 o da 0,22 μ m.

BIBLIOGRAFIA

- 1) SILVA A. e COLAGRANDE O. (1987), La cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) nel controllo di alcuni indici di qualità dei vini, *Ind. Bevande* 16,81-89.
- 2) CHIAVARI G., VITALI P. e GALLETTI G.C. (1987), Electrochemical detection in the high-performance liquid chromatography of polyphenols (vegetable tannins), *J.Chromat.* 392, 426-434.
- 3) BONATTI A. (1986), Estrazione delle antocianine monoglucosidate durante la macerazione, *Ind. Bevande* 15,197-201.
- 4) SILVA A. e COLAGRANDE O. (1986), Effetto della macerazione breve sui caratteri di alcuni vini rossi, *Atti Convegno "Moderni criteri di macerazione per la produzione di vini rossi e bianchi", Vignale Monferrato 11 Aprile 1986, a cura dell'Istituto di Enologia-Facoltà di Agraria (PC).*
- 5) CASOLI A. e COLAGRANDE O. (1982), Use of high-performance liquid chromatography for the determination of amino acids in sparkling wines, *Am. J.Enol. Vitic* 33, 135-139.
- 6) SCHMIDT G.J., OLSON D.C. e SLAVIN W (1979), Amino acid profiling of protein hydrolysates using liquid chromatography and fluorescence detection, *J.Liq. Chromat.* 2, 1031-45.
- 7) Official methods of analysis, Association of official analytical chemists, 15th edition 1990, 749.
- 8) Metodi di analisi comunitari per il vino, regolamento CEE n.2676/90- Commissione del 17 settembre 1990, riportati da G.U.I. 2 serie speciale anno 131 (n.90), lunedì 19 novembre 1990.
- 9) SILVA A., CASOLI A., BONATTI A. e COLAGRANDE O. (1983), Aspetti del controllo qualitativo dei vini con riferimento a componenti di natura biogena, *Atti 3 Simposio "La difesa antiparassitaria nelle industrie alimentari e la protezione degli alimenti", a cura di G.Domenichini, Piacenza 22-24 settembre 1982, 191-199.*
- 10) GAETANI E., LAURERI C.F. e VITTO M. (1981), Ion-pair high pressure liquid chromatography: detection and determination of histamine and its methyl derivatives using fluorescamine, *Il Farmaco* 36, 496.
- 11) McCORD J.D., TROUSDALE E. e RYU D.Y. (1984), An improved sample procedure for the analysis of major organic components in grape must and wine by high performance liquid chromatography, *Am. J.Enol. Vitic.* 35, 28-29.
- 12) SCHNEIDER A., GERBI V. e REDOGLIA M. (1987), A rapid HPLC method for separation and determination of the major organic acids in grape musts and wines, *Am. J.Enol. Vitic.* 38, 151-155.
- 13) MARTI M. e DE LA TORRE M.C. (1989), Determination of molecular weight of polysaccharides in musts and wines by HPLC, *Am. J.Enol. Vitic.* 40, 221-223.
- 14) INTERESSE F.S. e ALLOGGIO V. (1987), Proteins in musts estimated by size exclusion HPLC, *Food Chem.* 23, 65-78.
- 15) SILVA A., COLAGRANDE O. e FONTANA P. (1989), Studio chimico-fisico di gomme arabiche del commercio impiegate come stabilizzanti in enologia, *Atti Acc. Ital. Vite Vino (Siena) XLI, 297-313.*
- 16) SILVA A., FUMI M.D., TRIOLI G., PETEGOLLI D. e RAGG E. (1990), Evoluzione delle frazioni glicoproteiche e dei composti fosforilati del lievito durante la maturazione dello spumante in bottiglia, *Ind. Bevande* 19, 380-387.

DIDASCALIE DELLE FIGURE E DELLE TABELLE

- Fig. 1 - Pretrattamenti del campione per la determinazione delle antocianine mediante HPLC
- Fig. 2 - Condizioni operative del dosaggio delle antocianidine -3- monoglucoside mediante HPLC
- Fig. 3 - Separazione mediante HPLC di antocianidine monoglucosidate. a: Delfidina-3-monoglucoside; b: Cianidina-3-monoglucoside; c: Petunidina-3-monoglucoside; d: Peonidina-3-monoglucoside; e: Malvidina-3-monoglucoside. -Colonna da 12,5 cm con diametro delle particelle da 5 μm - Rivelatore: spettrofotometro UV-visibile, $\lambda = 520 \text{ nm}$ - Fase mobile: A: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (30/55/15), B: CH_3COOH al 15% in H_2O - Flusso: 1,7 ml/min
- Fig. 4 - Condizioni operative per il dosaggio degli amminoacidi liberi come dansilderivati mediante HPLC
- Fig. 5 - Cromatogramma dei componenti amminoacidici di un campione di vino spumante. - Colonna: C8 da 25 cm con diametro delle particelle da 10 μm - Rivelatore: spettrofluorimetro, λ eccit. = 298 nm e λ emiss. = 546 nm - Fase mobile: A: CH_3CN addizionato di 0,1 ml di CH_3COOH e di 0,7 ml di $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{l}$, B: H_2O acidificata con 0,5 ml di $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{l}$ - Flusso: 1,5 ml/min
- Fig. 6 - Curve di taratura per alanina e valina derivatizzate con dansilcloruro. Coeffic. di correlazione: Valina 0,9996; Alanina 0,9995
- Fig. 7 - Condizioni di analisi dell'acido sorbico mediante HPLC e curva di taratura con concentrazioni variabili da 1 a 20 ppm
- Fig. 8 - Cromatogramma di un vino addizionato di 200 ppm di acido sorbico e diluito per avere concentrazioni di 5 e 20 ppm. -Colonna C18 da 12,5 cm con diametro delle particelle da 5 μm - Rivelatore: spettrofotometro uv-visibile, $\lambda = 256 \text{ nm}$ - Fase mobile: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ (30/1/69) - Flusso: 1,4 ml/min
- Fig. 9 - Condizioni operative per la determinazione dell'istamina derivatizzata con fluorescamina mediante HPLC
- Fig. 10 - Analisi mediante HPLC dell'istamina. A: soluzione standard (2 mg/l); B: campione di vino. Colonna: C8 da 25 cm con diametro delle particelle da 10 μm - Rivelatore: spettrofluorimetro, λ eccit. = 390 nm, λ emiss. = 475 nm - Fase mobile: A: CH_3CN ; B: Tampone sodio fosfato 0,01 M (pH=6,5) contenente tetrabuttilammonio bromuro 0,005 M; l'eluente è composto dal 32% di CH_3CN in fase B - Flusso: 1,4 ml/min
- Fig. 11 - Condizioni operative per la determinazione degli acidi organici mediante HPLC
- Fig. 12 - Cromatogramma di una soluzione standard di acidi organici. Colonna: AMINEX HPX87H - Rivelatore: spettrofotometro UV-visibile, $\lambda = 210 \text{ nm}$ - Fase mobile: H_2SO_4 0,03N - Temperatura: 60 $^\circ\text{C}$ - Flusso: 0,8 ml/min
- Fig. 13 - Cromatogramma degli acidi organici di un vino bianco e di un vino rosso; il vino bianco è diluito 2 volte, il vino rosso è diluito 2 volte e trattato con carbone
- Fig. 14 - Curva di taratura dell'acido tartarico e coefficienti di correlazione degli acidi organici determinati mediante HPLC
- Fig. 15 - Cromatogramma di destrani T-2000 e T-40, ottenuto con colonna ProgelTM - TSK vinilpolimero GMPWXL, fase mobile costituita da H_2O addizionata di NaNO_3 0,05% e rivelatore ad indice di rifrazione

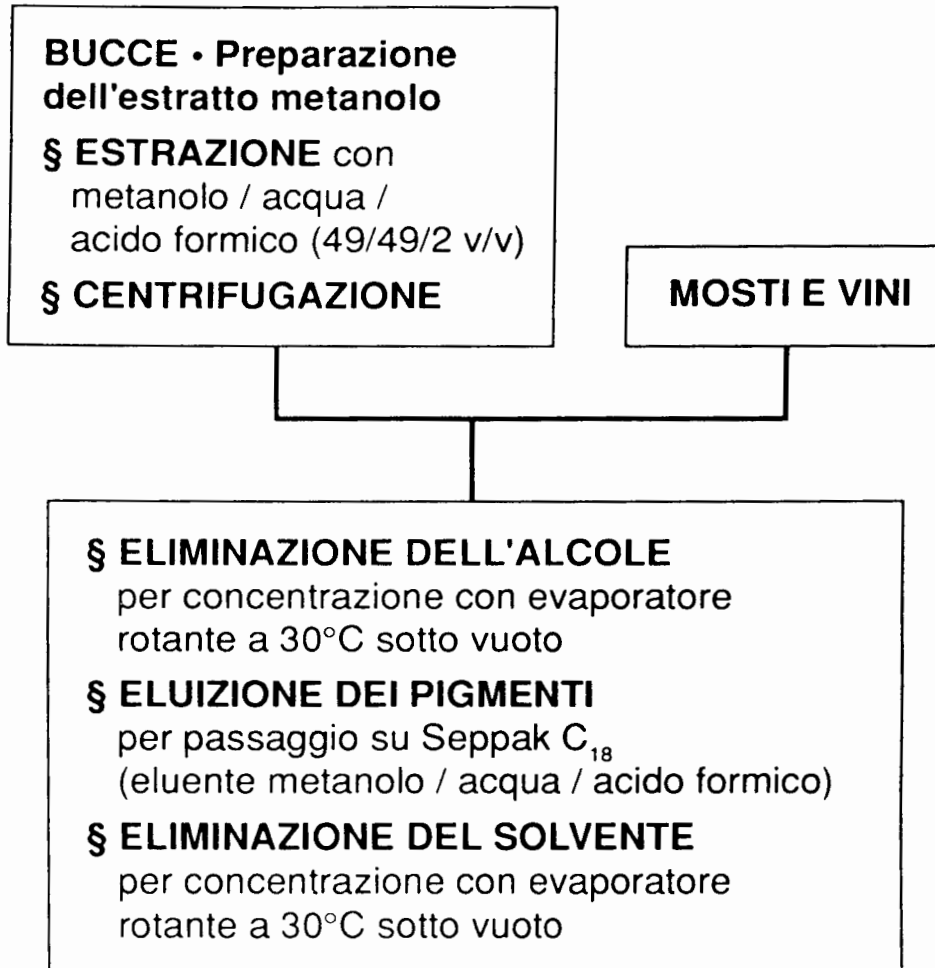
Fig. 16 - Cromatogrammi di campioni di gomma arabica (polisaccaride acido con PM medio di circa 600.000) ottenuti con colonna ProgelTM - TSK vinilpolimero GMPWXL
A= gomma arabica t.q.
B= gomma arabica parzialmente idrolizzata
C= gomma arabica idrolizzata

Tab. 1 - Tempi di ritenzione di amminoacidi dansilati

Tab. 2 - Dosaggio degli amminoacidi: deviazioni standard da otto analisi di uno stesso campione

Tab. 3 - Confronto tra i tenori di acidi organici determinati mediante HPLC e mediante i metodi tradizionali

FIG.1 - ANTOCIANINE
Pretrattamento di bucce, mosti e vini



**FIG.2 - CONDIZIONI OPERATIVE DEL DOSAGGIO DELLE
CINQUE
ANTOCIANIDINE-3-MONOGLUCOSIDI**

— COLONNA —

C₁₈ FASE INVERSA

Diametro delle particelle: 5 μ m

Lunghezza : 12,5 cm

Diametro interno: 0,46 cm

RIVELATORE UV-Vis λ = 520 nm

VOLUME INIETTATO : 10 μ l

TEMPO DI ANALISI : 8 min

— FASE MOBILE —

SOLUZIONE A: CH₃OH - H₂O - CH₃COOH (30/55/15)

SOLUZIONE B: CH₃COOH al 15% in H₂O

FLUSSO: 1,7 ml/min

— PROGRAMMA SOLVENTE —

(percentuale di soluzione A rispetto a soluzione B)

T₁: 15% 2 min, curva 0

T₂: 15-50% 12 min, curva 1

T₃: 50-85% 5 min, curva 1

T₄: 85% 3 min, curva 0

— Curva di taratura —

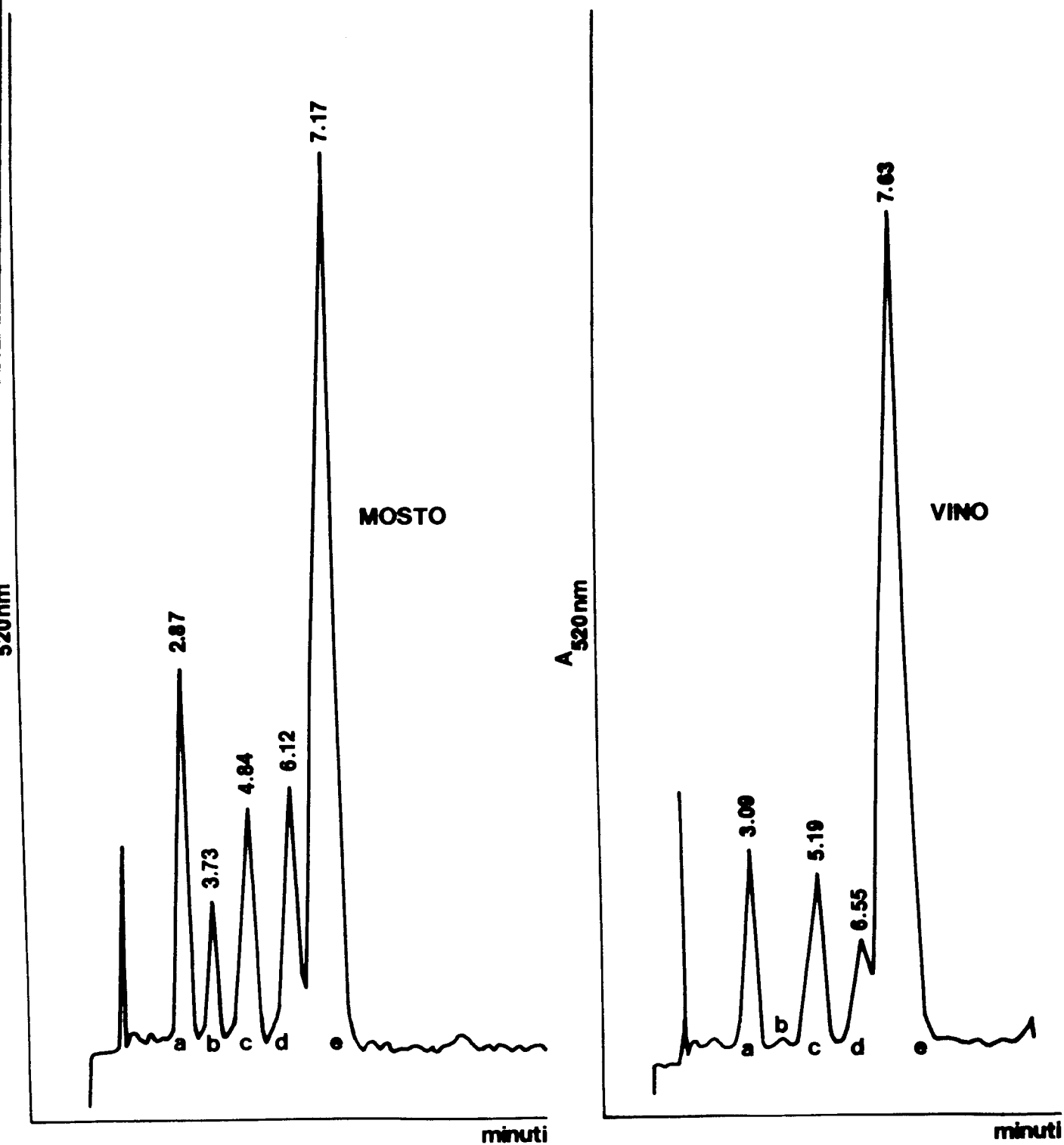
soluzioni di malvidina-3-monoglucoside

50 - 800 mg/l

coeffic. di correlazione: 0,9998

**FIG.3 - SEPARAZIONE MEDIANTE HPLC DI
ANTOCIANINE MONOGLUCOSIDATE.**

- a) Delfinidina-3-monogluside;
- b) Cianidina-3-monogluside;
- c) Petunidina-3-monogluside;
- d) Peonidina-3-monogluside;
- e) Malvidina-3-monogluside.



**Fig. 4 - CONDIZIONI OPERATIVE PER IL DOSAGGIO
DEGLI AMMINOACIDI LIBERI COME DANSILDERIVATI**

**Derivatizzazione degli amminoacidi con
dansilcloruro a 100°C per 4 min
in tampone a pH 10**

**COLONNA
C8 FASE INVERSA**

**Diametro delle particelle: 10 μ m
Lunghezza: 25 cm
Diametro interno: 0,46 cm**

RIVELATORE: SPETTROFLUORIMETRO

**$\lambda_{ecc} = 298$ nm, $\lambda_{emiss} = 546$ nm
fenditura di uscita: 10 nm**

VOLUME INIETTATO: 20 μ l

FASE MOBILE

**SOLUZIONE A: CH₃CN CONTENENTE 0,1 ml di CH₃COOH e
0,7 ml di H₃PO₄**

**SOLUZIONE B: H₂O PURIFICATA SU MilliQ ACIDIFICATA CON
0,5 ml/l di H₃PO₄**

FLUSSO : 1,5 ml/min

PROGRAMMA SOLVENTE

T₁: 5-17%	2 min, curva 1
T₂: 17-25%	17 min, curva 1
T₃: 25-34%	18 min, curva 0,3
T₄: 34-60%	10 min, curva 1
T lavaggio : 99,9%	5 min

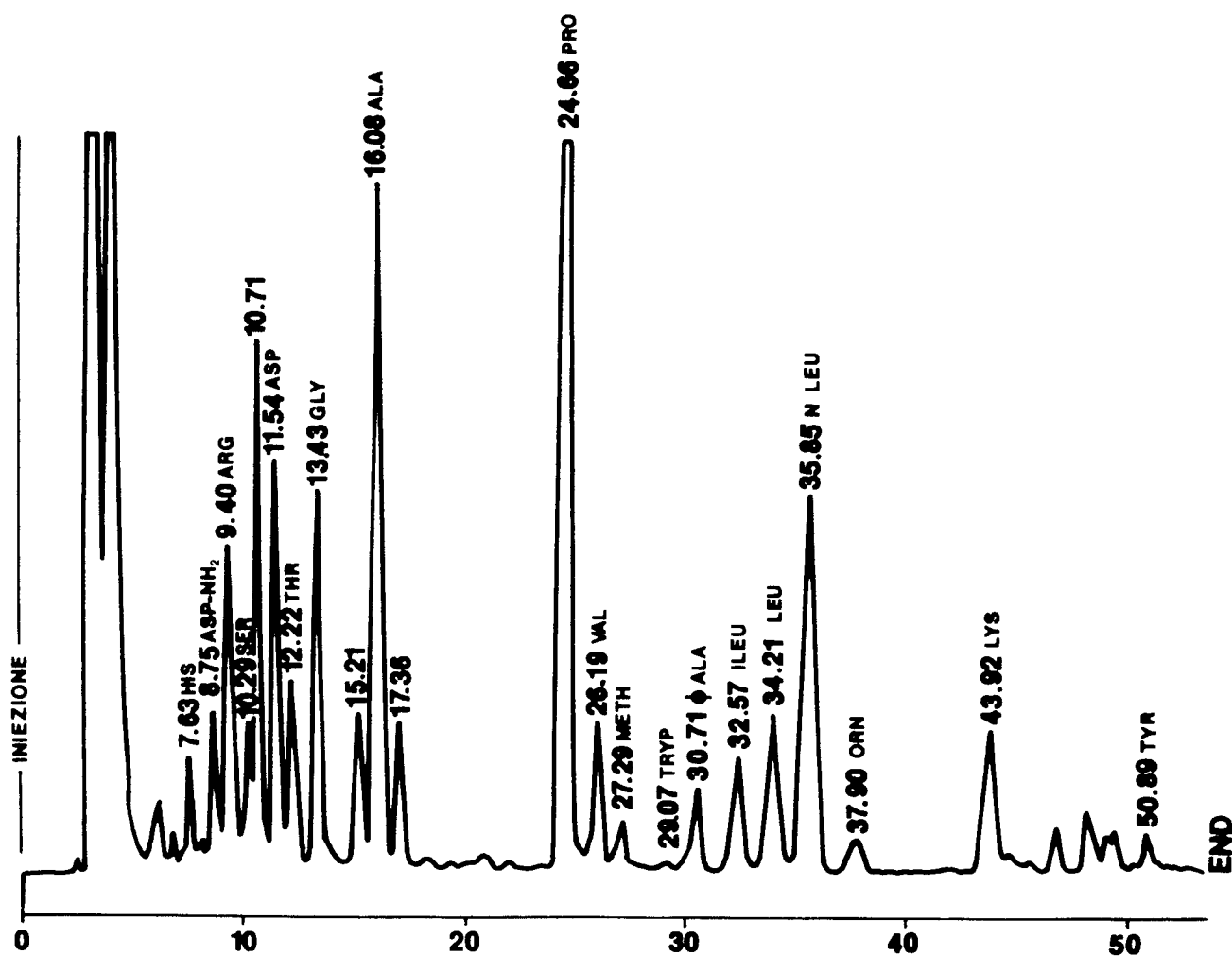
TEMPO DI ANALISI

**52 min + 15 min per equilibrare la colonna tra
un'analisi e l'altra**

FIG.5 - CROMATOGRAMMA DI UN CAMPIONE DI VINO SPUMANTE

(da A. Casoli e O. Colagrande, Am. J. Enol. Vitic. 1982, 33, 135).

- Componenti aminoacidi
- Colonna: C_8 da 25 cm. con diametro delle particelle di $10\ \mu\text{m}$
- Rivelazione: Spettrofluorimetro, $\lambda_{\text{eccit.}} = 298\ \text{nm}$ e $\lambda_{\text{emiss.}} = 546\ \text{nm}$
- Fase mobile: A) CH_3CN addizionato di 0,1 ml di CH_3COOH e di 0,7 ml di $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{l}$ - B) H_2O acidificata con 0,5 ml di $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{l}$
- Flusso: 1,5 ml/min.



**FIG.6 - CURVE DI TARATURA PER ALANINA E VALINA
DERIVATIZZATE CON DANSILCLORURO.**

Coeffic. di correlazione: Valina 0,9996; Alanina 0,9995

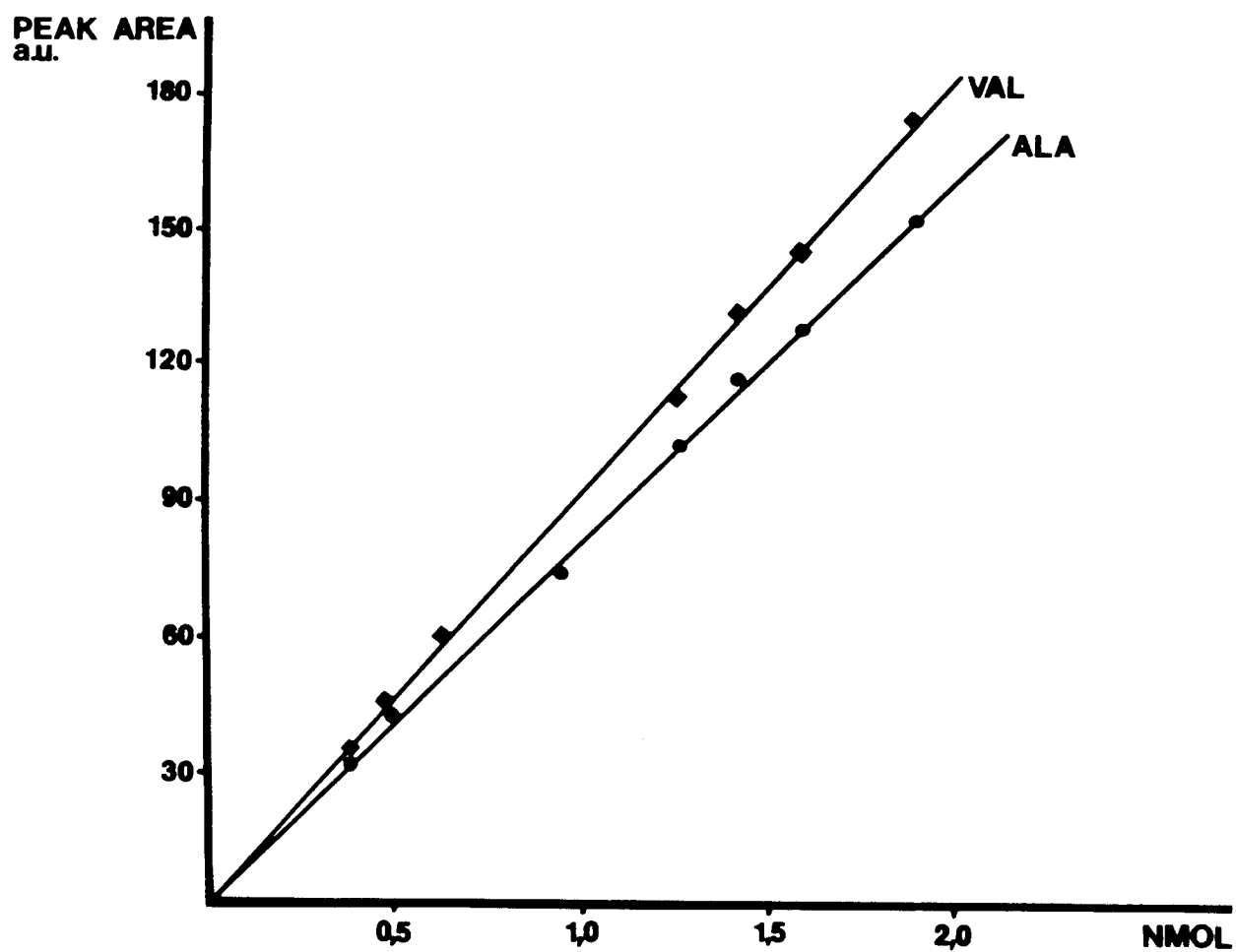


FIG.7 - DOSAGGIO DELL'ACIDO SORBICO

**CONDIZIONI
DI ANALISI**

FLUSSO

1,4ml/min

RIVELATORE UV

$\lambda = 256 \text{ nm}$

VOLUME INIETTATO

10 μl

COLONNA

C₁₈ fase inversa
diametro particelle: 5 μ
lung. 12,5 cm
diametro int. 0,45 cm

FASE MOBILE

CH₃CN/CH₃COOH/H₂O
(30/1/69)

TEMPO DI ANALISI

4 min.

**CURVA DI
TARATURA**

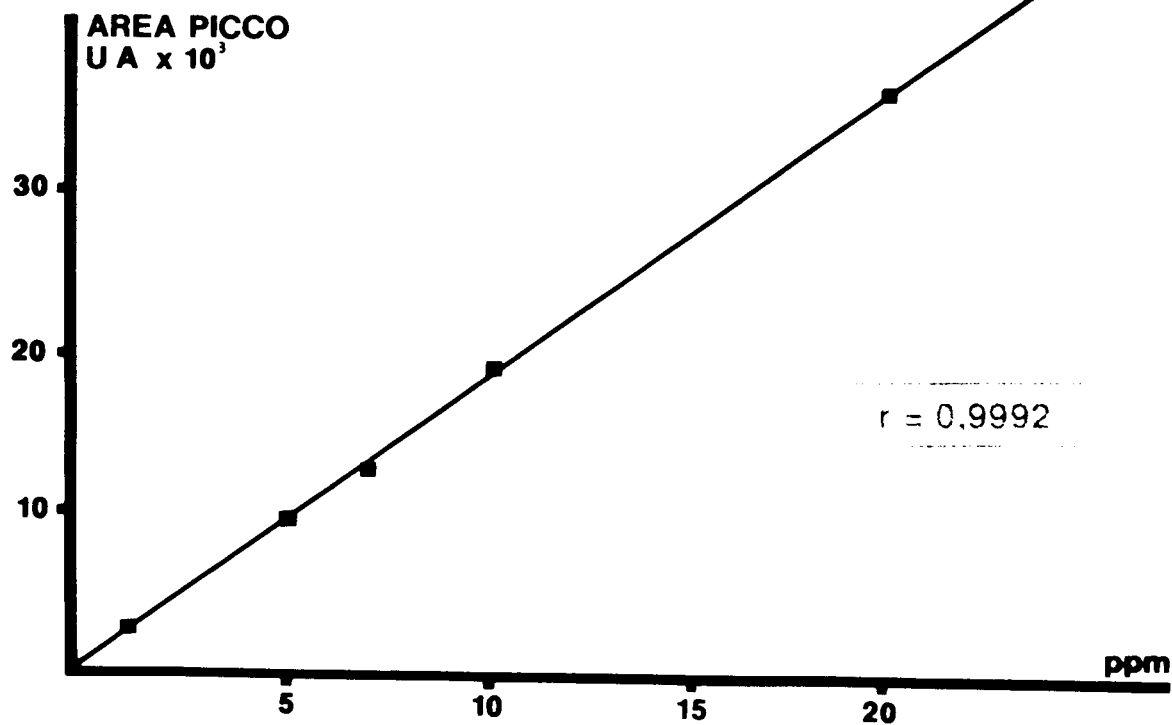
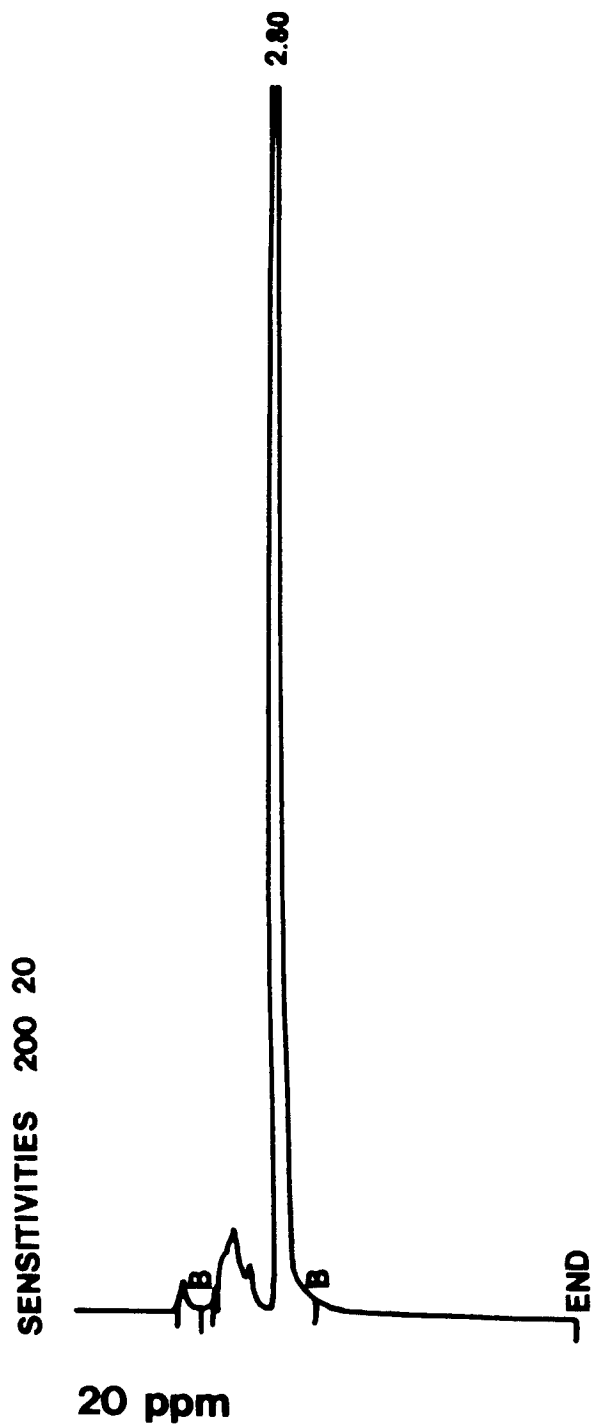
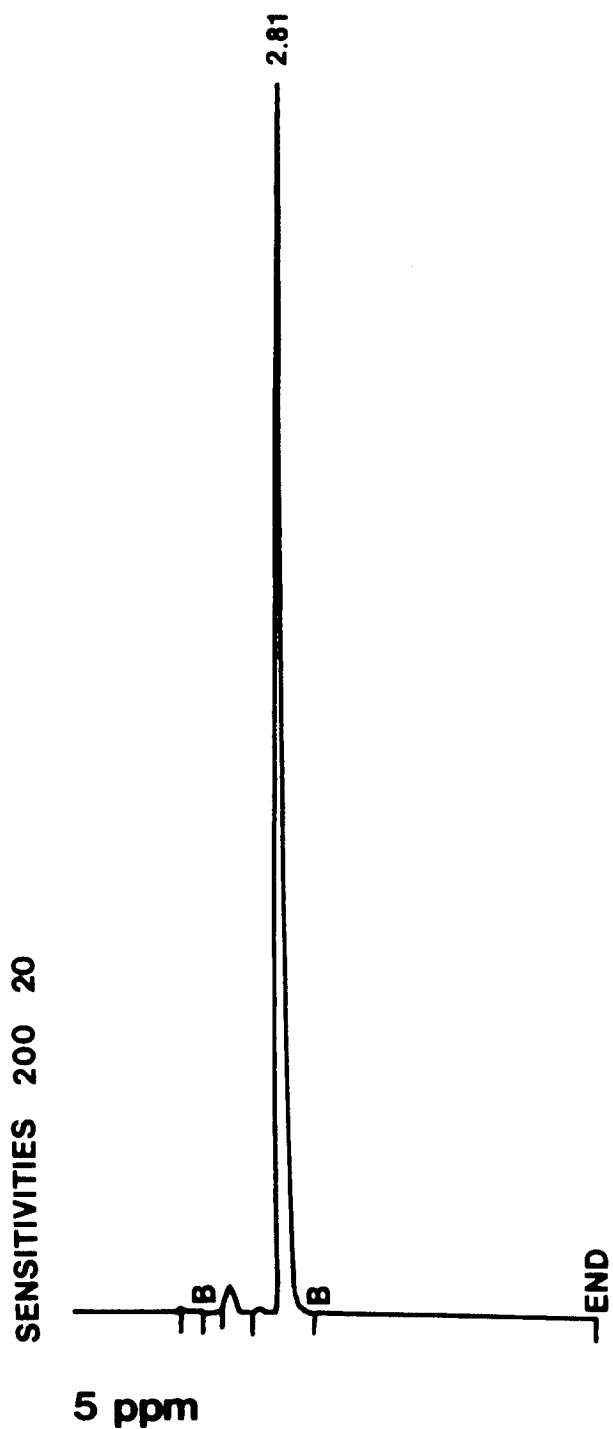


FIG.8 - CROMATOGRAMMA DI UN VINO
addizionato di 200 ppm di acido sorbico
e diluito per avere 5 e 20 ppm di acido sorbico.



**FIG. 9 - CONDIZIONI OPERATIVE PER IL DOSAGGIO
DELL'ISTAMINA DERIVATIZZATA CON
FLUORESCAMINA**

**Pretrattamento del campione con colonna a
scambio ionico (Dowex 50 W-X8)**

**Derivatizzazione dell'istamina con fluorescamina in
ambiente basico a temperatura ambiente**

Condizioni cromatografiche:

COLONNA

C₈ FASE INVERSA

Diametro delle particelle: 10 μ m

Lunghezza: 25 cm

Diametro: 0,46 cm

FASE MOBILE

SOLUZIONE A: CH₃CN

**SOLUZIONE B: Tampone Sodio Fosfato 0,01 M (pH=6,5)
contenente Tetrabutylammonio bromuro 0,005 M**

**L'analisi cromatografica é condotta con fase mobile
composta dal 32% di CH₃CN in fase B**

FLUSSO: 1,4 ml/min

RIVELATORE: Spettrofluorimetro

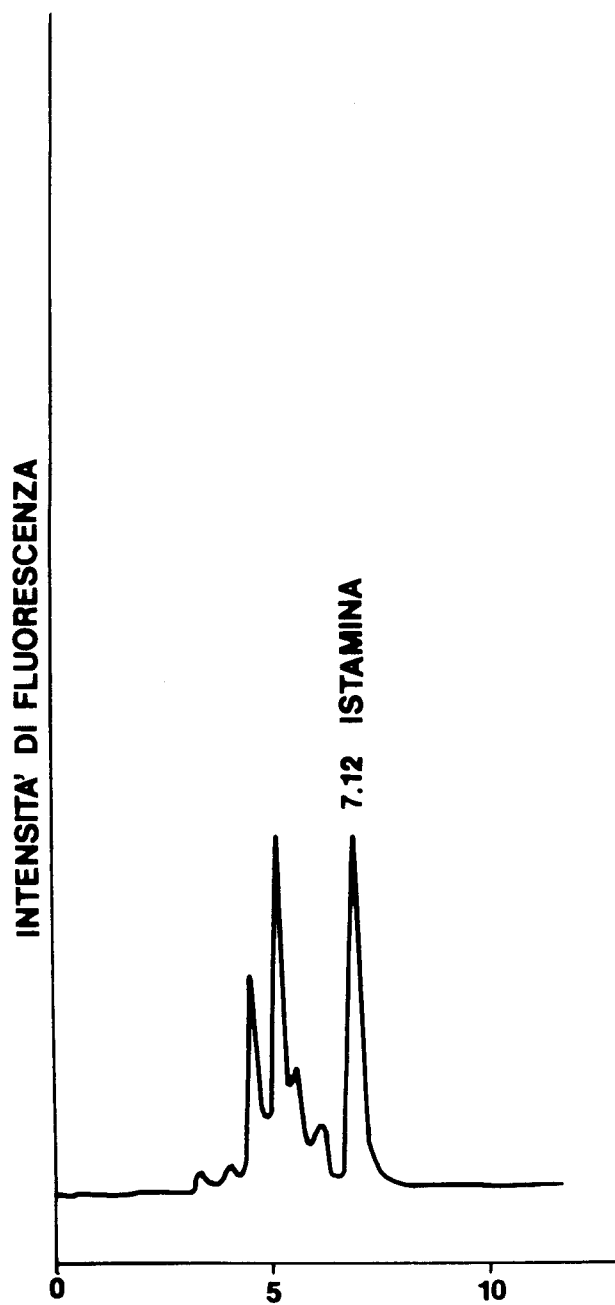
λ eccitaz= 390 nm, λ emiss = 475 nm

VOLUME INIETTATO : 20 μ l

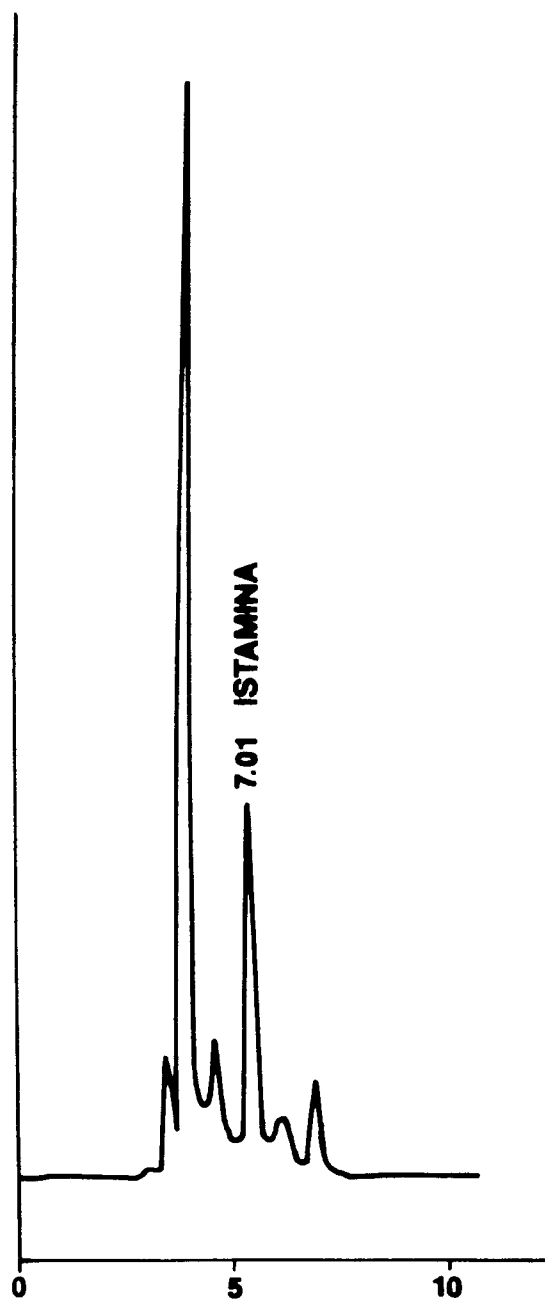
TEMPO DI ANALISI : 10 min

FIG.10

A) CROMATOGRAMMA
DI UNA SOLUZIONE
STANDARD
DI ISTAMINA (2 mg/l).



B) CROMATOGRAMMA
DI UN CAMPIONE
DI VINO.



**Fig. 11 - CONDIZIONI OPERATIVE PER LA
DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI ORGANICI**

COLONNA

**AMINEX ION EXCLUSION HPX-87H con precolonna dello
stesso materiale
Lunghezza : 30 cm**

FASE MOBILE

H₂SO₄ 0,03N

FLUSSO

0,8 ml/min

TEMPERATURA

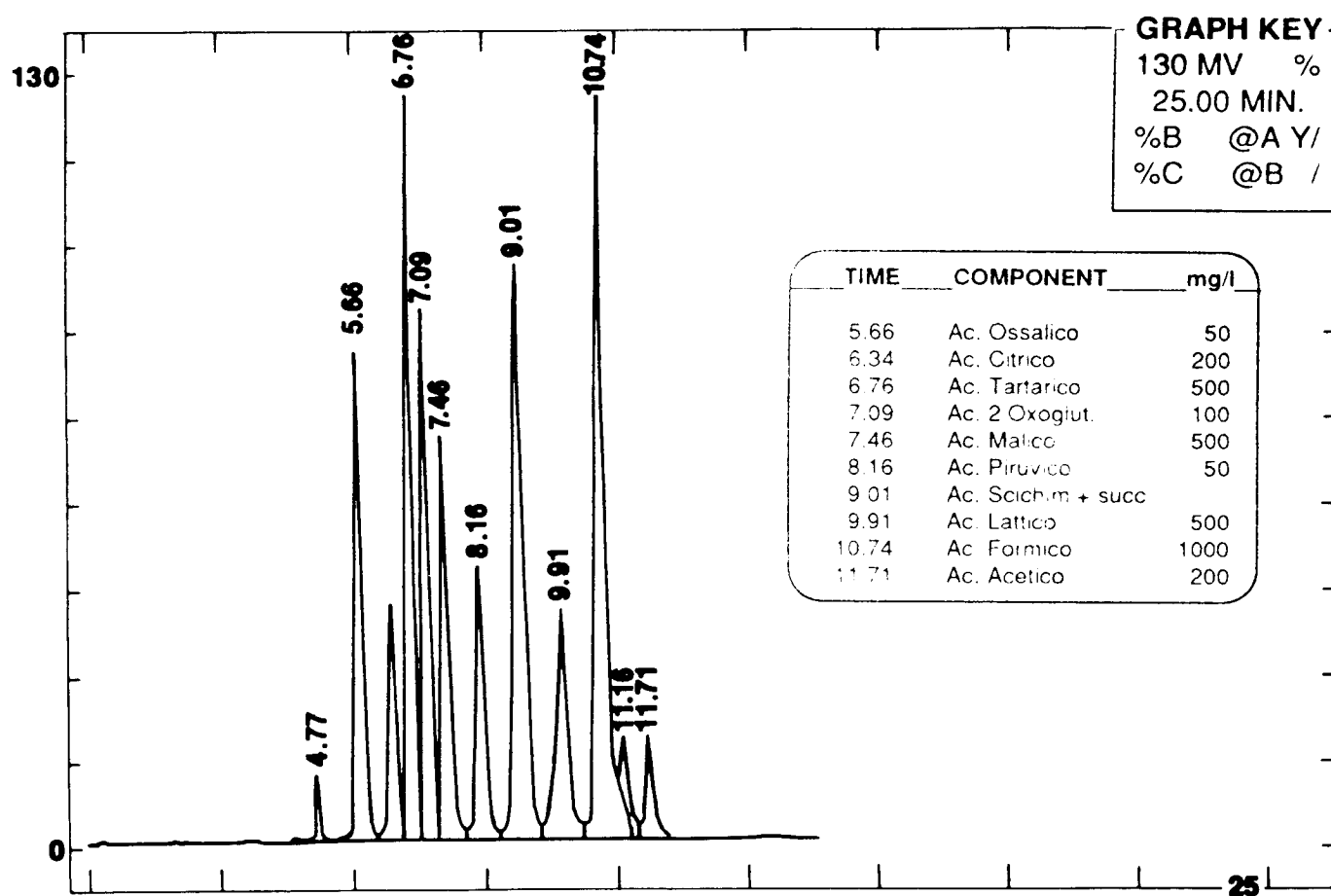
60° C

RIVELATORE UV-Vis

$\lambda = 210 \text{ nm}$

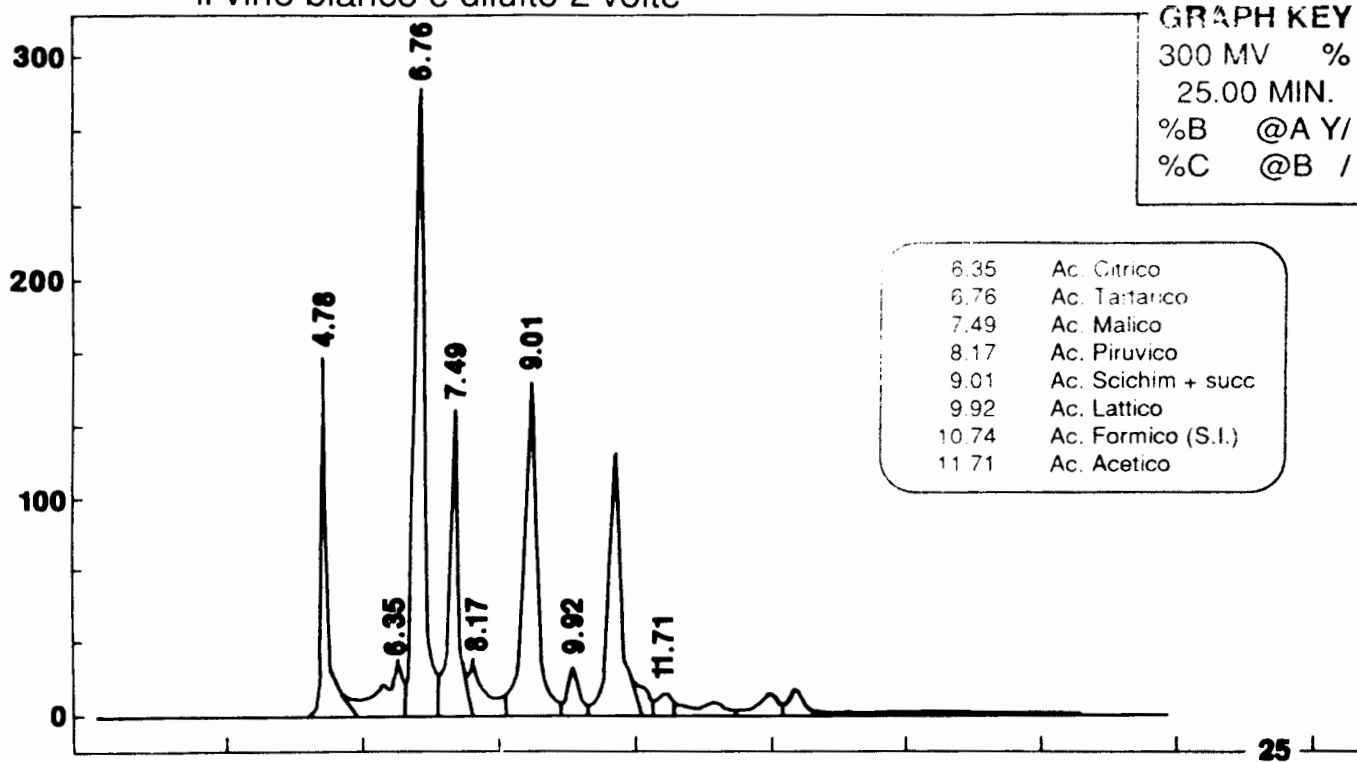
**Vini bianchi: 2 diluizioni
vini rossi: pretrattamento con carbone**

FIG.12 - CROMATOGRAMMA DI UNA SOLUZIONE
STANDARD DI ACIDI ORGANICI.



**FIG.13 - CROMATOGRAMMA DEGLI ACIDI ORGANICI
DI UN VINO BIANCO E DI UN VINO ROSSO**

il vino bianco è diluito 2 volte



il vino rosso è diluito 2 volte e trattato con carbone.

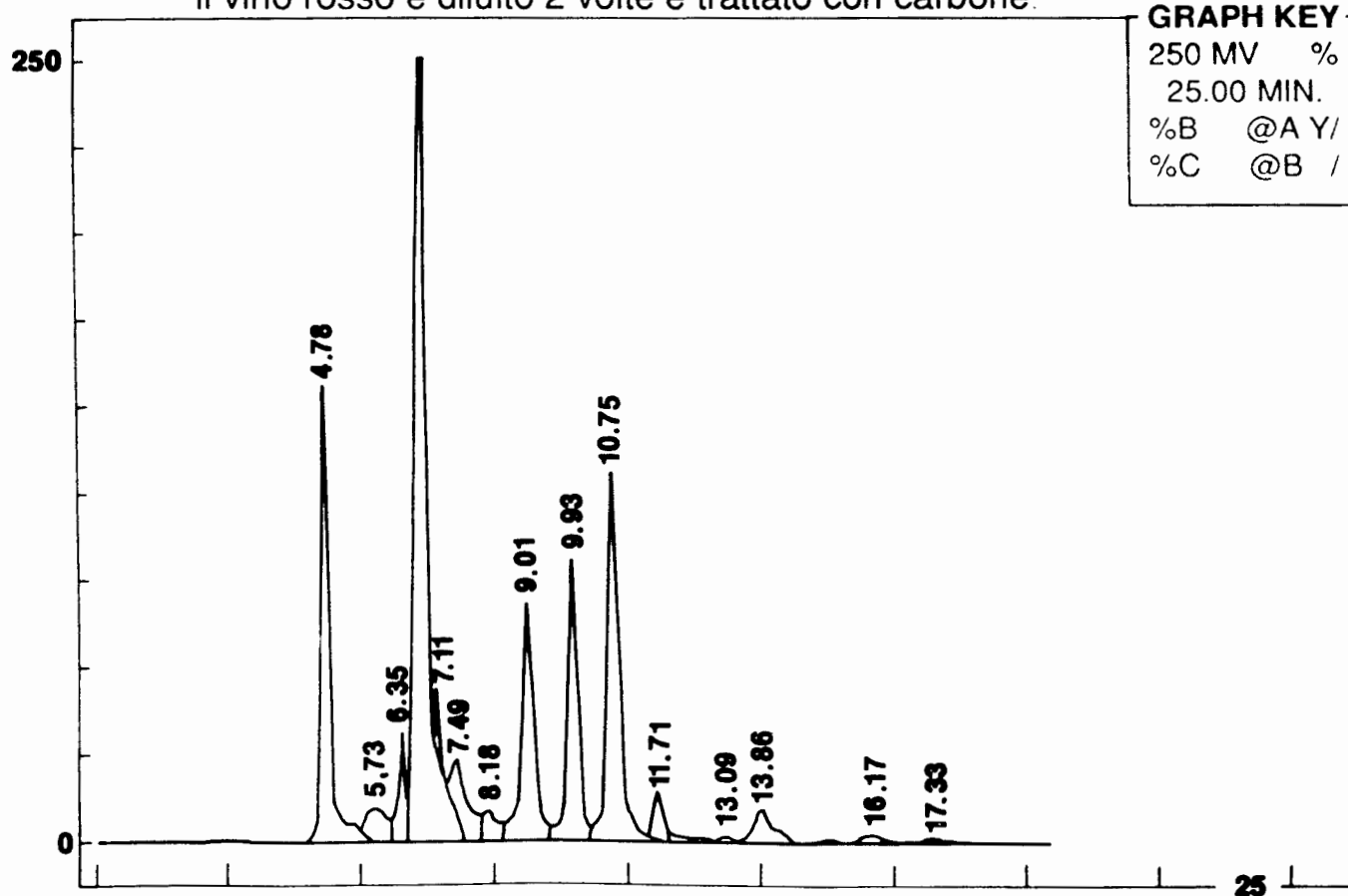
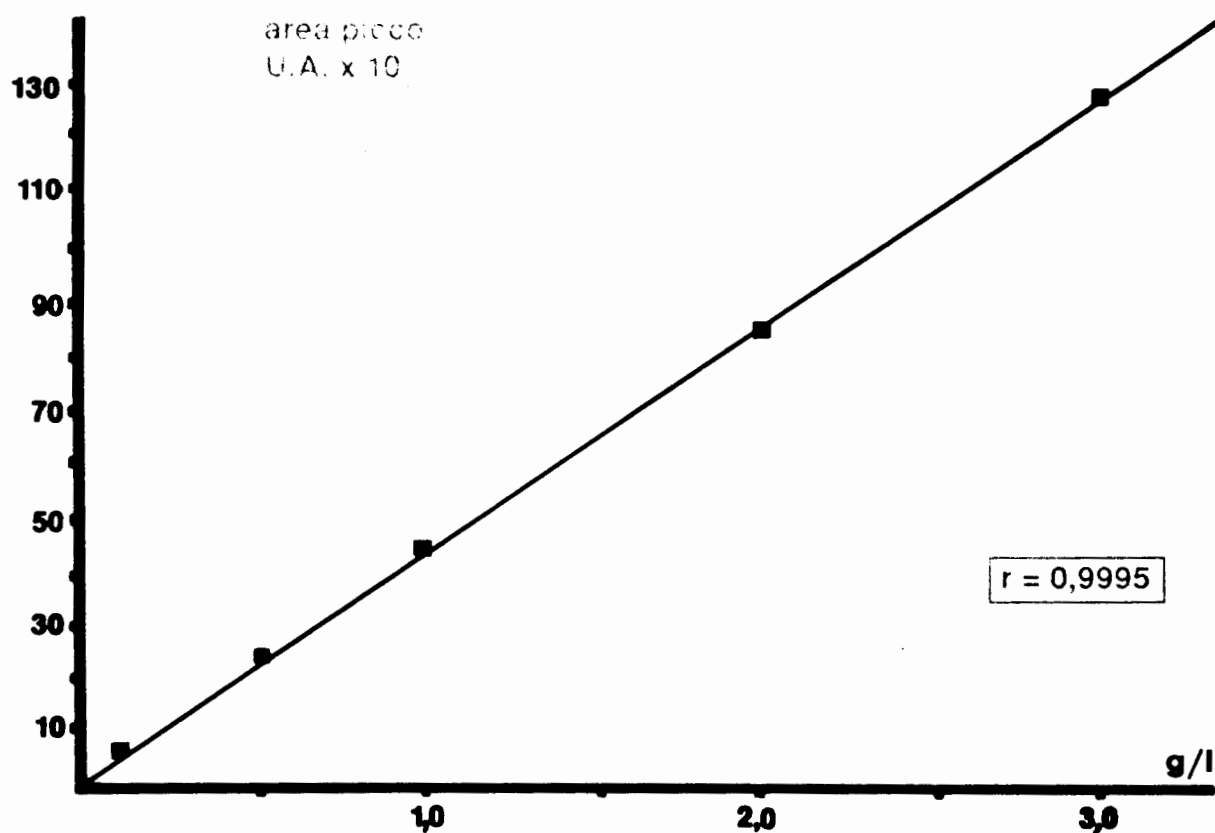


FIG.14 - ANALISI PER HPLC DEGLI ACIDI ORGANICI

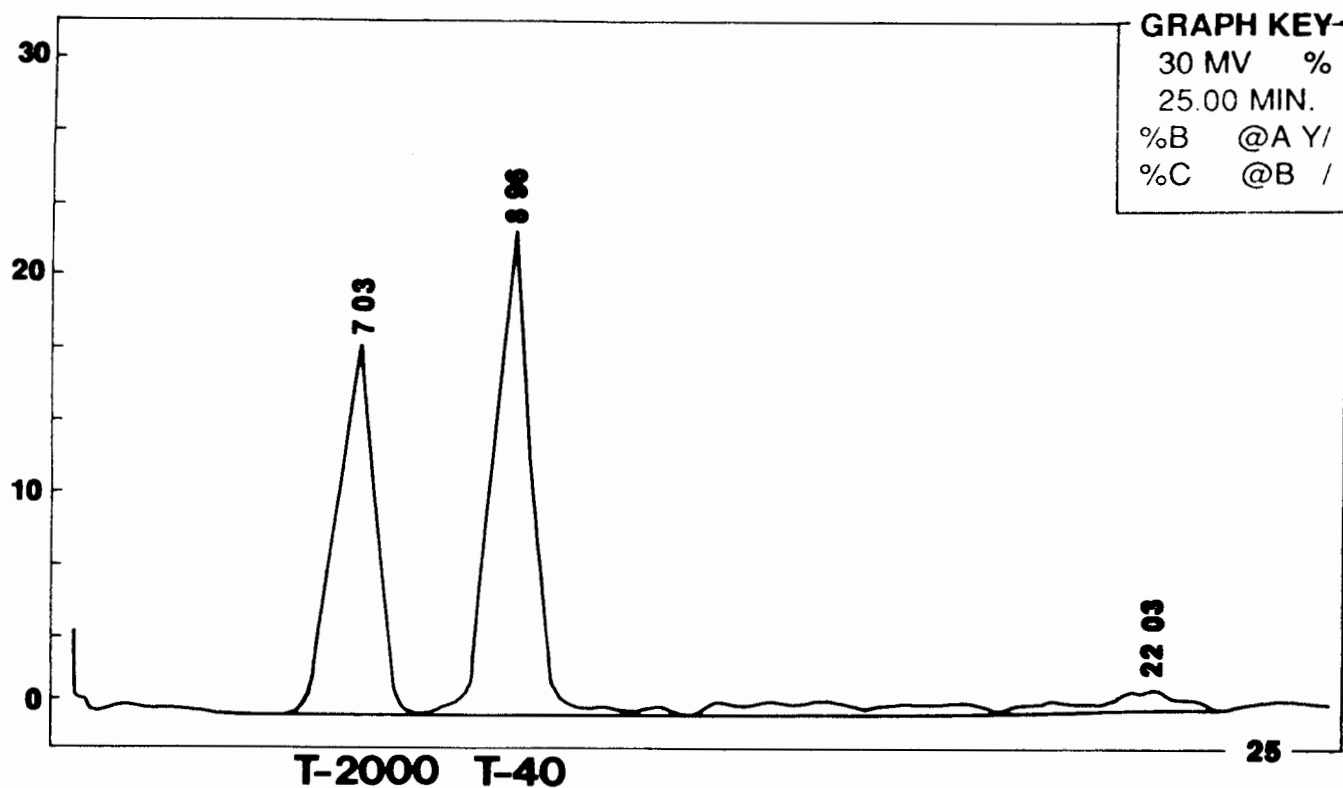
Curva di taratura dell'acido tartarico



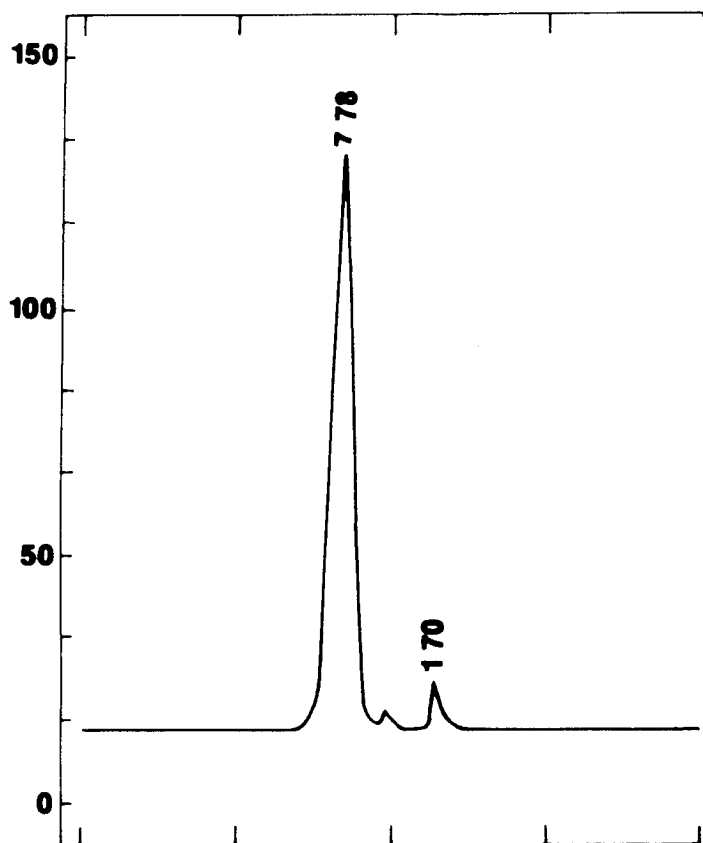
Coefficienti di correlazione per gli acidi organici determinati

	intervallo conc. mg/l	r
acido ossalico	10 - 100	0,9997
acido citrico	100 - 1000	0,9991
acido tartarico	100 - 3000	0,9995
acido α chetoglutar.	50 - 200	0,9986
acido malico	100 - 3000	0,9993
acido piruvico	25 - 150	0,9998
acido lattico	100 - 2000	0,9996
acido acetico	100 - 1000	0,9981

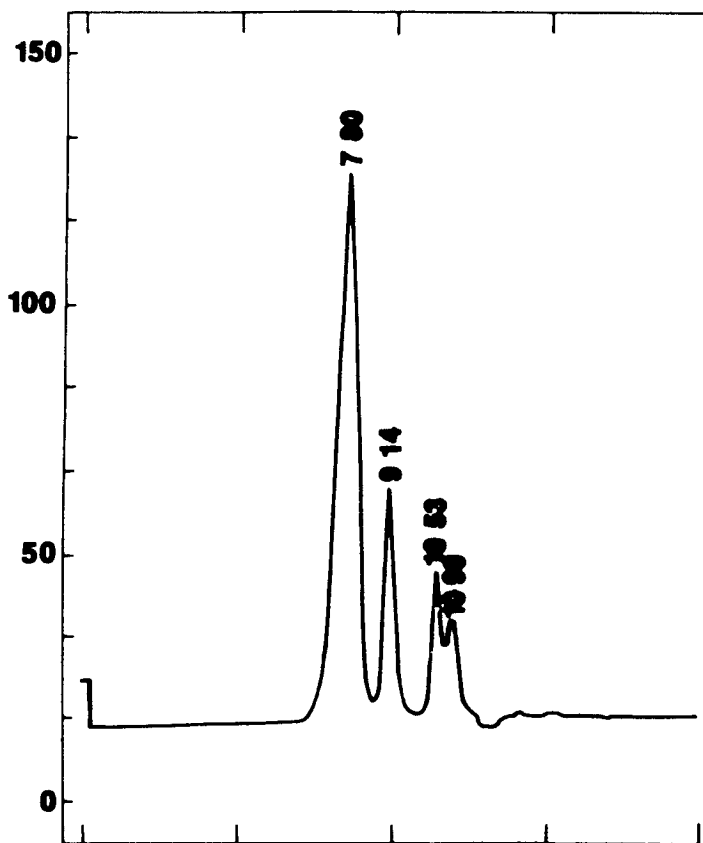
**FIG.15 - CROMATOGRAMMA DI DESTRANO T-2000 E T-40,
ottenuto con colonns Progel™-TSK vinilpolimero
GMPWXL e rivelazione con indice di rifrazione.**



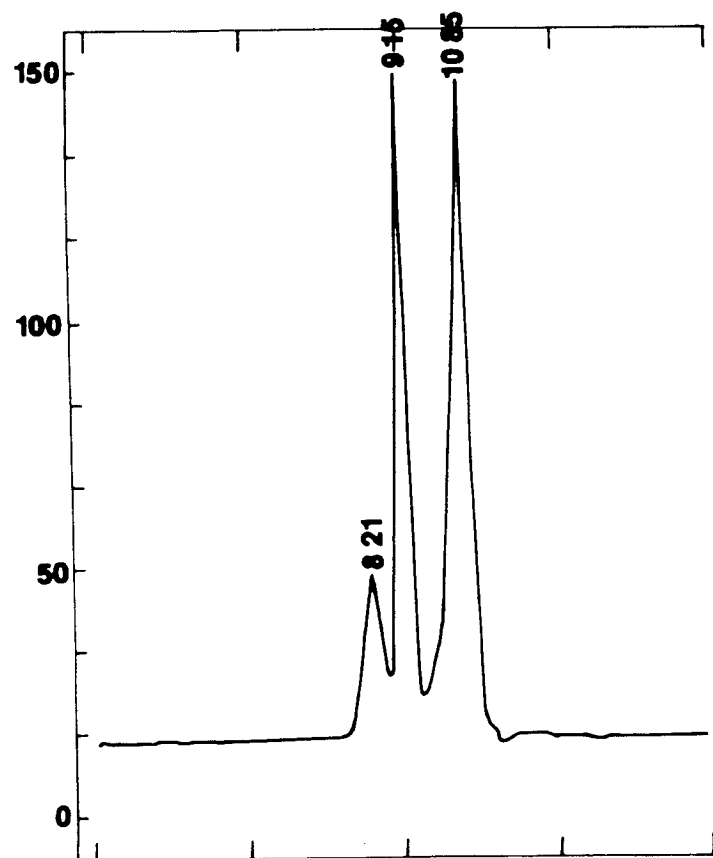
**A) GOMMA ARABICA
IN SOLUZIONE**



**B) GOMMA ARABICA
IN SOLUZIONE**



**B) GOMMA ARABICA
IN SOLUZIONE**



**FIG.16 - CROMATOGRAMMI DI
CAMPIONI DI GOMMA
ARABICA**

(polisaccaride acido
con P.M. medio di 600000)
ottenuti con cromatografia
di esclusione molecolare.

- A) gomma arabica t.q.;
- B) gomma arabica
parzialmente idrolizzata;
- C) gomma arabica idrolizzata.

Tab.1-TEMPI DI RITENZIONE DI AMINOACIDI DANSILATI

AMINOACIDI	SIMBOLO	TEMPO DI RITENZ min	RRT Medio *	RSD**(%)
ISTIDINA	HIS	7,8	0,136	2,535
ASPARAGINA	ASP-NH ₂	8,97	0,169	2,229
ARGININA	ARG	9,72	0,19	2,601
SERINA	SER	10,81	0,22	1,156
AC. ASPARTICO GLUTAMMICO	ASP	12,19	0,26	1,422
TREONINA	THR	13,29	0,287	3,144
GLICINA	GLY	14,29	0,319	1,894
ALANINA	ALA	17,26	0,403	1,898
PROLINA	PRO	25,94	0,655	0,729
VALINA	VAL	27,59	0,703	0,455
METIONINA	METH	28,31	0,731	1,243
TRIPTOFANO	TRYP	30,08	0,784	1,534
FENILALANINA	ALA	32,52	0,844	0,497
ISOLEUCINA	ILEU	34,63	0,901	0,546
CISTINA + CISTEINA	CYS	35,42	0,926	0,707
LEUCINA	LEU	36,35	0,951	0,483
NORLEUCINA	NLEU	38,16	1	
ORNITINA	ORN	41,48	1,08	1,491
LISINA	LYS	45,62	1,225	1,571
TIROSINA	TYR	51,12	1,408	3,475

* Tempo di ritenzione relativo alla norleucina

** Deviazione standard relativa calcolata, per ogni ammino-
acido, da otto determinazioni

Tab.2 - Deviazioni standard da otto analisi di uno stesso campione

Aminoacidi	Conc media mg/l	SD* mg/l	RSD **(%)
HIS	63,4	4,28	6,75
ASP-NH ₂	23,8	0,82	3,45
ARG	85,4	2,36	2,76
SER	22,1	0,5	2,26
ASP	79,6	1,39	1,75
THR	58,3	1,46	2,5
GLY	23,1	0,35	1,53
ALA	74,8	1,43	1,92
PRO	642,8	16,13	2,51
VAL	13,5	0,25	1,85
METH	22,1	0,73	3,3
TRYP	12,8	0,75	5,87
ALA	14,2	0,63	4,46
ILEU	52,1	2,31	4,44
LEU	9,6	0,33	3,39
ORN	22,3	1,03	4,6
LYS	17,5	0,82	4,66
TYR	11,3	0,59	5,21

* Deviazione standard

** Deviazione standard relativa

**Tab.3 - CONFRONTO TRA METODI PER HPLC
E METODI TRADIZIONALI**

**Sono riportate le
DIFFERENZE PERCENTUALI
del dosaggio per HPLC
rispetto al tradizionale**

VINI	acido citrico	acido tartarico	acido malico	acido lattico	acido acetico
1	- 8,3	- 4,4	-7,1	-3,7	-12,5
2	- 2,2	- 3,2	-7,4	-3,7	-10,7
3	- 8,7	- 2,3	-9,5	-3,4	-10,5
4	- 5,0	- 2,4	-14,3	+3,0	-14,3
5	- 1,4	- 4,6	-10,3	+1,5	-9,4
6	- 4,9	- 5,5	-5,0	+2,3	-10,7
7	- 12,0	- 5,4	+2,5	-3,2	-12,5
8	- 6,3	-3,4	+5,0	-2,1	-7,1
9	- 4,8	+2,0	-4,8	-2,5	-9,7
10	- 5,1	- 4,7	-2,1	- -	-16,6
11	- 12,0	- 6,8	-2,5	-12,9	-9,7
12	- 7,9	- 5,3	- -	-2,2	-5,5
M	- 6,6	- 4,2	-6,4	-3,7	-10,6

METODI TRADIZIONALI

ACIDO CITRICO • MALICO • LATTICO

metodo enzimatico

ACIDO TARTARICO

metodo colorimetrico

ACIDO ACETICO

per distillazione in corrente di vapore

MONITORAGGIO DI ZUCCHERI, ETANOLO, GLICEROLO E ACIDI PRINCIPALI NEL CORSO DI FERMENTAZIONI ALCOLICHE MEDIANTE HPLC.

Vincenzo GERBI e Cristina TORTIA

**Dipartimento di Valorizzazione e Protezione
delle Risorse Agroforestali - Università di Torino**

RIASSUNTO

Nella produzione di vini di qualità assume importanza rilevante poter disporre di informazioni tempestive sulla composizione del mosto e sulla evoluzione dei suoi componenti principali nel corso della fermentazione e della conservazione del vino.

Negli ultimi anni i laboratori enochimici hanno allargato il quadro delle analisi di routine grazie alla disponibilità di metodi sensibili ed altamente specifici come quelli enzimatici, che consentono rapidità e precisione, ma permettono la determinazione di un solo parametro alla volta a costi non sempre compatibili con un grande numero di analisi.

Le tecniche in HPLC hanno trovato largo impiego nella determinazione di componenti non volatili; i progressi nell'ottenimento di fasi stazionarie stabili ed altamente specifiche hanno consentito di ridurre, ed in qualche caso annullare, la necessità di complesse preparazioni del campione.

Sulla base di nostre precedenti esperienze sulla determinazione degli acidi organici con una colonna a scambio ionico (Aminex HPX87 H, BIORAD) nei mosti e nei vini, abbiamo verificato la possibilità di determinare con la stessa colonna, in condizioni cromatografiche costanti, sia i principali acidi, sia zuccheri, alcool e glicerina, operando semplicemente a diverse diluizioni e con due rivelatori accoppiati: U.V. per gli acidi e R.I. per gli altri componenti.

Per la determinazione degli acidi con rivelatore U.V. è risultata appropriata una diluizione 1:5, mentre per la determinazione con il rifrattometro vengono utilizzate diluizioni più spinte (fino a 1:50).

Nelle condizioni da noi utilizzate è possibile determinare con buona precisione glucosio, fruttosio, ac. citrico, tartarico e malico nei mosti. Nel corso della fermentazione è possibile seguire l'evoluzione dei suddetti componenti e valutare la formazione di etanolo, glicerolo ed acido lattico.

INTRODUZIONE

Nella produzione di vini di qualità assume importanza rilevante poter disporre di informazioni tempestive sulla composizione del mosto e sull'evoluzione dei suoi componenti principali nel corso della fermentazione e della conservazione del vino.

Il parametro più utilizzato nella valutazione della qualità del mosto continua ad essere il tenore zuccherino e la sua determinazione è affidata generalmente a metodi fisici rapidi quali densimetria e rifrattometria. Quando si rendano necessari interventi correttivi del contenuto zuccherino, occorrono determinazioni più precise e si ricorre ai metodi chimici come quello che utilizza il liquido di Fehling.

La necessità di selezionare le partite di uve e di mosti da vinificare e l'evoluzione delle conoscenze sul processo fermentativo, richiedono sempre più spesso ulteriori informazioni analitiche, in particolare relativamente al quadro acido. Conoscere l'acidità totale ed il pH non è però sufficiente per decidere, ad esempio, se impiegare un ceppo di lievito con spiccato carattere maloalcolico, quali dosi di SO₂ e quale temperatura impiegare in funzione di un controllo della fermentazione maloattica. In questi casi risulta molto utile conoscere il rapporto tra gli acidi tartarico e malico.

Durante il processo fermentativo è poi indispensabile individuare con tempestività eventuali arresti fermentativi o fermentazioni anomale.

Esiste quindi la necessità di effettuare un grande numero di determinazioni in tempi brevi ed a costi relativamente accessibili.

Negli ultimi anni i laboratori enochimici hanno allargato il quadro delle analisi routinarie grazie alla disponibilità di metodi sensibili ed altamente specifici come quelli enzimatici, che consentono rapidità e precisione, ma permettono la determinazione di un solo parametro alla volta a costi non sempre compatibili con un grande numero di analisi.

I metodi cromatografici richiedono viceversa un maggiore investimento iniziale, ma presentano poi minori spese di esercizio, grazie alla robustezza ed affidabilità delle moderne colonne da gascromatografia e da cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC).

Le metodiche gascromatografiche, quelli GLC in particolare, hanno trovato largo impiego nell'analisi enologica e consentono la contemporanea determinazione di un gran numero di componenti, ma la necessità di una laboriosa preparazione del campione (estrazione o derivatizzazione) ne hanno indirizzato l'impiego verso l'analisi di sostanze presenti in bassa concentrazione, come gli aromi, o in tracce, come i residui di fitofarmaci.

Le tecniche in HPLC hanno trovato invece largo impiego nella determinazione di componenti non volatili, presenti in quantità non troppo basse, ed i progressi nell'ottenimento di fasi stazionarie stabili ed altamente specifiche hanno consentito di ridurre, ed in qualche caso annullare, la necessità di complesse preparazioni del campione.

Numerosi contributi scientifici hanno dimostrato l'affidabilità dei metodi in cromatografia liquida nella determinazione di zuccheri, acidi organici e sostanze coloranti dei vini (Silva e Colagrande, 1987).

Nella determinazione degli zuccheri sono risultate particolarmente adatte fasi stazionarie caratterizzate da un gruppo -NH₂ chimicamente legato alla silice e quelle a scambio cationico sotto forma Ca⁺⁺. Quanto ai sistemi di rivelazione, non presentando il glucosio un assorbimento in U.V. al di sopra dei 200 nm, a meno di una eventuale derivatizzazione, risulta indicato l'impiego dell'indice di rifrazione (R.I.), che richiede però un'accurata termostatazione ed una riduzione al minimo delle pulsazioni della pompa. Inoltre la minore sensibilità del R.I. rispetto all'U.V. non consente di determinare accuratamente concentrazioni inferiori a 1 g/L, escludendo di fatto nei mosti e nei vini, a meno di ricorrere a concentrazioni, la determinazione dei pentosi.

Un miglioramento della risoluzione viene conseguito con l'allontanamento, mediante trattenimento su resine anioniche, degli acidi organici che in certe condizioni coeluiscono (McCord, Trousdale e Ryu, 1984).

Nella determinazione degli acidi organici vengono utilizzate colonne a fase inversa, ricorrendo a separazioni mediante soppressione ionica, e colonne in cui il meccanismo di separazione prevalente è quello a scambio ionico. Nelle prime si sfrutta la possibilità di operare con un meccanismo di ripartizione tra fase stazionaria e fase mobile anche in presenza di sostanze ionizzate come gli acidi organici, che però abbiano un pK compreso tra 2 e 8, utilizzando come eluente un tampone a pH sufficientemente basso da impedire la ionizzazione delle molecole da analizzare. Le colonne a fase inversa presentano costi limitati, ma utilizzate a pH bassi possono subire modificazioni che ne sconsigliano il successivo impiego in altre condizioni analitiche; queste colonne non richiedono normalmente termostatazione potendo operare a temperatura ambiente, le cui oscillazioni possono però causare piccole variazioni nel tempo di ritenzione dei picchi che complicano l'interpretazione dei cromatogrammi.

Le più impiegate fra le colonne a scambio ionico presentano matrici polimeriche (stirene-divinilbenzene) su cui sono legate resine cationiche in forma H^+ . Il meccanismo di separazione si basa su una combinazione di scambio ionico, esclusione ionica, adsorbimento, partizione ed esclusione dimensionale: proprio questa contemporaneità di azioni permette la separazione di soluti con caratteristiche molto diverse. Così mentre gli acidi vengono separati principalmente per scambio od esclusione ionica, i monosaccaridi, grazie ai loro gruppi idrossilici, possono venir trattenuti per competizione con il controione, infine l'etanolo viene separato per partizione per la maggiore affinità con la matrice non polare. Tali colonne hanno costi superiori a quelle a fase inversa e richiedono la termostatazione a temperature elevate ($>60^\circ C$), per contro necessitano di eluenti molto semplici quali acqua o soluzioni di acidi inorganici molto diluiti e presentano, purchè si operi con le dovute precauzioni, durate molto prolungate.

Le esigenze del nostro laboratorio, per quanto attiene le analisi di routine, ci hanno spinti alla messa a punto di una metodica sufficientemente affidabile, ma che richiedesse uno scarso lavoro di preparazione del campione, consentisse uno scarso lavoro di preparazione del campione, consentisse di determinare, possibilmente con lo stesso apparato cromatografico, il maggior numero di parametri interessanti la valutazione dei mosti e dei vini e permettesse, infine, la maggior durata del sistema cromatografico.

Sulla base di nostre precedenti esperienze (Schneider, Gerbi e Redoglia, 1987) sulla determinazione degli acidi organici con una colonna a scambio ionico (Aminex HPX87 H BIORAD) nei mosti e nei vini, abbiamo verificato la possibilità di determinare con la stessa colonna, in condizioni cromatografiche costanti, sia i principali acidi, sia zuccheri, alcool e glicerina, operando semplicemente a diverse diluizioni e con due rivelatori accoppiati: U.V. per gli acidi e R.I. per gli altri composti.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

I mosti ed i vini bianchi vengono semplicemente microfiltrati ($0,22\ \mu m$), mentre per i vini rossi si rende necessaria, per una più precisa determinazione degli acidi in U.V., il preliminare allontanamento delle sostanze fenoliche mediante passaggio su cartucce C18. Un ottimale recovery in tale pretrattamento può essere ottenuto eluendo con la fase mobile utilizzata per la successiva determinazione in HPLC, verificando l'esatta entità della diluizione apportata impiegando una soluzione di acido formico come standard interno (Schneider et al., loc. cit.).

Per la determinazione degli acidi con rivelatore U.V. è risultata appropriata una diluizione 1:5, mentre per la determinazione con il rifrattometro vengono utilizzate diluizioni più spinte (fino a 1:50).

CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE

Cromatografo: Varian 5000

Sistema di iniezione: autocampionatore/diluitore GILSON 231/401, loop da 20 μL . Per ogni campione vengono effettuate separatamente le due iniezioni, una per ciascun livello di diluizione, con un tempo totale di analisi di circa 40 minuti.

Colonna: HPX87 H organic acids column (mm 300 x 7.8 i.d.) con precolonna CATION H (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA), termostata a $65^\circ C$.

Eluente: H_2SO_4 0.0026 N, flusso 0.6 ml/min

Rivelatori: U.V. 100 VARIAN impostato a 210 nm di lunghezza d'onda; rifrattometro differenziale SPECTRA PHYSICS SP 6040 termostato a $40^\circ C$. I due rivelatori operano alternativamente ma sono, per comodità, collegati in serie.

Integratore: SPECTRA PHYSICS 4270 a due canali, picchi integrati in funzione dell'altezza.

APPLICAZIONI DELLA TECNICA PROPOSTA

In fig. 1 sono confrontate le separazioni ottenute su una miscela standard, i cui componenti hanno concentrazioni simili a quelle dei mosti e dei vini naturali, inviando il segnale del rivelatore U.V. (dil. 1:5) sul canale A e quello del rivelatore R.I. (dil 1:50) sul canale B. Nel cromatogramma ottenuto all'U.V. il picco dell'acido lattico ingloba tracce di acido fumarico (circa 75 mg/L), presente nella miscela standard come impurezza dell'acido L-malico di grado analitico: con la concentrazione di H_2SO_4 adottata nella fase mobile i due acidi coeluiscono. L'acido fumarico, a causa della presenza di un doppio legame nella sua molecola, determina un segnale molto forte in U.V., anche se presente in modesta quantità. La determinazione quantitativa dell'acido lattico nei vini non è comunque impedita in quanto essi contengono naturalmente acido fumarico in misura circa venti volte inferiore (Da Porto e Munari, 1989) alla miscela standard impiegata; inoltre la diluizione 1:5 attenua ulteriormente il disturbo. Nella calibrazione dell'integratore sarà però necessario utilizzare un fattore di risposta calcolato su una soluzione di acido lattico iniettata singolarmente nelle stesse condizioni analitiche.

Il rivelatore a indice di rifrazione fornisce buoni risultati se si opera a sensibilità elevate (fondo scala $2-4 \times 10^{-6}$ RIU), ma si rendono indispensabili diluizioni che portino la concentrazione dei singoli zuccheri del campione iniettato a livelli non superiori a 5 g/L per evitare la saturazione del rivelatore. La diluizione 1:50 permette un'ottima separazione tra glucosio e fruttosio e contemporaneamente annulla l'effetto interferente dell'acido malico, che ha un k' intermedio tra i due zuccheri (tab.1), perchè ne porta la concentrazione nei mosti normali a circa 0.1-0.2 g/L, tale da non falsare la quantificazione del glucosio. Naturalmente i problemi di interferenza tra ac. malico e glucosio troverebbero una soluzione teoricamente ineccepibile separando preliminarmente, come più sopra ricordato (McCorde et. al., loc.cit.), la frazione acida da quella neutra. Tuttavia va tenuto presente, oltre al maggior tempo necessario, che l'errore indotto dalla risoluzione non perfetta di due picchi utilizzando il segnale R.I., se uno dei due è presente in quantità molto limitata, può non essere superiore a quello provocato da un recovery incompleto nella separazione su resina.

Già Frayne (1986) aveva proposto la determinazione contemporanea di zuccheri, acidi, alcool e glicerina, utilizzando i due rivelatori (U.V. e R.I.) in serie, ma sfruttando due colonne analoghe a quella da noi utilizzata accoppiate ed una sola iniezione. Tale soluzione offre sicuramente una migliore risoluzione dei picchi, ma non c'è risparmio di tempo perchè l'analisi dura comunque 40', inoltre la pressione d'esercizio è più alta. La diluizione non può essere troppo spinta per non impedire la determinazione degli acidi, per cui risulta possibile dosare glucosio e fruttosio unitamente all'acido malico solo quando i primi sono in concentrazione molto bassa.

Negli intervalli di concentrazione di interesse enochimico la metodica da noi proposta fornisce per glucosio, fruttosio, glicerolo ed etanolo risposte sufficientemente lineari: in fig.2 sono riportate le equazioni delle rette interpolanti con le relative significatività. L'efficacia nella determinazione dei principali acidi organici è già stata dimostrata in un precedente lavoro al quale si rimanda (Schneider et.al, loc. cit.).

Come esempio delle possibili applicazioni della suddetta metodica si riporta (fig.3) la separazione di glucosio, fruttosio, acido tartarico e malico in 24 mosti di Nebbiolo della vendemmia 1990. I risultati quantitativi, rilevati in doppio, sono stati confrontati con quelli ottenuti, sempre in doppio, con metodi enzimatici (Boehringer, Mannheim) per glucosio, fruttosio e ac. malico e colorimetrici (Vidal e Blouin, 1978) per l'acido tartarico. Tra le due serie di dati esiste un'ottima correlazione e gli intervalli fiduciali sono soddisfacenti per i quattro parametri, seppur in misura leggermente inferiore per l'ac. malico (tab.2).

Su cinque campioni di vino (uno dolce e quattro secchi) sono stati determinati il titolo alcolometrico ed il tenore in glicerolo per HPLC, confrontando i risultati con quelli ottenuti con il metodo per distillazione e misura della densità del distillato per l'alcool e con il metodo enzimatico per il glicerolo. Sono state operate tre repliche per ciascuna determinazione: l'analisi della regressione lineare ha dimostrato una buona concordanza tra le due serie di dati (tab. 3).

In fig. 4 si riportano alcuni dei cromatogrammi ottenuti nel corso del monitoraggio della fermentazione di un mostio bianco. I cromatogrammi A, B e C, ottenuti con il rivelatore R.I., corrispondono alle fasi di fermentazione appena avviata (A), fermentazione del glucosio quasi ultimata (B), residuo < 2 g/L per glucosio e 10 g/L per fruttosio (C). Il cromatogramma D, ottenuto con rivelatore U.V., è contemporaneo a C: si può osservare la soddisfacente separazione dell'acido malico del residuo fruttosio.

Nelle condizioni cromatografiche indicate la determinazione dell'acido acetico fornisce risultati poco soddisfacenti in quanto, a concentrazioni basse, il picco è mal risolto e disturbato da sostanze interferenti. Migliori risultati si ottengono utilizzando un solvente più concentrato (H₂SO₄ 0.013 N) e flusso leggermente aumentato (0.8 ml/min). In fig. 5 è visibile un cromatogramma ottenuto nelle suddette condizioni con un vino rosso preventivamente passato su resina C18 (Sep-Pack, Waters) ed aggiunto di acido formico come standard interno.

BIBLIOGRAFIA CITATA

1. Da Porto C. and Munari M. (1989): HPLC determination of fumaric acid as a wine additive. *Ital. J. Food Sci.*, 1, 4, 35-40.
2. Frayne R.F. (1986): Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 4, 281-287.
3. McCord J.D., Trousdale E. and Dewey D.Y. Ryu (1984): An improved sample preparation procedure for the analysis of major organic components in grape must and wine by high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.*, 35, 1, 28-29.
4. Schneider A., Gerbi V. and Redoglia M. (1987): A rapid HPLC method for separation and determination of the major organic acids in grape musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38, 2, 151-155
5. Silva A. e Colagrande O. (1987): La cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) nel controllo di alcuni indici di qualità dei vini. *Industria bevande*, 16, 2, 81-97.

Tab.1 Fattore di capacità di glucosio, fruttosio, glicerolo, etanolo e dei principali acidi organici dei mosti e dei vini, con rivelatore U.V. a 210 nm (k'1) e R.I. (k'2). Colonna HPX87 H, temp. 65 °C, flusso 0,6 ml/min. solvente H₂SO₄ 0,0026N.

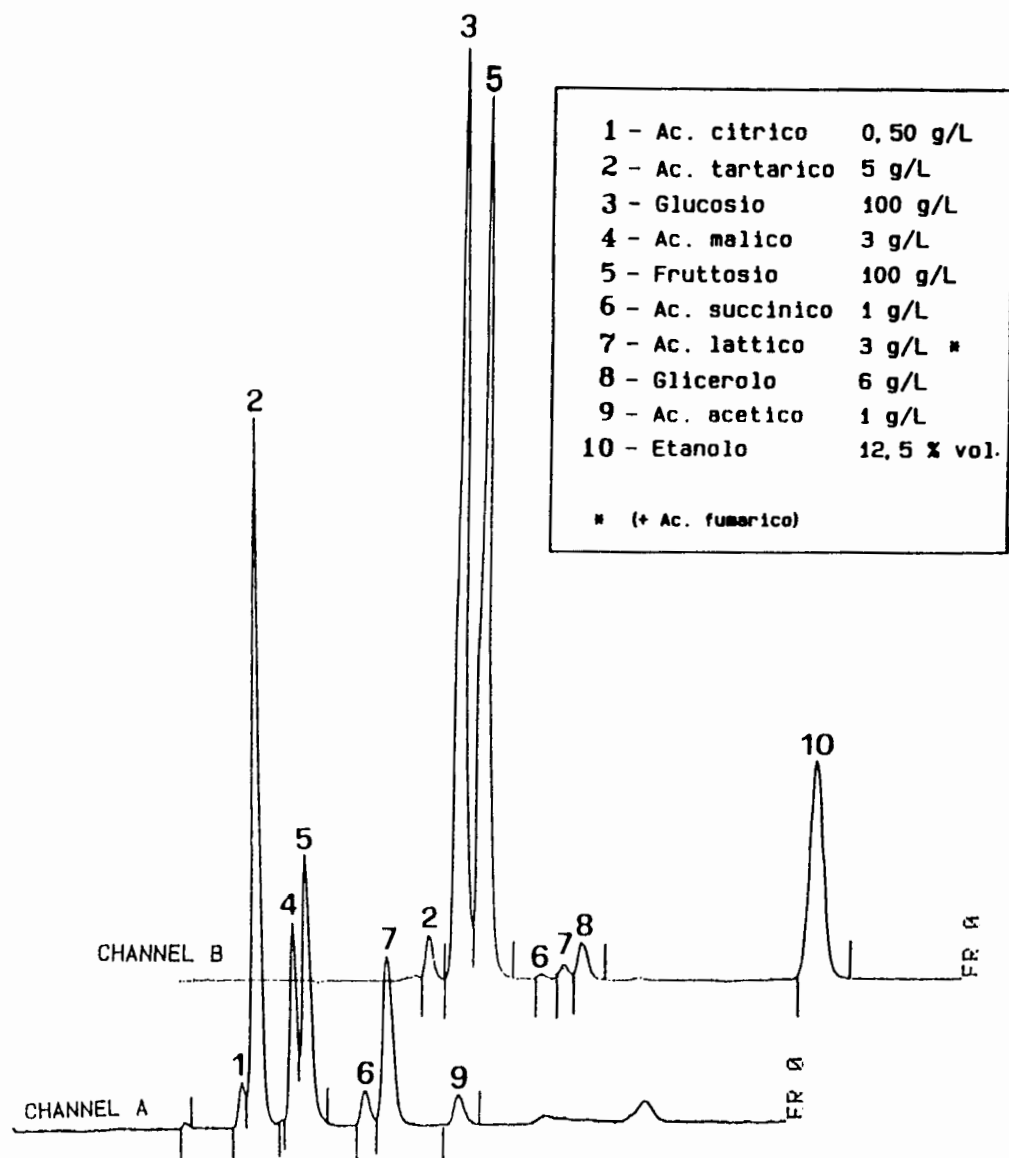
	k'1	k'2
acido citrico	0.3279	0.3224
acido tartarico	0.4408	0.4258
glucosio	-	0.5431
acido malico	0.6325	0.6103
fruttosio	0.6953	0.6775
acido succinico	1.0430	1.0034
acido lattico	1.1738	1.1275
glicerolo	-	1.2241
acido acetico	1.5931	1.5344
etanolo	-	2.5155

Tab. 2 Analisi della correlazione e della regressione lineare su dati analitici di 24 mosti di Nebbiolo ottenuti per HPLC e mediante metodi enzimatici (glucosio, fruttosio, ac. malico) o colorimetrici (ac. tartarico).

Parametri	Range concentrazione g/L		r	b ± Sb* t _{0.05}
	H.P.L.C.	enzim. o colorim.		
GLUCOSIO	94.9÷120.7	94.4÷118.6	1.00	0.85 ± 0.008
FRUTTOSIO	99.8÷125.4	97.8÷127.5	1.00	1.08 ± 0.0068
AC. TARTARICO	5.88÷ 7.69	5.59÷ 7.58	1.00	1.02 ± 0.014
AC. MALICO	2.32÷ 4.83	2.39÷ 5.20	1.00	0.98 ± 0.024

Tab. 3 Confronto tra valori medi ottenuti nella determinazione dell'etanolo e del glicerolo mediante HPLC e mediante distillazione (etanolo) o metodo enzimatico (glicerolo) in un vino dolce e quattro vini secchi.

Campioni	Etanolo % in vol.		Glicerolo g/L	
	H.P.L.C.	Distillaz.	H.P.L.C.	Enzimat.
Moscato	7.15	7.10	5.15	5.03
Pinot b.	11.79	11.50	7.39	7.13
Chardonnay	13.07	12.91	8.06	7.90
Riesling	11.89	11.82	6.78	6.58
M. Thurgau	12.29	12.25	6.83	6.66
r	1,00		1,00	
b ± Sb*t _{0.05}	0.98 ± 0.0143		0.97 ± 0.0105	



**FIG.1 - CROMATOGRAMMI OTTENUTI NELLA SEPARAZIONE DI
UNA MISCELA STANDARD utilizzando
il rivelatore U.V. A 210 nm (channel A)
e il rivelatore R.I. (4×10^{-6} RIU fondo scala, channel B).
Colonna Aminex HPX87 H, temperatura 65°C,
flusso 0,6 ml/min, eluente H_2SO_4 0,0026 N.**

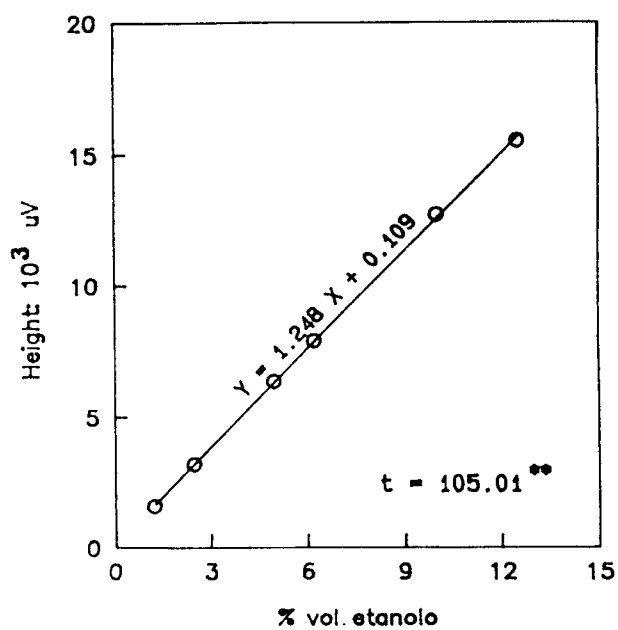
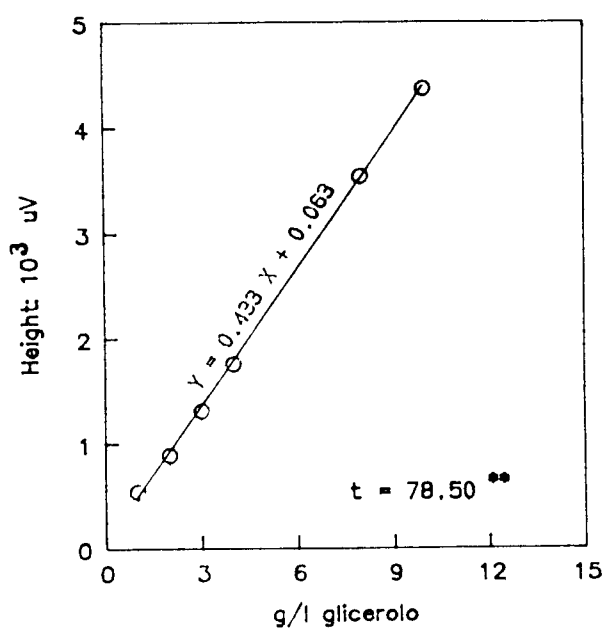
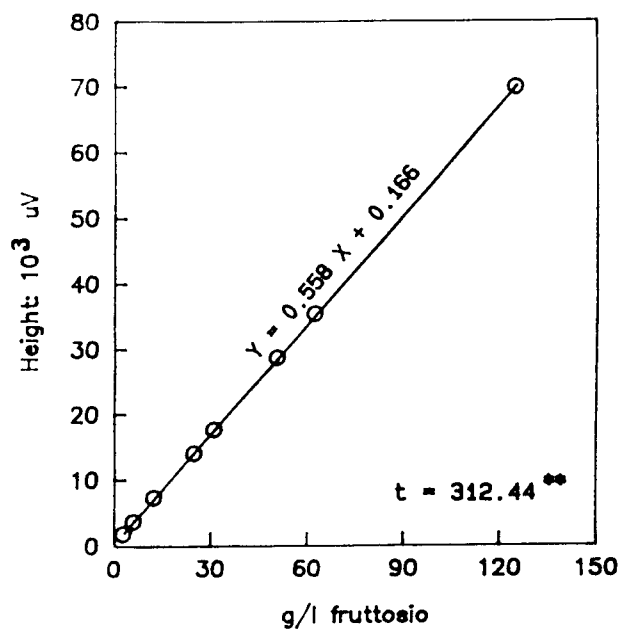
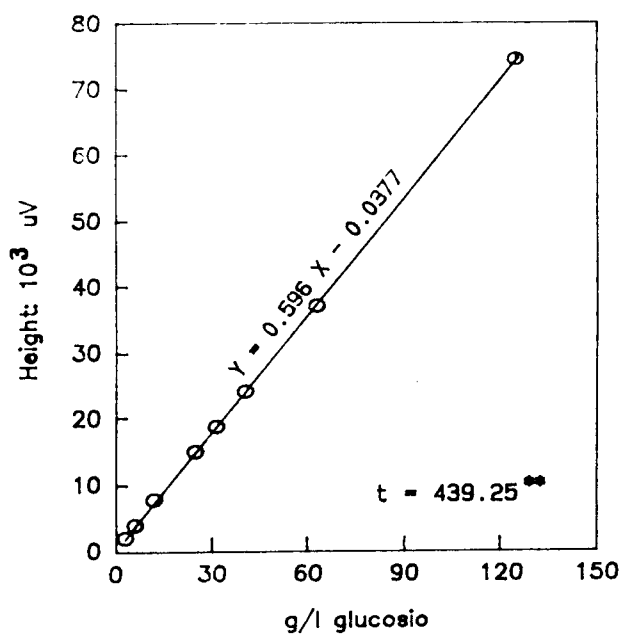
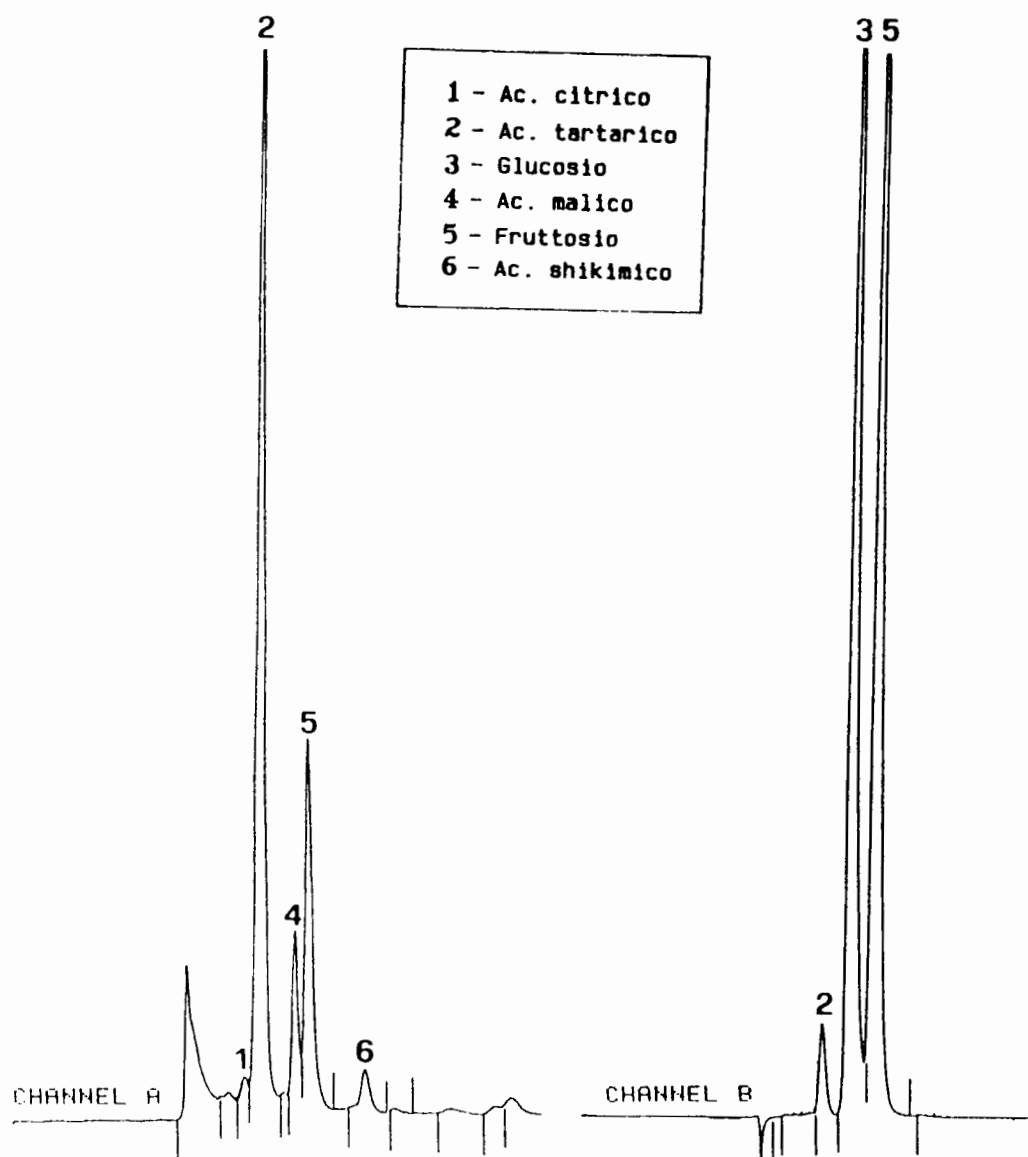


FIG.2 - CURVE DI CALIBRAZIONE DI GLUCOSIO, FRUTTOSIO, GLICEROLO ED ETANOLO.
Condizioni cromatografiche come FIG.1.



**FIG.3 - CROMATOGRAMMI OTTENUTI NELLA DETERMINAZIONE
DI GLUCOSIO, FRUTTOSIO, AC. MALICO E TARTARICO
IN UN MOSTO DI NEBBIOLO.**

U.V. = channel A; R.I. = channel B.
Condizioni cromatografiche come FIG.1.

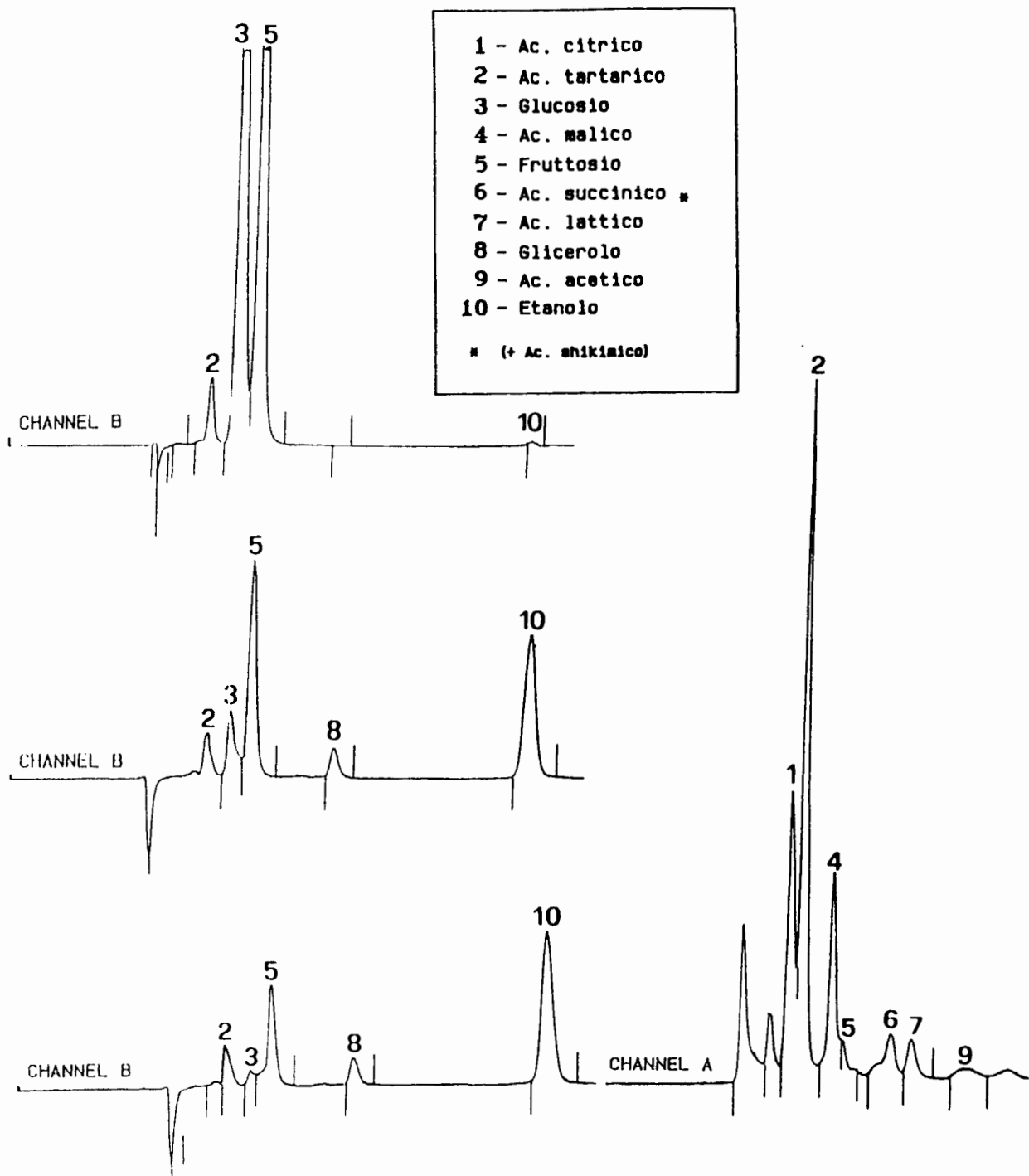


FIG.4 - CROMATOGRAMMI OTTENUTI IN DIVERSE FASI DELLA FERMENTAZIONE DI UN MOSTO.

A = inizio fermentazione (R.I.);

B = prelievo intermedio (R.I.);

C = glucosio < 2 g/L, fruttosio 10 g/L (R.I.);

D = come C con riv. U.V..

Condizioni cromatografiche come FIG.1.

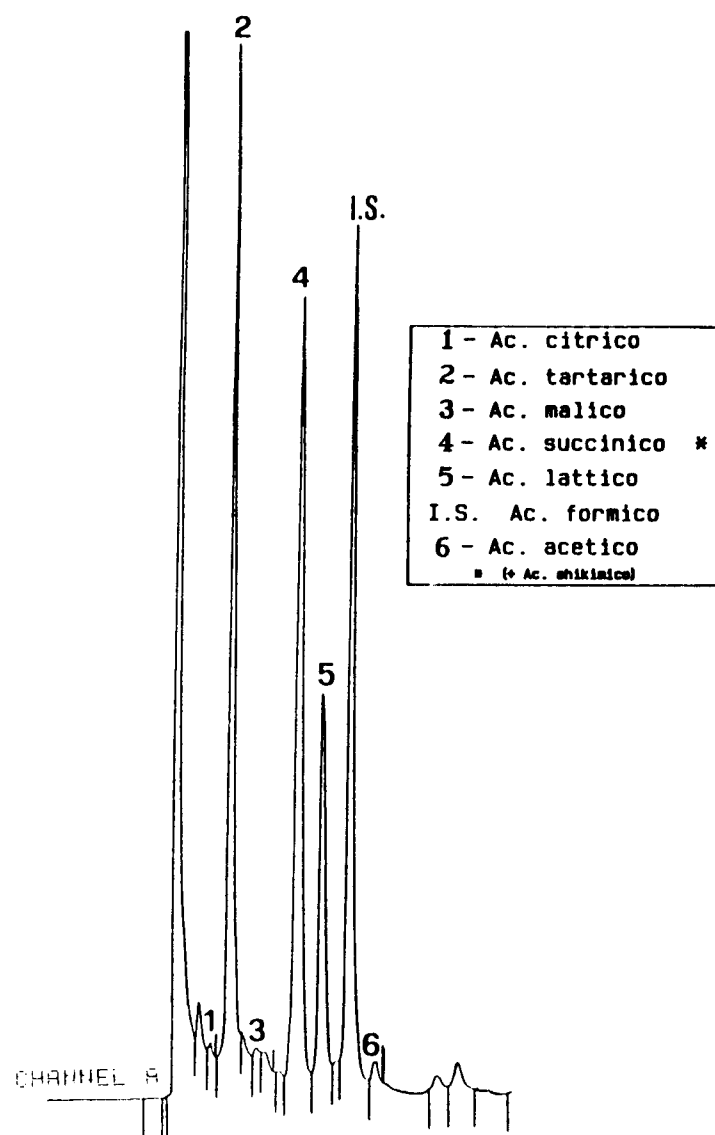


FIG.5 - SEPARAZIONE DEGLI ACIDI DI UN VINO ROSSO.
Rivelatore U.V., Colonna Aminex HPX87 H, temperatura 65°C,
flusso 0.8 ml/min, Eluente H₂SO₄ 0.013 N.

UTILIZZAZIONE DI UN SISTEMA CROMATOGRAFICO HPLC PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI TARTARICO E MALICO NELLE UVE

Renzo STEFANI, Agostino TONON
Istituto Agrario Provinciale
San Michele a/A (Trento)

RIASSUNTO

Nel presente lavoro si è studiata la possibilità di utilizzare un sistema cromatografico HPLC per la determinazione rapida degli acidi tartarico e malico nelle uve durante la vendemmia. Per poter aumentare la cadenza analitica dei campioni si è pensato di modificare il sistema con l'utilizzo di due colonne in parallelo e una valvola commutatrice che permettesse di utilizzare una colonna per l'analisi mentre la seconda era in lavaggio. La commutazione avveniva dopo l'uscita dell'acido malico che era l'ultimo picco che interessava durante l'analisi. In questo modo si raggiungeva il duplice scopo di aumentare la cadenza analitica e di caricare ogni singola colonna con un numero minore di campioni, con evidenti riflessi sulla durata. I confronti tra i dati ottenuti per HPLC e quelli ricavati con i metodi tradizionali hanno dimostrato la concordanza degli stessi e quindi la validità del sistema adottato.

INTRODUZIONE

L'acidità di un vino è sempre stata considerata uno dei principali fattori per la conoscenza e per la qualità del prodotto. Questa affermazione è tanto più vera nella moderna enologia dove si è capito che per ottenere prodotti migliori è necessario avere una migliore conoscenza.

L'acidità di un vino rappresenta uno dei primi aspetti nell'approccio sensoriale, rivelandosi di fondamentale importanza per l'equilibrio del gusto e per la serbevolezza. Inoltre l'acidità è uno di quei parametri regolati da precise normative nazionali e comunitarie.

Questi aspetti spiegano perchè la conoscenza dell'acidità di un prodotto enologico sia così importante.

E' chiaro d'altra parte che l'acidità del prodotto finale, (il vino), è strettamente legata e dipende dalla composizione dei prodotti che danno origine al vino stesso, ci si riferisce al mosto e ancora prima all'uva di partenza. Conoscere quindi la composizione dell'uva sarà senz'altro utile per poter prevedere quella del vino.

Per poter conoscere l'acidità di un prodotto si fa generalmente riferimento all'acidità titolabile, che è anche il parametro adottato dalla normativa ufficiale.

La conoscenza del solo valore dell'acidità titolabile, anche se importante, non è comunque sufficiente a darci un quadro più completo del complesso acidico dell'uva, che è formato per almeno il 95% da due acidi bicarbossilici, l'acido L-tartarico e l'acido L-malico. E' quindi necessario per avere un quadro più completo dell'acidità conoscere la concentrazione di questi due acidi.

Sapere la quantità dei singoli acidi nell'uva è molto importante in quanto questi hanno un comportamento diverso durante la fermentazione e durante l'invecchiamento del vino. Infatti l'acido L-tartarico è un acido chimicamente stabile, ma che tende a formare col potassio, naturalmente contenuto nei mosti in ragione di 1-2 g/l, sali scarsamente solubili che precipitano nel tempo, abbassando così la quantità di acido tartarico presente nel vino.

L'acido L-malico invece ha un comportamento opposto. Esso infatti forma col potassio sali solubili che non precipitano, ma è soggetto a delle alterazioni chimiche che tendono a trasformarlo per opera dei batteri lattici naturalmente presenti nel vino, in acido L-lattico e anidride carbonica. Tale fenomeno è noto col nome di fermentazione o retrogradazione malo-lattica. L'importanza di questo processo è dovuta al fatto che l'acido L-lattico ottenuto è un acido monocarbossilico, per cui come risultato si avrà un abbassamento dell'acidità.

Il conoscere le concentrazioni di acido tartarico e acido malico nelle uve ci potrà quindi fornire delle indicazioni di come sarà e di come si evolverà l'acidità del vino e quale dovrà essere dal punto di vista tecnologico il comportamento più corretto per ottenere il prodotto desiderato.

D'altra parte non è possibile conoscendo l'acidità titolabile delle uve risalire alle quantità dei singoli acidi, nemmeno in modo approssimato, essendo il loro rapporto variabile e dipendente da diversi fattori quali: il grado di maturazione, l'andamento dell'annata, il tipo di vitigno e di portainnesto, le condizioni pedoclimatiche, ecc.

A questo proposito si può osservare in fig. 1 quale sia la degradazione dell'acidità titolabile durante la maturazione.

In fig. 2 invece si può seguire nello stesso campione l'evoluzione degli acidi malico e tartarico.

Si notano immediatamente come le curve di evoluzione dei due acidi siano fra loro diverse. Generalmente si può dire che quando l'uva è ancora acerba la quantità di acido malico è nettamente superiore a quella dell'acido tartarico. Col procedere della maturazione si ha un calo fisiologico di ambedue gli acidi, molto più accentuato per l'acido malico. Così alla maturazione si avrà una concentrazione in acido tartarico superiore a quella dell'acido malico.

E' necessario quindi, per conoscere la struttura del mosto, determinare la concentrazione dei singoli acidi durante la maturazione e ciò anche per ricercare il migliore periodo della vendemmia tenendo conto anche delle esigenze di cantina.

MATERIALI E METODI

- cromatografo HPLC Bio-Rad mod. MDL-HRLC 8221 a due pompe completo di chromatography data Station per ricezione e elaborazione dati
- HPLC column Heater
- Autocampionatore Bio-Rad mod. AS-100
- Rivelatore U.V. Bio-Rad mod. 1706 programmabile
- Valvola commutatrice
- Due colonne per HPLC aminex HPX-87H da 300 mm
- Fase mobile: H₂SO₄ 0.0026
- Flusso 0.95 ml/min
- Temperatura: 65 °C
- Lunghezza d'onda 210 nm
- filtri da 0.45 µm

RISULTATI E DISCUSSIONE

Per le ragioni sopra descritte era sorta presso il Laboratorio di Analisi e di Ricerche dell'Istituto Agrario Provinciale di San Michele all'Adige l'esigenza di determinare la quantità degli acidi tartarico e malico in un numero elevato di campioni sia nelle uve durante la maturazione che sui mosti conservati, derivanti da sperimentazioni enologiche.

Per risolvere tale esigenza è stato quindi necessario ricercare metodi di analisi che rispondessero ad una serie di caratteristiche; in particolare era necessario che fossero rapidi, affidabili, di manualità non complicata, che potessero essere automatizzati e che nel contempo mantenessero la precisione e dessero dei risultati comparabili con i metodi tradizionali.

Si sono prese quindi in esame le varie tecniche ed i diversi tipi di attrezzature offerte dal mercato onde risolvere il problema che si era presentato. Dopo attente valutazioni la scelta è caduta sulla cromatografia liquida ad alta prestazione (H.P.L.C.). In effetti l'utilizzo dell'HPLC consentiva la risoluzione dei nostri problemi, in particolare si prestava ad essere automatizzata dando nel contempo risultati sufficientemente precisi confrontabili con quelli ottenuti con i metodi tradizionali, inoltre presentava una manualità semplice.

Per quanto concerne la colonna cromatografica si è optato per una colonna a scambio ionico, che si presentava meno versatile di una colonna R.P. 18, ma che era indubbiamente più specifica.

Questa scelta è stata fatta perchè tutta la nostra attrezzatura era dedicata esclusivamente alla determinazione degli acidi tartarico e malico nelle uve e nei mosti, sia freschi che conservati. Utilizzando l'attrezzatura citata è stato eseguito un confronto tra la tecnica HPLC ed i metodi tradizionali su 50 campioni di mosto. Da tale confronto è risultato che la differenza massima tra i due metodi di analisi è inferiore al 5% in valore assoluto. Tale differenza considerando la tipologia dei campioni analizzati e lo scopo dell'analisi era più che accettabile. Si sarebbe potuto ridurre ancora lo scarto tra i due tipi di analisi rendendo la determinazione per l'HPLC più precisa, ma ciò a scapito della rapidità di analisi. Si è preferito quindi una minore precisione a favore di una maggiore rapidità.

	ac. malico (g/l)	ac. tartarico (g/l)
media delle differenze (g/l)	0.034	0.106
deviaz. std delle differenze	0.234	0.278

Tab.1 - media e deviazione std degli scarti tra il metodo HPLC ed i metodi tradizionali.

Nella tabella 1 vediamo riportata la media e la deviazione standard degli scarti tra il metodo HPLC ed i metodi tradizionali. Osservando tale tabella si può notare come la media delle differenze e la deviazione standard tra i valori ottenuti con i diversi metodi sia piccola, tale da far ritenere soddisfacente il risultato.

Il procedimento adottato aveva comunque un inconveniente che era legato alla tecnica stessa della cromatografia. Infatti una volta iniziata l'analisi era necessario attendere l'esaurimento dell'analisi stessa con l'eluizione di tutti i composti iniettati prima di poter procedere ad una nuova iniezione, anche se per i nostri scopi l'analisi si poteva considerare terminata con l'uscita dell'acido malico che era l'ultimo picco di nostro interesse. Il dover attendere l'eluizione di tutti i composti in colonna allungava chiaramente i tempi di analisi diminuendo la cadenza analitica ed il numero giornaliero di campioni esaminabili. Il problema è stato risolto ricorrendo all'utilizzo di un sistema costituito da due colonne cromatografiche in parallelo, di cui una in analisi ed una in lavaggio, ognuna flussata da una pompa e comandata da una valvola gestita da un personal computer.

In fig. 3 e fig. 4 sono riportati gli schemi della valvola. Con il campionatore automatico si iniettava il primo campione che veniva eluito attraverso la colonna 1 passando quindi al rivelatore. Nel frattempo la colonna 2 era in lavaggio. Dopo l'uscita e la rivelazione dell'acido malico l'analisi veniva interrotta e la valvola commutatrice cambiava la colonna di analisi; in questo modo la colonna 1 veniva messa in lavaggio e poteva spurgare tutte le sostanze ancora presenti in colonna, mentre la colonna 2 era pronta per un'iniezione che veniva effettuata dal campionatore automatico.

All'uscita dell'acido malico dalla colonna 2 si aveva lo stop dell'analisi ed una nuova inversione delle colonne; la colonna 2 andava in lavaggio e la colonna 1, che nel frattempo aveva eluito tutte le sostanze della precedente analisi, era pronta per una nuova iniezione. Il sistema era utilizzabile in quanto gestito da un personal computer, (il cui software ci è stato fornito insieme all'HPLC dalla Bio-Rad), che una volta programmato comandava tutto il sistema dello scambio delle colonne, riceveva i dati di analisi, li elaborava e li stampava.

In questo modo si è riusciti a raddoppiare la cadenza analitica senza aumentare i flussi dell'eluente e senza dover sovraccaricare la colonna, con chiari riflessi sulla stabilità e sulla durata della colonna stessa. Avere un sistema del tipo esposto permette inoltre di lavorare in caso di necessità (es. per rottura di una pompa o di una colonna) con una sola pompa ed una sola colonna, chiaramente con cadenze dimezzate.

L'utilizzo del campionatore automatico e della data station permette di lavorare a tempo pieno, anche oltre il normale orario di lavoro senza necessità di particolari controlli da parte dell'operatore. Utilizzando tale apparecchiatura sono stati analizzati tra l'agosto 1989 ed il dicembre 1990 circa 10.000 campioni tra uve fresche e mosti conservati con risultati soddisfacenti.

Le due colonne montate inizialmente non sono mai state sostituite e continuano ad essere efficienti, con risposte fra loro paragonabili e analoghe nel tempo. A questo proposito possiamo riportare i fattori di risposta ricavati dalle curve di calibrazione per le due colonne in periodi diversi.

data	colonna	ac. tartarico	ac. malico
18.01.1991	1	$1.434 \cdot 10^{-6}$	$2.794 \cdot 10^{-6}$
	2	$1.432 \cdot 10^{-6}$	$2.761 \cdot 10^{-6}$
04.02.1991	1	$1.446 \cdot 10^{-6}$	$2.823 \cdot 10^{-6}$
	2	$1.450 \cdot 10^{-6}$	$2.821 \cdot 10^{-6}$

Tab.2 - Fattori di risposta delle due colonne

Si può notare come i fattori fra le due colonne siano molto simili e costanti nel tempo.

CONCLUSIONE

Si può affermare che il sistema cromatografico utilizzato ha corrisposto pienamente alle aspettative in quanto soddisfa le esigenze di rapidità, precisione ed affidabilità per le quali è stato messo a punto.

FIGURA 1,2,3,4,5

BIBLIOGRAFIA

1. A. Schneider, V. Gerbi, and M. Redoglia (1987) "A rapid HPLC method for separation and determination of major organic acids in grape musts and wines". *Am J. Enol. Vitic.* 35, 151-2
2. Metodi Ufficiali di Analisi Italiani - G.U. n. 161 del 14/07/86 pag. 26
3. M. Vidal and J. Blouin (1978) "Dosage colorimetrique rapide de l'acide tartrique dans les mouts et les vins". *Rev. Fr. Oenol.* 16, 39-46
4. M.E. Evans (1983) "High performance liquid chromatography in oenology" *J. Liq. Chromatogr.* 6, 153-8
5. R. Schwarzenbach (1984) "Direkte Bestimmung von Sauren in Frucht und Gemusesaften mittels HPLC" *Mitt. Geb. Lebensmittellunters Hyg.* 75, 51-9
6. J.K. Palmer and D.M. List. (1973) "Determination of organic acids in foods by liquid chromatography". *J. Agric. Food Chem.* 21, 903-6
7. J.D. McCord, E. Trousdale, and D.D.Y. Ryu (1984) "An improved sample preparation procedure for the analysis of major organic components in grape must and Wine by high performance liquid chromatography" *Am. J. Enol. Vitic.* 35, 28-9

**FIG.1 - ANDAMENTO DELL'ACIDITA' TITOLABILE
NELLE UVE DURANTE LA MATURAZIONE.**

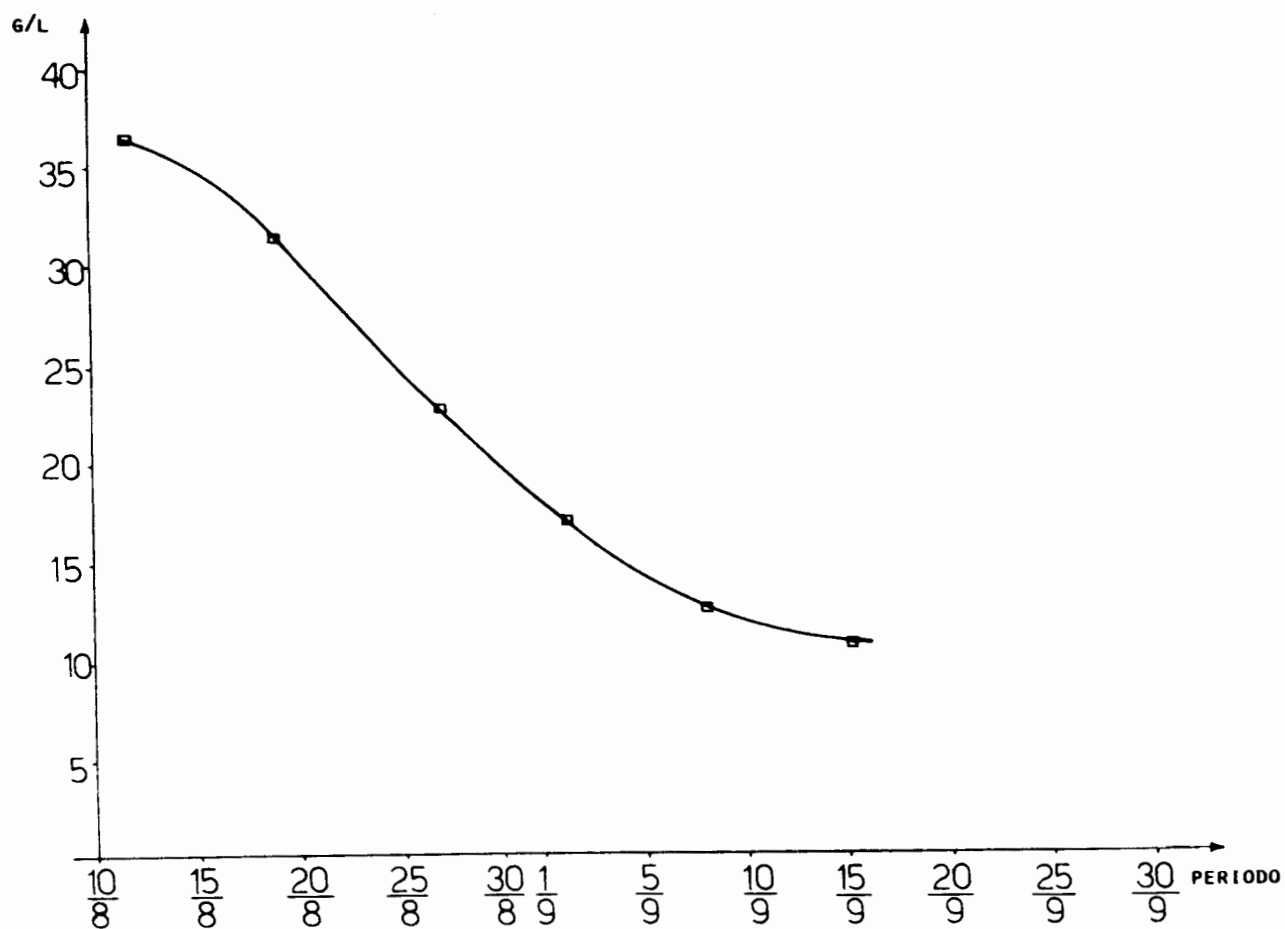


FIG.2 - VARIAZIONE DELLA QUANTITA' DI ACIDO TARTARICO E ACIDO MALICO NELLE UVE DURANTE LA MATURAZIONE.

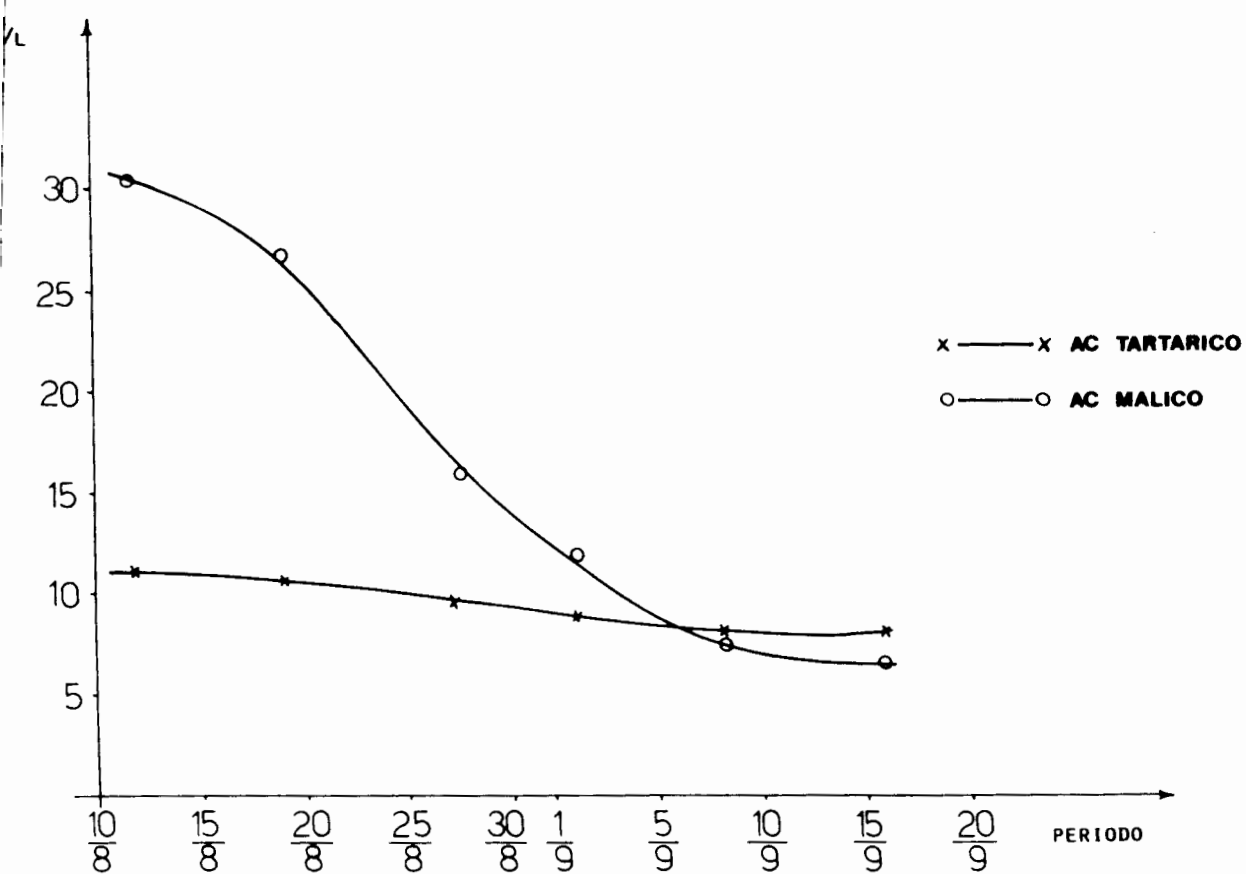


FIG.3 - SCHEMA DEL FLUSSO DELLE DUE COLONNE.

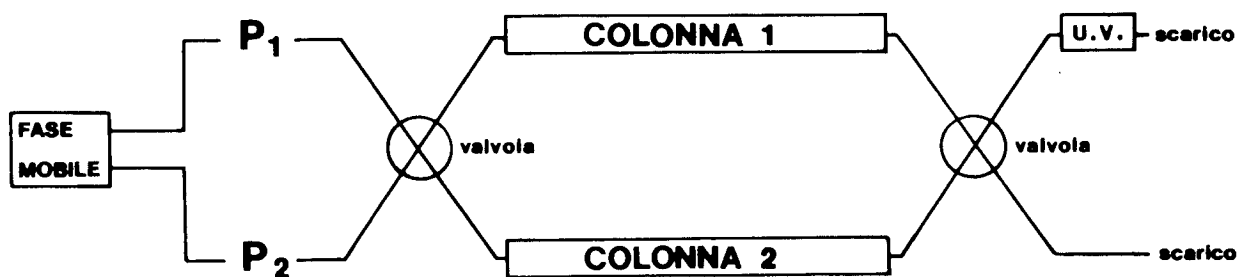
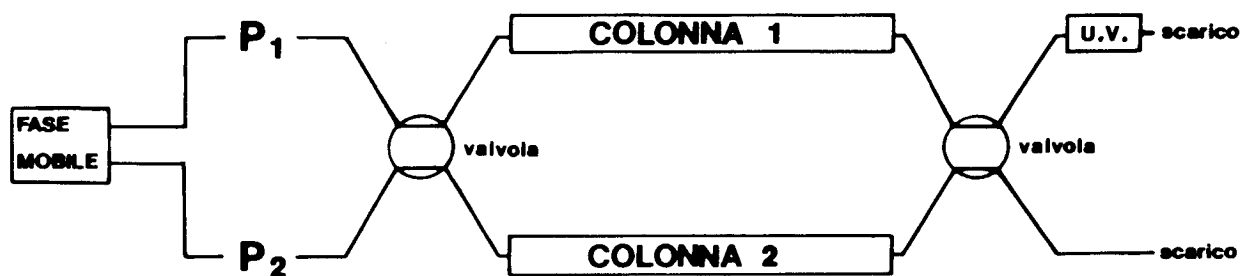


FIG.4 - SCHEMA DEL FLUSSO DELLA VALVOLA COMMUTATRICE.

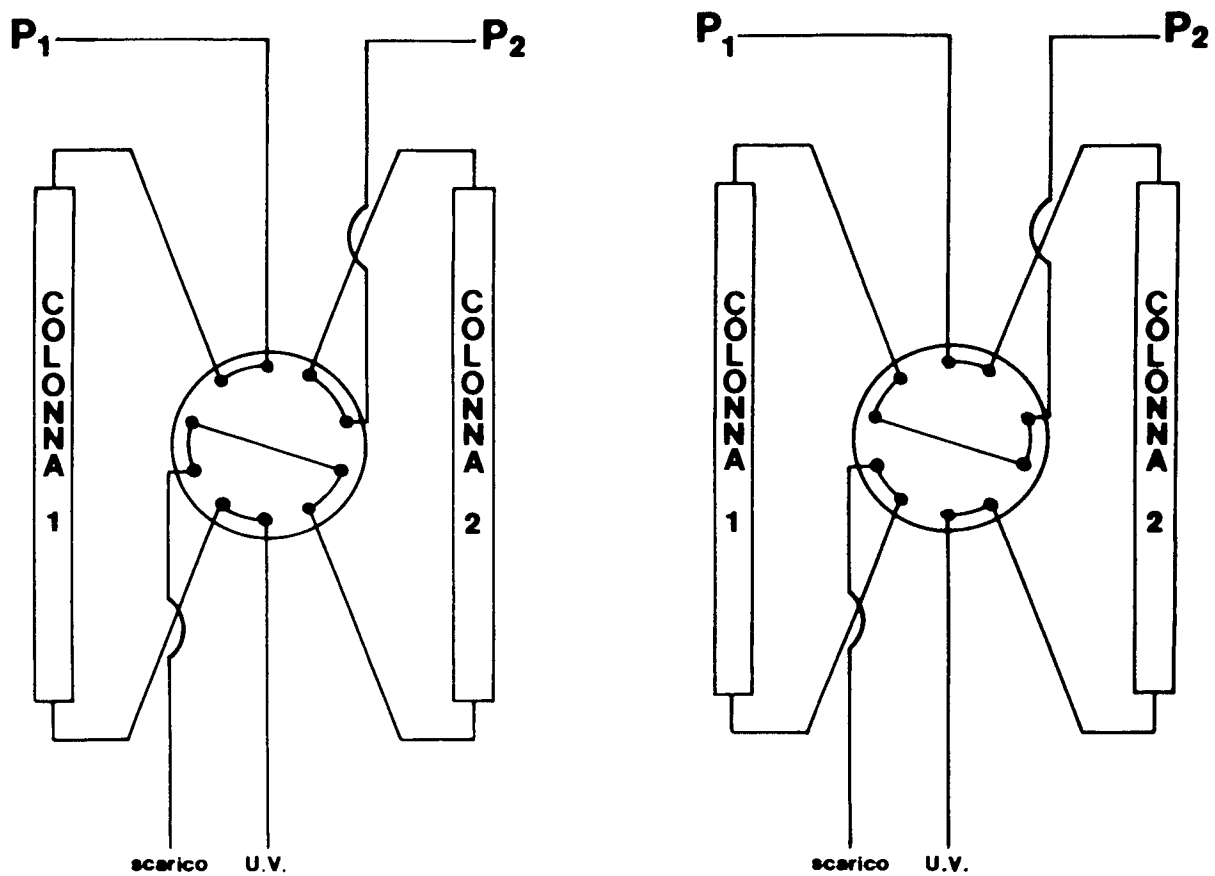
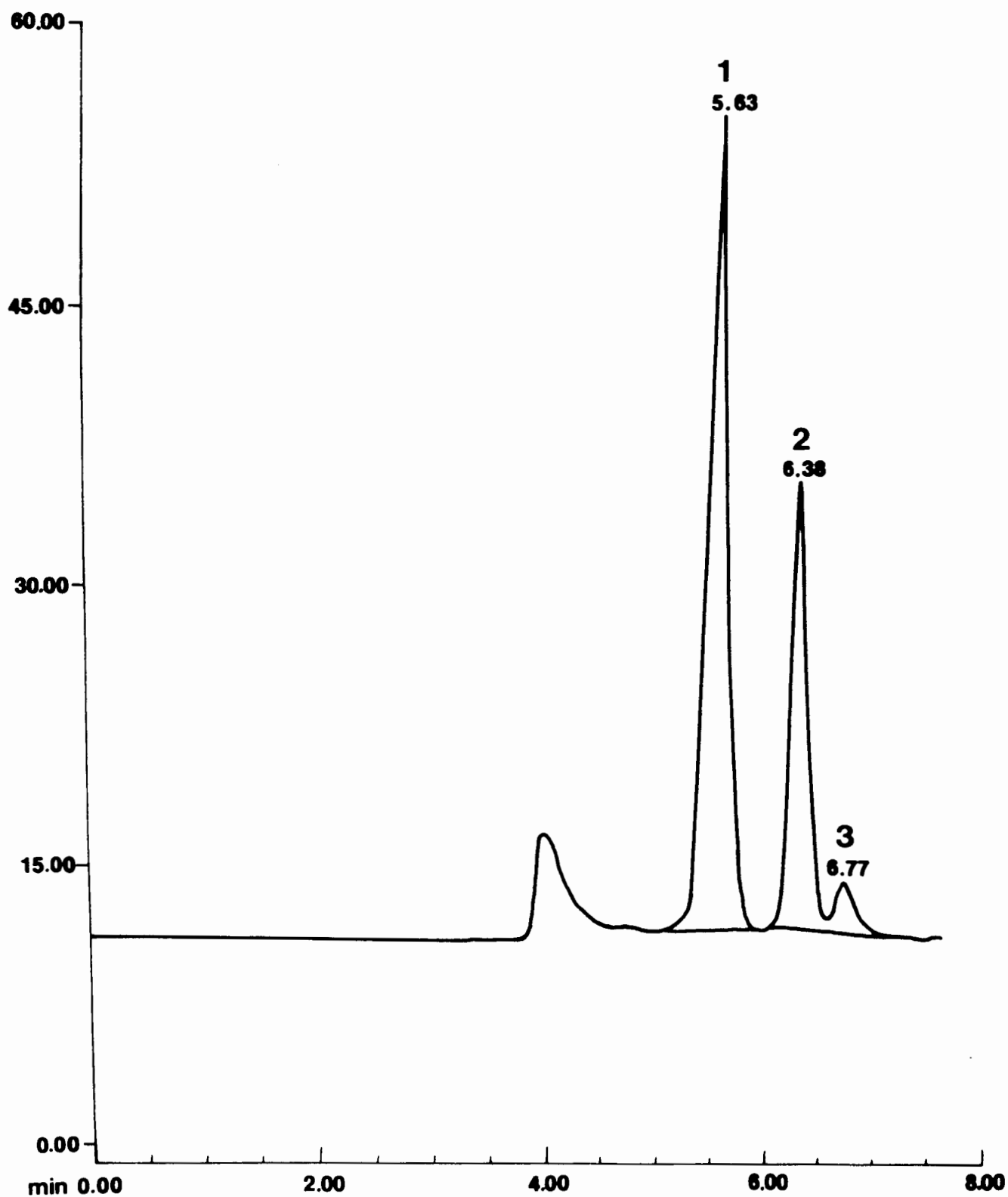


FIG.5 - CROMATOFRAMMA DI UN MOSTO

Bio-Rad Laboratories
Series 800 HRLC System



IMPIEGO DELLA TECNICA HPLC NEL CONTROLLO QUALITA' DI UNO STABILIMENTO ENOLOGICO

Ivano TONUTTI
Laboratorio Ricerche Martini & Rossi S.p.A.
-Pessione - Torino

RIASSUNTO

Nella relazione viene illustrato il funzionamento del Servizio Controllo Qualità in uno stabilimento di produzione di vini, spumanti e bevande alcoliche e, in questo ambito, viene sottolineato l'impiego della cromatografia liquida ad alta pressione. Sono riportati alcuni metodi per il dosaggio di principi attivi di particolare importanza per la valutazione dell'idoneità di materie prime, intermedi di lavorazione e prodotti finiti.

Le determinazioni eseguite nel nostro laboratorio sono riassunte nello schema seguente:

Vini e spumanti

- zuccheri e glicerina
- acidi organici
- acido sorbico
- residui di pesticidi
(benimidazoli)

Erbe, estratti idroalcolici, vermouths, liquori, sciroppi.

- coloranti azoici
- anetolo
- p.a. Iris (ironi)
- p.a. Aloe (aloine)
- vaniglia (vanillina)
- p.a. Genziana (genziopirina)
- alcaloidi China
- p.a. legno Quassio (quassine)
- residui di pesticidi
- acido agaricinico

Introduzione

In questi ultimi anni si sente sempre più spesso parlare di qualità, soprattutto in campo alimentare; i capitali investiti in questo campo sono sempre più elevati.

Un sicuro contributo a questo fatto è dato da una maggiore attenzione del consumatore alla qualità del prodotto. Per produrre "qualità" è indispensabile disporre di un sistema di controllo efficiente: in questa ottica si inserisce il Servizio Controllo Qualità.

"Stabilimento enologico": questa definizione talvolta individua una struttura produttiva che, oltre alla produzione di vini e spumanti, si occupa di tutta una serie di prodotti a "base vino" e bevande alcoliche in genere; questo fatto comporta la necessità di provvedere al controllo di una serie di parametri che riguardano anche la verifica dell'idoneità delle materie prime necessarie a queste produzioni.

Questo compito è a carico del S.C.Q., che, pur rimanendo una struttura eminentemente tecnica, non è più solo organo di controllo del prodotto finito.

In figura 1 si riporta uno schema di flusso relativo ai controlli analitici ed organolettici eseguiti sulle materie prime, su alcuni prodotti intermedi e sui prodotti finiti. Figura n.1

Dallo schema precedente si può rilevare il numero notevole di controlli analitici che devono essere eseguiti in laboratorio; considerando che il controllo qualità esige delle risposte rapide anche a scapito di una elevata precisione dei risultati analitici, a questo punto è facile intuire che le metodiche analitiche impiegate devono essere caratterizzate da:

- rapidità di preparazione del campione
- velocità di analisi
- affidabilità

Per elaborare e mettere a punto alcune di queste metodiche l'HPLC si è dimostrato essere l'unica strada proficuamente perseguibile. E' importante sottolineare che il S.C.Q. rappresenta anche l'unità di ricerca; in tal senso si occupa anche di analisi che esulano dalla normale routine, ruolo che consente di riconoscere ancor più la versatilità di tale tecnica.

Nella figura 2 sono riassunte le determinazioni che vengono normalmente eseguite su alcune materie prime e su alcuni prodotti finiti nel nostro laboratorio controllo qualità.

Figura 2 - Controlli eseguiti mediante la tecnica HPLC

Vini e Spumanti

- zuccheri e glicerina
- acidi organici
- acido sorbico
- residui di pesticidi (benimidazoli)

Erbe Estratti Idroalcolici - Vermouths - Liquori - Sciroppi -

- coloranti azoici
- anetolo
- p.a. Iris (ironi)
- p.a. Aloe (aloini)
- vaniglia (vanillina)
- p.a. Genziana (genziopirina)
- alcaloidi China
- p.a. legno Potasso (quassina)
- residui di pesticidi (benimidazoli)
- acido agaricinico (in fase di completamento)

Come già accennato in precedenza la tendenza attuale nei laboratori di Controllo Qualità, nella preparazione di un metodo analitico, è quella di ottenere un procedimento affidabile che non richieda particolari trattamenti del campione prima dell'analisi cromatografica vera e propria.

L'impiego della tecnica HPLC permette di sviluppare metodi analitici con tali caratteristiche, e questo per diversi fattori:

- la colonna HPLC è in grado di sopportare quantità di campione molto grandi, questo permette di evitare di dover concentrare lo stesso per ottenere la necessaria affidabilità

- è possibile analizzare campioni non volatili
- l'impiego di un detector diode array permette di acquisire dati a diverse lunghezze d'onda contemporaneamente, fatto importante nel caso vi sia la necessità di eseguire delle conferme oppure determinare composti diversi nella stessa analisi
- i tempi di analisi sono generalmente molto brevi (particolarmente rispetto ad una analisi gascromatografica); ciò consente fra l'altro di sfruttare al meglio la potenzialità di un autocampionatore, lasciando libero l'operatore di occuparsi di altre mansioni
- per ottimizzare una separazione in una analisi HPLC vi è la possibilità di intervenire su un gran numero di fattori:
 - polarità della colonna
 - polarità del solvente
 - condizioni di eluizione (isocratica od a gradiente)
 - temperatura della colonna

Altro possibile proficuo impiego di un sistema HPLC è la purificazione di campioni per una successiva analisi gascromatografica: sono citati in bibliografia diversi lavori eseguiti con colonne a "gel permeation" nella preparazione di campioni per la determinazione di residui di pesticidi in erbe aromatiche (matrici particolarmente insidiose per l'analista, a causa di numerosissime interferenze connesse per lo più con la loro componente aromatica); l'applicazione di tale tecnica è attualmente oggetto di studio nel nostro laboratorio.

In questa relazione vengono presentate alcune procedure analitiche correntemente impiegate per il dosaggio di:

- principi attivi caratteristici di alcune erbe impiegate nella preparazione di prodotti aromatizzati:
 - ANETOLO
 - ALCALOIDI DELLA CHINA
 - GENZIOPICRINA
 - VANILLINA
- coloranti AZOICI in sciroppi e liquori
- acido sorbico nei vini

RASSEGNA DI METODICHE ANALITICHE

- Determinazione dell'acido SORBICO in vini e vermouth

L'acido sorbico viene impiegato in enologia come antisettico, autorizzato con regolamentazione CEE fino ad un massimo di 200 ppm. Il dosaggio viene effettuato sul campione di vino o vermouth come tale, senza alcun pretrattamento; l'unica avvertenza è quella di filtrare a 0,45 µm eventuali analiti torbidi.

• Condizioni di analisi

- apparecchiatura:	LC Hewlett Packard 1090 con autocampionatore		
- colonna:	LICHROSPHER RP C18 25 cm, 4 mm, 5 µm		
- temperatura colonna:	40 °C		
- eluente:	SOPROPANOLO	30%	
	Tampone Fosfato pH 3	70%	
- flusso:	0,5 ml/min		
- detector:	Diode array HP		
- lunghezza d'onda:	254 nm bandwidth	4	
" " rif:	320 nm	10	
- loop:	20 µl		

• Risultati e discussione

I recuperi percentuali sono risultati mediamente superiori al 90% ed il limite di rivelabilità del metodo è pari a 2 mg/l. Le prove di laboratorio hanno dimostrato che l'impiego, nella miscela eluente, di una soluzione tampone a pH 3, è di fondamentale importanza per ottenere una buona riproducibilità della metodica.

L'impiego di una soluzione acida a pH 3, come suggerito da alcuni Autori, induce variazioni anche rilevanti del tempo di ritenzione dell'acido sorbico.

In figura 3 sono riportati i cromatogrammi relativi ad una prova di fortificazione eseguita su un vermouth rosso addizionato di una quantità di acido sorbico pari a 20 mg/l:

- 1) acido sorbico sol. standard 20 mg/l
- 2) vermouth rosso come tale
- 3) vermouth rosso fortificato con acido sorbico (20 ppm)

Numerose prove eseguite nel nostro laboratorio hanno dimostrato l'affidabilità e la riproducibilità del metodo.

Figura 3

- Determinazione di coloranti AZOICI artificiali

Sono stati presi in considerazione i seguenti coloranti artificiali:

- E 102 = Giallo Tartrazina
- E 122 = Rosso Azorubina
- E 123 = Rosso Amaranto
- E 124 = Rosso Ponceau 4R

Per questa determinazione viene generalmente impiegato il metodo ufficiale "Arata2", riportato in figura 4, basato sul fissaggio dei coloranti acidi su lana sgrassata, successivo rilascio in ambiente basico per NH_4OH e determinazione finale per cromatografia su carta o su strato sottile.

Si tratta di un metodo che richiede un notevole dispendio di tempo, e di conseguenza non molto pratico.

Il metodo HPLC messo a punto prevede di operare direttamente sul campione senza un'estrazione preventiva, in tal modo si evita anche la formazione di artefatti quali il colorante giallo originato dall'E 124 (Rosso Ponceau) trattato con una base.

E' in ogni caso buona norma filtrare con membrana da 0.45 μm eventuali campioni torbidi.

• Condizioni di analisi

- apparecchiatura:	LC Hewlett Packard 1090 con autocampionatore	
- colonna:	LICHROSPHER RP C18 25 cm, 4 mm, 5 μm	
- temperatura colonna:	40 °C	
- eluente :	METANOLO	30%
	ACQUA al 2% di AMMONIO FOSFATO	70%
- flusso:	0.6 ml/min	
- detector:	Diode array HP	
- lunghezza d'onda:	A) 520 nm	
	B) 430 nm	
- loop:	5 μl	

• Risultati e discussione

Il metodo consente un'ottimale separazione dei coloranti azoici rossi (fig. 5A) senza avere la presenza di sostanze interferenti; le percentuali di recupero sono superiori all'80%. La possibilità di acquisire i dati a due lunghezze d'onda differenti permette anche la determinazione contemporanea del Giallo Tartrazina. (Figura 5B)

1. Scopo e campo di applicazione

Ricerche dei coloranti organici rossi di sintesi, di natura acida, nel mosto, nel vino e nell'aceto.

2. Principio del metodo

I coloranti di natura acida vengono fissati su lana in ambiente acido, eluiti in ambiente alcalino e identificati per cromatografia su strato sottile.

A - SAGGIO PRELIMINARE (Metodo Arata)

3. Reattivi

- 3.1 Potassio solfato acido: soluzione al 10%
- 3.2 Acido cloridrico ($d = 1.10$)
- 3.3 Ammonio idrato ($d = 0.880$)
- 3.4 Lana bianca, sgrassata con etere etilico e lavata con soluzione diluita di idrossido di sodio e acqua

4. Procedimento

Far bollire 100 ml di prodotto in un bicchiere da 250 ml, fino a ridurre di circa un terzo il volume del liquido. Aggiungere 5-10 ml della soluzione di solfato acido di potassio, 0.5 g di lana e far bollire per almeno 5 min. Decantare il liquido e lavare ripetutamente la lana con acqua. Aggiungere 50-100 ml di acqua acidulata con l'acido cloridrico; bollire per 5 min, decantare il liquido e ripetere il lavaggio fino ad ottenere acqua incolore dopo l'ebollizione. Lavare ripetutamente la lana fino a scomparsa della reazione acida. Versare nel bicchiere 50 ml di acqua e 1 ml di idrossido di ammonio; far bollire per almeno 10 min. Decantare il liquido raccogliendolo in un bicchiere ed eliminare per ebollizione l'eccesso di ammoniaca. Raffreddare ed aggiungere acido cloridrico fino a reazione nettamente acida. Introdurre nel liquido un filo di lana bianca e far bollire per circa 5 min. Lavare la lana accuratamente con acqua. Una netta colorazione rossa indica la presenza di materie coloranti estranee.

5. Osservazioni

Se la colorazione della lana è debole, ripetere il procedimento a partire dall'aggiunta della soluzione di idrossido di ammonio. Se la lana risultasse ancora colorata in rosso, anche se debolmente, sono presenti materie coloranti estranee. La colorazione della lana nella soluzione alcalina non deve mai volgere al verde. Alcuni prodotti genuini, intensamente colorati, possono dare delle colorazioni dal giallo al bruno.

(figura 4 continuazione)

B. IDENTIFICAZIONE DEI COLORANTI PER CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE

3. Reattivi

- 3.1 Lastre di gel di silice G
- 3.2 Liquido di sviluppo: butanolo, acqua, etanolo, idrato di ammonio (50+25+25+10) v/v

4. Apparecchiatura

- 4.1 Attrezzatura per la cromatografia su strato sottile.

5. Procedimento

Introdurre la lana colorata in rosso, ottenuta come in A5 in un bicchiere da 25 ml contenente 5 ml di acqua distillata resa alcalina con qualche goccia di idrato di ammonio; concentrare il liquido su bagnomaria bollente fino a metà volume e decantare il liquido raccogliendolo in una provetta. Depositare sulla lastra, alla distanza di 3 cm dal bordo inferiore, in punti distanziati di 2.5 cm, 40 µl della soluzione del campione in esame e delle soluzioni dei coloranti di cui si presuppone la presenza. Introdurre la lastra nella camera cromatografica che deve essere già satura dei vapori del liquido di sviluppo. Lasciare migrare il liquido di sviluppo fino a 15 cm dalla linea di deposizione; estrarre la lastra e far asciugare all'aria.

L'identificazione della materia estranea viene effettuata per confronto con gli R_f dei coloranti noti depositati sulla lastra.

- Dosaggio dell'ANETOLO in un estratto idroalcolico di Agarico (*Polyporus officinalis*)

Questo procedimento è stato messo a punto per la determinazione dell'anelolo nei frutti di anice ed in liquori tipo "pastis", nel caso considerato il metodo è stato impiegato per la determinazione dell'anelolo in un campione di Agarico che all'esame organolettico presentava una "nota" di anetolo.

L'estratto idroalcolico preparato per l'analisi organolettica veniva filtrato con filtro Millipore da 0.45 µm e diluito 1:1 con metanolo e quindi analizzato in HPLC.

• Condizioni analitiche

- apparecchiatura:	LC Hewlett Packard 1090 con autocampionatore	
- colonna:	LICHROSPHER RP C18 25 cm, 4 mm, 5 µm	
- eluente:	METANOLO	70%
	SOL. ACQUOSA a pH 3 per H ₃ PO ₄	30%
- flusso:	0.2 ml/min	
- detector:	diode array HP	
- lunghezza d'onda:	254 nm	
- loop:	5 µm	

• Risultati e discussione

Grazie alla messa a punto di questo metodo rapido è stato possibile verificare una contaminazione accidentale in una partita di agarico, spedita in sacchi che in precedenza avevano contenuto frutti e semi di anice.

La determinazione gascromatografica dell'anelolo richiede una complessa serie di diluizioni prima della determinazione, il che incide negativamente, oltre che sulla rapidità della determinazione, sulla riproducibilità delle analisi.

La riproducibilità dei risultati (in modo particolare per quantità di anetolo dell'ordine delle ppm) e la precisione si sono dimostrati superiori al metodo gascromatografico.

Nella figura 6 sono riprodotti i cromatogrammi relativi a:

- soluzione standard di anetolo 40 mg/l (A)
- estratto di agarico non contaminato da anetolo (B)
- estratto di agarico contaminato da anetolo (C)

Figura 6

- Dosaggio della VANILLINA

Viene proposto un metodo di dosaggio della Vanillina nei vermouth e negli estratti idroalcolici di vaniglia naturale, previa semplice diluizione del campione in esame.

Si tratta di un'analisi particolarmente importante sia per il controllo dei prodotti finiti sia per il controllo delle vaniglie acquistate dal commercio.

• Condizioni analitiche

- apparecchiatura:	LC Hewlett Packard 1090 con autocampionatore	
- colonna:	LICHROSPHER RP C18 25 cm, 4 mm, 5 μ m	
- temperatura colonna:	40 °C	
- eluente:	METANOLO	35%
	SOL. ACQUOSA a pH 3 per H3PO4	65%
- detector:	diode array HP	
- lunghezza d'onda:	280 nm bandwidth	4
" " rif:	360 nm " "	80
- loop:	5 μ l	

• Preparazione del campione

Campioni non perfettamente limpidi dovranno essere preventivamente filtrati su membrane da 0.45 μ m. L'analisi può essere effettuata direttamente sul campione nel caso dei vermouth, per gli estratti di vaniglia è conveniente eseguire una diluizione 1:10.

• Risultati e discussione

Questo tipo di analisi non presenta alcuna difficoltà, il tempo di ritenzione è dell'ordine di circa 10 min in una zona priva di interferenze.

La sensibilità è molto elevata: si possono valutare quantitativamente anche frazioni di mg/l di vanillina. La linearità accertata per la calibrazione è valida fino a 150 mg/l, con ottima riproducibilità dei risultati. La sensibilità dell'analisi può essere ulteriormente elevata eseguendo la determinazione a 230 nm anziché a 280 nm. La figura 7 riproduce i cromatogrammi HPLC di:

- A) soluzione standard di vanillina 20 mg/l
- B) vaniglia naturale infuso idroalcolico 55 °
- C) elisir di Garus (fantasia)

L'elisir di Garus, utilizzato in questo caso come oggetto di studio per la messa a punto della metodica analitica, è una vecchia formulazione impiegata come correttivo del gusto nelle preparazioni galeniche ed è costituito dalla mescolanza di numerose erbe aromatiche quali la cannella, i chiodi di garofano, la noce moscata ed in questo caso anche da vaniglia (da cui l'appellativo "di fantasia"); nonostante la complessità della formulazione, nel cromatogramma non sono presenti interferenze che influiscono nella determinazione della vanillina, ciò a conferma della validità del metodo impiegato.

Figura 7

- Determinazione HPLC degli alcaloidi della CHINA

Si tratta di una determinazione importante sia per quanto riguarda il controllo delle cortecce di china sia per il controllo del liquore china.

Prove preliminari hanno dimostrato che l'analisi diretta del liquore china, ed anche dell'estratto idroalcolico delle cortecce, forniva risultati poco attendibili a causa della presenza di numerose interferenze connesse con la struttura della matrice.

E' quindi stato messo a punto un metodo di estrazione degli alcaloidi per la loro successiva determinazione HPLC.

• Preparazione del campione

Il campione viene basificato mediante alcune gocce di NH_4OH conc.; quindi l'alcool contenuto nei campioni (che può dare luogo ad interferenze) viene eliminato per distillazione sottovuoto in evaporatore rotante. Il residuo ottenuto viene ripreso con acqua e nuovamente basificato; a questo punto viene eseguita un'estrazione con cloroformio (3x30 ml) e l'emulsione formatasi viene separata per centrifugazione a 5000 rpm.

La fase cloroformica viene portata a secchezza in evaporatore rotante sottovuoto e ripresa con metanolo (10 ml).

Dopo un'eventuale filtrazione a 0.45 μm si passa all'analisi HPLC.

• Condizioni analitiche

- colonna:	LICHROSPHER RP - Select B 25 cm, 4 mm, 5 μm		
- temperatura colonna:	35 °C		
- eluente:	TAMPONE pH 2,4	90%	
	ACETONITRILE	10%	
- detector:	diode array		
- lunghezza d'onda:	225 nm		
- loop:	5 μl		

• Risultati e commenti

Le figure 8 e 9 riproducono rispettivamente i cromatogrammi relativi ad una miscela standard di alcaloidi della china (8) ed a due dosaggi eseguiti su campioni di CHINA ROSSA (9A) e CHINA GIALLA (9B).

Le percentuali di recupero ottenute in diverse prove sono state superiori al 90%.

La risoluzione del cromatogramma è migliorata notevolmente sostituendo la normale colonna RP 18 con una RP Select B, specifica per l'analisi di sostanze basiche, la particolare preparazione di questa fase cromatografica minimizza lo scodamento (tailing) dei picchi, anche in presenza di notevoli quantità di sostanze basiche come possono essere gli alcaloidi della china.

Figura 8

Figura 9

- Determinazione della GENZIOPICRINA

Si tratta di un principio amaro contenuto nella Genziana di cui vengono utilizzati gli estratti idroalcoolici delle radici, come amaricanti ed aromatizzanti.

E' di fondamentale importanza il dosaggio di tale principio stante l'estrema variabilità del suo contenuto in lotti diversi di radici di Genziana.

Come già osservato nei metodi precedenti, anche in questo caso non vi è la necessità di eseguire particolari preparazioni del campione, l'estratto idroalcoolico delle radici viene semplicemente filtrato a 0.45 micron e come tale è utilizzabile per l'analisi HPLC.

• Condizioni Analitiche

- apparecchiatura:	LC Hewlett Packard 1090					
- colonna:	LICHROSPHER RP. - Select B 25 cm, 4 mm, 5 µm					
- temperatura colonna:	40 °C					
- eluente:	ACQUA		80% (A)			
	METANOLO		20% (B)			
- gradiente di eluizione:						
time:	10 min	solv.	A	30%	solv. B	70%
	20 min	solv.	A	80%	solv. B	20%
- flusso:	0.5 ml/min					
- detector:	diode array HP					
- lunghezza d'onda:	230 nm	bandwidth	4 nm			
	270 nm	"	4 nm			
- loop:	5 µl					

• Risultati e discussioni

L'analisi risulta essere veloce, il tempo di ritenzione della Genziopicrina è di circa 12 min, e riproducibile. Numerose analisi hanno dato modo di rilevare l'assenza di possibili interferenze nel tracciato cromatografico.

Nella figura 10 sono riportati i cromatogrammi di una soluzione di Genziopicrina (10A) e di un estratto idroalcolico radici di Genziana Lutea (10B).

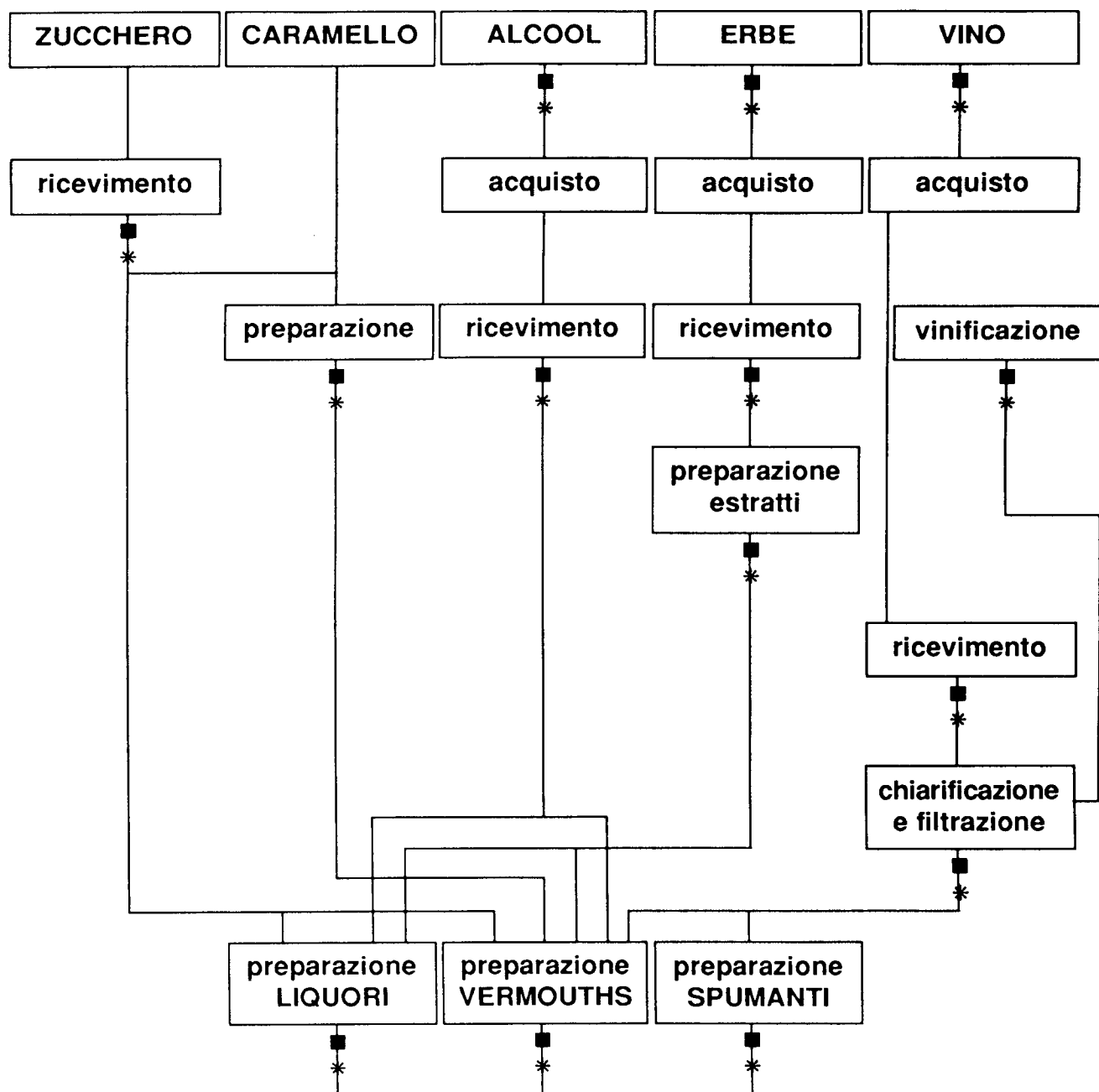
Figura10

- CONCLUSIONI

Per il S.C.Q. è di fondamentale importanza disporre di strumenti che consentano di poter fare fronte tempestivamente ai quesiti che gli si pongono, basti pensare per esempio alla continua evoluzione (talvolta rivoluzione) delle legislazioni in materia alimentare, la cromatografia liquida rappresenta il tal senso sicuramente un validissimo ausilio.

L'avvento di nuove applicazioni di questa tecnologia, per es. i recenti accoppiamenti HPLC-HRGC ed anche HPLC-MS, e il migliore utilizzo della potenzialità della vasta gamma di detectors (conduttimetrico, spettrofluorimetrico ecc.) consentiranno ai laboratori di controllo qualità di ampliare i campi di ricerca allo scopo di migliorare ulteriormente la "produzione della qualità".

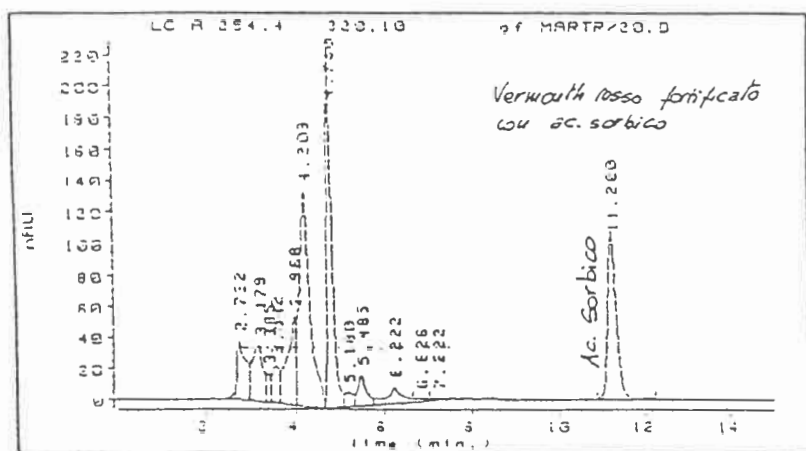
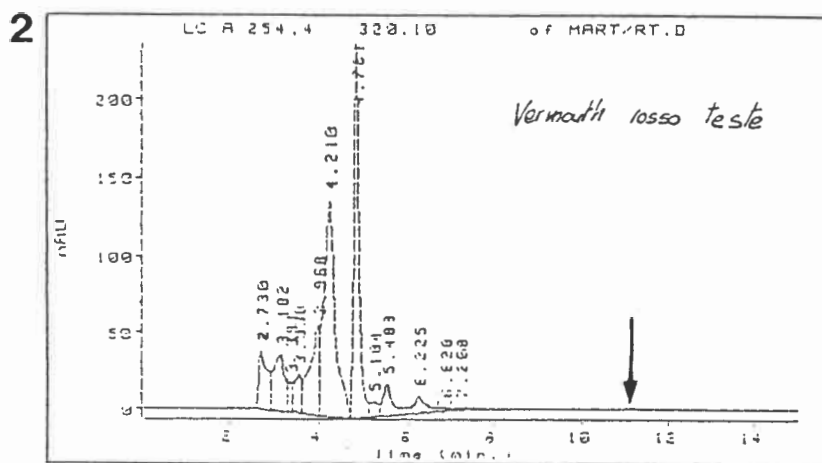
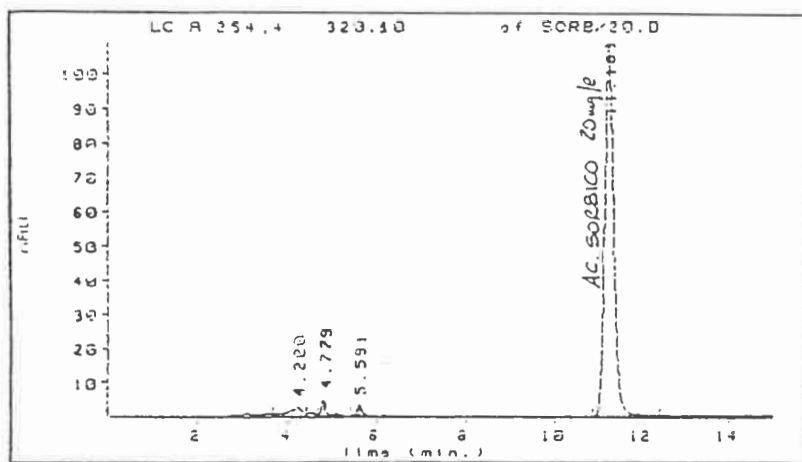
FIG.1 - PUNTI DI CONTROLLO IN UNO STABILIMENTO ENOLOGICO



* = controllo organolettico

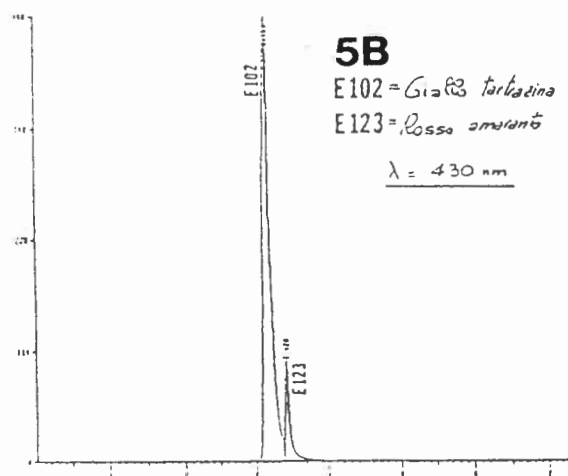
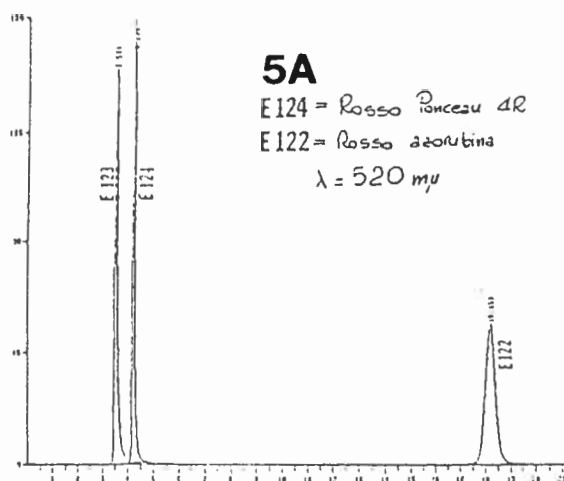
■ = controllo chimico

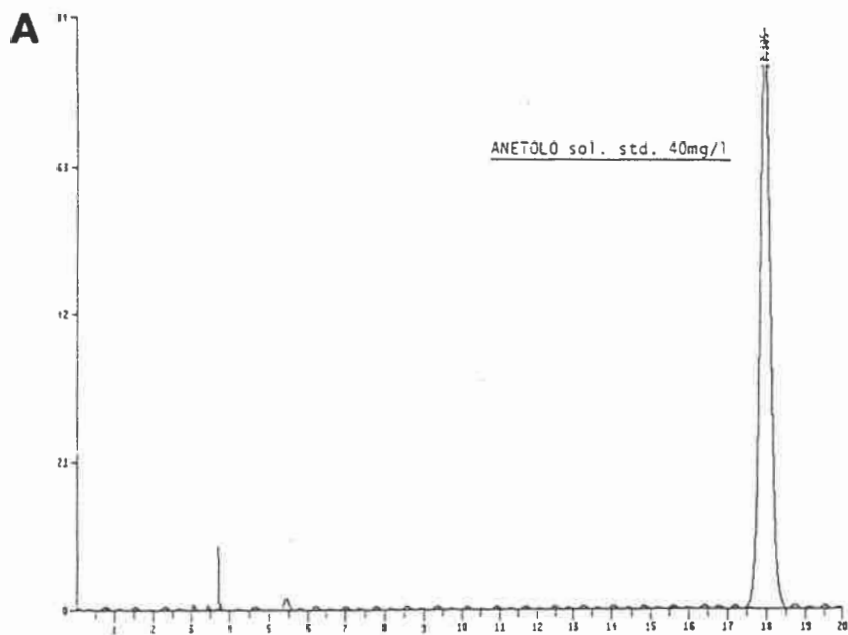
FIG.3 - ANALISI MEDIANTE HPLC DELL'ACIDO SORBICO



Peak Num	Int Type	Ret Time	Signal Description	Compound Name	Area	Amount
1	188	11.200	A 254.4 320.10	ACIDO SORBICO	1519.55	19.977 µg/l

FIG.5 - ANALISI MEDIANTE HPLC DEI COLORANTI AZOICI ARTIFICIALI





**FIG.6 - ANALISI
MEDIANTE HPLC
DELL'ANETOLO**

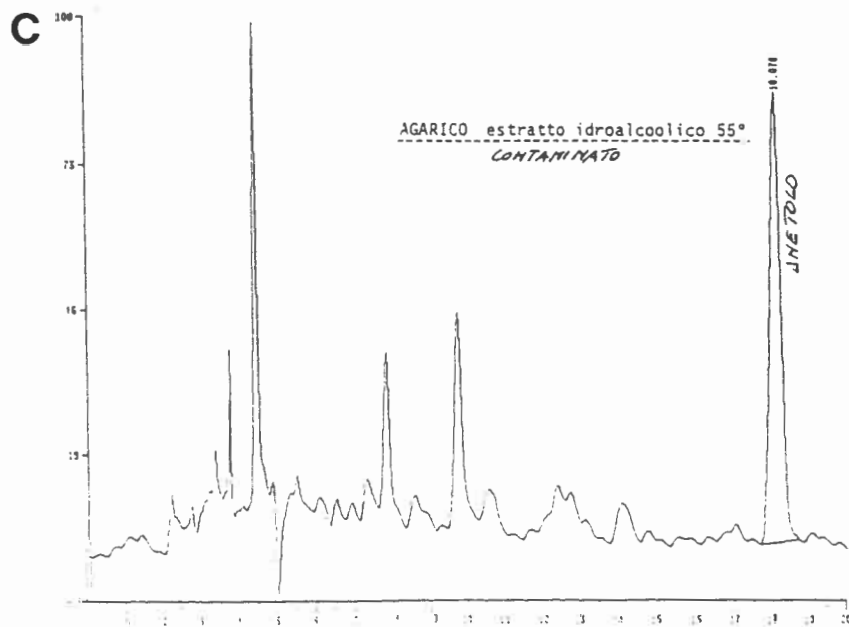
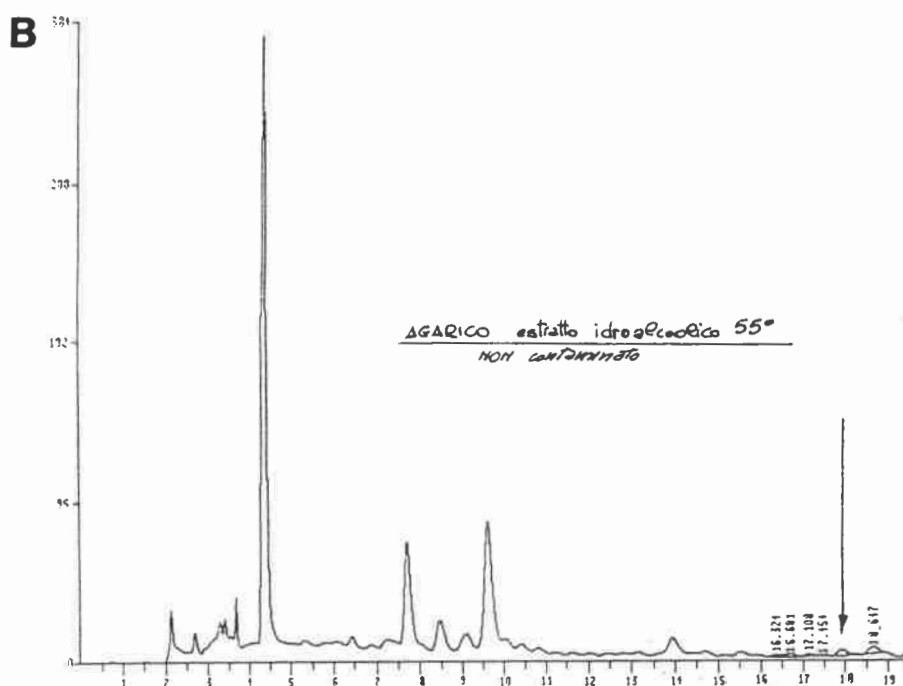


FIG.7 - ANALISI MEDIANTE HPLC DELLA VANILINA

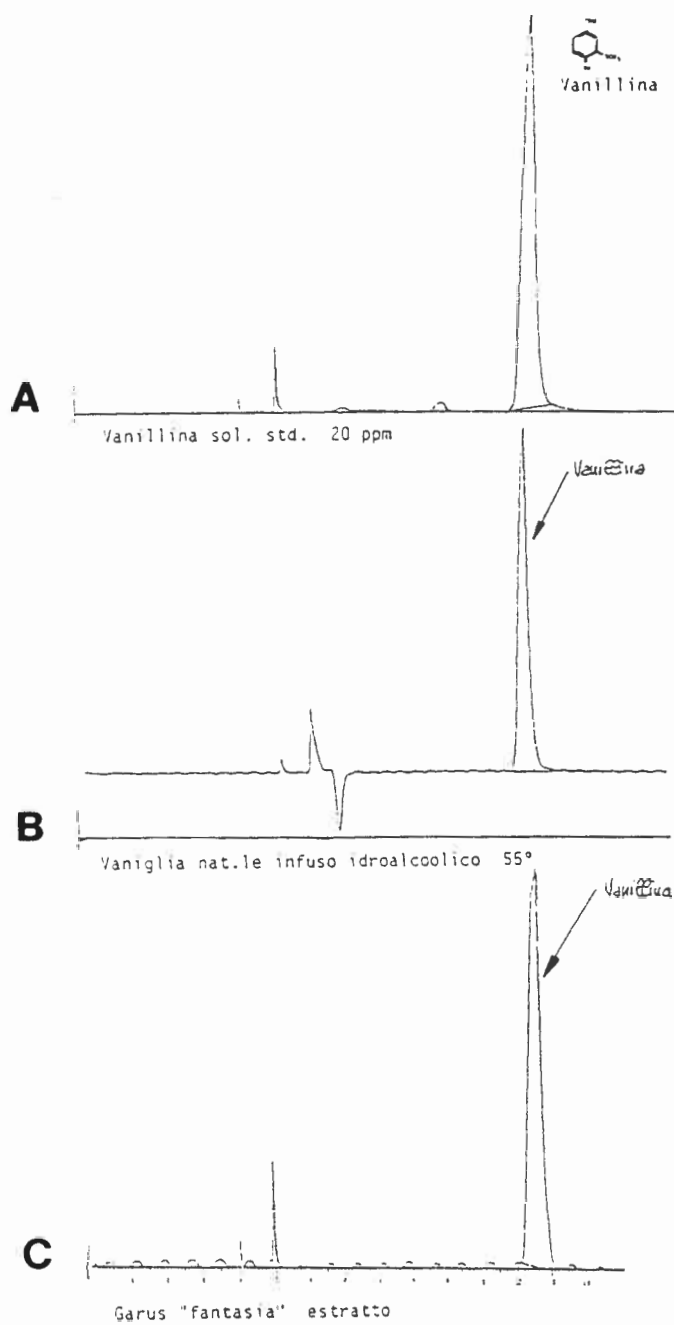
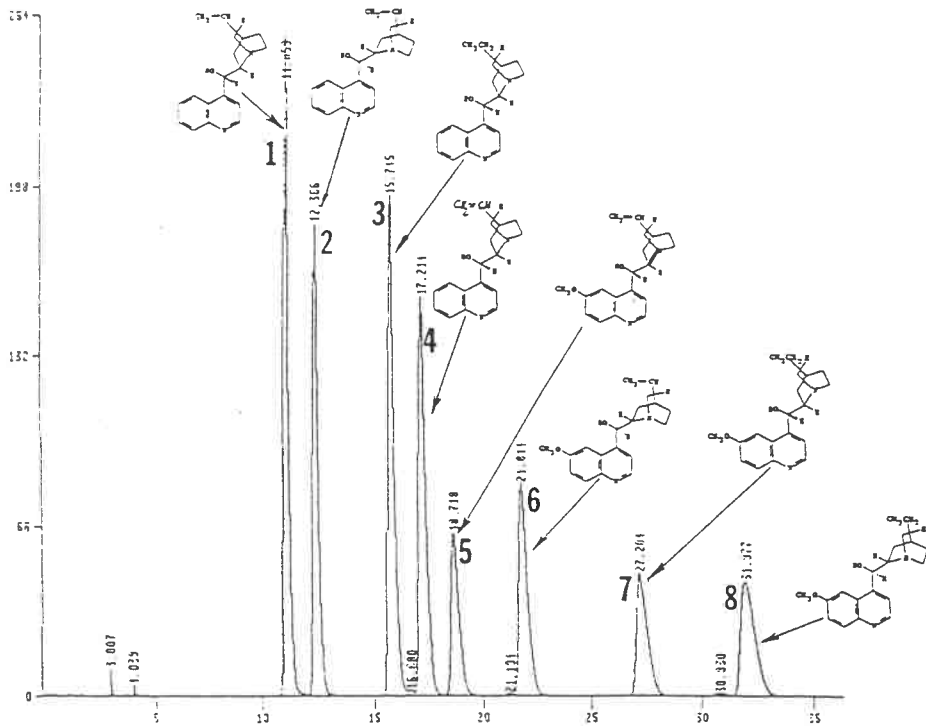


FIG.8 - ANALISI MEDIANTE HPLC DI UNA MISCELA STANDARD DI ALCALOIDI DELLA CHINA



Miscela standard alcaloidi CHINA

Peak Num	Int Type	Ret Time	Signal Description	Compound Name	Area	Amount
1	1BV	11.053	A 225,4 550,80	CINCONINA	3829.09	250.00 mg/lit
2	1VV	12.366	A 225,4 550,90	CINCONIDINA	3188.85	184.00 mg/lit
3	1BV	15.745	A 225,4 550,80	IDROCINCONIN	4115.08	190.00 mg/lit
4	1VV	17.214	A 225,4 550,80	IDROCINCONIO	3509.23	200.00 mg/lit
5	1VV	18.718	A 225,4 550,80	CHINIDINA	1617.52	225.00 mg/lit
6	1VB	21.314	A 225,4 550,80	CHININA	2565.51	290.00 mg/lit
7	1BB	27.204	A 225,4 550,80	IDROCHINIDIN	1758.96	185.00 mg/lit
8	1VV	31.377	A 225,4 550,80	IDROCHININA	2005.55	220.00 mg/lit

**FIG.9 - ANALISI MEDIANTE HPLC DI ALCALOIDI
IN CAMPIONI DI CHINA ROSSA E CHINA GIALLA**

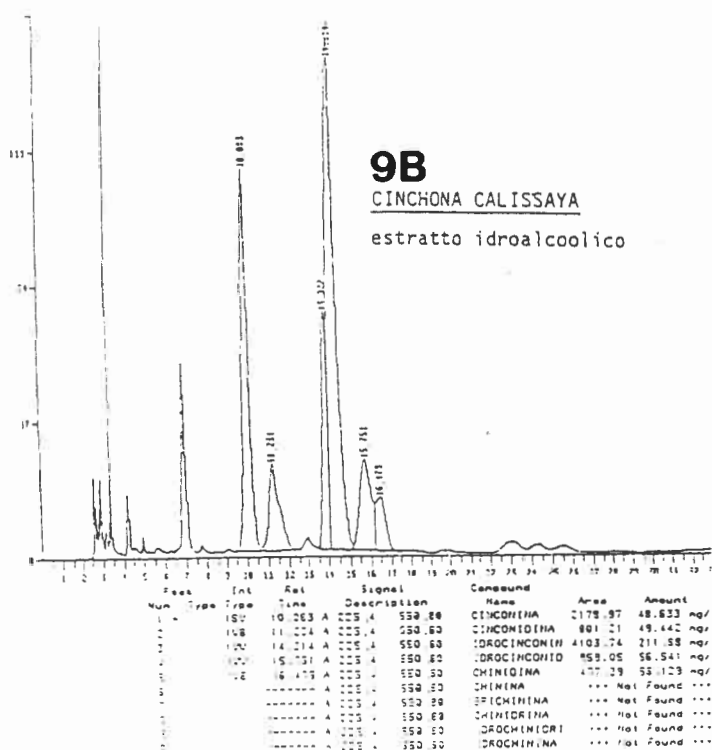
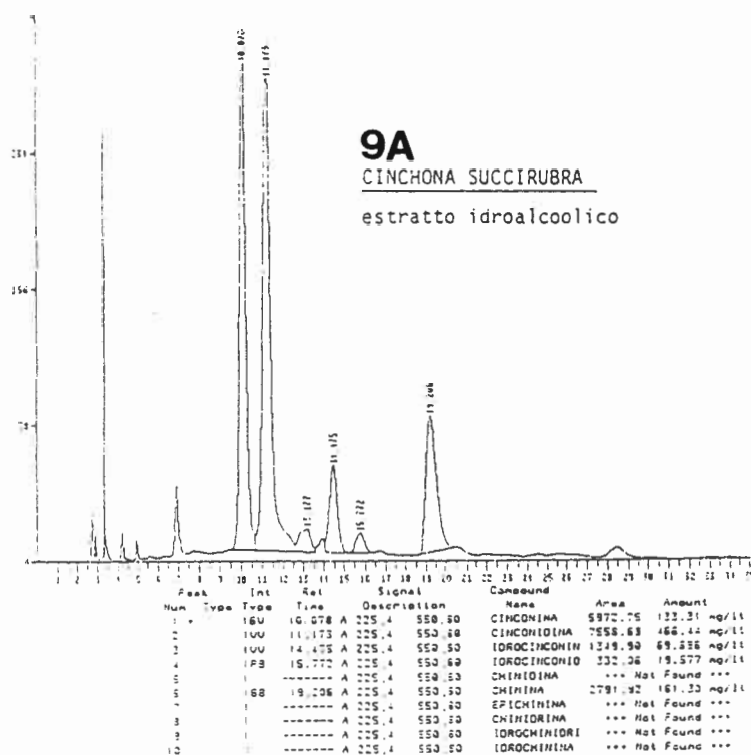
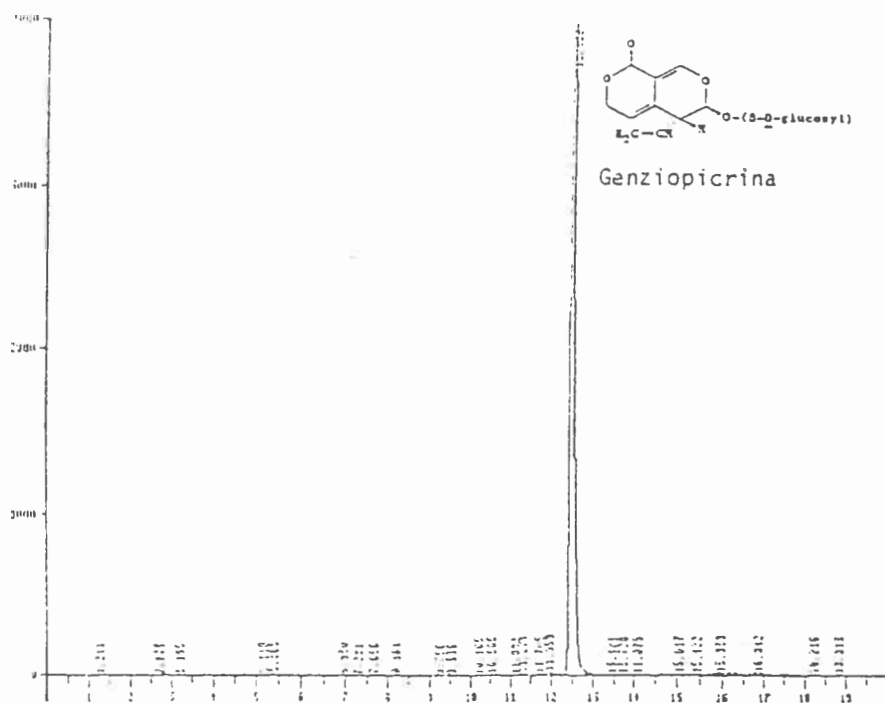


FIG.10 - ANALISI MEDIANTE HPLC DELLA GENZIOPICRINA



CONTROLLO DI RESIDUI DI FITOFARMACI NEI VINI PER HPLC

**Giuseppe MODI
Servizio Multizonale di Prevenzione
Unità Operativa di Chimica Ambientale
USL 10/A - Firenze**

RIASSUNTO

Negli ultimi decenni, l'impiego degli antiparassitari e dei diserbanti si è andato diffondendo dovunque e tutta l'agricoltura ne è diventata sempre più dipendente. Nel nostro paese, le quantità massime dei residui di principi attivi che possono essere tollerate negli alimenti sono fissate dalle ordinanze 6 giugno 1985 e 18 luglio 1990. Tuttavia, nel caso del vino, non è previsto nulla di specifico.

Nelle vendemmie 1987-88-89, è stato effettuato un vasto studio centrato sulla determinazione dei residui di antiparassitari e diserbanti in vini provenienti da uve prodotte in 11 fattorie toscane.

Nella relazione è illustrato il metodo di analisi per HPLC impiegato per determinare nei vini i residui di antiparassitari e diserbanti utilizzati in viticoltura.

Vengono inoltre riferiti i risultati ottenuti nei tre anni di sperimentazione.

Negli ultimi decenni l'impiego degli antiparassitari e dei diserbanti si è andato diffondendo dovunque e tutta l'agricoltura ne è divenuta sempre più dipendente. Successivamente il forte movimento di contestazione integrale verso l'impiego dei prodotti chimici in natura, ha determinato una riflessione profonda, un grande ripensamento sull'impiego massiccio e generalizzato di tali sostanze. Nel nostro paese il potere esecutivo ha avvertito tali esigenze e, tramite le ordinanze del 6 giugno 1985 e del 18 luglio 1990, ha fissato le quantità massime dei residui dei principi attivi che possono essere accettate negli alimenti.

Come altra frutta, l'uva è soggetta all'attacco di avversità di natura vegetale (funghi) e di natura animale (insetti, acari) e gli stessi vigneti vengono spesso trattati con diserbanti. Nelle ordinanze ricordate anche per l'uva sono ben specificate le tolleranze dei residui dei principi attivi contenuti nei vari presidi sanitari, ma per il vino non è previsto espressamente niente.

Pertanto si devono forse individuare nuovi valori massimi dei residui considerando sia la percentuale di frutta impiegata nella trasformazione (cioè il 100%), sia gli effetti dei processi di lavorazione. La vinificazione d'altra parte può svolgersi secondo differenti modalità che come tali incidono in maniera diversissima sui principi attivi che hanno caratteristiche chimico-fisiche molto varie fra loro.

Da tutte queste considerazioni e dalla riflessione primaria che la nostra bevanda deve essere, come ogni prodotto alimentare, igienicamente perfetta, si evince che uno studio sui residui di fitofarmaci e di diserbanti nei vini è interessante ed anche doveroso.

Mentre sono numerosi anche nel nostro paese i lavori e le ricerche sui pesticidi e sui loro residui nelle matrici più diverse, sui vini queste sperimentazioni sono relativamente poche e limitate a poche scuole. Presso la facoltà d'Agraria dell'Università Cattolica di Piacenza un gruppo di ricercatori segue da più di dieci anni le problematiche inerenti l'uso dei prodotti chimici in viticoltura e in enologia (1,2,3,4).

Studi simili vengono effettuati anche presso l'Università di Bologna, studi che hanno prodotto un notevole numero di pubblicazioni (5,6,7,8).

Infine, presso l'Università di Cagliari, Cabras e i suoi collaboratori hanno seguito la degradazione, la formazione di metaboliti, l'evoluzione in generale di molti fungicidi dal loro impiego sulla pianta fino al vino (9,10,11,12).

I lavori sui residui di fitofarmaci nei vini toscani sono pochi: alcuni furono pubblicati negli anni 70 (13,14), altri in questi ultimi tempi (15,16,17). Un vasto studio della durata di tre anni (vendemmie 1987-88-89) è stato centrato sulla determinazione dei residui di antiparassitari e diserbanti in vini provenienti da uve prodotte in fattorie toscane, uve che hanno subito trattamenti dei quali sono conosciuti il formulato, le dosi d'impiego e l'epoca di distribuzione.

I trattamenti sono stati tutti effettuati seguendo le indicazioni consigliate dalle varie ditte produttrici degli stessi presidi, cioè nei tempi ritenuti più congrui, perché i residui dei principi attivi siano o assenti o nei limiti fissati dall'Ordinanza Ministeriale.

I presidi sanitari impiegati nelle fattorie contengono, come principi attivi, fungicidi, insetticidi e diserbanti, sono fra loro molto diversi e sono anche quelli più comunemente usati nella nostra viticoltura collinare. Nostra prima cura è stata individuare sia la classe d'appartenenza sia quelli completamente degradabili e mettere a punto una metodica generale di rilevazione e di determinazione per gli altri. I principi attivi sono stati raggruppati a seconda delle attività che esplicano e delle molecole di base. (Tabella 1)

TABELLA 1 Principi attivi impiegati in viticoltura e limiti legali fissati per l'uva.

MOLECOLA BASE	PRINCIPIO ATTIVO	DL 50 mg/kg	CLASSE TOSSIC	LIMITE TOLLERAN ppm	INTERVALLO SICUREZZA giorni
Antiodici					
triazolo	triadimefon	380	III	1	15
"	triadimenol	700	III	0,5	10
pirimidina	fenarimol	2500	III	0,1	14
Antiperonosporici					
ditiocarbamato	zineb	5200	III	2	28
"	maneb	6750	III	2	28
"	mancozeb	8000	III	2	28
"	propineb	8500	III	2	28
"	ziram	1400	III	2	10
acilalanina	furalaxyl	940	III		
"	metalaxyl	670	III	1	28
"	benalaxyl	4200	IV	0,5	7
acetammide	cymoxanil	1425	III	0,1	10
Antibotritici					
tioftalimide	folfet	10000	IV	15	40
"	captan	9000	IV	15	40
"	captafol	6200	IV	8	40
benzimidazolo	benomyl	10000	IV	1	15
"	carbendazim	10000	IV	1	15
"	thiophanate metil	7500	III	1	15
3,5-dicloro anilina	iprodione	3500	III	5	28
"	procymidone	7000	III	1,5	21
"	vinclozolin	10000	IV	1,5	21
sulfanide	dichlofluanid	1000	III	10	20
Insetticidi					
cicloesano	lindano	90	II		
difeniletano	DDT	115			
"	aldrin	40			
tiofosfato	parathion	13	I	0,5	20
"	metil parathion	14	I	0,2	20
"	chlorpyrifos				
"	metil diazinon	1600	III	0,2	15
"	diazinon	300	II	0,5	15
ditiofosfato	dimetoato	320	II	1	20
"	phosalone	120	II	1	21
fosfato	phosfamidon	28	I	0,15	21
"	trichlorfon	630	II	0,5	10
carbammato	carbaryl	800	II	3	7
benzoidrossima	benzoximate	15000	IV	0,5	14
Diserbanti					
dipiridile	diquat	300	II	0,05	14
"	paraquat	160	I	0,05	30
triazina	atrazina	1405	III	0,1	30
"	terbumeton	485	II	0,02	-
"	terbutylazina	2160	III	0,02	-
fosfato	glyphosate	4800	III	0,1	-

I fungicidi aventi come molecole base l'acetamide ed il triazolo ed i ditiocarbammati hanno scarsa persistenza e già nell'uva i loro residui sono spesso trascurabili. Al contrario gli altri fungicidi, gli insetticidi, i diserbanti ricordati sono poco degradabili e i loro residui possono ritrovarsi anche in quantità elevate nel vino: perciò la nostra sperimentazione è stata centrata sulla loro ricerca e determinazione.

Le ricerche e le determinazioni dei residui di questi fitofarmaci negli estratti organici dei mosti e dei vini sono state effettuate con la cromatografia liquida ad alta risoluzione (rivelatore U.V.) con conferma per gascromatografia con colonne impaccate e wide bore (rivelatore N P D e ECD).

Il procedimento seguito è stato schematicamente il seguente:

10 ml di mosto o di vino sono posti in mixer con 10 ml d'etere di petrolio agitati per 10 minuti (in caso di emulsione bisogna centrifugare).

2,5 ml dello strato organico separatosi vengono portati a secco a temperatura ambiente, ripresi con 0,5 ml di acetonitrile e iniettati (volume: 50 μ l) nel cromatografo effettuando due separazioni a condizioni diverse:

- in isocratica; eluente: acetonitrile/acqua (45/55) flusso 2 ml/min.
- in programmata; eluente: acetonitrile/acqua (35/65), entro 12 minuti la miscela deve passare a: acetonitrile/acqua (55/45) flusso 1,5 ml/min

La colonna impiegata è una C18 della Merck.

La rivelazione viene fatta alla lunghezza d'onda di 221 nm.

Si sono preparate miscele dei principi attivi utilizzati nelle undici fattorie in quantità tali che nelle soluzioni finali acetoniche siano presenti in concentrazioni variabili da 0,2 a 1,5 ppm. Si effettuano le estrazioni e le separazioni descritte per HPLC.

In condizione isocratica si hanno buone separazioni e dosaggi dei fungicidi e degli insetticidi, mentre le triazine non rispondono altrettanto bene.

Il metalaxil con carbaril ed il folpet col procimidone hanno tempi di ritenzione praticamente uguali; fra i primi due si ottiene una buona separazione in condizioni programmate mentre questa è più difficile fra folpet e procimidone.

Complessivamente i recuperi sono stati abbastanza buoni (fra il 70 ed il 95%). Tutta la metodica è stata poi verificata su tre vini ritenuti non trattati a cui sono state aggiunte le miscele dei principi attivi: i recuperi sono stati nell'ordine di quelli descritti.

Tutto il procedimento è stato infine applicato ai vini provenienti dalle undici fattorie già ricordate. Le ricerche sono state effettuate fra sette e dieci mesi dalla vinificazione, per cui alcuni principi attivi potevano essere già degradati.

Non è stata effettuata la ricerca di metaboliti.

I risultati ottenuti schematicamente sono stati i seguenti: per il primo anno di ricerca nei vini di quattro aziende sono stati trovati residui di procimidone (massimo 92 ppb). I trattamenti con questo principio attivo erano stati effettuati a luglio.

Nelle analisi del secondo anno in due vini sono stati trovati ancora residui di procimidone, in uno residuo di simazina (utilizzata a maggio), in un altro quantità relativamente elevate di carbaril (1,2 ppm), prodotto che, secondo l'agricoltore interessato, non era stato impiegato.

Nell'ultimo anno di sperimentazione gli unici residui trovati sono stati il carbaril (2,8 ppm e 0,45 ppm), che anche in questi due casi non sarebbe stato impiegato. Il fatto è abbastanza inspiegabile, anche se si può formulare l'ipotesi che un trattamento con carbaril sia stato effettuato su coltivazioni vicine ai vigneti e che il vento vi abbia trasportato il carbammato (effetto deriva).

Al termine della sperimentazione si possono trarre alcune conclusioni.

I trattamenti, a cui sono state sottoposte le viti, sono diminuiti nei tre anni di sperimentazione, a conferma di una progressiva acquisizione del concetto di agricoltura guidata, in cui i trattamenti non si effettuano a tempi prefissati, ma solo nei casi di vera necessità. Nel primo anno della sperimentazione furono effettuati, mediamente tra maggio e giugno, dodici - quindici trattamenti anche con sette - otto principi attivi; nel terzo anno della ricerca i trattamenti sono stati ridotti a sei-sette con quattro-cinque principi.

I pochi diserbanti impiegati sono stati generalmente distribuiti nei primi mesi dell'anno. Altro fatto da mettere in rilievo è la verifica della metodica impiegata.

La cromatografia liquida ad alta risoluzione fu utilizzata per la prima volta per la ricerca di residui di fitofarmaci alla metà degli anni 70 (Moye - Possana): negli anni 80 fu estesa positivamente da Cabras e collaboratori alla ricerca di queste sostanze nei vini. La nostra sperimentazione ha confermato queste esperienze, evidenziando che il metodo è interessante per semplicità, rapidità e riproducibilità nel tempo. Infine dai risultati ottenuti in questi tre anni si può concludere che nei vini oggetto della sperimentazione sono assenti o a livelli bassissimi i principi attivi impiegati nelle vigne.

BIBLIOGRAFIA

- 1) G.P. Molinari, A. Del Re
La Chimica e l'Industria 60, 706 (1978)
- 2) C.Lazzarini, S.Verona, A. Del Re
La Chimica e l'Industria 62, 923 (1980)
- 3) G.P. Molinari, A. Del Re, P.Natali, G.Battini
La difesa delle piante 4, 135 (1981)
- 4) G.P. Molinari, A. Del Re, G.Corti, M.Trevisan, E.Bergamaschi
Atti Giorn. Fitopat Vol. 2, 23 (1984)
- 5) D. Flori, R.Stanzani, P.Musacci, R.Zironi
Atti Giorn. Fitopat 2,12 (1982)
- 6) P.Flori, R.Zironi
Vignevini 11 (1-2) 47 (1983)
- 7) P.Flori, R.Zironi
Vignevini 11 (6) 53 (1984)
- 8) R.Zironi, G.Arfeili
Vignevini 6,21 (1986)
- 9) P.Cabras, M.Meloni, F.Pirisi
Journal of Chromatography 176,473 (1979)
- 10) P.Cabras, P.Diana, M.Meloni F.M. Pirisi, R.Pirisi
Journal of Chromatography 256, 176 (1983)
- 11) P.Cabras, M.Meloni F.M. Pirisi, R.Pirisi
Pestic. Sci. 15,247 (1984)
- 12) P.Cabras, M.Meloni, F.M. Pirisi, L.Mascia,
L'enotecnica 1113 (1986)
- 13) M.Piccinini, G.Modi, S.Bonciani, S.Cambi,
Boll. Chim. Lab. Prov. 29,69 (1978)
- 14) G.Modi, M.Piccinini, S.Bonciani
Boll. Chim. Lab. Prov. 27,134 (1976)
- 15) G.Modi, P.Fiorentino, G.Simiani, G.Tani
Boll. Chim. Igienisti 39,75 (1988)
- 16) G.Modi, P.Fiorentino, G.Simiani, G.Tani, nota II
Boll. Chim. Igienisti 40,11 (1989)
- 17) G.Modi, P.Fiorentino, G.Simiani, G.Tani, nota III
Boll. Chim. Igienisti 40,291 (1989).