



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

## **Corso di Laurea Magistrale in Chimica**

Tesi di Laurea

Metodi avanzati di cromatografia e spettrometria di massa per lo studio di composti volatili, aromi e precursori aromatici nelle uve e nei vini

### **Relatore interno**

Ch. Prof. Rossano Piazza

### **Relatore esterno**

Dott. Riccardo Flamini

### **Laureando**

Renato Gava  
Matricola 796964

### **Anno Accademico**

**2013 / 2014**

RIASSUNTO .....	4
ABSTRACT .....	5
<b>CAPITOLO 1 – Introduzione e scopo della tesi</b>	
1.1 Composti aromatici dell’uva e del vino .....	7
1.1.1 Premessa .....	7
1.1.2 Terpeni .....	8
1.1.3 Norisoprenoidi .....	11
1.1.4 Benzenoidi.....	12
1.1.5 Alcanoli.....	12
1.1.6 Composti aromatici caratteristici delle uve prodotte da ibridi produttori diretti ....	13
1.2 Vitis vinifera e ibridi produttori diretti.....	14
1.3 La tecnica della sfogliatura.....	15
1.4 Caratteristiche dei vitigni oggetto della tesi.....	16
1.4.1 Semillon.....	16
1.4.2 Fiano .....	17
1.5 La spettrometria di massa .....	18
1.5.1 Premessa .....	18
1.5.2 Lo spettrometro di massa .....	18
1.5.3 Lo spettro di massa .....	19
1.5.4 Modalità di acquisizione degli spettri di massa.....	20
1.5.4.1 Modalità SCAN .....	20
1.5.4.2 Modalità SIM.....	21
1.5.5 Il Tuning.....	22
1.5.6 Sistemi di ionizzazione .....	23
1.5.5.1 Ionizzazione ad impatto elettronico .....	23
1.5.5.2 Ionizzazione elettrospray.....	25
1.5.5.3 Ionizzazione Jet Stream .....	26
1.5.6 Gli analizzatori di massa.....	25
1.5.6.1 Premessa.....	27
1.5.6.2 Analizzatore a quadrupolo.....	27
1.5.6.3 Analizzatore a tempo di volo .....	29
1.6 Tecniche ifenate.....	31
1.6.2 GC/MS.....	31
1.6.3 LC/MS .....	32
1.7 Estrazione in fase solida .....	33
1.7.1 Descrizione della tecnica.....	33
1.7.2 Adsorbenti silicei .....	34

1.7.3 Interazioni non polari .....	34
1.7.4 Interazioni polari .....	35
1.7.5 La matrice del campione .....	35
1.7.6 Sviluppo del metodo .....	36
1.8 Scopo della tesi.....	37

## **CAPITOLO 2 – Materiali e metodi**

2.1 Descrizione dei campioni oggetto delle analisi .....	39
2.1.1 Mosti Semillon .....	39
2.1.2 Vini ottenuti con uve raccolte da ibridi produttori diretti .....	39
2.2.3 Vini Fiano .....	39
2.2 Preparazione dei campioni per le analisi .....	41
2.2.1 Preparazione dei mosti Semillon per l'analisi GC/MS .....	41
2.2.2 Preparazione dei vini Fiano per l'analisi GC/MS .....	43
2.2.3 Preparazione dei vini Fiano per l'analisi UHPLC/MS.....	44
2.2.4 Preparazione dei campioni di vini per l'analisi GC/MS del metil antranilato e del furaneolo .....	45
2.3 Sistemi e parametri cromatografici e di spettrometria di massa.....	46
2.3.1 Sistemi GC/MS .....	46
2.3.2 Il sistema UHPLC/QTOF .....	52

## **CAPITOLO 3 – Risultati e discussioni**

3.1 Studio dei profili degli aromi liberi e glicosilati dei mosti Semillon .....	56
3.1.1 Studio dei composti liberi.....	57
3.1.2 Studio dei composti glicosilati.....	61
3.2 Studio dei profili dei profili aromatici dei vini Fiano .....	65
3.2.1 Studio dei composti liberi.....	65
3.2.2 Studio dei terpeni glicosilati .....	69
3.3 Efficienza dell'analisi UHPLC/QTOF per lo studio dei terpeni glicosilati dei vini .....	73
3.4 Studio del contenuto di metil antranilato e di furaneolo nei vini prodotti con uve di ibridi produttori diretti .....	74

## **CAPITOLO 4 – Conclusioni**

4.1 Conclusioni .....	78
-----------------------	----

BIBLIOGRAFIA .....	79
--------------------	----

RINGRAZIAMENTI.....	81
---------------------	----

L'insieme delle caratteristiche odorose ed aromatiche del vino rappresenta l'aspetto sensoriale di maggiore rilevanza tra quelli riconducibili alla tipicità dei prodotti ottenuti da uve di varietà differenti e con tecniche colturali diverse. I composti volatili responsabili delle caratteristiche aromatiche dei mosti e dei vini sono numerosi e di diversa natura: alcuni derivano dall'uva, e costituiscono la componente varietale del vino, altri si originano nel corso della fermentazione alcolica e vengono pertanto definiti aromi di fermentazione. I primi sono direttamente influenzati dalle varietà di uve utilizzate ed include i composti volatili liberi ed i precursori aromatici glicosilati. Alcuni composti volatili vengono inoltre studiati come marcatori di particolari caratteri, come nel caso dei vini prodotti da uve di ibridi produttori diretti.

In questo lavoro di tesi sono state messe a punto alcune metodiche di preparazione del campione e di analisi mediante cromatografia liquida e gascromatografia accoppiate alla spettrometria di massa (GC/MS e UHPLC/MS) finalizzate allo studio di composti volatili, aromi e precursori aromatici di alcune varietà di uve e vini. In particolare sono stati eseguiti i seguenti studi:

1. è stato indagato l'effetto della tecnica di defogliazione della vite sulla composizione aromatica dei mosti di uve Semillon;
2. al fine di indagare analogie e differenze tra i due prodotti, i profili aromatici di vini ottenuti da uve di Fiano della Puglia sono stati messi a confronto il vino di Fiano prodotto nella zona di Avellino;
3. è stata indagata la presenza del 4-idrossi-2,5-dimetil-3-furanone (furaneolo) e del metil-2-aminobenzoato (metil antranilato) come indicatori dei vini prodotti da uve provenienti da ibridi produttori diretti.

I profili dei composti volatili liberi e dei composti prodotti mediante idrolisi enzimatica (riconducibili ai precursori aromatici glicosilati) dei mosti Semillon sono stati studiati mediante analisi GC/MS ed identificati mediante l'utilizzo del database CRA-VIT (Consiglio di Ricerca in Agricoltura –Sezione Viticoltura – Conegliano –TV) contenente gli spettri di massa degli aromi delle uve e dei vini.

Lo studio del profilo dei precursori aromatici nei vini Fiano (terpenoli glicosilati) è stato eseguito mediante cromatografia liquida ad ultra prestazioni accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (UHPLC/QTOF) con l'utilizzo del database CRA-VIT *GrapeMetabolomics* sviluppato per lo studio della metabolomica delle uve e dei vini.

L'indagine simultanea del furaneolo e del metil antranilato nei vini è stata condotta mediante estrazione liquido-liquido ed analisi GC/MS dell'estratto.

The set of the wine olfactory and aromatic features, represents the most significant sensory aspect among those relating to the typicality of wines obtained from grapes of different varieties and by using various growing techniques. The volatile compounds responsible for the aroma of musts and wines are numerous and diverse: some compounds derive from grapes, and form the wine varietal aromatic component, others arise in the course of the alcoholic fermentation, and are therefore defined fermentation aroma. The former are directly influenced by the variety of grapes used, and include the free volatile compounds and the glycoside aroma precursors. Some volatile compounds are also studied as markers of special characters, as in the case of wines produced from hybrid grape varieties.

In this work, different sample preparation methods and liquid and gas chromatography techniques coupled with mass spectrometry (GC/MS and UHPLC/MS) were used in order to study the volatile and aroma compounds and aroma precursors of some grape and wine varieties. In particular, the study was focused on the following points:

1. the aromatic composition of musts from Semillon grapes harvested from vines grown with different techniques in order to analyze the effects of vine defoliation;
2. the aromatic profile of wines made from Fiano in Puglia grapes were compared to an Avellino Fiano in order to investigate similarities and differences between the two products;
3. the presence of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-furanone (furanol) and methyl-2-aminobenzoate (methyl anthranilate) were detected as indicators of wines made from hybrid grape varieties.

Free volatile compound profile and the aglycones produced by enzymatic hydrolysis (glycoside aroma precursors) were studied by GC/MS analysis performing the identification of compounds by using the CRA-VIT mass spectra database including the grape and wine aroma compounds.

Study of monoterpene glycoside compounds (aroma precursors) in Fiano wines was performed by ultra-performance liquid chromatography and high resolution mass spectrometry (UHPLC/QTOF) by using the CRA-VIT database called *GrapeMetabolomics* developed for grape and wine metabolomics.

Simultaneous analysis of furaneol and methyl anthranilate in wine was performed by liquid-liquid extraction and GC/MS analysis of the extract.

# CAPITOLO 1

---

## **Introduzione e scopo della tesi**

## 1.1. Composti aromatici dell'uva e del vino

### 1.1.1. Premessa

L'aroma dei vini è costituito da alcune centinaia di composti volatili i cui tenori variano da diversi mg/L a qualche ng/L. L'impatto olfattivo di tali composti non dipende solo dalla loro concentrazione ma anche dalla loro natura, tanto che alcuni di loro pur essendo presenti in tracce, influenzano notevolmente l'aroma. La complessità dell'aroma del vino e le difficoltà del suo studio sono conseguenza della diversità dei meccanismi che intervengono nella sua genesi, ed in particolare:

- il metabolismo dell'uva, che è influenzato dalla varietà, ma anche dal terreno, dal clima e dalle pratiche viticole, come per esempio la sfogliatura;
- i fenomeni biochimici prefermentativi (ossidazioni e idrolisi), che intervengono al momento della pigiatura e durante la macerazione;
- il metabolismo dei microrganismi che conducono le fermentazioni alcolica e malolattica;
- le reazioni chimiche ed enzimatiche post-fermentative che intervengono durante la conservazione del vino e durante il suo invecchiamento in bottiglia.

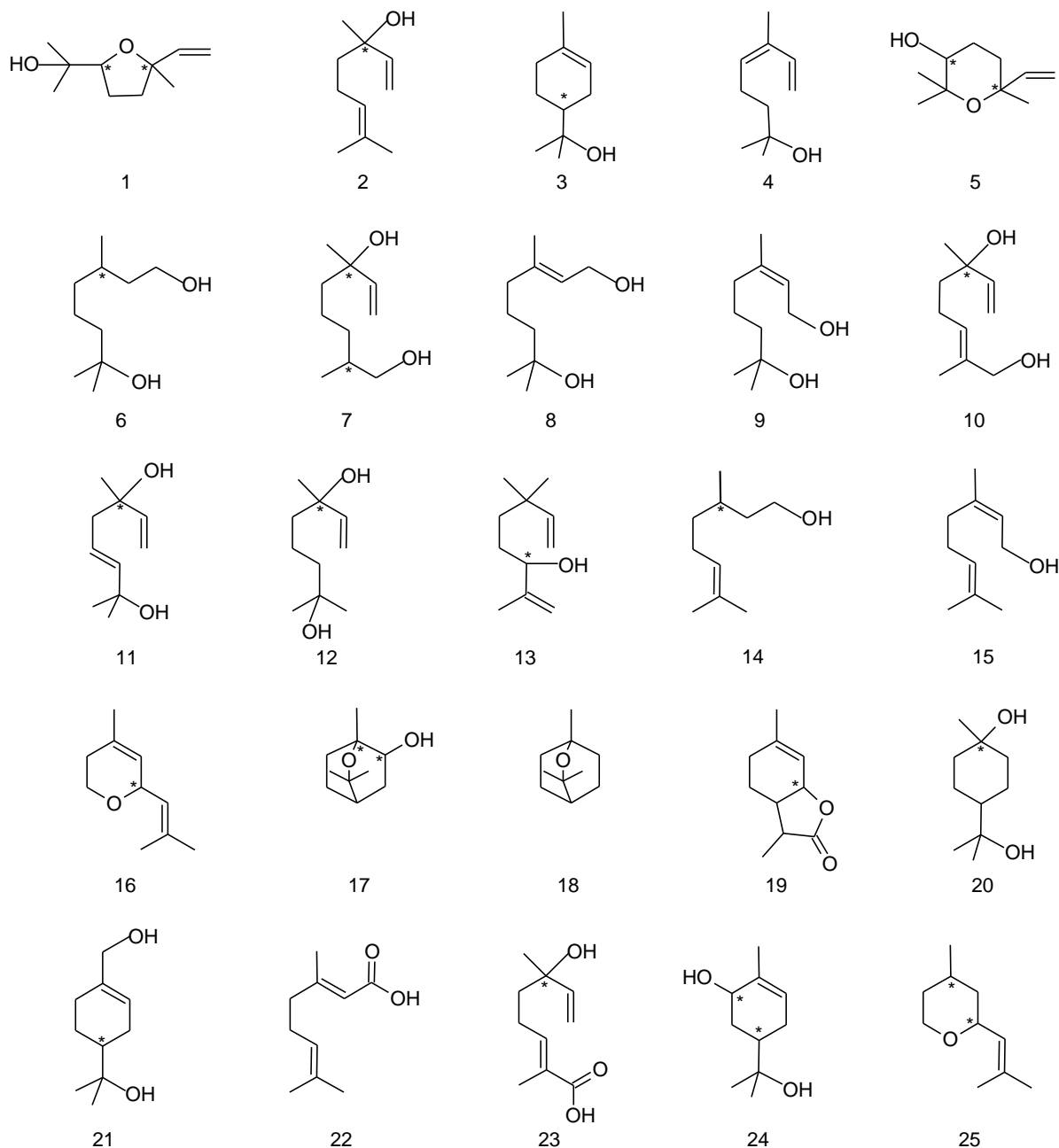
Fra tutti i costituenti dell'aroma dei vini, i composti odorosi che provengono dall'uva, caratteristici della varietà e sua espressione, giocano un ruolo determinante nella qualità e nella tipicità dei vini di cui costituiscono l'aroma varietale. Tuttavia, i mosti di numerose varietà, denominate a sapore semplice, pur essendo praticamente inodori, danno vini il cui aroma caratteristico è più o meno specifico della varietà. Pertanto la nozione di precursori aromatici come forme inodori dei composti odorosi responsabili dell'aroma varietale dei vini riveste una grande importanza in enologia. I composti che contribuiscono alla formazione dell'aroma varietale fanno parte di grandi famiglie di composti: i terpeni, i norisoprenoidi, i composti benzenoidi, le metossipirazine e i composti solforati (Ribéreau-Gayon, et al., 1998). In questo lavoro di tesi sono stati studiate in particolare le prime tre famiglie.

### 1.1.2. Terpeni

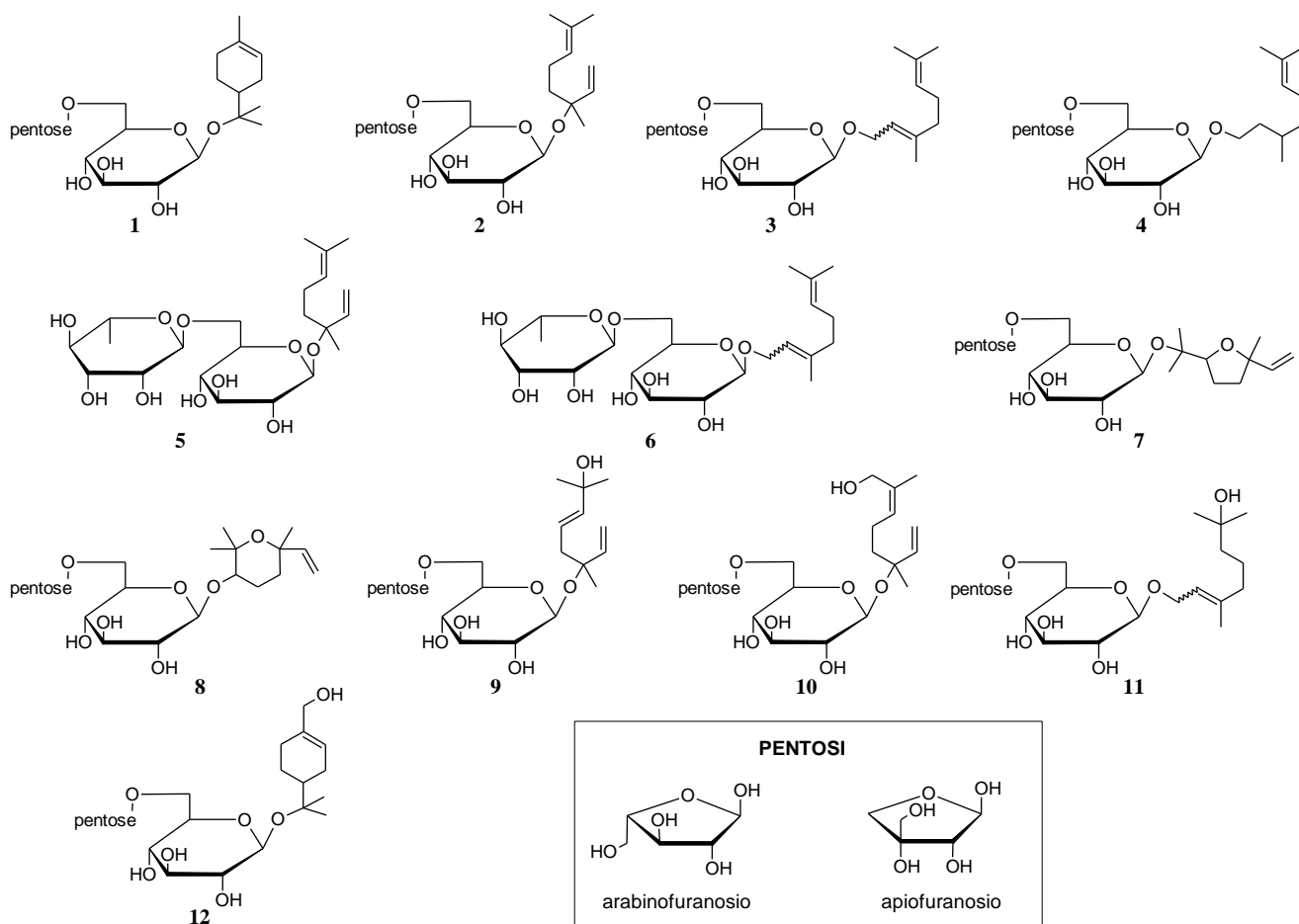
I terpeni sono biomolecole costituite da multipli dell'unità isoprenica, ottenute nei sistemi biologici dalla reazione di più unità di isopentenil pirofosfato e di dimetilallil pirofosfato. Possono avere struttura lineare, ciclica o mista lineare e ciclica. Quando i terpeni sono modificati con reazioni tali da portare alla formazione di gruppi funzionali contenenti atomi diversi dal carbonio, come gruppi idrossilici, carbonilici o contenenti azoto, vengono chiamati terpenoidi. I terpeni sono presenti nel regno vegetale con circa 4000 composti. Fra quelli presenti nell'uva, sono suscettibili di essere odorosi i monoterpeni a 10 atomi di carbonio e i sesquiterpeni a 15 atomi di carbonio. I monoterpeni esistono sotto forma di idrocarburi semplici (limonene, mircene, ecc.), aldeidi (es. nerale, geraniale, ecc.), alcoli (es. linalolo, geraniolo, ecc.), acidi (es. acido geranico) ed esteri (Ribéreau-Gayon, et al., 1998). Nell'uva sono stati identificati circa quaranta composti terpenici, dei quali i più odorosi appartengono alla classe degli alcoli monoterpenici ed in particolare linalolo,  $\alpha$ -terpineolo, geraniolo, citronellolo e l'ho-trienolo, i cui odori richiamano l'essenza di rosa. I polioli terpenici (dioli e trioli), presenti nei vini fino a concentrazioni superiori a 1 mg/L, sono poco odorosi. Tuttavia, per idrolisi acida, possono dare origine ad altri monoterpeni, alle volte odorosi. Per esempio, l'idrolisi acida del 3,7-dimetil-1,5-octadien-3,7-diolo permette di ottenere ho-trienolo (Strauss, et al., 1986). Di odore resinoso, sono stati individuati idrocarburi monoterpenici e sequiterpenici fra i quali ritroviamo il limonene, l' $\alpha$ -terpinene, il p-cimene, il mircene, e alcoli sequiterpenici come il farnesolo. Nelle uve sono stati identificati altri composti di natura terpenica come aldeidi (nerale e geraniale), acidi (acido *trans*-geranico), ed esteri monoterpenici (acetato di nerile e acetato di geranile) (Schreier, et al., 1976). Diversi gruppi di studio (Williams, et al., 1980), (Gunata, et al., 1985), (Voirin, et al., 1992), hanno dimostrato che i principali monoterpenoli e polioli terpenici esistono nelle uve sotto forma di glicosidi, nei quali gli zuccheri costitutivi sono il glucosio, l'arabinosio, il ramnosio e l'apiosio. In tutte le varietà di uva sono stati identificati quattro tipi di glicosidi: 3 disaccaridi (6-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosil- $\beta$ -D-glucopiranoside, 6-O- $\alpha$ -L-ramnofuranosil- $\beta$ -D-glucopiranoside o rutinoside, 6-O- $\beta$ -D-apiosil- $\beta$ -D-glucopiranoside) e un monoglucoside ( $\beta$ -D-glucopiranoside). Spesso le forme glicosilate sono più abbondanti di quelle libere e fra i glicosidi corrispondenti agli agliconi più odorosi si constata che i più rappresentati sono gli apiosilglucosidi e gli arabinosilglucosidi seguiti dai rutinosidi e i glucosidi. I glicosidi terpenici, largamente presenti nel regno vegetale, sono presenti nell'uva in maggior quantità come diglucosidi e in minor quantità come monoglucosidi. La buccia è più ricca in monoterpenoli liberi e legati rispetto al succo, inoltre, la composizione in terpenoli liberi delle diverse parti dell'acino varia sensibilmente. Gli agliconi che costituiscono i glicosidi non sono esclusivamente alcoli o polioli terpenici, ma anche alcoli lineari e ciclici (esanolo, 2-feniletanolo, alcol benzilico), norisoprenoidi a 13 atomi di carbonio e fenoli volatili come la vanillina. Sebbene l'uva contenga  $\beta$ -glucosidasi in grado di liberare certi terpenoli odorosi a partire dagli eterosidi non odorosi, le condizioni di pH acido inferiori al valore ottimale



(pH 5) fa sì che l'attività di tali enzimi sia molto limitata. Pertanto la quantità di glicosidi presenti nel vino è simile a quella riscontrata nell'uva di partenza. Sulla base di queste conoscenze, si è cercato di valorizzare il potenziale aromatico dell'uva, utilizzando attività enzimatiche esogene, presenti nei preparati pectolitici industriali derivati da *Aspergillus Niger* (Di Stefano, et al.,1995), In figura 1.1 sono riportati i principali composti terpenici in forma libera, mentre in figura 1.2 quelli in forma glicosilata.



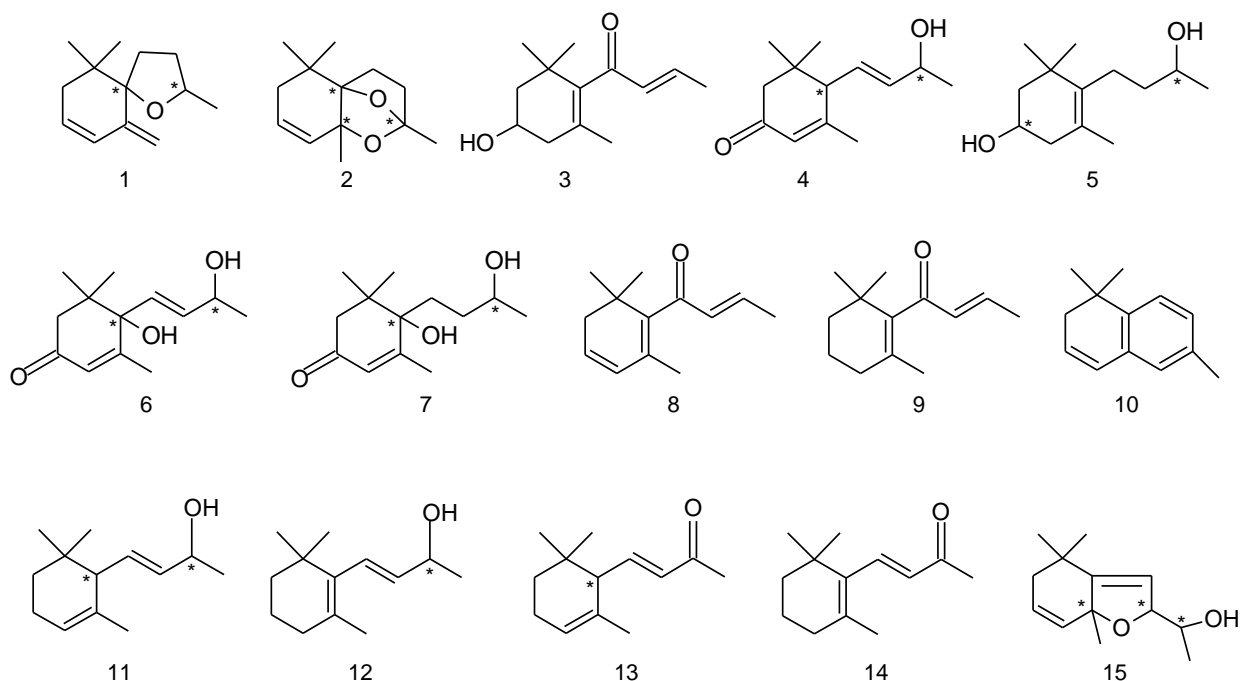
**Figura 1.1** Principali composti terpenoidi presenti nelle uve. **(1)** furan linalolo ossido (*cis* e *trans*); **(2)** linalolo; **(3)**  $\alpha$ -terpineolo; **(4)** *trans*-ocimeno; **(5)** piran linalolo ossido (*cis* e *trans*); **(6)** OH-citronello; **(7)** endiolo; **(8)** geraniolo; **(9)** 7-OH-nerolo; **(10)** 8-OH-linalolo; **(11)** diendiolo I; **(12)** enediolo; **(13)** diendiolo II; **(14)** citronello; **(15)** nerolo; **(16)** nerolo ossido; **(17)** 2-eso-idrossi-1,8-cineolo; **(18)** 1,8-cineolo; **(19)** wine lattone; **(20)** *cis* e *trans*-1,8-terpina; **(21)** *p*-mentendiendiolo II; **(22)** acido geranico; **(23)** acido 2,6-dimetil-6-idrossiocta-2,7-dienoico; **(24)** *p*-mentenediendiolo II; **(25)** *cis* e *trans*-ossido di rosa (Flamini *et al.*,2010).



**Figura 1.2** Principali monoperpeni presenti in forma glicosilata **(1)**  $\alpha$ -terpineolo pentosil-esoside; **(2)** linalolo pentosil-esoside; **(3)** geraniolo/nerolo pentosil-esoside; **(4)** citronellolo pentosil-esoside; **(5)** linalolo ramnosil-esoside; **(6)** geraniolo/nerolo ramnosil-esoside; **(7)** furan linalolo ossido pentosil-esoside; **(8)** piran linalolo ossido pentosil-esoside; **(9)** diendiolo I pentosil-esoside; **(10)** 8-idrossilinalolo pentosil-esoside; **(11)** 7-idrossigeraniolo/7-idrossinerolo pentosil-esoside; **(12)** *p*-mentenediendiolo I pentosil-esoside. (Flamini, et al., 2014).

### 1.1.3. Norisoprenoidi

I norisoprenoidi, composti a 13 atomi di carbonio che derivano dalla degradazione ossidativa dei carotenoidi, si dividono in due principali gruppi di composti: i megastigmani e i non megastigmani, costituiti ognuno da un certo numero di composti volatili. La struttura dei megastigmani è caratterizzata da un ciclo a sei atomi di carbonio sostituito da gruppi metilici sui carboni C1 e C5 e da una catena alifatica a quattro atomi di carbonio, insatura, sul carbonio C6 del ciclo. I megastigmani sono norisoprenoidi a 13 atomi di carbonio ossigenati sul carbonio C7 (serie damascenone) o sul carbonio C9 (serie ionone). Fra questi composti, il  $\beta$ -damascenone, presenta un odore complesso di fiori, di frutti esotici e di composta di mele, mentre il  $\beta$ -ionone presenta l'odore caratteristico di violetta. Altri norisoprenoidi importanti sono il 3-oxo- $\alpha$ -ionolo (aroma di tabacco), il 3-idrossi- $\beta$ -damascone (aroma di tè e tabacco) e il  $\beta$ -damascone (aroma di tabacco e fruttato). I non megastigmani sono altri norisoprenoidi a 13 atomi di carbonio che comprendono alcuni composti molto odorosi fra i quali si ricorda il TDN (1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftalene) responsabile dell'aroma di cherosene e gli actinidoli e i vitispirani che impartiscono il classico aroma difettoso di canfora. Alcuni norisoprenoidi, come ad esempio il 3-oxo- $\alpha$ -ionolo e il 3-idrossi- $\beta$ -damascenone esistono sotto forma glicosilata come monoglucosidi che non vengono idrolizzati dalle  $\beta$ -glucosidasi dell'uva ma solo da quelle di origine esogena (Strauss, et al., 1986). In figura 1.3 vengono riportati i principali norisoprenoidi presenti nell'uva e nel vino.



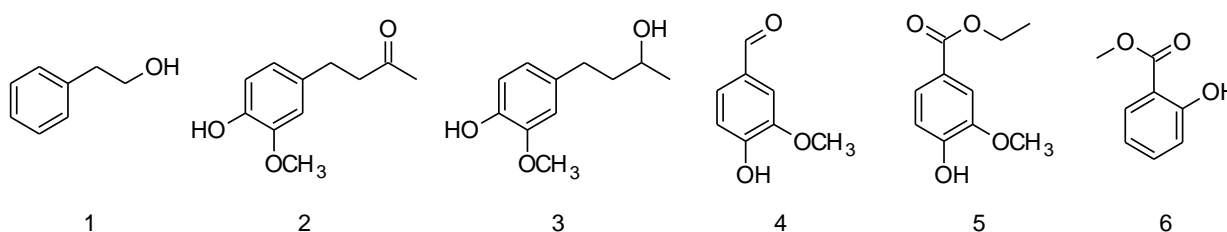
**Figura 1.3** Norisoprenoidi presenti nell'uva e nel vino. **(1)** vitispirani; **(2)** Riesling acetale; **(3)** 3-OH- $\beta$ -damascenone; **(4)** 3-oxo- $\alpha$ -ionolo; **(5)** 3-OH-7,8-diidro- $\beta$ -ionolo; **(6)** vomifoliolo; **(7)** diidrovomifoliolo; **(8)**  $\beta$ -damascenone; **(9)**  $\beta$ -ionolo; **(10)** TDN; **(11)**  $\alpha$ -ionolo; **(12)**  $\beta$ -ionolo; **(13)**  $\alpha$ -ionone; **(14)**  $\beta$ -ionone; **(15)** actinidoli.

### 1.1.4. Benzenoidi

La biosintesi dei composti benzenoidi è legata a quella dei composti fenolici e delle lignine e risulta controllata dalla varietà in quanto, come è noto dallo studio dei composti fenolici, l'attività che presiede alla idrossilazione e alla metossilazione dell'anello benzenico B degli antociani dipende dalla cultivar. Alla classe dei benzenoidi fanno parte composti con la comune caratteristica di avere un anello benzenico e comprende:

- composti ad anello benzenico non sostituito (come l'alcol benzilico, 2-feniletanolo, benzaldeide),
- composti con un ossidrilico sostituente (salicilato di metile e 4-idrossibenzaldeide);
- composti con due ossidrili sostituenti (derivati dell'acido salicilico);
- composti con un gruppo funzionale guaiacolo (vanillina, alcol vanillico);
- composti con un ossidrilico e due metossili sostituenti (come la siringaldeide) (Di Stefano, 1996).

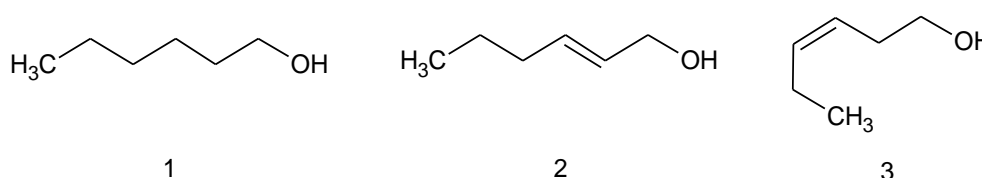
In figura 1.4 vengono riportati i principali aromi benzenoidi.



**Figura 1.4** Principali aromi benzenoidi. **(1)** 2-feniletanolo; **(3)** zingerolo; **(4)** vanillina; **(5)** etil vanillato; **(6)** metil salicilato.

### 1.1.5. Alcanoli

Gli alcanoli dell'uva sono rappresentati principalmente da composti a sei atomi di carbonio come esanoli e esenoli. Generalmente, gli alcanoli, contribuiscono ai sentori erbacei tipici dell'uva poco matura (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998). Essi derivano dalla lisi delle membrane cellulari o dai processi metabolici che dipendono in larga parte dalla varietà. In particolare, l'esanolo, il *trans*- e *cis*-3-esenolo e il *trans*-2-esenolo derivano dalla reazione di idrolisi enzimatica della frazione glicosidica dell'uva (Di Stefano, 1996). In figura 1.5 vengono riportati i principali alcanoli dell'uva.



**Figura 1.5** Principali alcanoli dell'uva. **(1)** 1-esanolo; **(2)** *trans*-2-esen-1-olo **(3)** *cis*-3-esen-1-olo



## 1.2. *Vitis vinifera* e ibridi produttori diretti

La vite appartiene all'ordine delle *Rhamnales*, famiglia delle *Vitaceae* o *Ampelidaceae*, suddivisa nelle sottofamiglie *Lecoideae* e *Ampelideae*. Quest'ultima è composta da quattro generi: *Ampeloësis*, *Cissus*, *Parthenocissus*, *Ampelocissus* e *Vitis*. I primi quattro sono impiegati a scopo ornamentale. Il genere *Vitis* comprende due sottogeneri: *Muscadinia* e *Euvitis*. Il sottogenere *Muscadinia* è caratterizzato da vinaccioli quasi tondeggianti e dall'assenza di ritidoma. Comprende tre specie: *Vitis rotundifolia*, *Muscadiniaitis munsoniana* e *Vitis popenoei*. Il sottogenere *Euvitis* comprende la specie *Vitis vinifera*, detta anche vite europea, coltivata fin dall'antichità in Europa, in Medio Oriente e nella regione caucasica e altre specie, prevalentemente selvatiche, di origine americana come la *Vitis labrusca*, la vite americana (in inglese *fox grape*, in quanto l'uva ha un gusto "selvatico" o "volpino" poco apprezzato in Europa), la *Vitis riparia*, la *Vitis rupestris* e la *Vitis berlandieri*.

Poco sensibili alla fillossera, un afide parassita che attacca le radici delle viti europee, le specie americane, così come i loro ibridi, vengono utilizzate sia come portinnesto (arbusto su cui innestare le barbatelle dei vitigni), sia come incrocio con alcune varietà di *Vitis vinifera* per la produzione di uva. L'uva della *Vitis labrusca*, e dei suoi ibridi con *Vitis vinifera*, può essere vinificata e si ottengono vini come il Fragolino (dal nome dell'uva, detta uva fragola o Isabella), o il Clinton, che fino a pochi anni fa erano, ed in qualche caso sono ancora, prodotti tipici dell'autoconsumo di zone fredde ed umide del nord Italia. La legislazione della Comunità Europea vieta la vinificazione per il commercio delle uve prodotte da viti americane e dagli ibridi. Le ragioni sono di tipo organolettico e di salute umana. Per quanto riguarda l'aspetto organolettico, i vini prodotti da tali uve presentano il peculiare aroma selvatico (*foxy*), ritenuto inaccettabile dall'enologia classica e provocato principalmente dall'metil antranilato e dal furaneolo. Le ragioni salutistiche si basano sul fatto che i vini contengono alte concentrazioni di metanolo la cui tossicità è ben nota (Fregoni, 2005).

### 1.3. La tecnica della sfogliatura

La tecnica della sfogliatura consiste nell'eliminare una parte delle foglie situate nella zona dei grappoli. Tale pratica viene eseguita comunemente in pre-vendemmia per aumentare l'esposizione solare dei grappoli con lo scopo di favorire un maggior accumulo di zuccheri e allo stesso tempo aumentare l'arieggiamento con la conseguente minore incidenza di malattie fungine. Recentemente la sfogliatura viene eseguita anche in pre-allegagione (fase fenologica che si verifica normalmente nei primi giorni del mese di maggio) per diminuire la percentuale di acini presenti nel grappolo (conseguenza di una ridotta biosintesi dei principi nutritivi con aumento degli aborti fiorali) e modificare il microclima del grappolo migliorando nel contempo la situazione sanitaria. La sfogliatura provoca il rigetto di nuove foglie nella zona apicale con conseguente aumento della biosintesi di sostanze nutritive grazie alla maggiore attività fotosintetica delle foglie giovani rispetto a quelle vecchie che sono state eliminate. Nel caso di varietà di uve a bacca bianca, come il Semillon, la pratica della sfogliatura può portare ad un maggiore accumulo di sostanze polifenoliche e aumento di degradazione delle sostanze aromatiche con conseguente perdita dei profumi. Nello specifico, le viti che hanno prodotto i mosti analizzati in questa tesi sono state sfogliate in pre-allegagione con lo scopo di valutare in che misura tale operazione influisca sulla fisiologia della pianta e sul contenuto in sostanze aromatiche dei mosti al momento della vendemmia. Nelle figure 1.7, 1.8 e 1.9 sono riportate rispettivamente le foto di viti non sfogliate, viti sfogliate e di un grappolo spargolo con numero di acini ridotti dalla sfogliatura (CRA-VIT).



**Figura 1.7** Viti non sfogliate



**Figura 1.8** Viti sfogliate

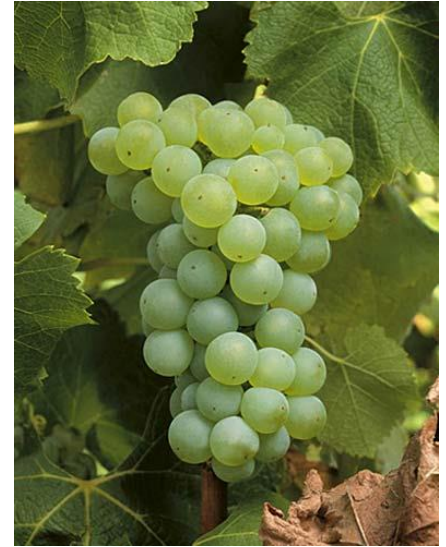


**Figura 1.9** Grappolo spargolo da viti sfogliate

## 1.4. Caratteristiche dei vitigni oggetto di studio nella tesi

### 1.4.1. Semillon

Il Semillon, vitigno a bacca bianca dai riflessi dorati, è uno dei grandi protagonisti della viticoltura bordolese, dove, mescolato con il Sauvignon Blanc dà vita ad uno dei grandi vini di Francia, ovvero il Sauternes, oltre ai vari bianchi di Bordeaux. È coltivato anche in altre aree della Francia meridionale, dove, data la tendenza a produrre vini abbastanza neutri, è utilizzato spesso come base per bianchi sia secchi che dolci. La pianta è vigorosa, a foglia scura, resistente e non soggetta a colatura ma, fortunatamente, sensibile al prezioso attacco del marciume nobile che fornisce il valore aggiunto a quest'uva, che pure negli ultimi anni ha subito un certo declino in popolarità a favore del già citato Sauvignon. All'estero è molto diffuso in Australia, dove viene anche vinificato in purezza con



**Figura 1.10** Grappolo d' uva di varietà Semillon

eccellenti risultati nella Hunter Valley, e in Sud America, soprattutto Cile ed Argentina. È presente anche in America del Nord, soprattutto negli stati della costa occidentale, in Nuova Zelanda, in Israele, nell'Europa Orientale e in Sud Africa, dove nella prima metà dell'Ottocento era addirittura la varietà più diffusa del Paese ([www.vinealia.org](http://www.vinealia.org)). I composti aromatici presenti in maggiori concentrazioni nei vini Semillon risultano essere butanoato di etile, 2-metilpropanoato di etile, 3-metil-1-butanolo, 1-esanolo, ottanoato di etile, *cis*-3-esen-1-olo, 2-feniletanolo, acido esanoico e gli acidi ottanoico e decanoico (Rebière, et al., 2010). In figura 1.10 la foto di un grappolo di varietà Semillon.



## 1.4.2. Fiano



**Figura 1.11** Grappolo d'uva di varietà Fiano

Il vitigno Fiano è considerato tra i migliori vitigni a bacca bianca italiani. Viene coltivato prevalentemente nella provincia di Avellino ma si è diffuso anche in Puglia e, recentemente, in Sicilia. Il nome Fiano sembra che derivi dal nome di una popolazione Ligure delle Alpi Apuane sopraffatta dai Romani e, migrate, nel secondo secolo a.C. in Campania. In questo esodo sembra abbiano portato con se la vite Apuana, poi divenuta Apiano, poi Afiano e infine Fiano. Il vitigno Fiano è fin dall'800 documentato non solo in Irpinia ma anche nella provincia di Caserta, in Puglia e in Basilicata. Precedentemente era sicuramente diffuso anche nel resto della Campania. Per la presenza del Fiano in Puglia dobbiamo risalire a Carlo II d'Angiò che, intorno alla fine del 1200, fece importare da Cava dei Tirreni 16000 piante di Fiano verso Manfredonia. Probabile però la sua

presenza in terra pugliese anche in epoche precedenti. Il Fiano è un vitigno capace di dar vita a vini di grande complessità, finezza aromatica e capacità di invecchiamento, come ad esempio il Fiano di Avellino DOCG. Solo negli ultimi anni si è puntato su una coltivazione concentrata soprattutto sulla qualità e quindi si possono prevedere in futuro risultati ancora migliori dal punto di vista della produzione ([www.quattroclici.it](http://www.quattroclici.it)). L'uva Fiano pur non essendo particolarmente dotata di molecole odorose in forma libera, è caratterizzata da elevate concentrazioni di precursori aromatici glicosilati. Nel corso della vinificazione e dell'invecchiamento il potenziale aromatico dell'uva viene espresso grazie ai processi idrolitici enzimatici e acidi. I composti principali presenti nell'uva Fiano come glicosidi sono: linalolo, geraniolo, 4-vinilguaiacolo,  $\beta$ -damascenone, 1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftalene (TND), butan-1,3-diene, terpinen-4-olo e cinnamato di etile. Questi composti si sono rivelati odorosamente attivi nei vini giovani. In particolare, linalolo e geraniolo, la cui concentrazione in forma libera dipende dai processi idrolitici di natura enzimatica operati dai lieviti, possono essere ritenuti i principali responsabili del carattere floreale del vino Fiano. La completa espressione del carattere varietale riconducibile all'uva di origine avviene dopo un invecchiamento di circa 24 mesi. Fra i composti aromatici liberi presenti nel vino, i maggiormente rappresentati sono alcol isoamilici (2-metilbutanolo e 3-metilbutanolo), 2-feniletanolo, 4-vinilguaiacolo, butanoato di etile e esanoato di etile (Moio, 2012). In figura 1.11 è riportata la foto di un grappolo d'uva di varietà Fiano.

## 1.5. La spettrometria di massa

### 1.5.1. Premessa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica usata per identificare prodotti incogniti, per determinazioni quantitative di composti noti e per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole. La spettrometria di massa trae origine nei primi anni del ventesimo secolo dalle esperienze di J.J. Thompson, il quale mise in evidenza la formazione di elettroni e “radiazioni positive” in un tubo posto sotto vuoto, nel quale veniva applicata una differenza di potenziale elettrico. Thompson intuì che tale nuova tecnica poteva essere molto utile al chimico per analizzare le sostanze, come descrisse nel suo libro “*Rays of positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis*”. La spettrometria di massa fu in realtà utilizzata per oltre trent’anni solamente per ricerche nel campo della fisica soprattutto nella determinazione della massa esatta degli isotopi. Queste fondamentali e importanti misure hanno permesse di creare le basi per gli sviluppi successivi della spettrometria di massa nelle varie branche della chimica (A.V., 2002).

Gli spettrometri di massa sono stati sviluppati attraverso numerose configurazioni strumentali in modo tale da permettere da un lato l’analisi di diverse matrici e dall’altro una sempre migliore risoluzione. La complessità della matrice, come nel caso dell’uva e del vino, ha reso necessari diversi approcci sia per quanto riguarda i sistemi per l’introduzione del campione che la scelta dell’opportuno analizzatore di massa. I primi studi sistematici di spettrometria di massa sui composti dell’uva e del vino risalgono al 1980. Negli ultimi anni la spettrometria di massa ha acquistato notevole importanza nella viticoltura e nell’enologia, per il controllo di numerosi parametri utili sia per la ricerca e il miglioramento del prodotto finale e sia per contrastare le possibili frodi, in un settore della filiera agroalimentare che negli ultimi anni ha visto un forte sviluppo in tutto il mondo (Flamini e Traldi, 2010).

In particolare la ricerca in viticoltura ed enologia cerca di determinare le caratteristiche tipiche dei vitigni, la selezione dei cloni migliori e l’identificazione dei parametri più adatti per la caratterizzazione del prodotto (Di Stefano, 1995).

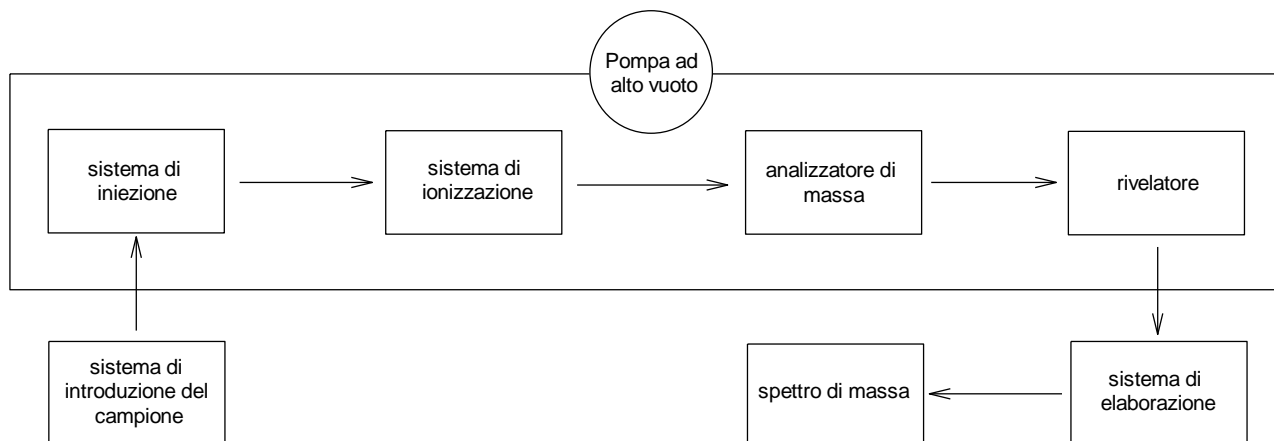
### 1.5.2. Lo spettrometro di massa

Lo spettrometro di massa è uno strumento utilizzato per determinare la massa di una molecola dopo che essa è stata ionizzata, ossia alla quale è stata impartita una carica elettrica. Più precisamente lo spettrometro non misura direttamente la massa molecolare, ma il rapporto massa/carica ( $m/z$ ) degli ioni che si formano dalla molecola in esame. La carica elettrica è una proprietà quantizzata, che può esistere solo come multipli interi della carica elementare, che è quella negativa di un elettrone o positiva di un protone. La maggior parte degli ioni che si possono riscontrare in spettrometria di massa possiede solo una carica ( $z=1$ ) così che il loro valore  $m/z$  coincide numericamente con la massa molecolare o meglio ionica.

I processi che avvengono all’interno di uno spettrometro di massa sono:

- a) produzione di ione e frammentazione,
- b) separazione degli ioni in base al rapporto  $m/z$ ,
- c) rivelazione.

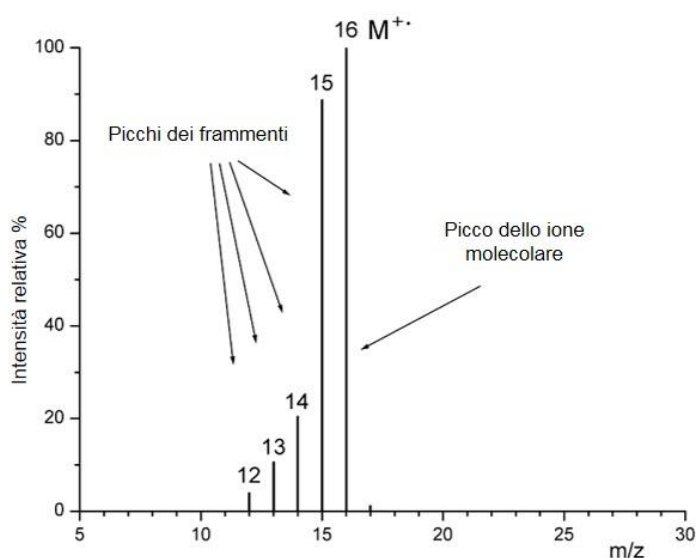
In figura 1.12, vengono rappresentate le parti che compongono uno spettrometro di massa.



**Figura 1.12** Schema dello spettrometro di massa

Fino a poco tempo fa gli spettrometri di massa richiedevano il campione in fase gassosa, ma grazie agli sviluppi più recenti, l'applicabilità della spettrometria di massa è stata estesa fino ad includere anche campioni in fase liquida o inglobati in una matrice solida. A seconda del sistema di introduzione e della tecnica di ionizzazione utilizzata, il campione può già esistere in forma ionica in soluzione, oppure può essere ionizzato simultaneamente con la sua volatilizzazione o mediante altri metodi nella sorgente ionica. Gli ioni prodotti, che si trovano in fase gassosa, vengono separati nell'analizzatore sulla base del loro rapporto  $m/z$  e vengono raccolti da un rivelatore. Nel rivelatore essi generano un segnale elettrico proporzionale al numero di ioni presenti. Il sistema di elaborazione dati registra questi segnali elettrici in funzione del rapporto  $m/z$  e li converte in uno spettro di massa (A.V., 2002).

### 1.5.3. Lo spettro di massa



**Figura 1.13** Esempio di spettro di massa

Lo spettro di massa consiste in un diagramma di abbondanza ionica in funzione del rapporto  $m/z$ . (vedi figura 1.13). Gli spettri di massa vengono rappresentati spesso in forma di semplici istogrammi. Gli ioni e la loro intensità relativa permettono di stabilire il peso molecolare e la struttura del composto in esame. Le abbondanze vengono riportate come rapporto rispetto al picco base, che è il picco più abbondante osservato nello spettro. Tale normalizzazione permette di avere spettri che sono funzione solamente dell'analita e delle condizioni di analisi. Il picco base non sempre coincide con il picco molecolare o picco genitore, che è invece il picco che corrisponde alla molecola ionizzata (ione molecolare)

molecolare o picco genitore, che è invece il picco che corrisponde alla molecola ionizzata (ione molecolare)

e che consente di stabilire quindi il peso molecolare dell'analita. In genere, più uno ione molecolare è stabilizzato (per effetto induttivo o per risonanza), maggiore è la sua probabilità di giungere intatto al rivelatore, maggiore quindi sarà la sua abbondanza. Dall'abbondanza del picco genitore è possibile già ipotizzare a quale classe di composti appartenga l'analita.

Il numero di picchi osservati in uno spettro di massa è sempre maggiore di quello dei frammenti prodotti dall'analisi, questo perché ogni picco è accompagnato da picchi satellite, prodotti da ioni contenenti isotopi minoritari dei vari elementi. Dato che i rapporti medi tra le diverse quantità di isotopi di uno stesso elemento in natura sono noti e sostanzialmente costanti, dall'abbondanza dei picchi satellite è possibile ricavare informazioni che consentono di ipotizzare la formula bruta dell'analita. Un esempio particolarmente eclatante di questo effetto riguarda il cloro e il bromo, la cui presenza nello spettro è immediatamente evidente. Il rapporto isotopico fa sì che ci sia un cluster isotopico molecolare. L'intensità relativa dei picchi  $M+1$   $m/z$  e  $M+2$   $m/z$ , dove  $M$  è il picco dello ione molecolare, risente molto del rapporto isotopico. Sfruttando questo fenomeno sono state ricavate formule, per i composti contenenti C, H, N, O, F, P, I, per determinare la formula bruta dell'analita. Esistono in letteratura tabelle (le *tabelle di Beynon*) che mettono in correlazione le distribuzioni dei picchi satellite con la formula bruta di un composto, inoltre tali funzioni sono ormai integrate nei software di analisi ed interpretazione degli spettri di massa (A.V., 2002).

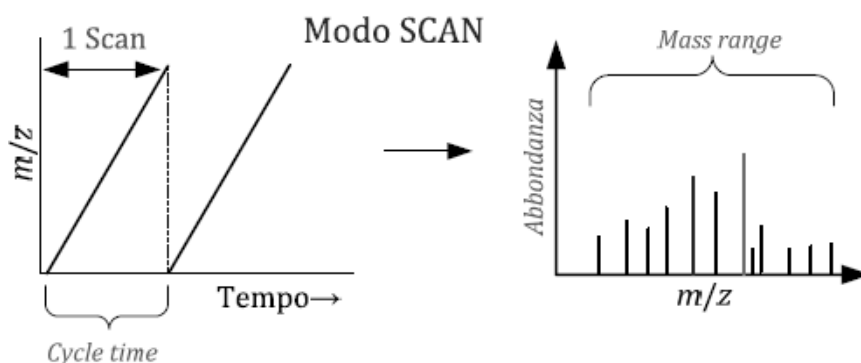
#### 1.5.4. Modalità di acquisizione degli spettri di massa

##### 1.5.4.1. Modalità SCAN

La modalità SCAN (detta anche FULL SCAN) viene utilizzata quando è necessario riconoscere il maggior numero di composti presenti in un campione ed è la modalità preferita quando si analizza per la prima volta un nuovo campione o si sta mettendo a punto un nuovo metodo analitico.

Il Full Scan MS è un esperimento di massa in cui l'analizzatore trasmette sequenzialmente al detector tutte le masse, formate nella sorgente, in un range selezionato dall'operatore. Si ottiene così, momento per momento, l'intero spettro di massa di ciò che viene eluito. Il cromatogramma che ne deriva è dato dalla corrente ionica totale (*Total Ion Current*, o TIC) in funzione del tempo di ritenzione. Benché tale modalità di acquisizione fornisca il massimo numero di informazioni qualitative possibile, essa non è tuttavia selettiva qualora si cerchi di rivelare un analita noto all'interno di una miscela molto complessa avendo a disposizione un analizzatore quadrupolare. Infatti il TIC apparirà in questo caso come un unico insieme irrisolto di picchi sovrapposti. Inoltre, poiché la sensibilità con cui un sistema quadrupolare rivela una data massa è direttamente proporzionale al tempo speso dall'analizzatore su quella massa, l'acquisizione in modalità FULL SCAN è poco idonea alla ricerca e rivelazione di sostanze in tracce.

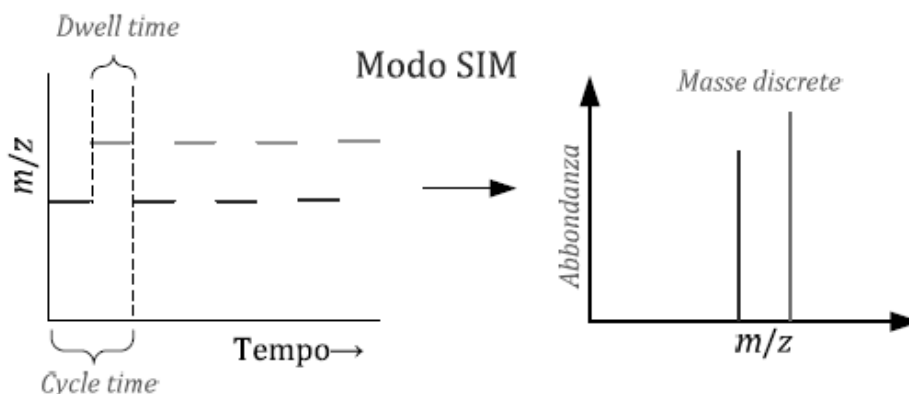
Nel caso in cui dal TIC non si riesca a distinguere molecole che eluiscono allo stesso tempo di ritenzione, è possibile riconoscere distintamente tali molecole effettuando l'*Extracted Ion Chromatogram* (EIC). Esso consiste nella ricerca di una molecola attraverso alcuni dei suoi frammenti che la contraddistinguono da altre, selezionando appropriati valori di  $m/z$  da ricercare sull'intero TIC (Hübschmann, 2009). In figura 1.14 è rappresentata la modalità di acquisizione SCAN.



**Figura 1.14** Rappresentazione modalità di acquisizione SCAN (Salvatore, 2013)

#### 1.5.4.2. Modalità SIM

La modalità *Selected Ion Monitoring* (SIM) è un metodo di acquisizione a singolo stadio in cui sono monitorati uno o più ioni di particolari rapporti massa/carica. Nella modalità di acquisizione SIM gli ioni formati in sorgente vengono accumulati nell'analizzatore, e di qui solo quelli che presentano il rapporto  $m/z$  prescelto sono isolati, fuoriescono dall'analizzatore, che funge da filtro e vengono quindi rivelati producendo uno spettro di massa SIM in cui le intensità degli ioni preselezionati sono "continuamente" registrate in funzione del tempo. Nessun dato è acquisito per gli altri ioni che vengono emessi dall'analizzatore. Poiché solo pochi ioni di selezionati rapporti  $m/z$  vengono monitorati, la modalità SIM, in uno strumento a singolo o triplo quadrupolo generalmente fornisce sensibilità più alta della modalità FULL SCAN grazie al fatto che l'analizzatore dedica alla particolare massa selezionata un tempo totale notevolmente superiore rispetto a quanto avviene per la stessa in modalità FULL SCAN si ottiene quindi un notevole incremento oltre che della sensibilità anche di selettività, a discapito del numero di informazioni ricavabili. La diminuzione del segnale dovuto al rumore di fondo e l'aumento del rapporto segnale/rumore rendono questa modalità di analisi indicata nella rivelazione e soprattutto nella quantificazione di sostanze presenti anche in tracce (Hübschmann, 2009). In figura 1.15 è rappresentata la modalità di acquisizione SIM.



**Figura 1.15** Rappresentazione modalità di acquisizione SIM (Salvatore, 2013)

### 1.5.5. Il *Tuning*

L'aspetto di uno spettro di massa, cioè il rapporto fra le abbondanze dei picchi di massa dei vari ioni, può dipendere dallo strumento in vari modi. Le varie impostazioni dello spettrometro di massa, per esempio la temperatura della sorgente o i voltaggi applicati alle lenti elettrostatiche influenzano la sensibilità alle varie masse e quindi le abbondanze relative degli ioni provenienti dalla frammentazione di un composto. Ciò contraddice l'idea fondamentale su cui è basato il riconoscimento di una sostanza per confronto con una collezione di spettri di riferimento, e cioè che ogni sostanza abbia uno spettro di massa invariante e non dipendente dal particolare strumento con cui esso è stato acquisito. Sfortunatamente, nella pratica, le cose stanno ben diversamente, e per ottenere spettri standard occorre regolare appropriatamente le condizioni di acquisizione. A ciò provvede il *tuning* dello spettrometro di massa. Infatti, uno degli obiettivi del *tuning*, oltre a quello di calibrare l'asse delle masse e di ottenere una risoluzione accettabile sul range di massa, è quello di regolare la sensibilità alle varie masse in maniera da ottenere spettri di massa standard, che sono comunemente detti *spettri classici*. Il *tuning* dello spettrometro di massa viene eseguito, immettendo nella sorgente di ioni, attraverso un'apposita valvola, un gas di calibrazione e modificando iterativamente vari parametri da cui dipende la performance dello spettrometro di massa fino a che sono soddisfatti determinati criteri. Per lo più il processo di *tuning* è gestito automaticamente dal software dello strumento, ma può essere anche condotto manualmente. Durante il *tuning* automatico, vari parametri, fra cui i voltaggi delle lenti di focalizzazione e di entrata, vengono modificati fino a che i picchi di massa della sostanza utilizzata, soddisfino i criteri memorizzati in un apposito file. Alla fine della procedura di *tuning* il software prepara un rapporto di *tuning* in cui sono visualizzati i valori ottimizzati dei vari parametri di *tuning* (Salvatore, 2013). In GC/MS la sostanza più utilizzata per il *tuning* è la perfluorotributilammina PFTBA il cui spettro di massa è riportato in figura 1.16.

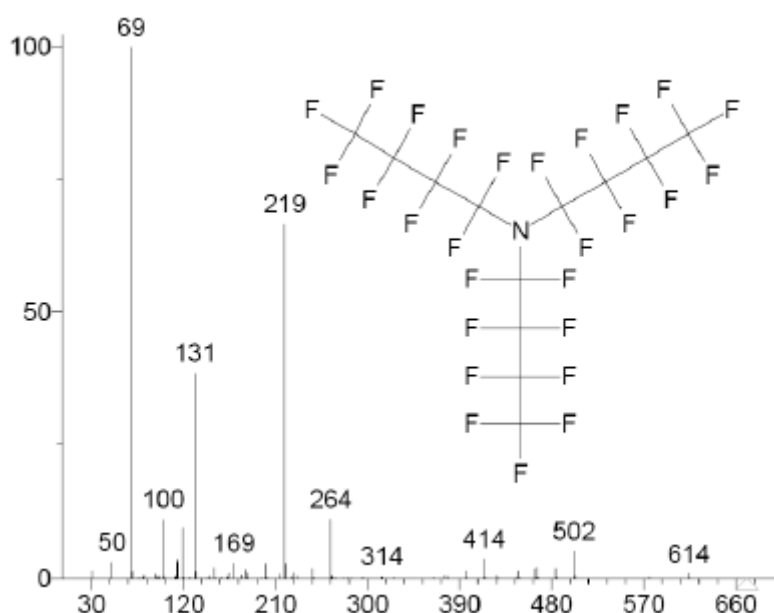
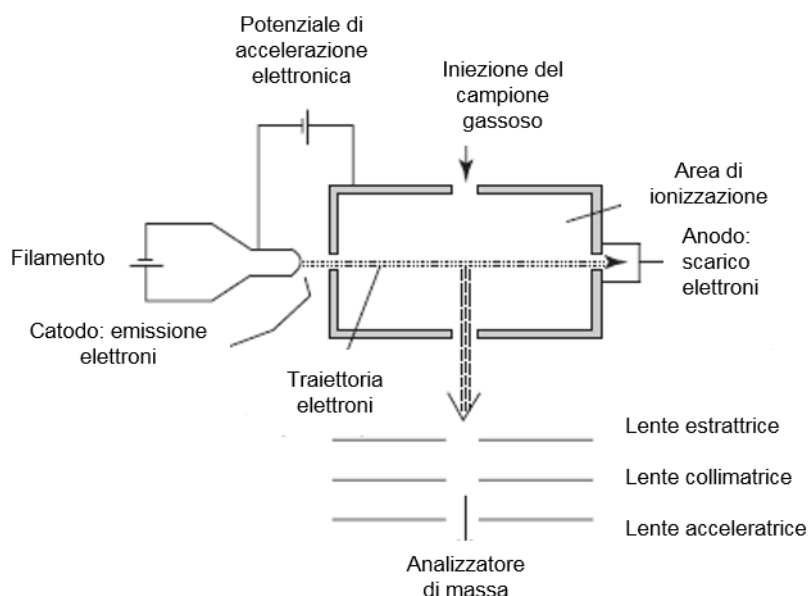


Figura 1.16 Spettro classico della PFTBA (Salvatore, 2013)

## 1.5.6. Sistemi di ionizzazione

### 1.5.6.1. Ionizzazione ad impatto elettronico (EI)

Nelle sorgenti ad ionizzazione per mezzo di elettroni, le molecole gassose vengono bombardate con un fascio di elettroni aventi una energia di 70 eV, ossia una energia molto superiore a quella dei legami che tengono insieme la molecola. La ionizzazione elettronica è sicuramente il metodo di ionizzazione più diffuso (Mark, et al., 1985). Questo metodo, proposto fin dalla nascita della spettrometria di massa, ha permesso la compilazione di vaste librerie di composti che permettono la facile identificazione di molte molecole e la previsione di sostanze sconosciute. Questo metodo di ionizzazione è affetto da due limiti. Il primo è dovuto dal fatto che il campione viene vaporizzato ad alte temperature in condizioni di vuoto molto spinto. In tali condizioni, essendo i legami intermolecolari superiori a quelli intramolecolari si ha la pirolisi dell'analita. La seconda limitazione della EI è correlata al trasferimento di energia alle molecole. Per molte classi di composti è troppo alta, portando ad una notevole frammentazione della molecola con la conseguente assenza in alcuni casi, del segnale dello ione molecolare, generalmente considerato la più importante informazione ricevuta da una misura di spettrometria di massa. (Flamini, et al., 2010). In figura 1.17 è raffigurata la sorgente EI.

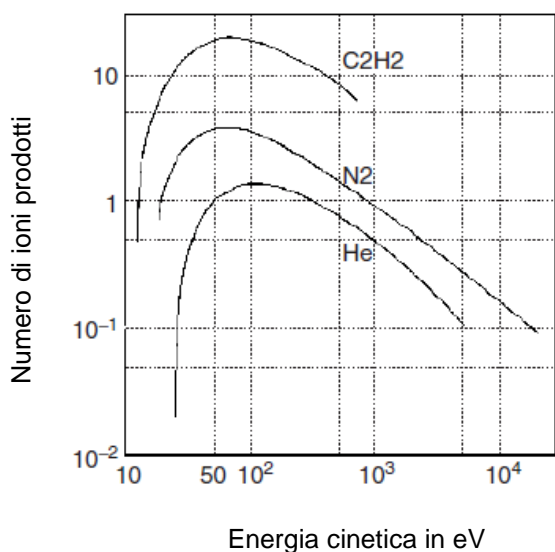


**Figura 1.17** Schema delle sorgente ionica ad impatto elettronico (Hoffmann, et al., 2007)

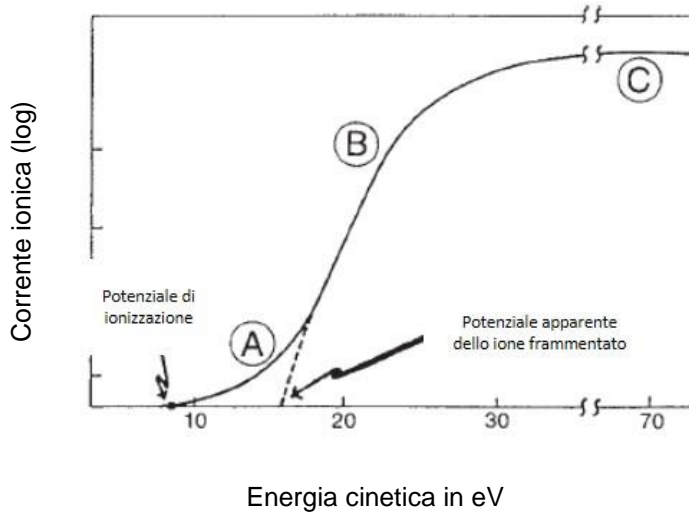
Ad ogni elettrone è associata una lunghezza d'onda dalla relazione  $\lambda = h/mv$ , dove  $h$  è la costante di Planck,  $m$  è la massa dell'elettrone e  $v$  la sua velocità. La lunghezza d'onda è pari a 2.7 Å per un'energia cinetica di 20 eV e 1.4 Å per un'energia cinetica di 70 eV. Quando questa energia è sufficiente, può avvenire il salto energetico dell'elettrone dallo stato fondamentale ad uno degli stati eccitati permessi. Se l'energia dell'elettrone è alta può avvenire l'espulsione di un elettrone con la conseguente formazione di una specie carica positivamente. Il numero di ioni che derivano dalla frammentazione dipende dall'energia cinetica del

fascio elettronico che colpisce una molecola. Come si può osservare dalla figura 1.18, il numero di ioni prodotti cresce rapidamente partendo da circa 20 eV con un picco massimo intorno a 70 eV, per poi diminuire a valori maggiori. Questo fenomeno è dovuto dal fatto che diminuendo la lunghezza d'onda, il fascio di elettroni non riesce più a colpire gli elettroni della molecola, come se la molecola bersaglio diventasse invisibile.

Nella figura 1.19 sono evidenziate tre zone della curva relativa all'aumento della corrente ionica all'aumentare dell'energia degli elettroni. Nella zona A si formano gli ioni molecolari, nella zona B si ha un forte incremento della produzione di ioni e nella zona C la corrente ionica raggiunge un valore massimo stabile (Hübschmann, 2009).



**Figura 1.18** Andamento del numero di ioni prodotti all'aumentare dell'energia degli elettroni (Hoffmann, et al., 2007)



**Figura 1.19** Aumento della corrente ionica all'aumentare dell'energia degli elettroni (Hoffmann, et al., 2007)

Nella ionizzazione elettronica a 70 eV, l'entità delle reazioni di frammentazione osservate per la maggior parte dei composti organici è indipendente dalla tipologia della sorgente di ioni. Per la costruzione di librerie di spettri, la comparabilità degli spettri di massa prodotta è pertanto garantita. Per tutte le librerie disponibili in commercio, gli spettri di massa vengono registrati in queste condizioni standard, permettendo di confrontare il pattern di frammentazione di una sostanza sconosciuta con gli spettri disponibili nelle varie librerie (Hübschmann, 2009).

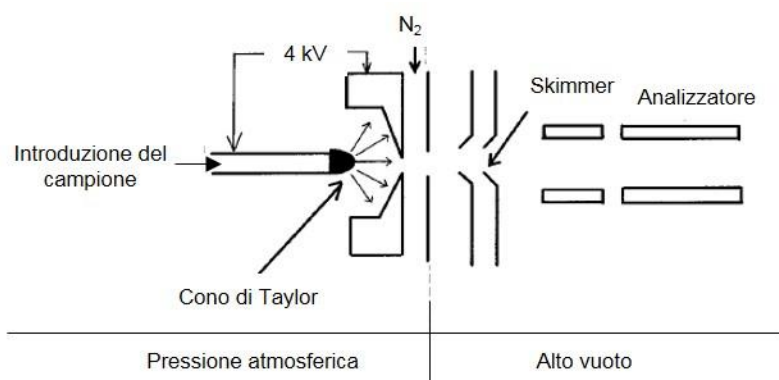
Identificare una semplice molecola dal suo spettro di massa ottenuto con la ionizzazione elettronica è relativamente facile rispetto a spettri ottenuti con altre tecniche. Lo spettro di massa mostra la massa della molecola e le masse dei frammenti, quindi il chimico non deve imparare qualcosa di nuovo: l'approccio è simile ad un'aritmetica rompicapo. Nella forma di grafico a barre uno spettro indica in ascissa la massa (in realtà il rapporto  $m/z$ ) e l'ordinata indica l'intensità relativa. (Mc Lafferty, 1993). In tabella 1.1 sono riportati i tempi di formazione degli ioni.



TIPO DI PROCESSO	TEMPO
Tempo di attraversamento di un elettrone in una molecola organica (70 eV)	$10^{-16}$ s
Formazione dello ione molecolare $M^+$ (EI)	$10^{-12}$ s
Fine delle reazioni di frammentazione	$10^{-9}$ s
Fine delle reazioni di riarrangiamento	$10^{-6} - 10^{-7}$ s
Tempo di vita degli ioni metastabili	$10^{-3} - 10^{-6}$ s

**Tabella 1.1** Tempi di formazione degli ioni nella spettrometria di massa.

### 1.5.6.2. Ionizzazione elettrospray (ESI)



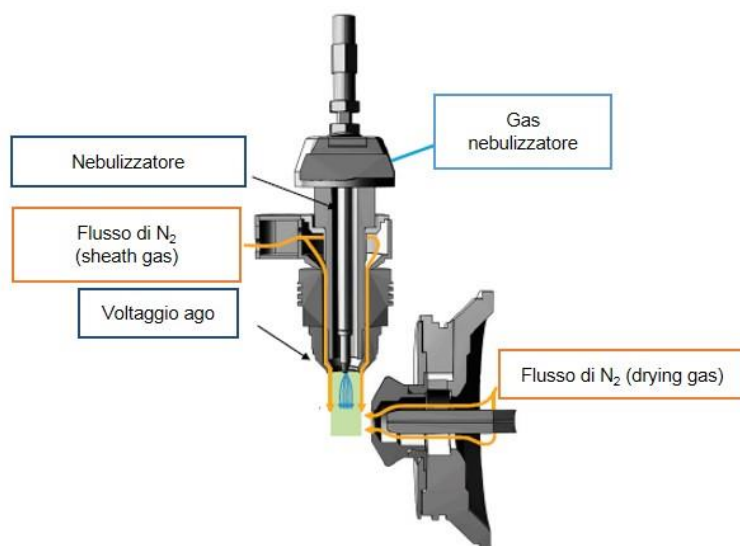
**Figura 1.20** Schema della sorgente ionica ESI (Hoffmann, et al., 2007)

La tecnica EI si usa principalmente per molecole relativamente piccole fino a circa 1000 Da. Per masse molecolari più grandi come quelle di polimeri e macromolecole biologiche si hanno a disposizione altre tecniche come il bombardamento con atomi veloci (FAB), la spettroscopia di massa di ioni secondari (SIMS), il deassorbimento e ionizzazione laser su matrice (MALDI) e la

ionizzazione elettrospray (ESI) che si usa per molecole non volatili con massa fino a 200.000 Da. La ionizzazione elettrospray si ottiene applicando un forte campo elettrico, al campione liquido che passa attraverso un tubo capillare con un flusso compreso fra 1 e 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Il campo elettrico viene ottenuto applicando una differenza di potenziale di 3-6 kV tra il capillare e il controlettrodo, separati da 0,3-2 cm, producendo campi elettrici nell'ordine di  $10^6$  V/m. Questo campo induce un accumulo di carica in corrispondenza della superficie del liquido che si trova all'uscita del capillare con la conseguente formazione di goccioline altamente cariche. Un flusso di gas (normalmente azoto) viene fatto scorrere in direzione coassiale con lo scopo di rimuovere le molecole di solvente dal campione prima dell'entrata dell'ago e dello *skimmer* (Barbante, 2011). In figura 1.20 viene riportato lo schema della sorgente ESI.

### 1.5.6.3. Ionizzazione Jet Stream

La tecnologia di ionizzazione denominata *Jet Stream* è stata sviluppata dai ricercatori dell'azienda Agilent per aumentare significativamente la sensibilità in ESI-MS. Un getto molto caldo di azoto, incontrando direttamente il flusso che esce dal nebulizzatore permette di desolvatare il campione e di concentrare e focalizzare gli ioni, migliorando il segnale e riducendo il rapporto segnale-rumore. In dettaglio, l'azoto viene diviso in due flussi distinti: uno a 400 °C collineare con il flusso che esce dal nebulizzatore e uno a 350 °C, ortogonale all'uscita del nebulizzatore. La focalizzazione termica che si ottiene in questo modo permette di ottenere una efficace desolvatazione del campione e una ionizzazione ottimale. Questa tecnica permette di ottenere segnali 5 volte più intensi rispetto ad una sorgente ESI classica, portando un significativo aumento della sensibilità delle analisi. In figura 1.21 la configurazione della sorgente *Jet Stream*.



**Figura 1.21** Configurazione della *Jet Stream* Agilent (Mordehai, et al., 2009)

Come detto in precedenza, la funzione principale della sorgente ionica è la formazione di specie cariche che verranno opportunamente convogliate negli analizzatori di massa. Nella tabella 1.2 sono elencati le varie tipologie e caratteristiche degli ioni.

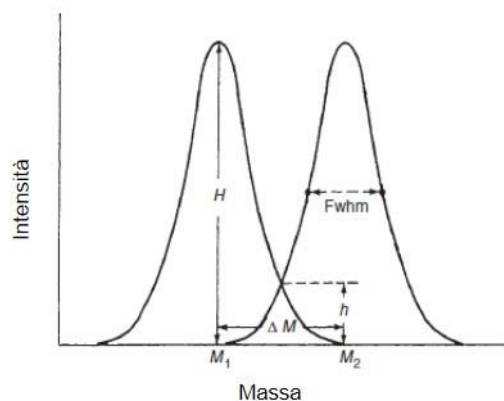
TIPO DI IONE	CARATTERISTICHE
Molecolare	Ione carico positivamente o negativamente con una massa uguale alla massa molecolare e di natura radicale perché possiede un elettrone spaiato.
Quasimolecolare	Ioni non radicali associati alla massa molecolare che si formano attraverso alla ionizzazione chimica come $[M+H]^+$ , $[M-H]^+$ o $[M-H]^-$ .
Addotto	Gli ioni che si formano con l'aggiunta di specie cariche $[M+NH_4]^+$ mediante ionizzazione chimica.
Frammento	Ioni formati per scissione di uno o più legami.
Riarrangiamento	Gli ioni che vengono a formarsi in seguito alla scissione e la migrazione di un atomo (vedi riarrangiamento di McLafferty).
Metastabile	Ioni ( $m_1$ ) che perdono specie neutre ( $m_2$ ) durante il tempo di volo attraverso la analizzatore settore magnetico e vengono rilevati con massa $m^* = (m_2)^2 / m_1$
Base	Questo ione dà il segnale massimo (100%) (picco di base) in uno spettro di massa.

**Tabella 1.2** Tipologia e caratteristiche degli ioni nella spettrometria di massa (A.V., 2002)

## 1.5.7. Gli analizzatori di massa

### 1.5.7.1. Premessa

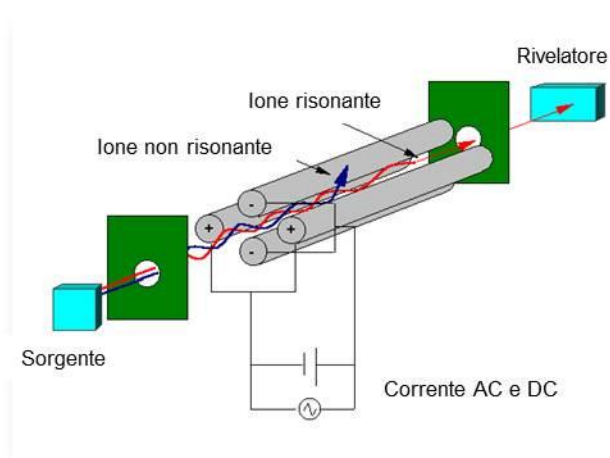
Gli analizzatori di massa sono dispositivi che separano gli ioni provenienti dalla sorgente ionica in base al loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ). Le caratteristiche più importanti degli analizzatori di massa sono la trasmissione ionica e la risoluzione di massa. La trasmissione ionica è la capacità dell'analizzatore di far arrivare al rivelatore tutti gli ioni di interesse analitico, mentre la risoluzione di massa è la capacità di separare due ioni con masse vicine. La risoluzione necessaria per separare due ioni di massa  $M$  e  $M+\Delta M$  è definita dalla seguente relazione:  $R = M / \Delta M$ . I parametri della risoluzione possono essere descritti graficamente come si evince dalla figura 1.22. Se i picchi di due masse  $M_1$  e  $M_2$  di intensità simile sono separati in modo tale che l'altezza  $h$  della valle tra di loro sia minore del 10% della loro altezza  $H$ , la risoluzione è definita come il rapporto sopra descritto. Gli analizzatori di solito si considerano a bassa risoluzione se  $R$  è inferiore a 5000 e ad alta risoluzione se  $R$  è superiore a 5000 (Barbante, 2011).



**Figura 1.22** Parametri della risoluzione di un analizzatore di massa (Barbante, 2011)

### 1.5.7.2. Analizzatore a quadrupolo

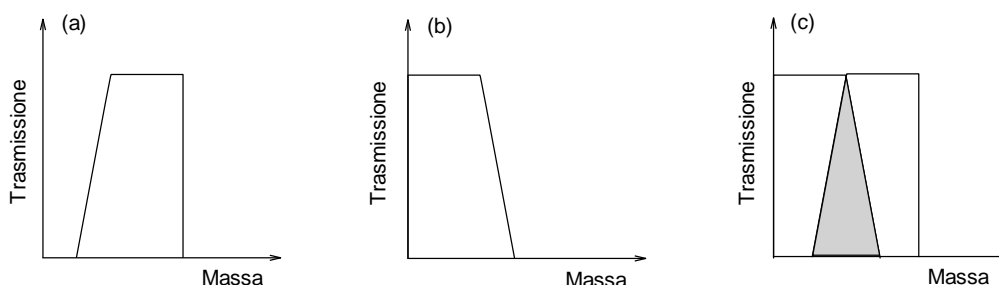
Fino alla fine del 1960 gli spettrometri di massa erano considerati dispositivi di utilizzo limitato e ristretto a settori scientifici molto specialistici. Gli strumenti erano di notevoli dimensioni, molto costosi e difficili da utilizzare. Lo sviluppo del filtro di massa a quadrupolo ha portato un enorme sviluppo della spettrometria di massa in campo analitico per quattro fattori: diminuzione drastica dell'ingombro strumentale, prezzo abbordabile da molti laboratori, tempi di analisi sensibilmente ridotti e facilità d'uso.



**Figura 1.23** Configurazione di un quadrupolo (A.V., 2002)

L'analizzatore a quadrupolo seleziona ioni aventi diverso rapporto  $m/z$  sfruttando la loro diversa stabilità all'interno di un campo elettrico quadrupolare a radiofrequenza. Come illustrato in figura 1.23, un quadrupolo a radiofrequenza è costituito da quattro barre metalliche cilindriche, aventi lo stesso diametro e lunghezza, connesse con un opportuno circuito corrente continua-corrente alternata. Due barre opposte vengono connesse al polo positivo di un generatore di corrente continua a potenziale variabile, mentre le altre due barre vengono connesse al polo negativo. Alle barre viene applicato un

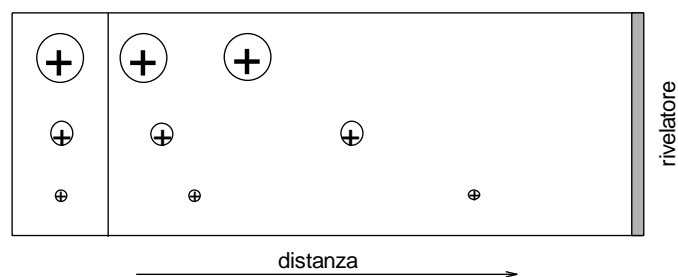
potenziale variabile in corrente alternata a radiofrequenza con uno sfasamento tra le coppie di 180 °C. I quadrupoli sono costituiti generalmente da sbarre cilindriche di acciaio, molibdeno o ceramica rivestita in oro della lunghezza di 15-20 centimetri e di diametro di 1 centimetro. La frequenza operativa è compresa fra 2 e 3 MHz. Per comprendere le proprietà filtranti di un quadrupolo, occorre considerare l'effetto del potenziale continuo e alternato sulla traiettoria degli ioni positivi che percorrono il canale tra le barre. Consideriamo la coppia di barre collegate con il polo positivo del generatore di potenziale continuo. Il potenziale continuo tenderà a focalizzare gli ioni verso il centro del quadrupolo, mentre per effetto del potenziale alternato, gli ioni tenderanno a convergere verso il centro durante il semiciclo positivo del potenziale alternato e a divergere durante il semiciclo negativo. Se durante il semiciclo negativo lo ione colpisce una barra, la sua carica viene neutralizzata e viene allontanato come specie neutra. Ricordando la fisica newtoniana è noto che il momento della quantità di moto di uno ione è direttamente proporzionale alla sua massa. Ne consegue che, a parità di energia cinetica è più difficile deviare uno ione pesante rispetto ad uno leggero. Pertanto, se lo ione presente nel canale è pesante e/o la frequenza del potenziale alternato è elevato, lo ione tenderà a rimanere confinato nello spazio tra le sbarre. Viceversa, se lo ione è leggero e/o la frequenza è bassa, lo ione colliderà contro una delle barre. Infine si può dire che la coppia di barre collegata al polo positivo del generatore costituisce un filtro di massa passa-alto. Si consideri adesso la coppia di barre collegate al polo negativo del generatore. In assenza di potenziale alternato, lo ione verrebbe attratto verso le barre e neutralizzato. Tuttavia, per gli ioni leggeri questo moto può essere compensato durante il semiciclo positivo del potenziale alternato. Lo ione perciò risulterà stabile se sufficientemente leggero e/o se la frequenza è elevata. Perciò questa coppia di barre si comporta come un filtro di massa passa-basso.



**Figura 1.24** Trasmissione in funzione della massa per un filtro a quadrupolo. (a) effetto delle barre positive; (b) effetto delle barre negative; (c) effetto combinato (Barbante, 2011)

Uno ione per poter essere rilevato deve essere in grado di percorrere tutto il suo cammino senza scontrare le barre. Per far questo deve essere sufficientemente pesante da non essere eliminato dal filtro passa-alto e sufficientemente leggero da non essere eliminato dal filtro passa basso (vedi figura 1.24). Perciò, l'intervallo di massa per cui uno ione può attraversare il quadrupolo è dato dalla sovrapposizione dei due filtri.

### 1.5.7.3. Analizzatore a tempo di volo



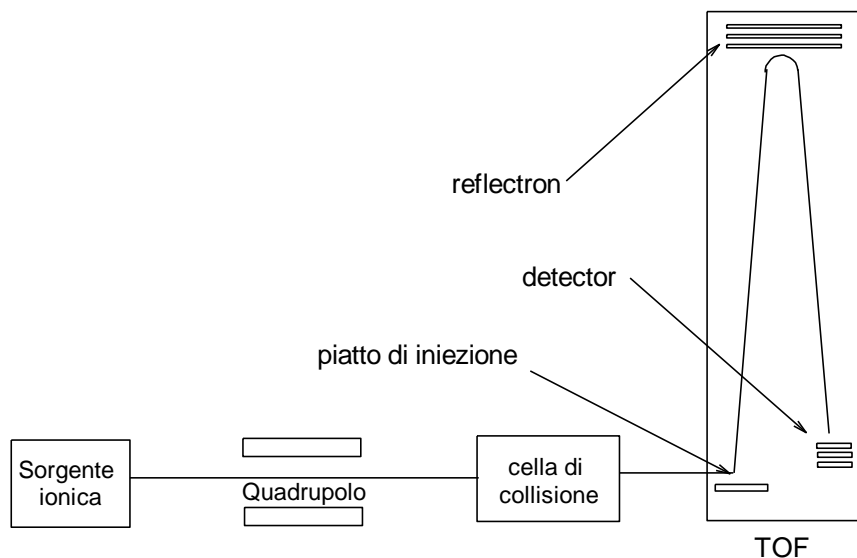
**Figura 1.25** Principio di separazione di un analizzatore a tempo di volo

L'analizzatore a tempo di volo (*time of flight* – TOF) si basa sul principio che l'energia cinetica di uno ione è direttamente proporzionale alla sua massa e alla sua velocità secondo la relazione  $E_k = 1/2mv^2$ . Perciò, ioni aventi massa diversa ma uguale energia cinetica, data dall'applicazione di un potenziale di accelerazione, avranno velocità differenti e percorreranno una distanza fissata in tempi diversi. Il principio è illustrato in figura 1.25, dove vengono considerati tre ioni aventi massa diversa. L'ione più leggero si muove con velocità maggiore e giungerà per primo al rivelatore, seguito dallo ione a massa intermedia e infine dallo ione più pesante. Perciò, tali ioni potranno essere risolti temporalmente. Uguagliando l'energia cinetica dello ione ( $1/2mv^2$ ) e l'energia potenziale ( $Uz$ ), si ottiene la relazione:  $m/z = 2Ut^2/D^2$ , dove  $m$  è la massa dello ione,  $z$  la sua carica,  $U$  il potenziale di accelerazione e  $D$  la lunghezza del tubo di volo. Da essa si deduce che il tempo impiegato da uno ione a percorrere la distanza  $D$  è proporzionale alla radice quadrata del rapporto  $m/z$ .

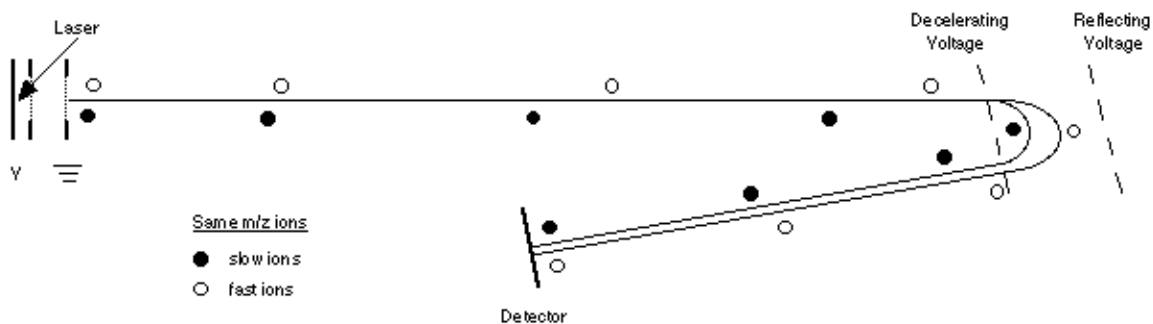
Tipici valori di tempo di volo sono dell'ordine di grandezza dei nanosecondi. Ciò significa che uno spettrometro di massa TOF è in grado di acquisire circa 20000 spettri di massa per secondo, ed è perciò significativamente più veloce (2-3 ordini di grandezza) di un analizzatore a quadrupolo. La capacità quasi simultanea dell'intero spettro di massa comporta di raggiungere un'eccellente precisione nella misura dei rapporti isotopici e un'ottimale applicazione del metodo dello standard interno.

Nel caso particolare della configurazione quadrupolo + tempo di volo (Q-TOF), gli ioni che arrivano dalla sorgente ionica vengono isolati dal quadrupolo che opera in modalità FULL SCAN prima dell'entrata del fascio ionico nella cella di collisione. Gli ioni in uscita dalla cella vengono focalizzati e accelerati da una serie di lenti su un piatto di iniezione a potenziale pulsato. Esso genera pacchetti di ioni, i quali vengono accelerati e guidati verso uno specchio ionico detto *reflectron*. Quest'ultimo funziona come sistema di compensazione di energia, allineando ioni aventi la stessa massa ma diversa velocità, in modo che essi giungano contemporaneamente al rivelatore (vedi figura 1.27). La risoluzione di un analizzatore di massa a tempo di volo può essere espressa in funzione del tempo secondo la relazione:  $R = t/2\delta t$ . La risoluzione può essere migliorata allungando il tempo di volo  $t$  (riducendo il potenziale di accelerazione o aumentando la lunghezza

del tubo di volo) oppure diminuendo la minima differenza di tempo che può essere apprezzata dal rivelatore (ossia diminuendo il suo tempo di risposta). (Barbante, 2011). Gli strumenti TOF moderni hanno risoluzioni che arrivano a 50000. In figura 1.26 viene illustrata la tipica configurazione Q-TOF.



**Figura 1.26** Configurazione tipica del Q-TOF

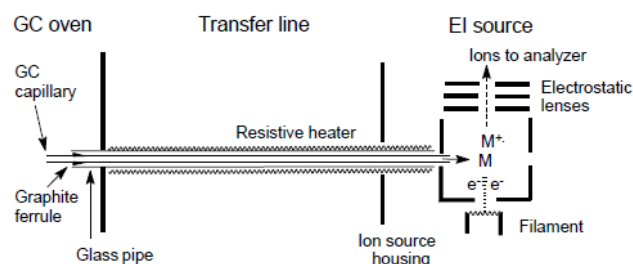


**Figura 1.27** Principio di funzionamento del *reflectron*.

## 1.6. Tecniche ifenate

### 1.6.1. GC/MS – Gascromatografia-Spettrometria di massa

La metodologia analitica del gas massa (GC/MS) combina la tecnica gas-cromatografica (GC) con le potenzialità della spettrometria di massa (MS) per la determinazione qualitativa e quantitativa di una ampia gamma di sostanze, prevalentemente organiche, a bassa polarità e basso peso molecolare accomunate da una temperatura di ebollizione sempre inferiore a 300°C. I principali vantaggi che si ottengono utilizzando lo spettrometro di massa come rivelatore dopo la separazione cromatografia dei componenti, consistono in una sensibilità maggiore rispetto ai detectors comunemente usati dai GC e nella possibilità di identificare la sostanza analizzata. Le due tecniche associate possiedono quindi una capacità analitica notevolmente superiore rispetto alle singole metodologie usate separatamente. Il GC sfrutta le differenti proprietà delle varie specie chimiche presenti in una miscela gassosa per la loro separazione. Una volta che i singoli componenti la miscela sono stati separati, questi passano all'interno del MS dove vengono sottoposti a ionizzazione e conseguente frammentazione. L'interfacciamento di un gascromatografo con colonna capillare con uno spettrometro di massa dipende dal tipo di sorgente ionica che viene utilizzata. Come illustrato in figura 1.28, nel caso più comune di sorgente ad ionizzazione elettronica (EI) il collegamento del gascromatografo con lo spettrometro di massa avviene mediante una *transfer line* costituita da un capillare in vetro della lunghezza di circa 30 centimetri. La *transfer line*, mantenuta ad alte temperature è collegata, ad un capo direttamente con l'uscita della colonna capillare e dall'altro con la sorgente ionica. La sua funzione è quella di evitare assolutamente un possibile processo di condensazione degli analiti dall'uscita della colonna cromatografica e l'entrata della sorgente ionica. Gli analizzatori di massa più utilizzati in GC/MS sono il quadrupolo e la trappola ionica (Hoffmann, et al., 2007)



**Figura 1.28** Interfacciamento della colonna capillare con la sorgente ionica (Hoffmann, et al., 2007)

## 1.6.2. LC/MS – Cromatografia liquida-Spettrometria di massa

L'interfacciamento tra la cromatografia liquida e la spettrometria di massa, è un connubio particolarmente utile nella rivelazione sensibile di composti organici presenti in tracce in matrici complesse. Fino ad una decina d'anni fa anche solo immaginare tale accoppiamento risultava difficile a causa dell'incompatibilità tra le due tecniche HPLC e Spettrometria di Massa . Nel tempo si sono susseguiti una serie di approcci per rendere possibile l'accoppiamento LC-MS ma la tecnica di ionizzazione più convincente è rappresentata dalla *Atmospheric Pressure Ionization* (API) dove la ionizzazione avviene a pressione atmosferica, successivamente gli ioni vengono introdotti nel sistema ad alto vuoto dell'analizzatore di massa guidati da opportuni campi elettrici. L'ESI è una delle molteplici varianti dell'API applicata tra l'uscita di un unità HPLC e l'ingresso di uno spettrometro di massa. Oltre all'ESI classico in cui la nebulizzazione avviene per semplice repulsione elettrostatica tra le particelle (goccioline) cariche producendo uno spray molto allargato, esiste l'*Ion Spray Ionization* (ISI) in cui la nebulizzazione viene assistita da un nebulizzatore a gas (aria o azoto) che produce uno spray più direzionale, una maggiore compatibilità con acqua, nonché la possibilità di utilizzare flussi più elevati. Queste caratteristiche rendono particolarmente adatto l'ISI all'accoppiamento con l'HPLC. In ogni caso è spesso utile splittare il flusso proveniente dall'HPLC prima del collegamento alla sorgente, al fine di ottenere un miglioramento del rapporto segnale/rumore, un recupero di parte del campione senza alterare la sensibilità in quanto l'ESI dipende dalla concentrazione dell'analita e non dalla sua quantità. Infine esiste una tipologia di ESI ad alto flusso (*Turbo Ion Spray*) che permette di incrementare la velocità di evaporazione del solvente mediante immisione controcorrente di un flusso di aria riscaldata. Questo permette di operare a flussi di anche 1-5ml/min senza necessità di splittare (Hoffmann, et al., 2007).



## 1.7. Estrazione in Fase Solida (**Solid Phase Extration - SPE**) (fonte [www.stepbio.it](http://www.stepbio.it))

### 1.7.1. Descrizione della tecnica

L'estrazione per adsorbimento SPE è un processo fisico tra una fase solida e una fase liquida in cui la fase solida ha una affinità maggiore per il composto da isolare rispetto al solvente in cui lo stesso composto è sciolto. Quando il campione passa attraverso la fase solida gli analiti vengono concentrati sulla superficie del materiale adsorbente mentre gli altri composti presenti nel campione eluiscono senza interagire. Il risultato è la purificazione e la concentrazione delle sostanze isolate dal materiale adsorbente. Ciò può essere ottenuto



**Figura 1.29**  
Cartuccia SPE

grazie ad interazioni specifiche tra i gruppi funzionali dei composti e il substrato della fase solida. La fase solida adsorbente viene impaccata in una cartuccia (vedi figura 1.29). Il campione viene fatto passare attraverso la cartuccia in modo che i diversi composti in esso presenti possano interagire con la superficie adsorbente venendo trattenuti o meno a seconda della loro capacità di stabilire interazioni. Si ha ritenzione quando la fase solida riesce ad immobilizzare alcuni dei composti presenti nel campione; la ritenzione cambia in funzione del tipo di adsorbente o del solvente utilizzato.

L'eluizione è il processo di rimozione delle sostanze isolate dall'adsorbente mediante il passaggio nella cartuccia di un opportuno solvente (da usare nel minor volume possibile). Maggiore è l'interazione tra adsorbente e analita, minore è il rischio che questo venga eliminato dalla cartuccia durante le fasi di lavaggio utilizzate per eliminare molecole interferenti coadsorbite. Unità di misura per caratterizzare ritenzione ed eluizione è la quantità di solvente necessario per riempire gli interstizi tra particelle di adsorbente e tutti i pori presenti nella fase stazionaria della cartuccia di estrazione (*bed volume*). Adsorbenti di 40  $\mu\text{m}$  con pori di circa 60 Angstroms hanno un "*bed volume*" di circa 120  $\mu\text{l}$  per 100 mg di adsorbente. La ritenzione è considerata sufficientemente forte quando possono passare 20 *bed volume* di solvente di lavaggio senza determinare l'eluizione degli analiti isolati. Una eluizione ottimale richiede non più di 5 *bed volumes* di solvente di estrazione. Il flusso del campione attraverso la cartuccia durante la fase di estrazione non deve essere superiore ai 5-10 mL/min per 100 mg di adsorbente.

La capacità dell'adsorbente è la quantità di analita trattenuta da una determinata quantità di adsorbente in condizioni ottimali varia in funzione degli adsorbenti. Adsorbenti a scambio ionico hanno capacità di 0,5-1,5 meq/g. Per altri adsorbenti la capacità varia tra l'1 e il 5% della massa dell'adsorbente (es. 100 mg di adsorbente trattengono fino a 5 mg di analiti).

La selettività è la capacità dell'adsorbente di distinguere tra sostanze da isolare e interferenti da allontanare. Dipende dalla struttura chimica dell'analita da isolare, dalle proprietà dell'adsorbente e dalla composizione

della matrice del campione. La selettività è massima quando l'adsorbente interagisce solo con i gruppi funzionali dell'analita, assenti negli altri componenti della matrice del campione.

La solvatazione è l'interazione tra gli ioni di un soluto e le molecole del solvente, possibile solo con solventi polari (es. NaCl in acqua, gli ioni  $\text{Na}^+$  attirano le molecole di  $\text{H}_2\text{O}$ ). La solvatazione dell'adsorbente è necessaria prima che questo interagisca con le sostanze da isolare, l'adsorbente viene bagnato mediante il passaggio di diversi volumi di un solvente come il metanolo (ma anche acetonitrile, isopropanolo o THF), che viene a sua volta allontanato (anche se non completamente) mediante passaggio del solvente che prepara l'adsorbente al passaggio del campione. Una volta avvenuta la solvatazione, l'adsorbente non deve essere lasciato essiccare.

### 1.7.2. Adsorbenti silicei

Sono tra gli adsorbenti più utilizzati, prodotti mediante reazione tra organosilani e silicati attivi (legame silil-etero). Stabili a pH variabile tra 2 e 7,5 (sopra pH 7,5 tendono a sciogliersi in soluzione acquosa; sotto pH 2 il legame silil-etero diventa labile e i gruppi funzionali cambiano le loro caratteristiche di specificità) e con tutti i solventi organici. Sono materiali rigidi, non si gonfiano in presenza del solvente come accade per le resine di polistirene. Ciò permette l'uso successivo di diversi solventi, rendendo possibile estrazioni anche molto complesse. La fase solida è costituita da particelle di dimensioni variabili tra i 15 e i 100  $\mu\text{m}$ , di forma irregolare o sferica, permette un flusso rapido del solvente in condizioni di vuoto minimo. La porosità degli adsorbenti è di circa 60 Angstroms, adeguata a composti con peso molecolare attorno a 15.000. Molecole di dimensioni maggiori sono escluse dai pori e non vengono tratteneute. Le proprietà di ritenzione degli adsorbenti silicei sono dovute soprattutto ai gruppi funzionali legati al substrato di silice, alla polarità del substrato e ai silanoli rimasti liberi sulla sua superficie. Interazioni secondarie tra substrato e analita sono in funzione della polarità che permette o meno la formazioni di legami idrogeno tra i silanoli e i gruppi amminici o i gruppi -OH degli analiti in presenza di un solvente non-polare. In condizioni acquose i gruppi silanoli producono delle interazioni ioniche con eventuali gruppi ionici degli analiti (es. con ammine protonate).

### 1.7.3. Interazioni non polari

Le interazioni non polari più importanti che possono intercorrere tra fase adsorbente e analita, sono le forze di Van der Waals (interazioni tra i gruppi C-H di analita e adsorbente).

Il  $\text{C}_{18}$  (Octadecil-silano) è l'adsorbente più usato per le interazioni non-polari, non è selettivo e permette di tratteneute molti composti non polari. Utilizzato per isolare composti anche molto diversi soprattutto in analisi che necessitano l'estrazione del maggior numero di composti presenti all'interno di una matrice.

Le interazioni non-polari e la ritenzione sono facilitate in presenza di solventi molto polari (come l'acqua). In presenza di questo tipo di solventi anche molecole che presentano gruppi funzionali polari ma che hanno una struttura non polare possono interagire con l'adsorbente non-polare. Solventi non-polari invece interferiscono con i meccanismi di ritenzione. L'eluizione degli analiti isolati deve avvenire tramite un solvente non-polare, in grado di rompere le interazioni non-polari tra analita ed adsorbente. Caratteristiche degli analiti: composti con catena achilica, aromatica, aliciclica o altri gruppi funzionali con una struttura idrocarburica significativa.

#### 1.7.4. Interazioni polari

Interazioni polari come i legami idrogeno, forze dipolo/dipolo e molte altre che determinano la distribuzione degli elettroni tra gli atomi presenti nei gruppi funzionali producendo una distribuzione polare delle cariche (+) e (-). Molecole con gruppi funzionali polari (-OH, -NH<sub>2</sub>, C=O, anelli aromatici, gruppi sulfidrilici, doppi legami e gruppi che contengono eteroatomi come O, N, S, P) interagiscono con i gruppi funzionali polari di opportuni adsorbenti. Il legame idrogeno è una interazione polare che interviene tra un gruppo che ha un H legato ad un atomo elettronegativo (come l'O oppure l'N) e un altro gruppo con un atomo elettronegativo. -OH ed -NH<sub>2</sub> sono i principali donatori di legami idrogeno in grado di interagire con gruppi funzionali che contengono O, N e S. Interazioni polari sono tipiche degli adsorbenti silicati (ammine e gruppi ossidrilici sono i gruppi funzionali più sensibili). La ritenzione è facilitata in presenza di un solvente non-polare, l'eluizione viene eseguita con solventi polari in grado di rompere le interazioni polari tra adsorbente ed analita. Caratteristiche degli analiti: molecole contenenti gruppi funzionali con dipoli, inclusi gruppi con etero-atomi o gruppi con proprietà di risonanza come anelli aromatici.

#### 1.7.5. La matrice del campione

Nel campione, oltre alle sostanze da isolare sono presenti molti altri composti. L'insieme di queste sostanze costituisce la matrice. Lo sviluppo di un metodo di estrazione efficace deve dunque tener conto sia delle caratteristiche della matrice sia di quelle del composto da isolare. Le proprietà dell'analita condizionano la scelta del tipo di adsorbente e del solvente necessario all'eluizione, ma si deve tener conto anche delle interazioni tra matrice ed adsorbente, perché alcuni composti sono in grado di competere con i siti di interazione per gli analiti, riducendone di fatto la ritenzione. Si deve valutare il pH, il carattere polare o non polare, la forza ionica delle specie presenti, ma anche l'eventuale adsorbimento dell'analita da parte di componenti della matrice.

### 1.7.6. Sviluppo del metodo

Sono due gli approcci alle tecniche di estrazione:

- ritenzione degli analiti da isolare mediante eluizione selettiva degli interferenti;
- ritenzione degli interferenti da parte dell'adsorbente ed eluizione diretta degli analiti.

Per lo sviluppo di un metodo di estrazione sono necessari:

1. Valutazione delle caratteristiche dell'analita e dei composti presenti nella matrice del campione;
2. Scelta dell'adsorbente;
3. Testare l'adsorbente per valutare efficienza, selettività, tipo di eluizione;
4. Verifica del metodo di estrazione su campione reale.

## 1.8. Scopo della tesi

Questo lavoro di tesi si proponeva i seguenti obiettivi:

1. mediante analisi GC/MS, studiare il profilo dei composti aromatici liberi e dei precursori di aromi glicosilati presenti nei campioni dei mosti di uve di Semillon raccolte nelle vendemmie 2013 e 2014 da viti defogliate e non defogliate al fine di indagare l'effetto della defogliazione sulla componente aromatica;
2. mediante analisi GC/MS e UHPLC/QTOF, studiare la composizione dei composti liberi e dei precursori aromatici di tre campioni di vini ottenuti da uve di Fiano della Puglia e di un vino Fiano di Avellino al fine di indagare analogie e differenze tra i prodotti provenienti dalle due regioni;
3. valutare l'efficienza dell'analisi UHPLC/QTOF per lo studio dei terpeni glicosilati dei vini;
4. mettere a punto un metodo SPE per la preparazione del campione finalizzato alla determinazione simultanea del metil antranilato e di furaneolo nei vini prodotti da uve di ibridi produttori diretti.

## Materiali e metodi

## 2.1. Descrizione dei campioni oggetto delle analisi

### 2.1.1. Mosti Semillon

I mosti di varietà Semillon, oggetto dello studio della presente tesi, sono stati ottenuti da uve sane raccolte nella zona di Soave (VR) da viti non sfogliate e viti sfogliate, nelle annate 2013 e 2014 con due ripetizioni biologiche per ogni annata e per ogni tipologia di viti per un totale di 6 campioni. Con la dicitura “ripetizioni biologiche” si intende in questo caso specifico, una serie di campioni prelevati sullo stesso vigneto ma su piante diverse. Come descritto in tabella 2.1, ai campioni sono stati assegnati dei codici identificativi dove:

- NS sta per mosti derivanti da uve di viti non sfogliate
- S sta per mosti derivanti da uve di viti sfogliate
- R1, R2 e R3 indicano il numero della ripetizione biologica

Ripetizione	Annata 2013		Annata 2014	
1	NS13R1	S13R1	NS14R1	S14R1
2	NS13R2	S13R2	NS14R2	S14R2

**Tabella 2.1** Codici dei campioni di mosto Semillon

### 2.1.2. Vini ottenuti con uve prodotte da ibridi produttori diretti

In questo lavoro di tesi sono state analizzate le concentrazioni di furaneolo e metil antranilato di 22 campioni di vino ottenuti da ibridi produttori diretti, suddivisi in 10 campioni di vino bianco e 12 campioni di vino rosso. I vini sono stati prodotti da una cantina sperimentale situata in provincia di Pordenone. Per ragioni di riservatezza non è stato possibile riportare i nomi dei vini e pertanto i campioni sono stati chiamati genericamente Bianco e Rosso con numerazione progressiva.

### 2.1.3. Vini Fiano

I quattro campioni di vino Fiano, oggetto di studio nella tesi, provengono dalla vendemmia 2013. Uno, distinto con il codice FAT (Fiano di Avellino Testimone), proviene dalla zona di Antripalda in provincia di Avellino. Questo campione rappresenta il testimone con il quale si confronteranno gli altri campioni. Gli altri tre vini, distinti con i codici FP1 (Fiano Puglia 1), FP2 (Fiano Puglia 2) e FP3 (Fiano Puglia 3) sono vini prodotti in Puglia rispettivamente nelle zone di Andria, Locorotondo e San Pietro Vernotico. Nelle cartine in figura 2.1 sono indicate le rispettive zone di produzione. Per tutti i quattro campioni sono state eseguite sempre presso il laboratorio chimico del CRA-VIT di Conegliano, le analisi di routine allo scopo di conoscere il contenuto di etanolo, glucosio, fruttosio, glicerina, alcol, acidità totale, pH e acidi organici. In tabella 2.2 sono riportati i valori delle analisi appena citate.

Campione	Codice	Etanolo ml%ml	Glucosio g/L	Fruttosio g/L	Zuccheri tot.g/L	Glicerina g/L	Alcool da svolgere ml%ml	Alcool compl. ml%ml	Ac.Tot. g/L	pH	Tartarico g/L	Piruvico g/L	Malico g/L	Lattico g/L	Acetico g/L	Citrico g/L	Succinico g/L
Fiano Avellino 2013 Antripalda	FAT	12.56	0.37	1.18	1.55	6.34	0.09	12.65	5.50	3.28	1.24	0.02	2.21	0.29	0.20	0.21	0.61
Fiano Puglia 2013 Andria	FP1	12.14	0.42	2.55	2.97	5.33	0.18	12.32	5.60	3.29	1.74	0.01	2.57	0.08	0.20	0.27	0.48
Fiano Puglia 2013 Locorotondo	FP2	12.10	1.20	4.50	5.70	5.74	0.34	12.44	4.95	3.25	1.48	0.01	1.52	0.23	0.15	0.25	0.50
Fiano Puglia 2013 San Pietro Vernotico	FP3	13.00	0.17	0.55	0.72	6.37	0.04	13.04	5.60	3.25	1.99	0.01	1.91	0.09	0.20	0.24	0.41

**Tabella 2.2** Risultati delle analisi dei parametri più comuni effettuate sui vini Fiano



**Figura 2.1** Individuazione delle zone di provenienza dei campioni di vino Fiano



## 2.2. Preparazione dei campioni per le analisi

### 2.2.1. Preparazione dei mosti Semillon per l'analisi GC/MS.

Dopo aver pigiato a mano le uve di ogni campione separatamente ed eliminate le sostanze solide presenti (raspi, bucce e vinaccioli) con un colino a maglie strette, sono stati prelevati 500 mL di mosto e posti in una bottiglia Kartell®. Per rendere infermentescibile il mosto, sono stati aggiunti 50 mg di sodio azide (Fluka) per ogni bottiglia. I campioni sono stati congelati. L'estrazione dei composti liberi e glicosilati è stata eseguita utilizzando la metodica descritta da Di Stefano (1997).

Dopo aver scongelato i campioni a temperatura ambiente il mosto è stato centrifugato in provettoni da 50 mL a 4000 rpm per 10 minuti a 20 °C utilizzando la centrifuga 4235A (A.L.C. srl, Milano). Questa operazione è resa necessaria per eliminare le sostanze in sospensione ed illimpidire il campione. Ad un volume di 350 mL di mosto sono stati aggiunti 40 mg di enzima pectolitico Pectazina DC (Dal Cin, Concorezzo, MB) privo di attività glicosidasi secondaria. Dopo 2 ore il mosto è stato centrifugato in provette da 50 mL a 4000 rpm per 10 minuti a 20 °C. Dopo aver raccolto 200 mL di surnatante in un matraccio da 200 mL, sono stati aggiunti 200 µL di standard interno 1-eptanolo 180 mg/L (Carlo Erba Analyticals, Milano). La soluzione di 1-eptanolo è stata preparata in soluzione di etanolo al 50% in acqua deionizzata (sistema di purificazione Elix™ 5 Millipore, Milano).

La procedura di estrazione del mosto è stata condotta utilizzando l'apparecchiatura VacMaster (Stepbio srl, Bologna), nella quale sono presenti 10 postazioni utilizzabili per l'estrazione in fase solida (SPE). Sono state utilizzate cartucce C<sub>18</sub> Sep-Pak® da 10 g (Waters, USA). Le cartucce sono state condizionate mediante il passaggio di 40 mL di diclorometano (J.T.Baker, Olanda), 30 mL metanolo (Romil SpS, Cambridge) e 50 mL acqua deionizzata. Dopo passaggio dei 200 mL di mosto, le cartucce sono state lavate con 40 mL di acqua deionizzata per eluire i composti polari. Le cartucce sono state successivamente portate a secco sotto vuoto. I composti liberi sono stati eluiti con 40 mL di diclorometano, mentre i composti glicosilati con 30 mL di metanolo. La frazione in metanolo è stata portata a secco sotto vuoto utilizzando l'evaporatore rotante LABOROTA 4000 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelheim, Germany) e ripresa con 5 mL di tampone fosfato-citrato a pH=5. Il tampone è costituito da acido citrico (Carlo Erba) 0.1 M e difosfato di sodio diidrato 0.2 M (Riedel-de Haën). Successivamente sono stati aggiunti 100 mg di enzima pectolitico AR 2000 ad attività glicosidasi secondaria e lasciata 15 ore in stufa a 40 °C. L'enzima utilizzato è quello che fra i preparati commerciali possiede l'attività glicosidasi più elevata (Sarry, et al., 2004). Dopo centrifugazione, alla soluzione sono stati aggiunti 200 µL di standard interno 1-decanolo 177.8 mg/L (Carlo Erba Analyticals, Milano). La soluzione di 1-decanolo è stata preparata in soluzione di etanolo al 50% in acqua deionizzata. Per l'estrazione è stata utilizzata una cartuccia C<sub>18</sub> Sep-Pak® da 1 g, preventivamente attivata con 5 mL di diclorometano, 3 mL di metanolo e 5 mL di acqua deionizzata. Dopo il passaggio del campione, la cartuccia è stata lavata con 5 mL di acqua deionizzata ed i composti liberati per idrolisi enzimatica sono stati eluiti con 6 mL di diclorometano. La frazione organica è stata anidrificata con sodio solfato anidro (Fluka, Milano), filtrata con filtro a fascia blu (Whatman n.40) e concentrata fino a 200 µL mediante flusso di azoto prima dell'analisi.

In figura 2.2 è riportato lo schema del metodo utilizzato per la preparazione dei campioni di mosto Semillon.

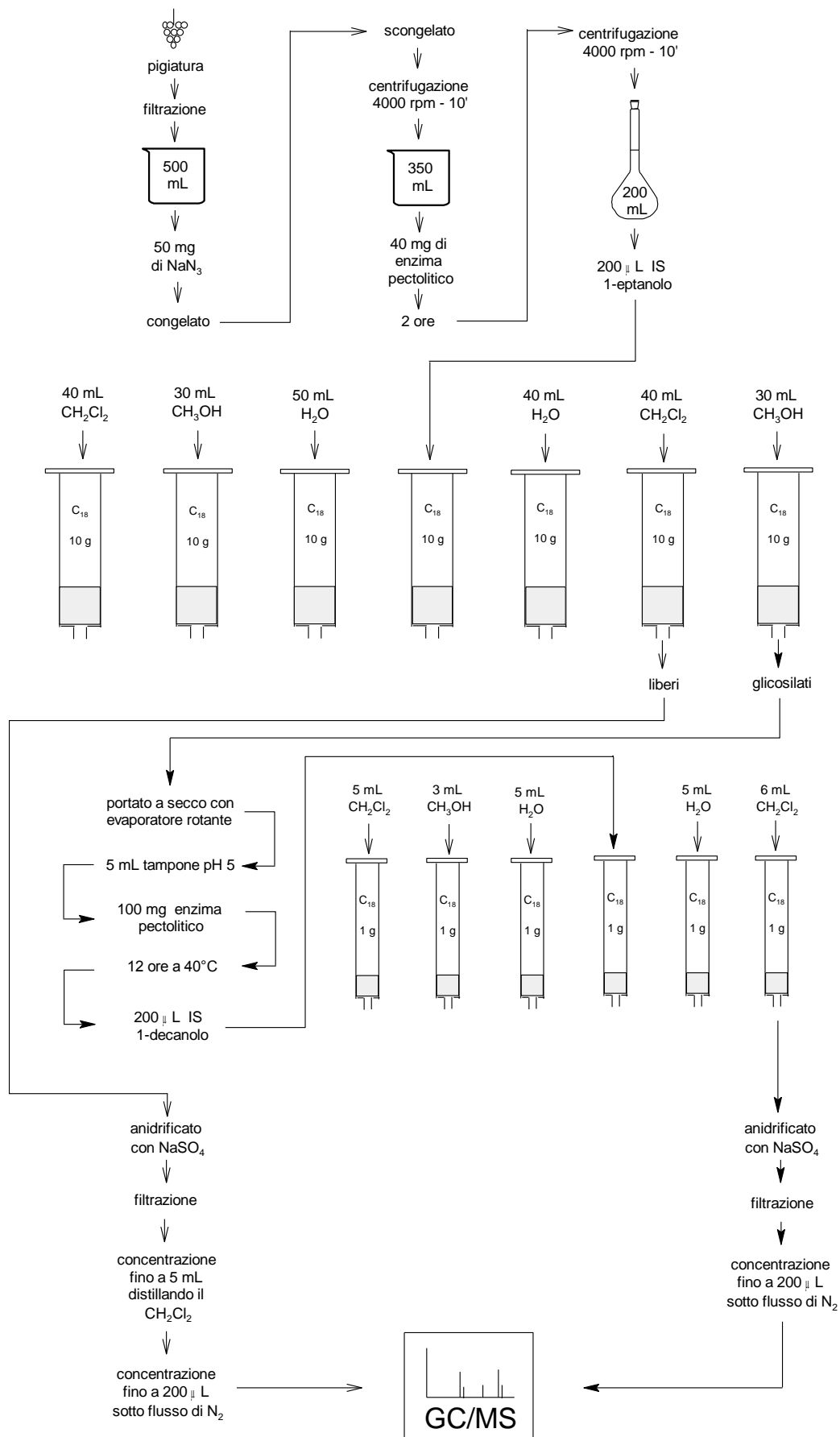
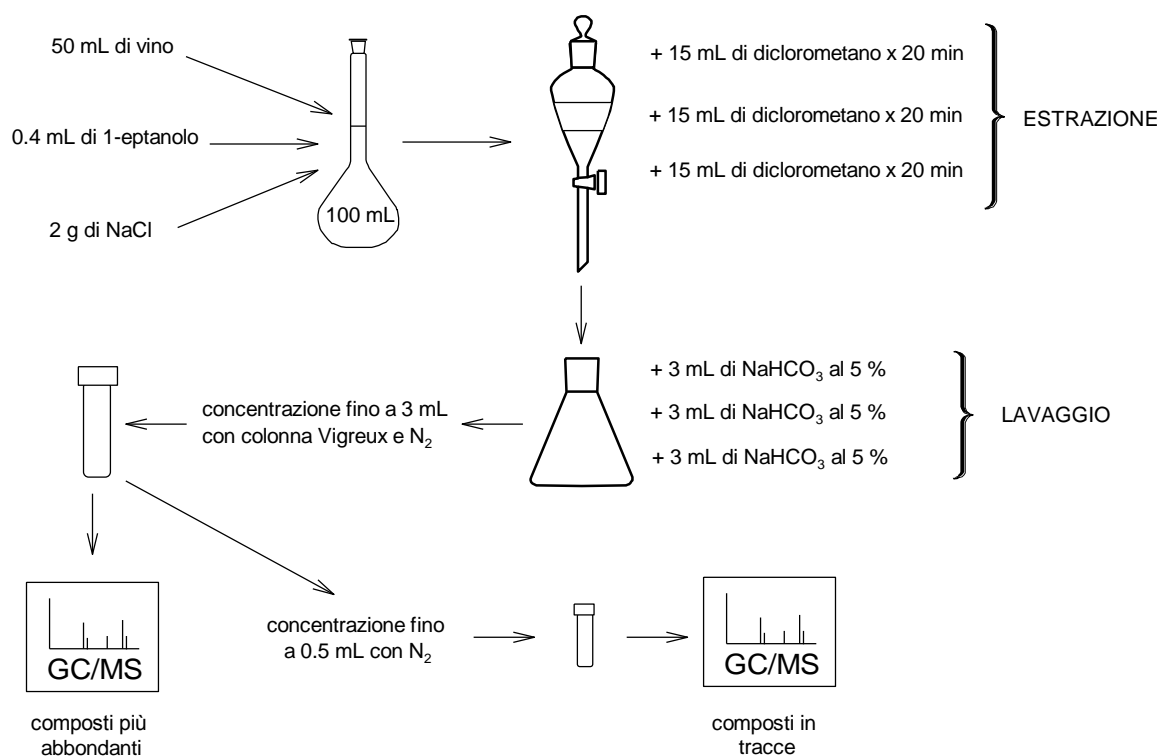


Figura 2.2 Schema dei passaggi per la preparazione del campione per determinare gli aromi liberi e glicosilati nei mosti Semillon.

## 2.2.2. Preparazione dei vini Fiano per l'analisi GC/MS.

I campioni sono stati preparati seguendo metodi già pubblicati (Moio, et al., 1993a) (Moio, et al., 1993b). In un matraccio da 100 mL sono stati introdotti 50 mL di vino ai quali sono stati aggiunti in successione 0.4 mL di 1-eptanolo e 2 g di NaCl (Fluka, Milano) per aumentare la forza ionica. I composti volatili sono stati estratti in un imbuto separatore con 15 mL di diclorometano per 3 volte (LLE). La durata di ogni estrazione è stata di 20 minuti. Le fasi organiche relative alle tre estrazioni sono state lavate per 3 volte con 3 mL di NaHCO<sub>3</sub> al 5% (Fluka, Milano). Tale operazione è stata effettuata allo scopo di neutralizzare gli acidi organici. L'estratto è stato successivamente anidrificato con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrato con filtro a fascia blu (Whatman n.40). Il filtrato è stato concentrato al volume di 3 mL utilizzando prima una colonnina Vigreux della lunghezza di 30 cm e poi il flusso di azoto. Il campione ottenuto è stato analizzato mediante GC/MS per la determinazione dei composti volatili più abbondanti. Dopo la prima analisi, l'estratto è stato ulteriormente concentrato a 0.5 mL sotto flusso di azoto ed analizzato mediante GC/MS per la determinazione dei costituenti volatili presenti in tracce. In figura 2.3 lo schema che illustra la preparazione dei campioni di vino per analisi GC/MS.

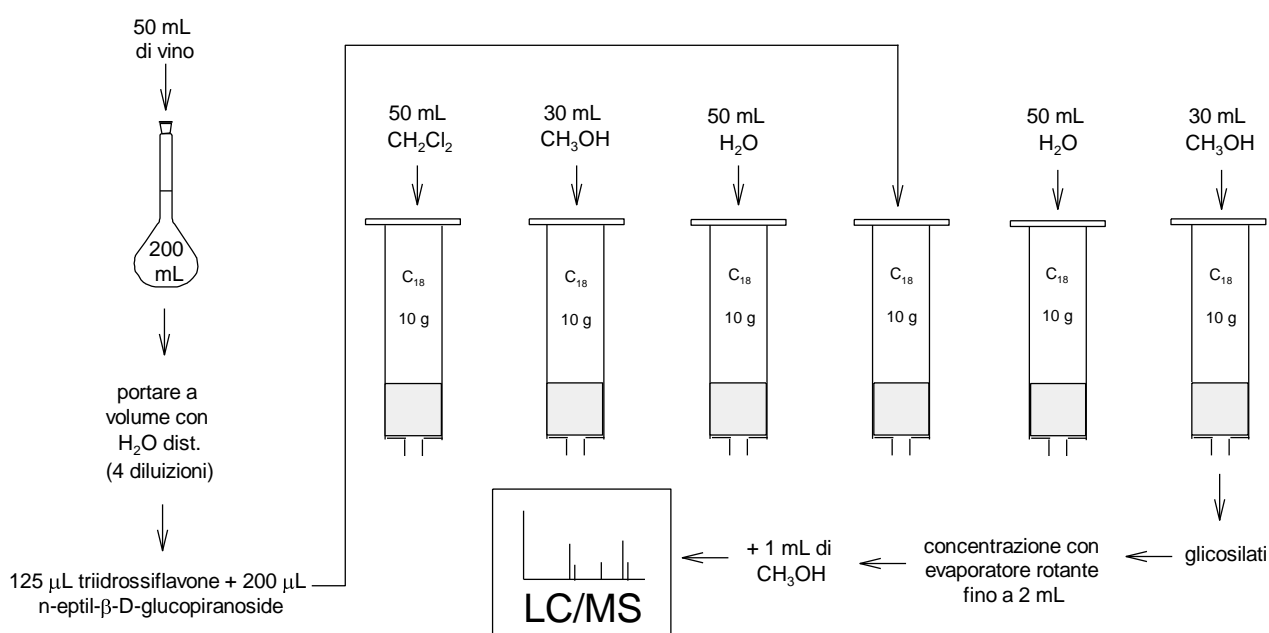


**Figura 2.3** Schema dei passaggi per la preparazione dei campioni di vino Fiano per determinare i composti liberi nei vini.

### 2.2.3. Preparazione dei vini Fiano per l'analisi UHPLC/MS.

Un volume di 50 mL di vino è stato diluito 4 volte con acqua deionizzata in un matraccio da 200 mL ed alla soluzione sono stati aggiunti e 200  $\mu$ L di *n*-eptil- $\beta$ -D-glucopiranoside (Sigma-Aldrich) come standard interno alla concentrazione di 36.2 mg/L. Per l'estrazione SPE è stata utilizzata una cartuccia C<sub>18</sub> Sep-Pak® da 10 g attivata facendo eluire in successione 50 mL di diclorometano, 30 mL di metanolo e 50 mL di acqua deionizzata.

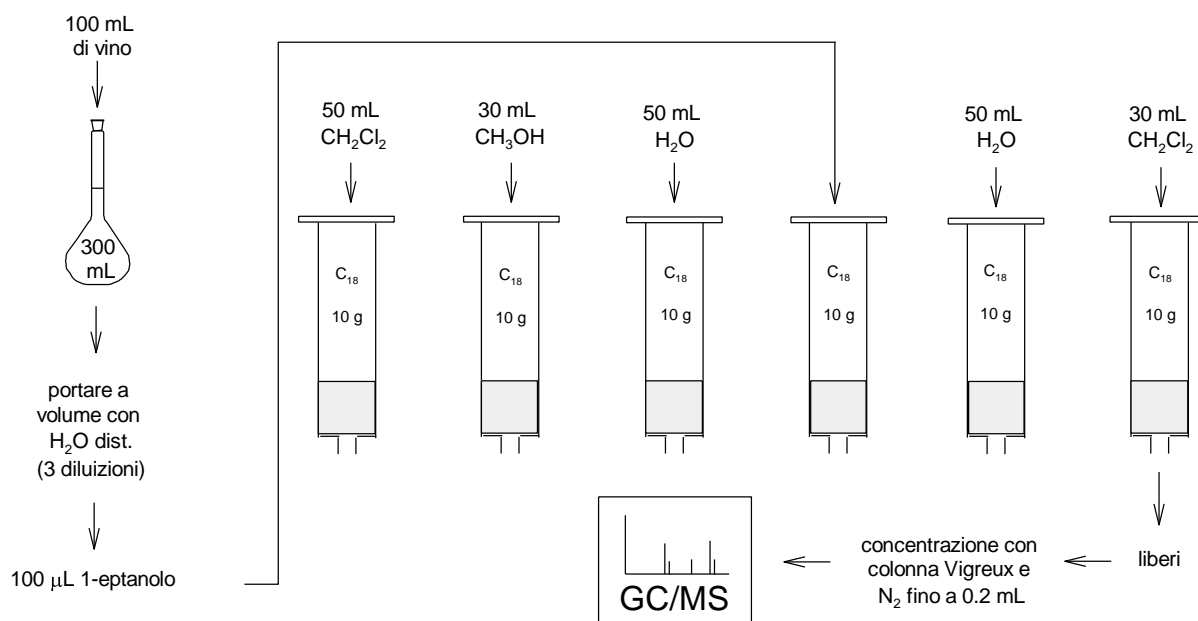
Dopo il passaggio del campione, la cartuccia è stata lavata con 50 mL di acqua deionizzata e i composti glicosilati sono stati eluiti con 30 mL di metanolo. L'eluito raccolto è stato concentrato con evaporatore rotante fino a circa 2 mL ed è stato aggiunto 1 mL di metanolo misurando esattamente il volume totale. Il campione ottenuto è stato filtrato con filtro Acrodisc® GHP a 0.22  $\mu$ m. In figura 2.4 lo schema che illustra la preparazione dei campioni di vino per analisi LC/MS.



**Figura 2.4** Schema dei passaggi per la preparazione dei campioni di vino Fiano per determinare i precursori glicosilati nei vini.

## 2.2.4. Preparazione dei campioni di vini di ibridi produttori diretti per l'analisi GC/MS del metil antranilato e del furaneolo

E' stato messo a punto un metodo SPE per la determinazione simultanea del metil antranilato (MA) e del furaneolo nei campioni di vini bianchi e rossi. Un volume di 100 mL di vino è stato trasferito in un matraccio da 300 mL ed il campione è stato diluito 3 volte con acqua deionizzata. Sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di soluzione di 1-eptanolo 89.8 mg/L come standard interno. La soluzione è stata caricata su una cartuccia C<sub>18</sub> SepPak® da 10 g precedentemente attivata mediante passaggio rispettivamente di 50 mL di diclorometano, 30 mL di metanolo e 50 mL di acqua. I composti aromatici sono stati eluiti con 50 mL di diclorometano. Il volume dell'estratto è stato ridotto a 0.2 mL utilizzando prima una colonna di concentrazione Vigreux della lunghezza di 30 cm e poi mediante flusso di azoto. Il campione ottenuto è stato analizzato via GC/MS. In figura 2.5 è illustrato lo schema di preparazione dei campioni di vino per l'analisi GC/MS del metil antranilato e del furaneolo.



**Figura 2.5** Schema dei passaggi per la preparazione dei campioni di vino per determinare furaneolo e metil antranilato

## 2.3. Sistemi e parametri cromatografici e di spettrometria di massa

### 2.3.1. Sistemi GC/MS

Per le analisi sono stati utilizzati due sistemi analitici. Lo strumento GC/MS impiegato per le analisi dei composti liberi e glicosilati dei mosti Semillon e per la determinazione del metil antranilato e del furaneolo nei vini è della ditta Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) costituito da un gas cromatografo HP 5890, un sistema di iniezione HP 6890 Series Injector e uno spettrometro di massa HP 5971. La colonna analitica installata nel gas cromatografo è capillare in silice fusa HP Innowax in polietilenglicole (Supelco, Milano) della lunghezza di 30 metri per 0.25 millimetri di diametro interno con lo spessore di film 0.25  $\mu\text{m}$ .

Nella tabella 2.3 sono descritte le condizioni strumentali del gas cromatografo HP 5890.

PARAMETRO	VALORE
Temperatura iniettore	250 °C
Modalità iniezione	Splitless
Volume iniettato	1 $\mu\text{L}$
Gas di trasporto	Elio
Pressione in testa alla colonna	12 psi

**Tabella 2.3** Condizioni strumentali del gas cromatografo HP 5890

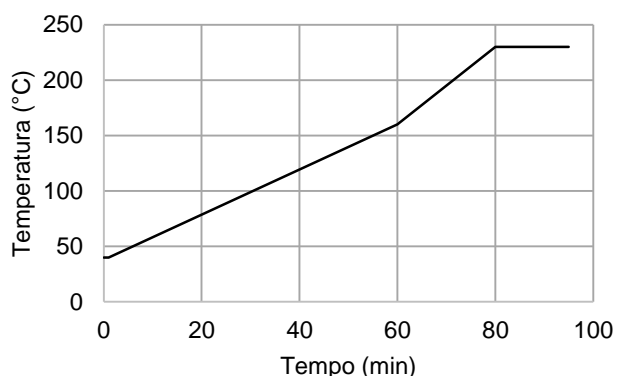
Nella tabella 2.4 sono indicati i parametri del programma di temperatura del forno per tutte le analisi GC/MS effettuate con il gas cromatografo HP 5890.

Temperatura iniziale del forno: 40 °C

Rate	°C/min	Temperatura finale (°C)	Tempo finale (min)
1	0	40	1
2	2	160	0
3	3	230	15

Durata totale dell'analisi: 93.33 min

**Tabella 2.4** Programma di temperatura del forno



**Figura 2.6** Grafico del programma di temperatura

Lo spettrometro di massa è dotato di una sorgente di ioni ad impatto elettronico (EI) che opera ad una energia di ionizzazione di 70 eV. La temperatura della transfer line è di 280 °C. L'analizzatore di massa è un quadrupolo. Per la determinazione dei composti liberi e glicosilati l'acquisizione dei segnali è avvenuta in modalità FULL SCAN. L'identificazione dei composti è stata effettuata sulla base dei tempi di ritenzione ed utilizzando la libreria di spettri di massa NIST98 (versione 1.6) e la libreria ESTRATTI del Laboratorio Chimico del CRA-VIT.

Il *tuning* è stato effettuato utilizzando come calibrante la perfluorotributilamina (PFTBA) misurando le masse 69, 219 e 502. Nella figura 2.7 viene riportato il rapporto del *tuning* effettuato prima delle analisi.

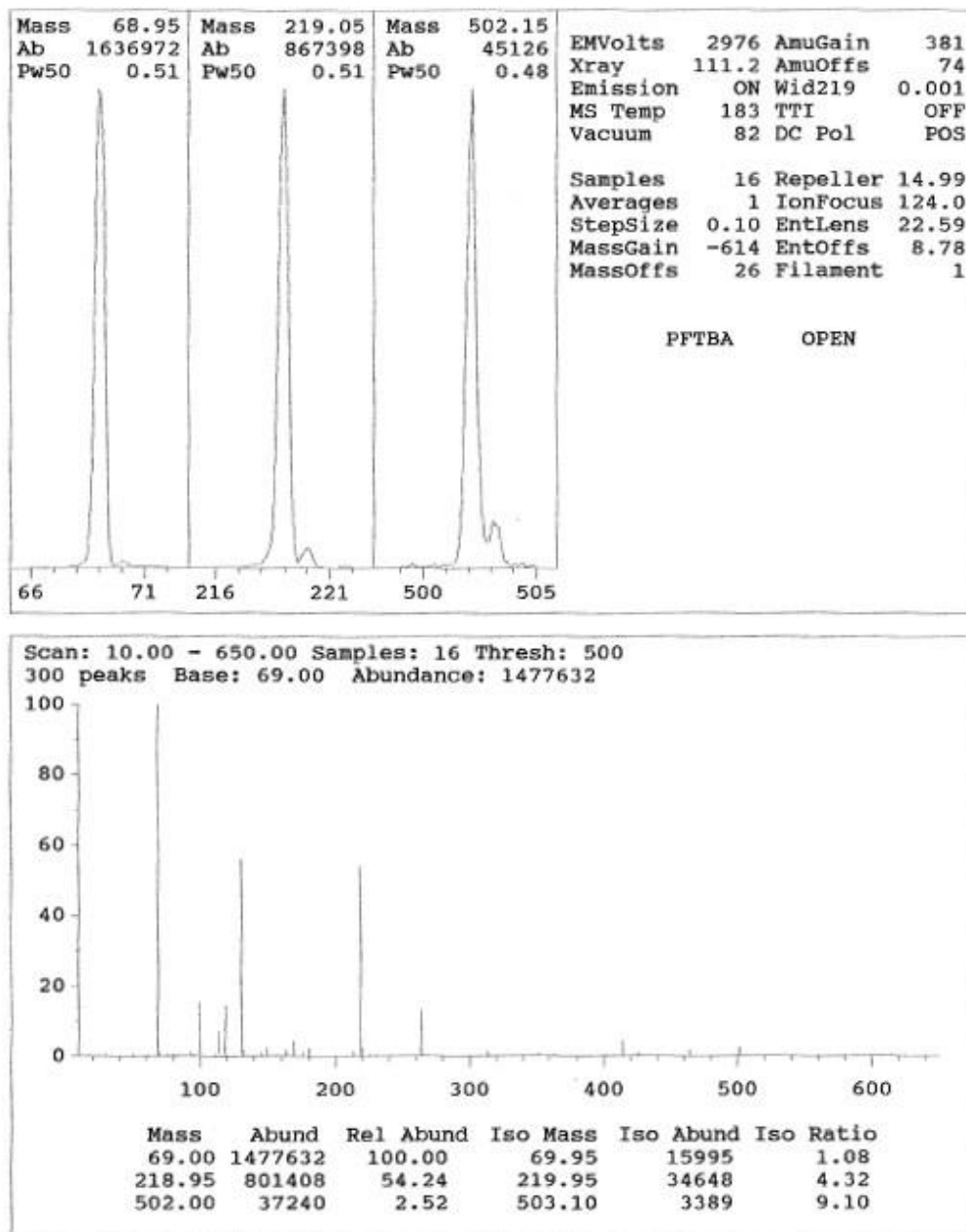


Figura 2.7 Rapporto di *tuning* generato dal software al termine del *tuning* dell'analizzatore di massa con PFTBA.

Per la costruzione delle curve di calibrazione per la quantificazione dell'metil antranilato e del furaneolo l'acquisizione dei segnali degli analiti è avvenuta in modalità FULL SCAN e la quantificazione è stata fatta sulla base del Extract Ion Chromatogram (EIC) del picco base dello spettro di frammentazione di ciascun composto: il segnale  $m/z$  128 per il furaneolo,  $m/z$  119 per il metil antranilato e  $m/z$  70 per l'1-eptanolo.

Sono state costruite due rette di calibrazione per il MA e due per il furaneolo, aggiungendo quantità note e crescenti degli analiti e la stessa quantità di standard interno 1-eptanolo su due matrici di vino, un vino bianco

ed un rosso in cui era stata preventivamente verificata l'assenza dei due analiti. Il limite di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) dei due composti sono stati calcolati in base al rapporto segnale/rumore: per LOD  $S/N \geq 3$  e per LOQ  $S/N \geq 10$ .

Per la preparazione delle soluzioni standard per la costruzione della retta di calibrazione si è operato come segue:

- a 100 mL di vino bianco o rosso sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di soluzione di metil antranilato alla concentrazione di 11.96 mg/L, 100  $\mu$ L di soluzione di furaneolo alla concentrazione di 10.54 mg/L e 100  $\mu$ L di soluzione di 1-eptanolo, come standard interno, alla concentrazione di 89.9 mg/L;
- il campione è stato caricato su una cartuccia C<sub>18</sub> SepPak da 10 g precedentemente attivata con 50 mL di diclorometano, 30 mL di metanolo e 50 mL di acqua;
- gli analiti sono stati eluiti con 50 mL di diclorometano;
- il volume dell'estratto è stato ridotto prima utilizzando una colonna di concentrazione Vigreux (lunghezza 30 cm) e poi il flusso di azoto fino ad ottenere un volume di 0.2 mL;
- il campione è stato analizzato mediante GC/MS

Il procedimento appena esposto è stato ripetuto per tutti gli standard con le concentrazioni descritte per la retta di taratura.

Le concentrazioni degli standard utilizzati per la costruzione delle rette di taratura nei vini rossi erano per il furaneolo 10.54  $\mu$ g/L, 52.70  $\mu$ g/L e 105.40  $\mu$ g/L, e 1.20  $\mu$ g/L, 11.96  $\mu$ g/L, 59.80  $\mu$ g/L e 119.59  $\mu$ g/L per il metil antranilato.

Le concentrazioni degli standard utilizzati per la rette di taratura nei vini bianchi erano per il furaneolo 10.54  $\mu$ g/L, 52.70  $\mu$ g/L e 105.40  $\mu$ g/L, e 1.20  $\mu$ g/L, 11.96  $\mu$ g/L e 119.59  $\mu$ g/L per il metil antranilato.



Nelle tabelle 2.5, 2.6, 2.7 e 2.8 sono riportati i dati per la costruzione delle rette di taratura.

STD	1-eptanolo (IS) µg/L	furaneolo µg/L	A <sub>fur</sub>	A <sub>IS</sub>	C <sub>fur</sub> /C <sub>IS</sub>	A <sub>fur</sub> /A <sub>IS</sub>
1	89.8	0.00	125533	12335451	0.000	0.010
2	89.8	10.54	190497	9870189	0.117	0.019
3	89.8	52.70	655858	11419710	0.587	0.057
4	89.8	105.40	1099391	11327984	1.174	0.097

**Tabella 2.5** Standard utilizzati per la costruzione della retta di taratura per la quantificazione del furaneolo nei vini rossi.

STD	1-eptanolo (IS) µg/L	MA µg/L	A <sub>MA</sub>	A <sub>IS</sub>	C <sub>MA</sub> /C <sub>IS</sub>	A <sub>MA</sub> /A <sub>IS</sub>
1	89.8	0.00	0	12335451	0.000	0.000
2	89.8	1.20	190400	9706672	0.013	0.020
3	89.8	11.96	1556773	9870189	0.133	0.158
4	89.8	59.80	11652155	11419710	0.666	1.020
5	89.8	119.59	20422873	11327984	1.332	1.803

**Tabella 2.6** Standard utilizzati per la costruzione della retta di taratura per la quantificazione del metil antranilato (MA) nei vini rossi.

STD	1-eptanolo (IS) µg/L	furaneolo µg/L	A <sub>fur</sub>	A <sub>IS</sub>	C <sub>fur</sub> /C <sub>IS</sub>	A <sub>fur</sub> /A <sub>IS</sub>
1	89.8	0.00	248121	7997161	0.000	0.031
2	89.8	10.54	476715	9548093	0.117	0.050
3	89.8	52.70	916413	9099448	0.587	0.101
4	89.8	105.40	1572642	7791149	1.174	0.202

**Tabella 2.7** Standard utilizzati per la costruzione della retta di taratura per la quantificazione del furaneolo nei vini bianchi.

STD	1-eptanolo (IS) µg/L	MA µg/L	A <sub>MA</sub>	A <sub>IS</sub>	C <sub>MA</sub> /C <sub>IS</sub>	A <sub>MA</sub> /A <sub>IS</sub>
1	89.8	0.00	351087	7997161	0.000	0.044
2	89.8	1.20	412497	8818830	0.013	0.047
3	89.8	11.96	2563538	9548093	0.133	0.268
4	89.8	119.59	22778090	7791149	1.332	2.924

**Tabella 2.8** Standard utilizzati per la costruzione della retta di taratura per la quantificazione del metil antranilato (MA) nei vini bianchi.

Il sistema GC/MS impiegato per le analisi dei composti liberi nei vini Fiano è costituito da un gas cromatografo 6850 (Agilent Technologies, S. Clara, CA, USA) equipaggiato con una colonna capillare in silice fusa HP Innowax in polietilenglicole (PEG) della lunghezza di 30 metri per 0.25 millimetri di diametro interno con lo spessore del film di 0.25 micrometri (Agilent Technologies, S. Clara, CA, USA).

Nella tabella 2.9 sono descritte le condizioni strumentali del gas cromatografo Agilent 6850.

PARAMETRO	VALORE
Temperatura iniettore	230 °C
Modalità iniezione	Splitless
Volume iniettato	1 µL
Gas di trasporto	Elio
Flusso del gas	1.2 mL/min

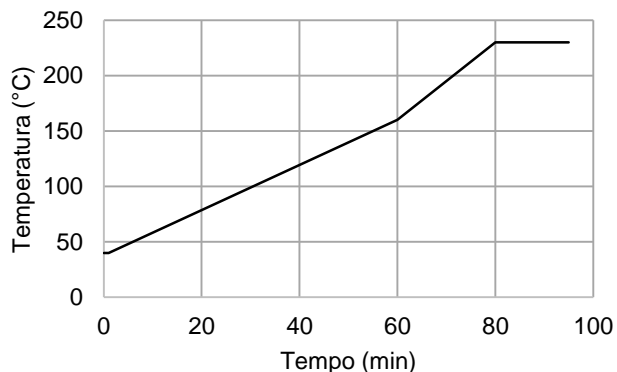
**Tabella 2.9** Condizioni strumentali del gas cromatografo Agilent 6850

Nella tabella 2.10 sono indicati i parametri del programma di temperatura del forno per tutte le analisi GC/MS effettuate con il gas cromatografo Agilent 6850.

Temperatura iniziale del forno: 40 °C

Rate	°C/min	Temperatura finale (°C)	Tempo finale (min)
1	0	40	1
2	2	160	0
3	3	230	15

Durata totale dell'analisi: 93.33 min



**Tabella 2.10** Programma di temperatura del forno

**Figura 2.8** Grafico del programma di temperatura

Lo spettrometro di massa è costituito da una sorgente di ioni ad impatto elettronico (EI) che opera ad una energia di ionizzazione di 70 eV. La temperatura della transfer line è di 250°C. L'analizzatore di massa è un quadrupolo che opera alla temperatura di 150 °C e l'acquisizione dei segnali è avvenuta in modalità FULL SCAN. L'identificazione dei composti è stata effettuata sulla base dei tempi di ritenzione ed utilizzando la libreria di spettri di massa NIST08 e la libreria ESTRATTI del laboratorio chimico del CRA-VIT di Conegliano. Il *tuning* è stato effettuato utilizzando come calibrante la perfluorotributilamina (PFTBA) misurando le masse 69, 219 e 502.

Nella figura 2.9 sono riportati i parametri del *tuning* effettuato prima delle analisi.

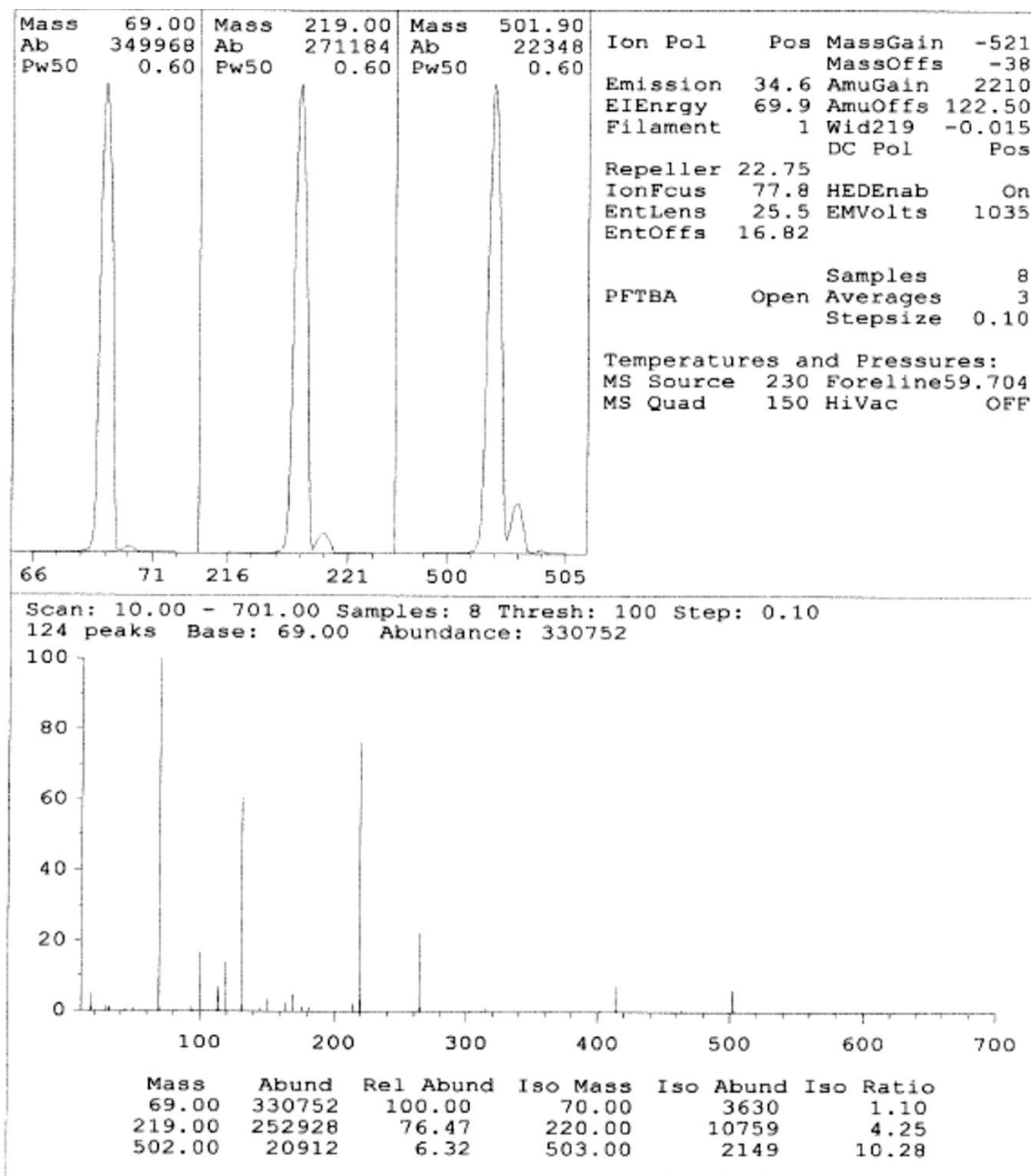


Figura 2.9 Rapporto di *tuning* generato dal software al termine del tuning dell'analizzatore di massa con PFTBA.

### 2.3.2. Il sistema UHPLC/QTOF

Il sistema cromatografico utilizzato per l'analisi dei terpeni glicosilati nei vini Fiano è un Agilent UHPLC 1290 Infinity, equipaggiato con un autocampionatore Agilent 1290 Infinity Autosampler (G4226A). La separazione dei composti è avvenuta utilizzando una colonna a fase inversa Zorbax (RRHD SB-C<sub>18</sub> 3×150 mm, 1.8 µm). La fase mobile è composta dalla soluzione A di acido formico allo 0.1 % (v/v) in acqua e dalla soluzione B di acido formico allo 0.1 % (v/v) in acetonitrile (Romil SpS).

Nella tabella 2.11 sono descritte le condizioni strumentali del UHPLC Agilent 1290.

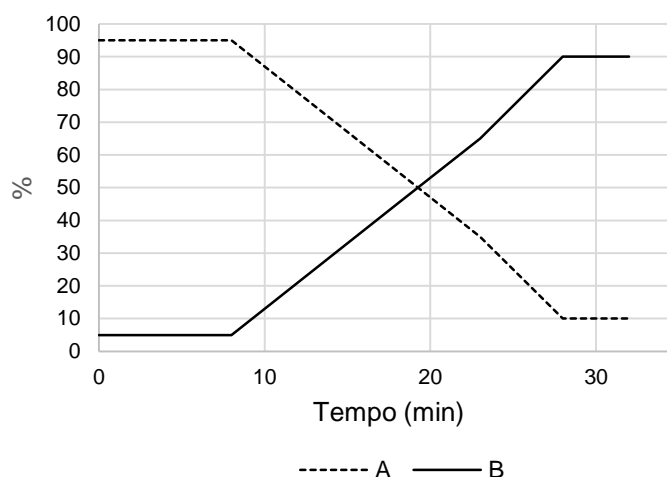
PARAMETRO	VALORE
Temperatura colonna	35 °C
Volume iniettato	10 µL
Flusso	0.4 mL/min

**Tabella 2.11** Condizioni strumentali del UHPLC Agilent 1290 Infinity

L'eluizione a gradiente è stata effettuata secondo il programma descritto nella tabella 2.12.

Tempo (min)	soluzione A (%)	soluzione B (%)
	95	5
8	95	5
18	55	45
23	35	65
28	10	90
32	10	90

Durata totale dell'analisi 32 min



**Tabella 2.12** Programma gradiente di eluizione

**Figura 2.10** Grafico del programma di eluizione

Il sistema cromatografico è stato accoppiato ad uno spettrometro di massa Agilent 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF con risoluzione nominale di 40000. La sorgente ionica è costituita dal sistema Jet Stream Ionization della Agilent, (Agilent Technologies, S. Clara, CA, USA). I parametri della sorgente ionica sono descritti nella tabella 2.13.

PARAMETRO	VALORI
Flusso N <sub>2</sub> (sheath gas)	10 L/min 400 °C
Flusso N <sub>2</sub>	8 L/min 250 °C
Pressione nebulizzazione	60 psi
Voltaggio ago	1 kV
Voltaggio capillare	3.5 kV

**Tabella 2.13** Condizioni strumentali del sorgente ionica Jet Stream

Sono stati registrati i segnali degli ioni negativi compresi nell'intervallo 100-1700  $m/z$ , come ioni  $[M-H]^-$  e  $[M+HCOO]^-$  (addotti formiato). L'identificazione dei composti è stata effettuata attraverso il software Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis ver. B.5.00, utilizzando come database il *Grape Metabolomics Database* (Flamini, et al., 2014) del laboratorio chimico del CRA-VIT di Conegliano sviluppato includendo informazioni riguardo la struttura molecolare dei composti chimici dell'uva trovate in letteratura ed in altri database elettronici. L'algoritmo utilizzato è il *Find Compounds by Formula*. L'identificazione certa della formula molecolare dei composti si basa sulla determinazione accurata della massa esatta e del pattern isotopico. Il peso relativo dei diversi parametri per il calcolo dello score sono:  $W_{\text{massa}} = 100$ ,  $W_{\text{abbondanza}} = 60$ ,  $W_{\text{spaziatura}} = 50$ , con una variazione di massa di 2.0 mDa + 5.6 ppm, abbondanza isotopica del 7.5 % e una tolleranza della spaziatura dei picchi del pattern isotopico di 0.0025  $m/z$  + 7.0 ppm.

Per la calibrazione dell'asse delle masse è stato utilizzato lo standard mix G1969-85000 (Supelco Inc). Sono stati osservati, in modalità ioni negativi, i seguenti  $m/z$ : anione TFA (acido trifluoro acetico) con  $m/z$  112.9856 e HP-0921 (+ formiato) con  $m/z$  966.0007. In figura 2.11 è riportato lo spettro di massa dello standard mix G1969-85000 e in figura 2.12 la schermata del software che gestisce il QTOF con riportati i parametri della calibrazione delle masse.

### G1969-85000 NEG ES-TOF SPECTRA

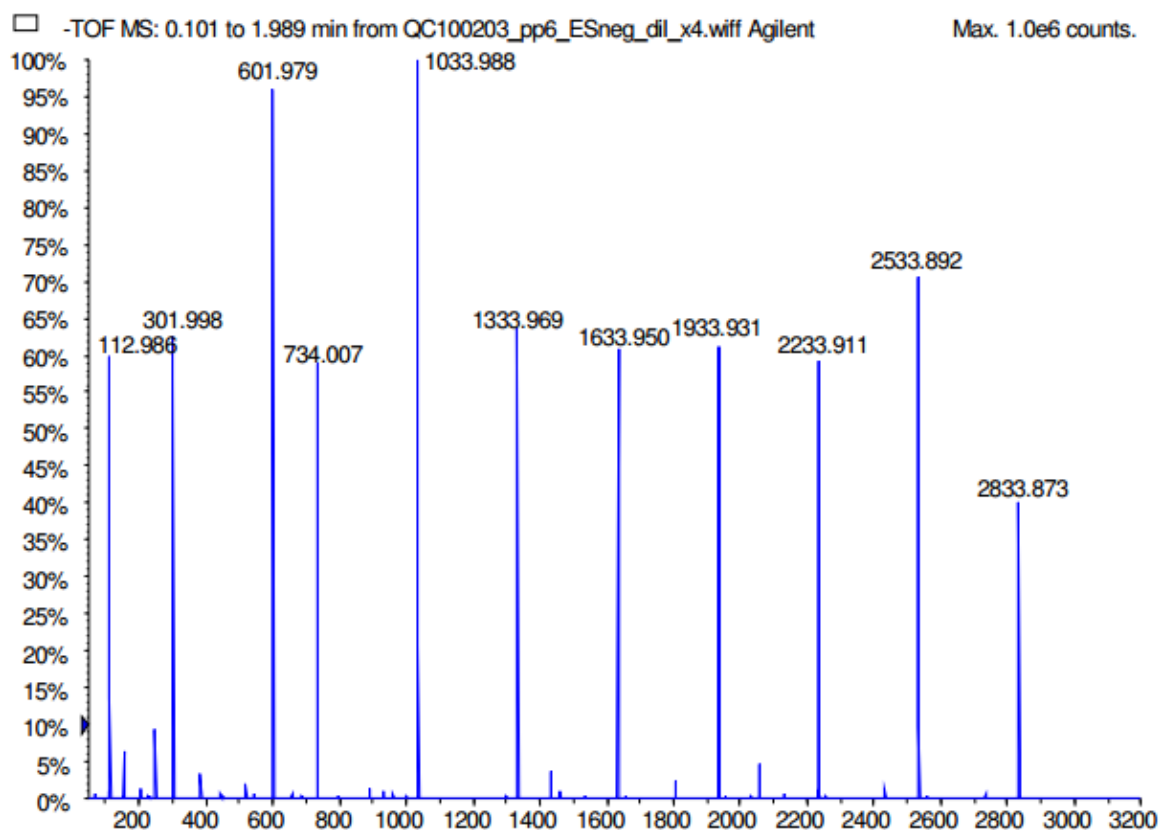
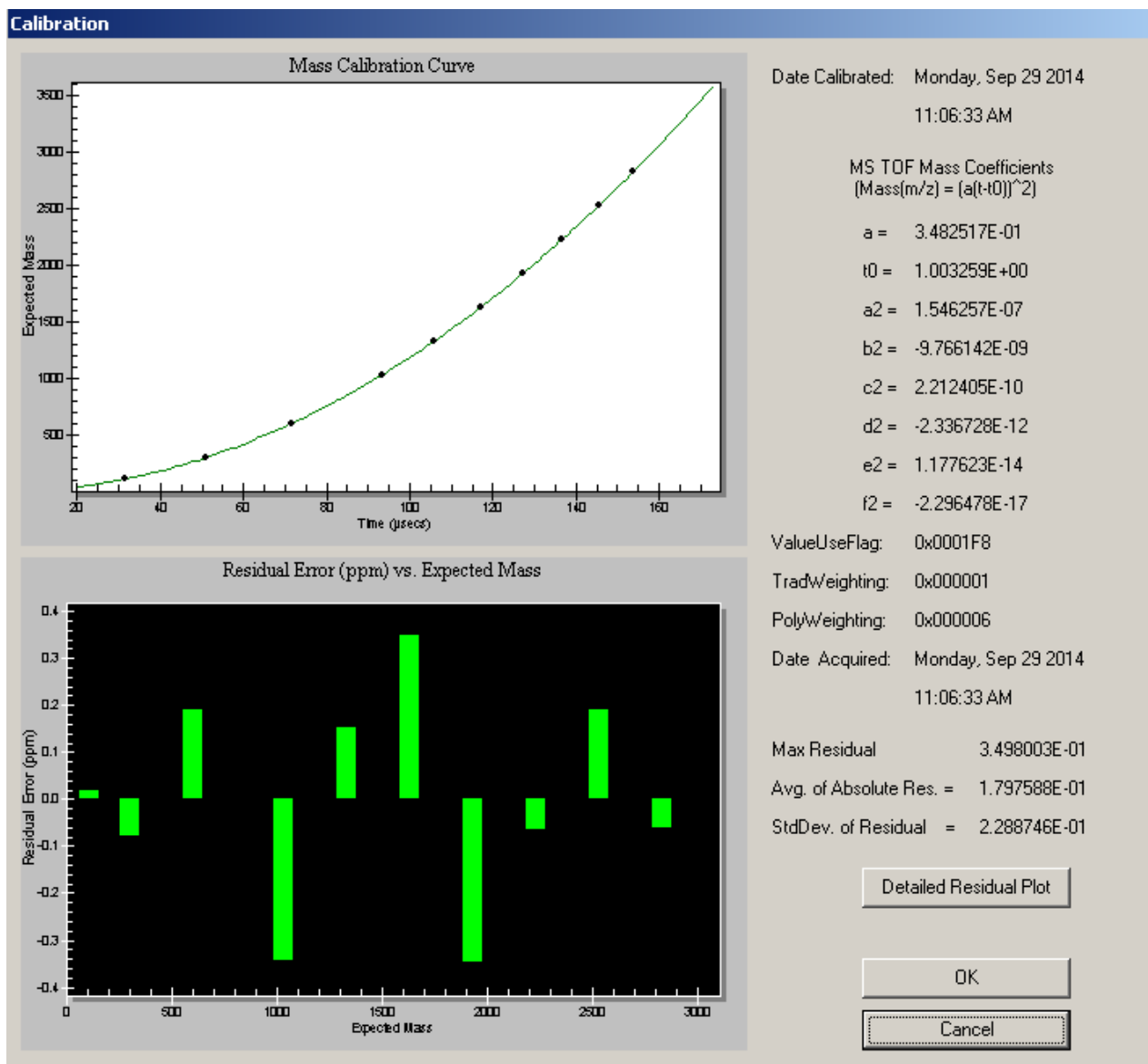


Figura 2.11 Spettro di massa dello standard mix G1969-85000.



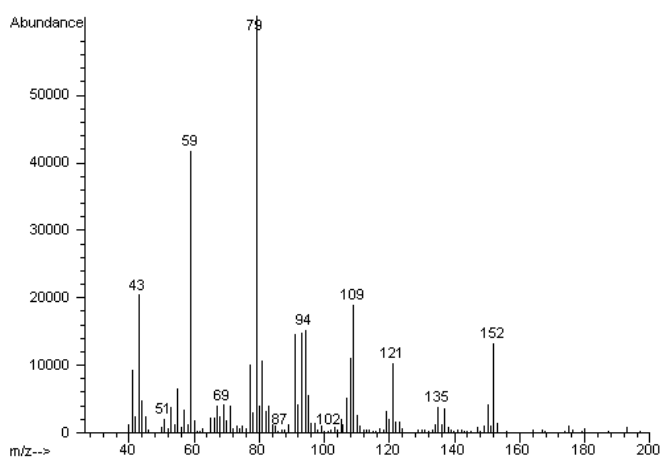
**Figura 2.12** Schermata che riporta il risultato della calibrazione delle masse nel QTOF.

## Risultati e discussioni

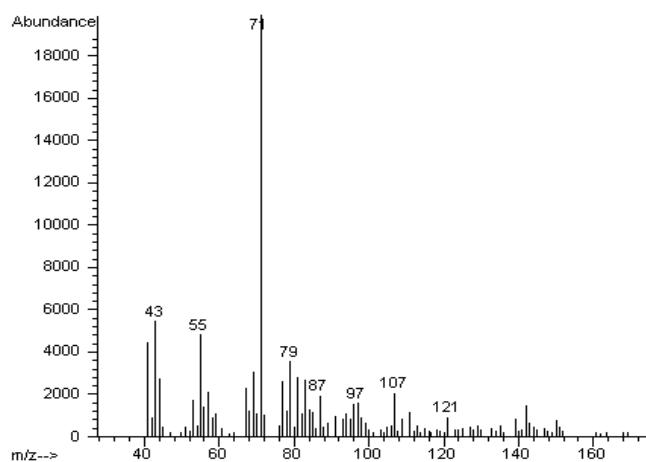
### 3.1. Studio dei profili degli aromi liberi e glicosilati nei mosti Semillon

La tecnica di analisi GC/MS ad impatto elettronico accoppiata all'utilizzo del database di spettri di massa ESTRATTI ha dimostrato un'elevata potenzialità ed ha consentito l'identificazione di una vasta gamma di sostanze organiche volatili. I principali vantaggi dell'analizzatore di massa a quadrupolo sono una elevata sensibilità e la capacità di identificare gli analiti grazie all'uso dei database di spettri di massa.

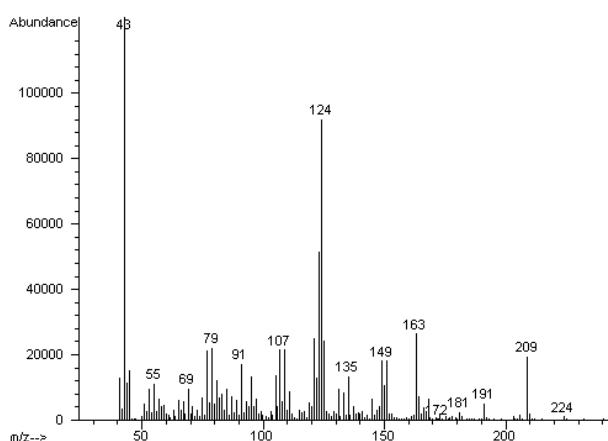
Nelle figure 3.1,3.2,3.3 e 3.4 sono riportati come esempio gli spettri di massa di quattro composti rilevanti nel determinare la composizione aromatica varietale dei mosti Semillon presenti nel database ESTRATTI sviluppato presso il Laboratorio Chimico CRA-VIT.



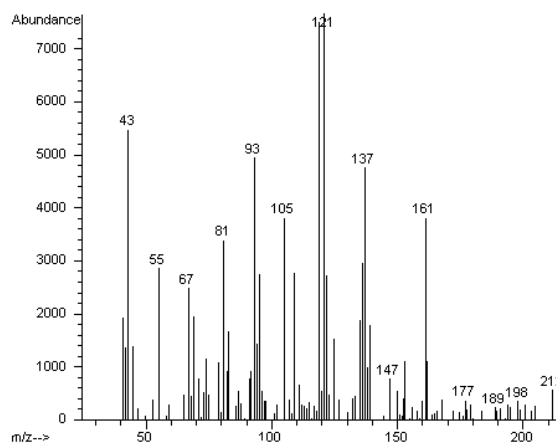
**Figura 3.1** Spettro di frammentazione del 7-idrossi- $\alpha$ -terpineolo



**Figura 3.2** Spettro di frammentazione del 8-idrossididrolinalolo



**Figura 3.3** Spettro di frammentazione del vomifoliolo

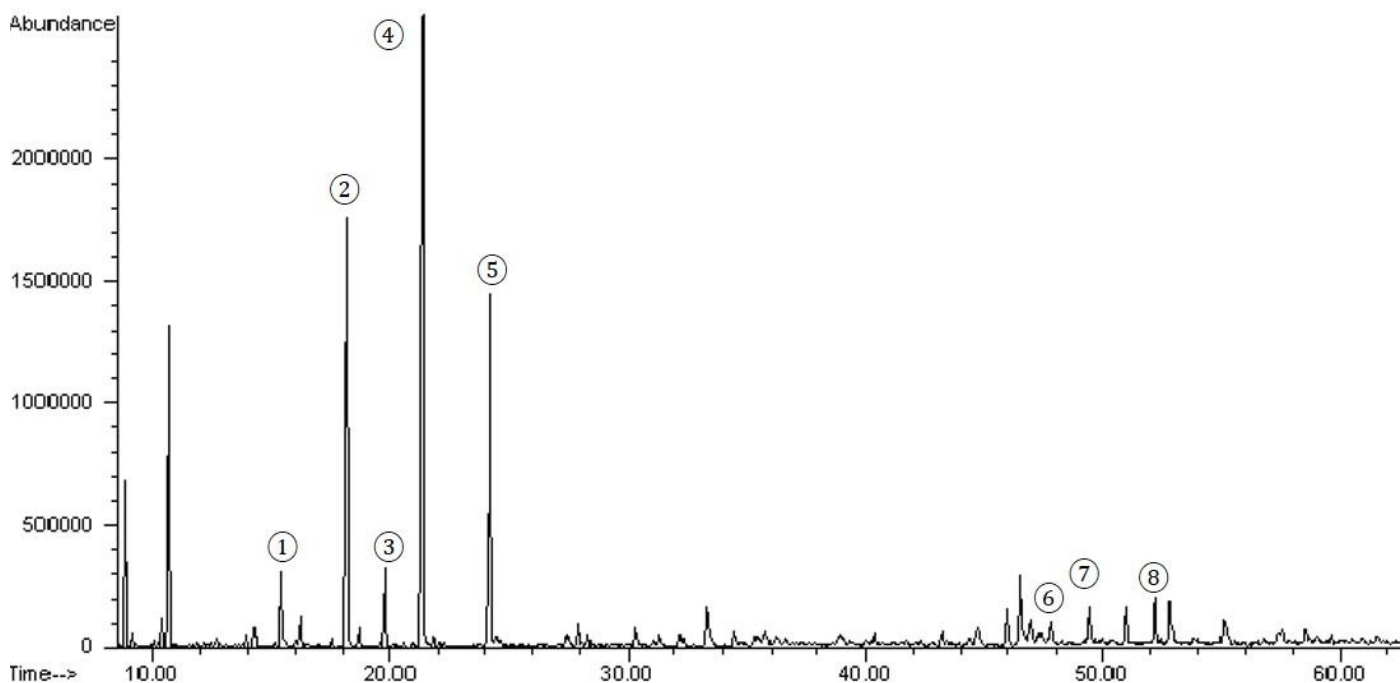


**Figura 3.4** Spettro di frammentazione del 3,9-didrossimegastigma-5-ene

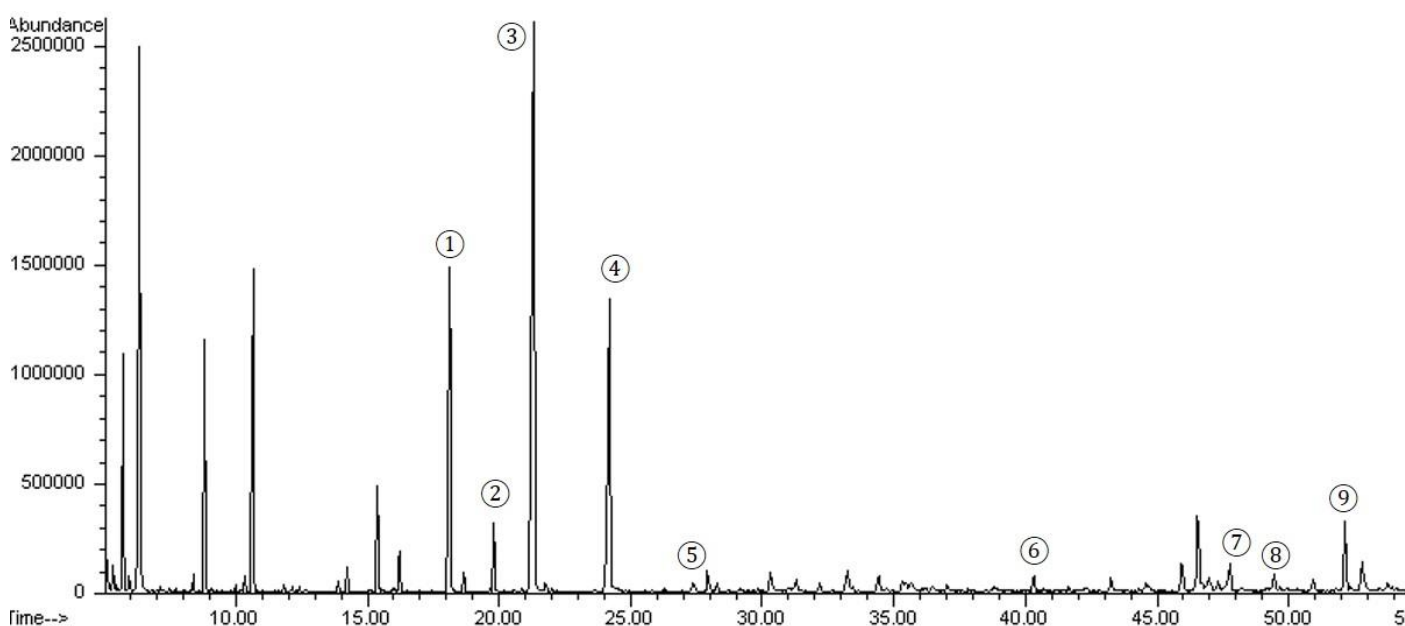


### 3.1.1. Studio dei composti liberi

Nelle figure 3.5 e 3.6 sono riportati i cromatogrammi relativi all'analisi dei composti liberi di un mosto Semillon prodotto con uve raccolte da viti non defogliate e di un mosto Semillon di uve di viti defogliate.



**Figura 3.5** Cromatogramma GC/MS (registrato in modalità SCAN) di un campione di mosto Semillon proveniente da uve di viti non sfogliate (composti liberi principali): **(1)** 4-metil-2-pentanol; **(2)** 1-esanolo; **(3)** *cis*-3-esen-1-olo; **(4)** *cis*-2-esen-1-olo; **(5)** 1-eptanolo (IS); **(6)** alcol benzilico; **(7)** 2-feniletanolo; **(8)** diendiolo 1.



**Figura 3.6** Cromatogramma GC/MS (modalità SCAN) di un campione di mosto Semillon proveniente da uve di viti sfogliate (composti liberi principali): **(1)** 1-esanolo **(2)** *cis*-3-esen-1-olo; **(3)** *cis*-2-esen-1-olo; **(4)** 1-eptanolo (IS); **(5)** benzaldeide; **(6)** *trans* piran linalolo ossido; **(7)** alcol benzilico; **(8)** 2-feniletanolo; **(9)** diendiolo 1.

I composti determinati sono stati raggruppati in quattro classi di composti: alcoli, terpenoli, benzenoidi e norisoprenoidi. I contenuti di composti liberi sono stati espressi in µg/L di 1-eptanolo, quelli degli agliconi liberati dall'idrolisi enzimatica dei composti glicosilati come µg/L di 1-decanolo. I valori sono riportati come media di due ripetizioni per ogni annata con la relativa semidispersione massima.

Nelle tabella 3.1 sono riportati i principali composti liberi identificati nei campioni di mosto Semillon divisi per classe di composti, annata e tesi.

	RT min	VITI NON SFOGLIATE		VITI SFOGLIATE	
		2013 $\bar{x} \pm d$	2014 $\bar{x} \pm d$	2013 $\bar{x} \pm d$	2014 $\bar{x} \pm d$
<b>ALCOLI</b>					
2-metil-1-propanolo	5.98	6.3±1.0	171.7±47.8	4.9±0.7	76.9±23.7
1-butanolo	7.74	1.6±0.3	7.6±0.6	1.8±0.1	4.0±0.8
3-metil-1-butanolo	10.37	8.6±2.3	519.2±52.2	6.1±0.6	223.6±104.0
3-metil-3-buten-1-olo	12.39	0.8±0.8	5.1±1.1	0.1±0.1	2.7±0.7
4-metil-2-pentanolo	15.40	25.7±5.2	6.8±1.8	48.8±4.0	3.7±1.4
2-metil-2-buten-1-olo	16.26	5.4±3.0	7.2±1.9	18.6±0.4	3.3±1.0
1-esanolo	18.17	195.0±14.9	180.8±9.6	211.9±12.8	137.2±4.5
<i>trans</i> -3-esen-1-olo	18.69	7.5±0.6	2.8±0.5	9.3±0.3	3.3±0.6
<i>cis</i> -3-esen-1-olo	19.83	31.2±1.0	56.5±6.6	33.1±2.7	37.6±3.6
<i>trans</i> -2-esen-1-olo	21.32	385.6±44.4	148.4±30.6	426.3±6.1	150.8±16.4
<i>cis</i> -2-esen-1-olo	21.79	4.9±0.2	1.0±0.2	4.6±0.5	1.0±0.4
<b>Alcoli totali</b>		<b>672.5±66.0</b>	<b>1107.1±86.8</b>	<b>765.4±1.9</b>	<b>644.2±113.4</b>
<b>TERPENOLI</b>					
linalolo	29.87	1.0±0.2	1.0±0.1	0.8±0.0	0.8±0.2
<i>trans</i> -piran linalolo ossido	40.36	3.9±0.3	1.9±0.1	5.8±1.1	5.3±1.3
<i>cis</i> -piran linalolo ossido	41.94	0.5±0.1	0.7±0.0	0.6±0.0	0.6±0.0
diolo 1	52.18	20.1±1.4	15.9±1.2	37.7±4.1	27.9±7.3
<b>Terpenoli totali</b>		<b>25.4±1.8</b>	<b>19.5±1.0</b>	<b>44.8±5.1</b>	<b>34.6±8.4</b>
<b>BENZENOIDI</b>					
benzaldeide	27.41	0.9±0.0	2.1±0.7	3.1±1.7	1.5±0.1
benzenacetaldide	34.45	7.7±0.4	53.2±22.6	11.0±1.9	35.2±1.7
alcol benzilico	47.78	19.0±0.7	32.9±2.4	20.7±1.5	22.7±0.3
2-feniletanolo	49.47	25.8±2.0	1129.2±278.9	22.0±9.3	593.0±46.8
vanillina	76.11	5.1±0.6	4.5±0.4	6.3±1.4	4.8±0.5
metilvanillato	78.32	2.9±0.3	4.2±0.4	2.3±0.2	2.6±0.3
<b>Benzenoidi totali</b>		<b>61.4±2.3</b>	<b>1226.2±299.9</b>	<b>65.5±6.0</b>	<b>659.8±44.4</b>
<b>NORISOPRENOIDI</b>					
3-oxo- $\alpha$ -ionolo	78.12	10.8±0.6	9.7±6.0	6.1±1.4	5.3±0.6
vomifoliolo	94.10	38.1±3.9	20.3±5.7	33.3±2.7	21.9±4.1
<b>Norisoprenoidi totali</b>		<b>48.9±3.3</b>	<b>30.0±11.7</b>	<b>39.3±4.0</b>	<b>27.2±4.7</b>

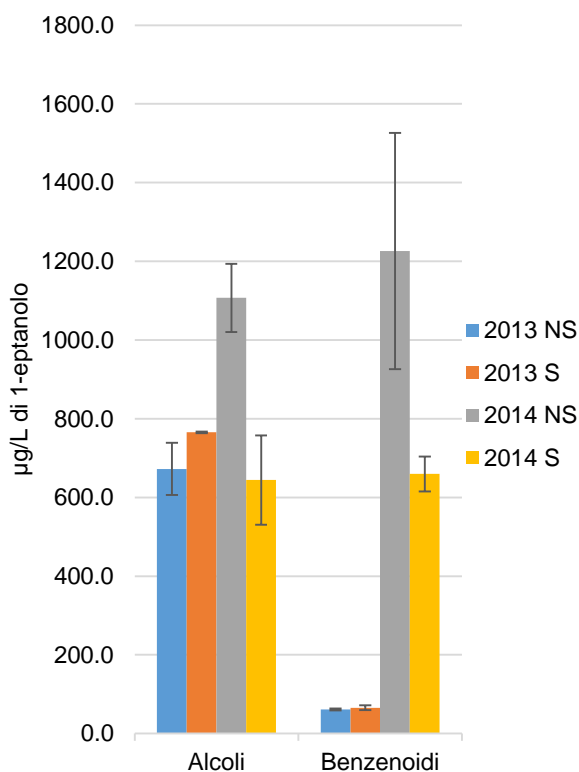
**Tabella 3.1** Principali composti liberi determinati nei mosti di Semillon (µg/L di standard interno 1-eptanolo) nelle due annate 2013 e 2014. Media di due ripetizioni e relativa semidispersione massima.

La tabella 3.2 riporta i totali dei dati della tabella 3.1, suddivisi per classe di composti, tipologia di campione e per annata.

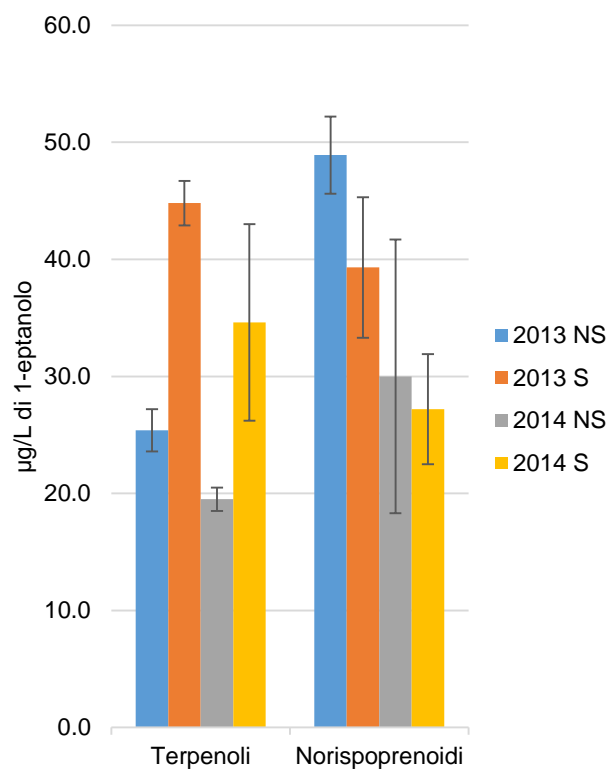
Annata	Alcoli	Terpenoli	Benzenoidi	Norispoprenoidi
2013 NS	672.5±66.0	25.4±1.8	61.4±2.3	48.9±3.3
2013 S	765.4±1.9	44.8±5.1	65.5±6.0	39.3±4.0
2014 NS	1107.1 ±186.8	19.5±1.0	1226.2±299.9	30.0±11.7
2014 S	644.2±113.4	34.6±8.4	659.8±44.4	27.2±4.7

**Tabella 3.2** Concentrazioni totali medie di due ripetizioni dei composti liberi determinati nei mosti Semillon ( $\mu\text{g/L}$  di standard interno 1-eptanolo) per le due tesi nelle due annate. S, viti sfogliate; NS, viti non sfogliate.

Le figure 3.7 e 3.8 rappresentano gli istogrammi relativi ai dati della tabella 3.2.



**Figura 3.7** Confronto alcoli e benzenoidi liberi totali



**Figura 3.8** Confronto terpenoli e norispoprenoidi liberi totali

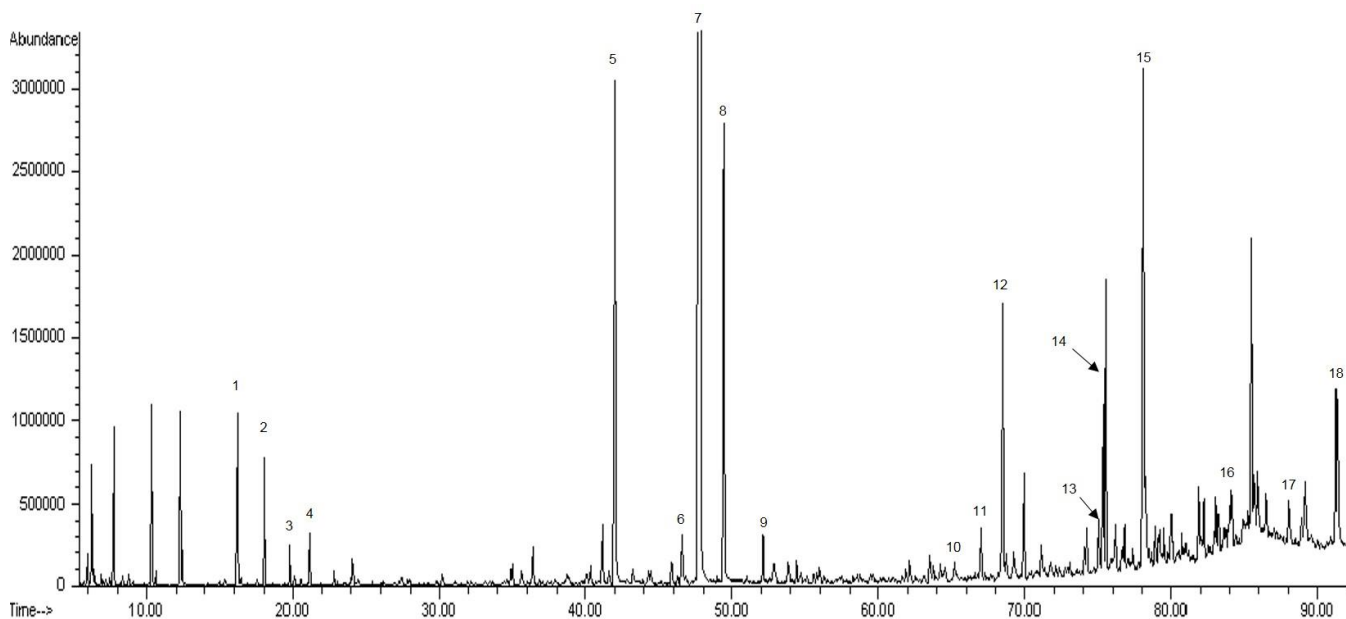
Le uve delle tesi sfogliate mostrano contenuti di terpenoli liberi totali superiore rispetto alla tesi non sfogliate sia nel 2013 che nel 2014, mentre la concentrazione di norispoprenoidi liberi totali risulta inferiore nelle tesi sfogliate rispetto alle tesi non sfogliate. Nell'annata 2013 i contenuti di alcoli totali liberi nelle tesi sfogliate e non sfogliate risultano simili, mentre nell'annata 2014 risulta maggiore nella tesi non sfogliata.

Nell'annata 2014 si osservano in entrambe le tesi contenuti rilevanti di 3-metil-1-butanolo, probabilmente dovuto ad una modifica del catabolismo degli aminoacidi in seguito a stress fisico della pianta (Bellincontro, et al., 2004). Per quanto riguarda i composti a sei atomi di carbonio (1-esanolo, *trans* e *cis*-3-esen-1-olo,

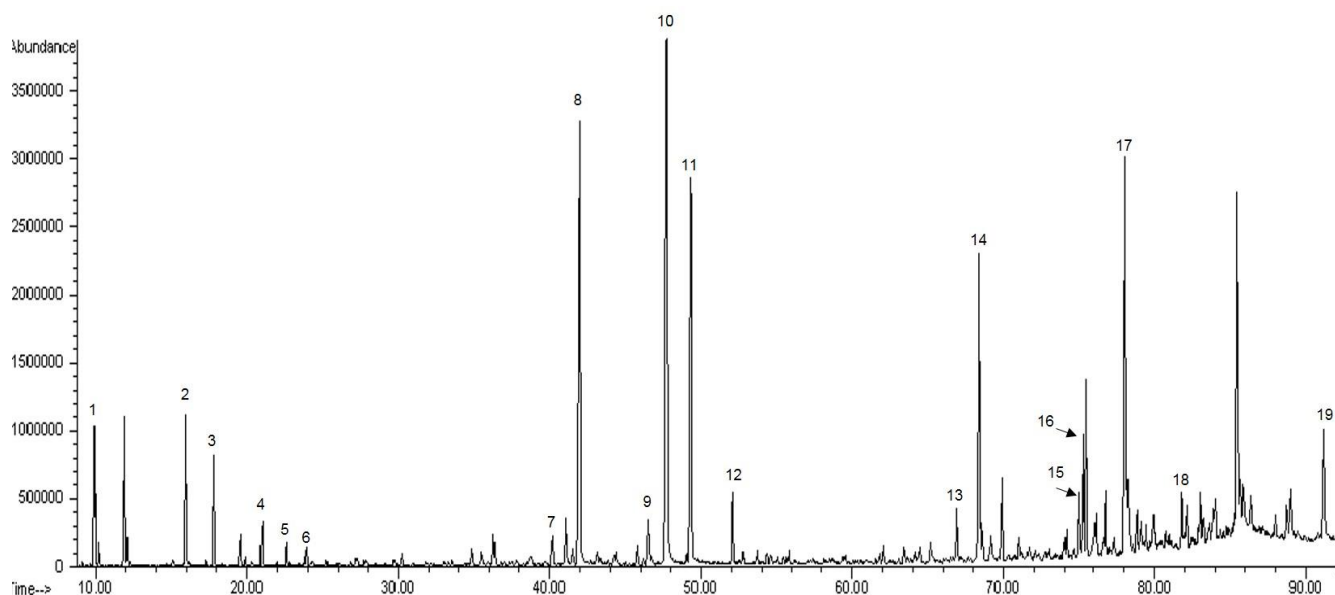
*trans* e *cis*-2-esen-1-olo e 2-esenale) si nota che i tenori sono più alti nell'annata 2013, tranne per il *cis*-3-esen-1-olo che nelle tesi non sfogliate annata 2014 raddoppia rispetto a quella sfogliata. I contenuti di *trans*-piran linalolo ossido e diendiolo 1 risultano superiori nelle tesi sfogliate in entrambe le annate, ma in entrambe le tesi si osserva un calo nell'annata 2014. E' interessante notare che il contenuto di 2-feniletanolo è più elevato nell'annata 2014 in entrambe le tesi, probabilmente a causa di uno stress della pianta legato ad un'annata particolarmente fredda e piovosa. In entrambe le tesi la concentrazione di vomifoliolo risulta più elevata nel 2014 rispetto al 2013.

### 3.1.2. Studio dei composti glicosilati

Nelle figure 3.9 e 3.10 sono riportati i profili degli agliconi liberati dall'idrolisi dei composti glicosilati in un mosto Semillon prodotto da uve provenienti da viti non sfogliate e da un mosto Semillon di uve di viti sfogliate.



**Figura 3.9** Cromatogramma GC/MS (modalità SCAN) di un campione di mosto Semillon proveniente da uve di viti non sfogliate (composti glicosilati principali): **(1)** 2-metil-2-buten-1-olo; **(2)** 1-esanolo; **(3)** *cis*-3-esen-1-olo; **(4)** *cis*-2-esen-1-olo; **(5)** 1-decanolo (IS); **(6)** geraniolo; **(7)** alcol benzilico; **(8)** 2-feniletanolo; **(9)** diendiolo 1; **(10)** 8-OH-diidrossilinalolo; **(11)** *trans*-8-OH-linalolo; **(12)** idrossigeraniolo; **(13)** 7-OH- $\alpha$ -linalolo; **(14)** 3-OH- $\beta$ -damascenone; **(15)** 3-oxo- $\alpha$ -ionolo; **(16)** alcol omovanillico; **(17)** acido omovanillico; **(18)** vomifoliolo.



**Figura 3.10** Cromatogramma GC/MS (modalità SCAN) di un campione di mosto Semillon proveniente da uve di viti sfogliate (composti glicosilati principali): **(1)** 3-metil-1-butanolo; **(2)** 2-metil-2-buten-1-olo; **(3)** 1-esanolo; **(4)** 2-esen-1-olo; **(5)** *trans*-furan linalolo ossido; **(6)** *cis*-furan linalolo ossido; **(7)** *trans*-piran linalolo ossido; **(8)** 1-decanolo (IS); **(9)** geraniolo; **(10)** alcol benzilico; **(11)** 2-feniletanolo; **(12)** diendiolo 1; **(13)** *trans*-8-OH-idrossilinalolo; **(14)** *cis*-8-OH-linalolo; **(15)** 7-OH- $\alpha$ -terpineolo; **(16)** 3-OH- $\beta$ -damascenone; **(17)** 3-oxo- $\alpha$ -ionolo; **(18)** 3-OH-7,8-diidro- $\beta$ -ionolo; **(19)** vomifoliolo.

Nelle tabella 3.3 sono riportati i principali composti glicosilati identificati nei campioni di mosto Semillon divisi per classe di composti, annata e per tesi. I risultati sono espressi in µg/L di 1-decanolo (IS).

	RT min	VITI NON SFOGLIATE		VITI SFOGLIATE	
		2013 $\bar{x} \pm d$	2014 $\bar{x} \pm d$	2013 $\bar{x} \pm d$	2014 $\bar{x} \pm d$
<b>ALCOLI</b>					
2-metil-1-propanolo	5.96	4.6±0.3	7.0±0.1	4.1±0.3	5.4±0.1
1-butanolo	7.72	28.4±2.6	11.5±0.6	22.8±1.2	12.6±0.5
3-metil-1-butanolo	10.36	37.2±1.6	62.7±1.1	31.5±1.2	37.1±8.0
3-metil-3-buten-1-olo	12.27	33.7±0.2	22.8±0.5	33.2±1.3	20.8±1.5
2-metil-2-buten-1-olo	16.23	40.0±0.7	24.7±1.2	40.0±1.5	25.3±0.7
1-esanolo	18.05	36.1±5.9	28.8±4.3	29.8±0.8	22.9±0.6
<i>trans</i> -3-esen-1-olo	18.63	0.9±0.1	0.5±0.0	0.6±0.1	0.4±0.0
<i>cis</i> -3-esen-1-olo	19.76	9.9±0.4	12.9±1.3	9.9±0.2	9.6±0.8
4-metil-3-penten-1-olo	20.08	2.4±0.1	1.6±0.1	2.7±0.2	1.6±0.1
<i>trans</i> -2-esen-1-olo	20.57	15.4±2.0	6.7±0.7	0.9±0.1	0.5±0.1
<i>cis</i> -2-esen-1-olo	21.17	2.5±2.5	0.7±0.0	13.0±0.2	6.5±0.3
<b>Alcoli totali</b>		<b>211.2±10.2</b>	<b>179.9±6.2</b>	<b>188.5±7.1</b>	<b>142.6±10.6</b>
<b>TERPENOLI</b>					
<i>trans</i> -furan linalolo ossido	22.77	4.6±1.2	1.8±0.1	8.2±0.9	4.8±1.2
<i>cis</i> -furan linalolo ossido	24.49	1.2±0.0	1.3±0.1	1.4±0.1	1.2±0.2
linalolo	29.79	1.3±0.1	0.7±0.0	3.0±0.8	1.0±0.2
α-terpineolo	37.88	1.5±0.1	1.4±0.1	1.7±0.2	1.7±0.1
<i>trans</i> -piran linalolo ossido	40.28	9.3±1.2	4.6±0.0	14.0±2.6	11.7±2.8
<i>cis</i> -piran linalolo ossido	41.90	1.3±0.0	1.5±0.1	1.4±0.0	0.9±0.0
nerolo	43.92	2.2±0.1	1.4±0.1	2.5±0.3	1.7±0.9
geraniolo	46.61	47.4±3.8	33.4±2.1	31.6±12.2	35.0±2.9
diendiolo I	52.11	13.1±2.6	4.1±1.0	24.3±1.0	13.0±3.7
8-idrossi-diidrolinalolo	64.53	12.0±0.7	11.0±0.6	13.4±0.2	14.4±1.8
<i>trans</i> -8-idrossilinalolo	66.99	16.7±0.3	13.5±0.3	19.9±0.1	20.6±2.2
idrossigeraniolo	68.42	28.2±0.8	13.7±0.2	28.5±0.0	21.1±2.0
<i>cis</i> -8-idrossilinalolo	68.43	105.2±9.1	42.3±1.0	129.6±6.1	84.9±19.7
7-idrossi-α-terpineolo	75.03	21.0±0.5	20.7±0.5	24.6±2.1	29.3±3.5
<b>Terpenoli totali</b>		<b>265.0±9.4</b>	<b>151.3±2.9</b>	<b>304.0±5.6</b>	<b>241.4±40.7</b>
<b>BENZENOIDI</b>					
benzaldeide	27.33	2.9±0.6	2.8±1.1	3.6±0.1	2.2±0.0
benzenacetaldide	34.55	5.7±1.2	12.0±2.2	7.7±3.8	7.5±0.4
metil salicilato	41.59	4.9±0.0	5.3±1.2	5.3±2.0	6.9±1.2
alcol benzilico	47.76	504.3±24.2	400.2±15.6	449.8±20.4	363.9±21.9
2-feniletanolo	49.43	169.4±6.1	256.2±11.9	148.6±5.6	177.2±11.3
eugenolo	62.10	9.1±1.0	6.9±0.1	6.4±0.1	5.7±0.1
2-metossi-4-vinilfenolo	63.43	10.2±0.4	3.8±0.2	6.7±0.3	3.1±0.0
vanillina	76.05	12.7±0.9	10.3±2.3	13.9±1.7	9.8±0.9
acetovanillone	77.35	20.2±0.2	30.1±3.5	18.2±0.9	36.6±2.6
metilvanillato	78.26	131.1±6.0±1.4	93.1±9.3	105.4±0.5	91.5±1.3
alcol salicilico	79.06	10.8±3.1	5.5±0.7	23.7±2.4	20.6±0.0
alcol vanillico	83.00	31.9±1.9	16.5±1.4	27.4±0.9	21.2±0.4
alcol omovanillico	84.04	36.6±13.3	18.4±0.8	28.6±3.6	21.3±1.0
acido omovanillico	87.95	51.8±2.1	28.0±4.9	30.4±4.7	94.5±5.7
4-idrossibenzenetanolo	89.01	55.7±2.1	38.8±5.6	26.4±7.3	49.4±1.5
<b>Benzenoidi totali</b>		<b>1057.4±24.1</b>	<b>927.9±32.4</b>	<b>902.1±21.9</b>	<b>911.4±22.7</b>
<b>NORISOPRENOIDI</b>					
3-idrossi-β-damascone	75.35	49.8±3.5	32.9±3.9	39.2±2.7	34.6±0.7
3-oxo-α-ionolo	78.10	167.2±2.1	64.3±8.5	563.1±2.9	296.8±17.1
3,9-didrossimegastigma-5-ene	79.16	15.1±3.1	9.7±0.9	19.2±2.3	20.3±3.0
3-idrossi-7,8-dideidro-β-ionolo	81.82	34.8±4.4	20.6±1.5	21.5±2.9	27.9±0.3
vomifoliolo	94.01	234.8±17.1	108.2±7.7	174.1±2.7	128.8±3.1
<b>Norisoprenoidi totali</b>		<b>501.6±14.4</b>	<b>235.7±22.5</b>	<b>817.1±8.1</b>	<b>508.4±16.0</b>

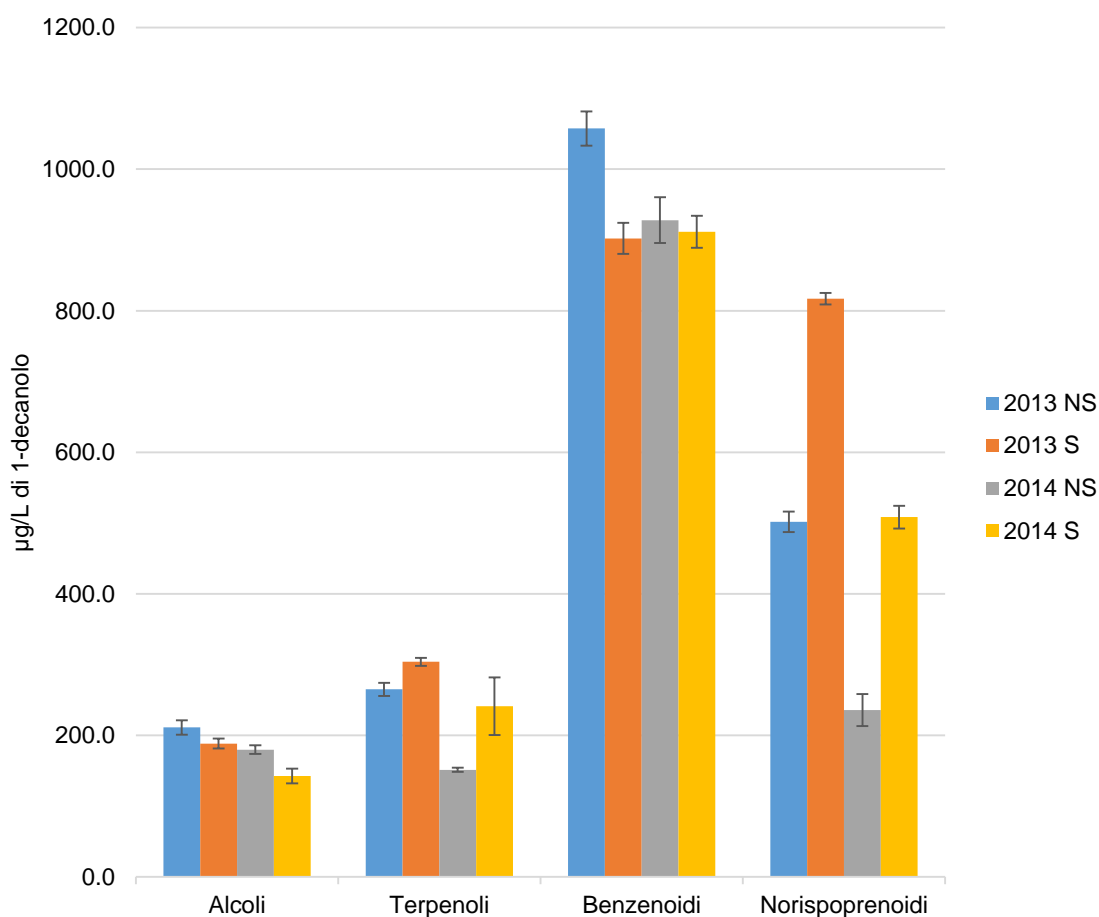
**Tabella 3.3** Principali composti glicosilati identificati nei mosti Semillon (µg/L di standard interno 1-decanolo) nelle due annate. Media di due ripetizioni e relativa semidispersione massima.

La tabella 3.4 riporta i totali dei dati della tabella 3.3, suddivisi per classe di composti, tipologia di campione e per annata.

Annata	Alcoli	Terpenoli	Benzenoidi	Norisoprenoidi
2013 NS	211.2±10.2	265.0±9.4	1057.4±24.1	501.6±14.4
2013 S	188.5±7.1	304.0±5.6	902.1±21.9	817.1±8.1
2014 NS	179.9±6.2	151.3±2.9	927.9±32.4	235.7±22.5
2014 S	142.6±10.6	241.4±40.7	911.4±22.7	508.4±16.0

**Tabella 3.4** Concentrazioni totali medie di due ripetizioni dei composti glicosilati determinati nei mosti Semillon ( $\mu\text{g/L}$  di standard interno 1-decanolo) per le due tesi nelle due annate. S, viti sfogliate; NS, viti non sfogliate.

La figura 3.11 rappresenta l'istogramma relativo ai dati della tabella 3.4.



**Figura 3.11** Confronto fra le classi di composti glicosilati

Nelle tesi sfogliate si evidenziano contenuti di terpeni e norisoprenoidi glicosilati superiori rispetto alle tesi non sfogliate in entrambe le annate. Il contenuto totale di alcoli glicosilati nelle tesi sfogliate risulta invece inferiore rispetto alle tesi non sfogliate in entrambe le annate.

Come osservato per i composti liberi, nell'annata 2014 si osservano in entrambe le tesi un aumento del contenuto di 3-metil-1-butanolo e 2-feniletanolo, anche se meno marcato che nei liberi.

I contenuti di *trans*-furan linalolo ossido, *trans*-piran linalolo ossido, diendiolo 1, *trans* e *cis* 8-idrossilinalolo ed idrossigeraniolo risultano superiori nelle tesi sfogliate in entrambe le annate. Il 3-oxo- $\alpha$ -ionolo ed il vomifoliolo presentano concentrazioni maggiori nell'annata 2013 in entrambe le tesi.



### 3.2. Studio dei profili aromatici dei vini Fiano

Le analisi sono state eseguite su quattro campioni di vino varietà Fiano. Il campione FAT è il Fiano di Avellino, campione di riferimento prodotto in una zona vocata per la produzione di questo vino, i campioni FP1, FP2 e FP3 sono i vini prodotti nelle tre diverse zone della Puglia come descritto nel paragrafo 2.1.3.

#### 3.2.1. Studio dei composti liberi

Nelle tabelle 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10 sono riportati i composti volatili determinati nei campioni di vini Fiano suddivisi per classe. I risultati, relativi all'analisi di un solo campione di vino, sono espressi in µg/L di 1-eptanolo (IS).

<b>ALCOLI</b>	<b>RT</b> min	<b>FAT</b> µg/L	<b>FP1</b> µg/L	<b>FP2</b> µg/L	<b>FP3</b> µg/L
alcoli isoamilici	11.54	54487	50944	45283	58749
2-metil-1-propanolo	6.39	4858	3562	4405	2080
1-butanolo	8.14	170	104	316	310
3-metil-3-buten-1-olo	12.79	15	18	25	21
2-metil-2-buten-1-olo	16.52	70	70	80	nd
3-metil-1-pentanololo	16.95	65	13	129	77
1-esanololo	18.50	991	1468	686	632
(E)-3-esen-1-olo	18.94	64	88	53	148
3-etossi-1-propanolo	19.31	318	230	330	875
(Z)-3-esen-1-olo	20.02	46	86	101	56
2-butossietanololo	20.77	7	9	6	10
2-metil-1-etanololo	16.95	27	35	40	32
2,3-butandiolo 1	29.05	2652	2764	2781	12582
2,3-butandiolo 2	31.15	44	600	665	3661
glicole propilenico	31.78	71	83	108	426
2-furanmetanololo	35.71	22	10	31	9
3-metil-1-propanolo	38.32	768	486	1619	680
<b>Alcoli totali</b>		<b>10190</b>	<b>9626</b>	<b>11376</b>	<b>21599</b>

**Tabella 3.5** Alcoli determinati nei vini Fiano (µg/L di IS 1-eptanolo)

<b>ESTERI</b>	<b>RT</b> min	<b>FAT</b> µg/L	<b>FP1</b> µg/L	<b>FP2</b> µg/L	<b>FP3</b> µg/L
butanoato di etile	5.15	458	900	325	290
isoamilacetati	7.67	3277	2652	3195	3394
esanoato di etile	12.32	1149	1134	1036	1345
acetato di esile	14.20	187	301	110	218
lattato di etile	17.76	8209	3152	6027	4772
ottanoato di etile	23.31	2095	1914	1757	2631
3-idrossibutanoato di etile	27.43	220	313	287	349
decanoato di etile	34.90	729	395	668	891
dietilsuccinato	36.56	1791	1609	777	1884
2-fenilacetato	43.34	2421	959	218	2070
dodecanoato di etile	45.74	39	1	77	27
dietilmalato	54.91	3726	3684	1079	5675
<b>Esteri totali</b>		<b>24302</b>	<b>17016</b>	<b>15555</b>	<b>23546</b>

**Tabella 3.6** Esteri determinati nei vini Fiano (µg/L di IS 1-eptanolo)

<b>BENZENOIDI</b>	<b>RT</b> min	<b>FAT</b> µg/L	<b>FP1</b> µg/L	<b>FP2</b> µg/L	<b>FP3</b> µg/L
benzaldeide	27.12	104	15	12	6
benzeneacetaldide	33.96	27	nd	10	6
acetofenone	34.13	14	20	9	nd
metilsalicilato	40.76	17	29	1	10
alcol benzilico	46.56	624	433	153	123
2-feniletanolo	48.38	43933	21998	16190	36481
4-vinil-guaiacolo	61.54	68	43	53	92
vanillina	74.37	12	18	8	17
acetovanillone	76.53	57	86	27	117
alcol omovanillico	81.33	15	8	19	36
acido omovanillico	84.65	14	16	nd	49
4-idrossibenzenmetanolo	85.54	1220	888	617	6167
<b>Benzenoidi totali</b>		<b>46104</b>	<b>23554</b>	<b>17098</b>	<b>43104</b>

**Tabella 3.7** Composti benzenoidi determinati nei vini Fiano (µg/L di IS) nd: non determinato.

<b>NORISOPRENOIDI</b>	<b>RT</b> min	<b>FAT</b> µg/L	<b>FP1</b> µg/L	<b>FP2</b> µg/L	<b>FP3</b> µg/L
β-damascenone	43.51	17	11	29	240
3-oxo-α-ionolo	75.76	53	98	56	67
<b>Norisoprenoidi totali</b>		<b>70</b>	<b>109</b>	<b>85</b>	<b>307</b>

**Tabella 3.8** Composti norisoprenoidi determinati nei vini Fiano (µg/L di IS)

<b>TERPENOLI</b>	<b>RT</b> min	<b>FAT</b> µg/L	<b>FP1</b> µg/L	<b>FP2</b> µg/L	<b>FP3</b> µg/L
<i>trans</i> -furan linalolo ossido	23.05	5	7	35	nd
<i>cis</i> -furan linalolo ossido	24.82	nd	nd	34	nd
linalolo	29.80	60	87	194	129
α-terpineolo	37.51	61	89	792	150
<i>trans</i> -piran linalolo ossido	39.69	nd	nd	134	nd
geraniolo	45.82	nd	nd	46	nd
diendiolo 1	50.86	103	130	513	313
<b>Terpenoli totali</b>		<b>230</b>	<b>313</b>	<b>1748</b>	<b>592</b>

**Tabella 3.9** Terpenoli determinati nei vini Fiano (µg/L di IS) nd: non determinato.

<b>ALTRI COMPOSTI</b>	<b>RT</b> min	<b>FAT</b> µg/L	<b>FP1</b> µg/L	<b>FP2</b> µg/L	<b>FP3</b> µg/L
furfurale	24.53	nd	nd	nd	82
γ-butilrolattone	32.85	1344	1704	1630	1873
acido esanoico	47.08	811	625	344	821
pantolattone	53.94	127	107	83	126
acido ottanoico	58.88	3395	5542	2444	6010
acido decanoico	66.40	2245	1473	2644	3861
<b>Composti vari totali</b>		<b>7922</b>	<b>9451</b>	<b>7146</b>	<b>12774</b>

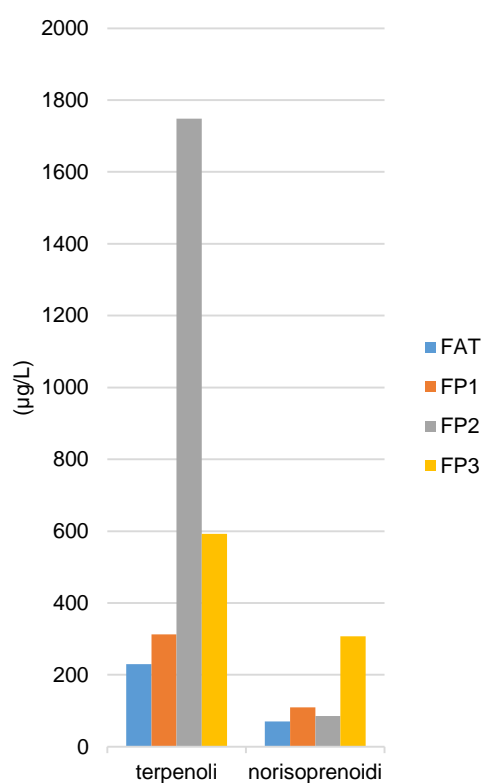
**Tabella 3.10** Altri composti volatili determinati nei vini Fiano (µg/L di IS) nd: non determinato.

In tabella 3.11 sono riportate le concentrazioni dei composti volatili totali suddivisi per classe di composti.

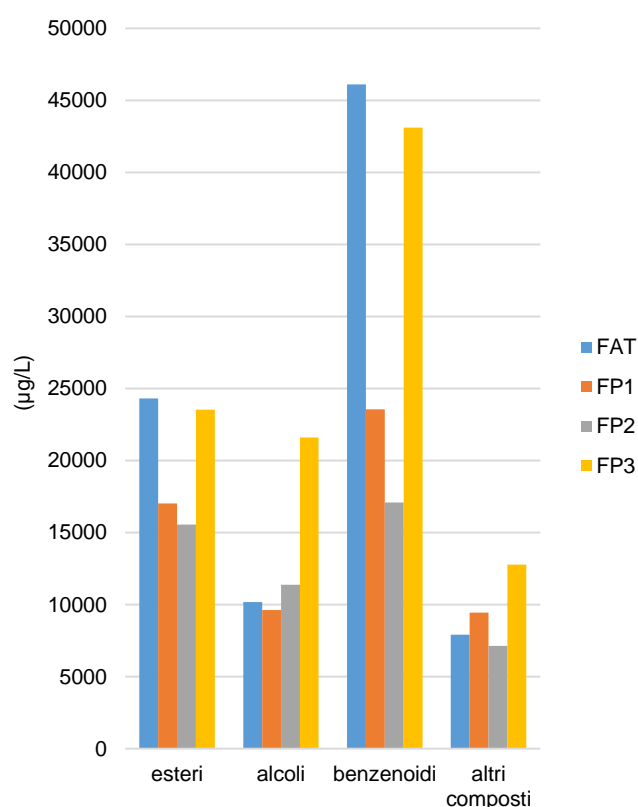
Campione	Esteri	Alcoli	Terpenoli	Benzenoidi	Norisoprenoidi	Altri composti
FAT	21897	10190	230	48508	70	7922
FP1	16086	9626	313	24484	109	9451
FP2	15338	11376	1748	17315	85	7146
FP3	21485	21599	592	45165	307	12774

**Tabella 3.11** Concentrazioni totali dei composti volatili determinati nei vini di Fiano ( $\mu\text{g/L}$  di IS 1-eptanolo)

Le figure 3.12 e 3.13 rappresentano gli istogrammi relativi ai dati della tabella 3.11.



**Figura 3.12** Confronto terpenoli e norisoprenoidi liberi totali



**Figura 3.13** Confronto esteri, alcoli, benzenoidi ed altri composti liberi totali

Dalla tabella 3.8 si evidenzia che il  $\beta$ -damascenone è più abbondante nel campione FP3 rispetto agli altri campioni. Tale composto, con soglia di percezione  $0.05 \mu\text{g/L}$ , è il principale responsabile dei sentori di frutta esotica del vino. Inoltre, il campione FP3 spicca tra gli altri vini in quanto è caratterizzato da contenuti di benzenoidi ed esteri totali comparabili al testimone FAT, e da un maggior contenuto di alcoli totali, esteri a nota fruttata (esanoato, ottanoato e decanoato di etile), 2-feniletacetato e 2-feniletanolo (nota di rosa).

Dai dati riportati in tabella 3.11 si evidenzia che il campione FP2 è risultato il più ricco di terpenoli liberi seguito

dal campione FP3. In particolare nel campione FP2 è stata riscontrata la più alta concentrazione di linalolo (che è risultato sempre presente in concentrazioni superiori alla soglia di percezione nei vini di 25 µg/L), di α-terpineolo (soglia di percezione nei vini di 250 µg/L) dove, a differenza degli altri campioni, rappresenta il terpenolo maggiormente espresso. Il campione FP3 è inoltre caratterizzato da alti contenuti di vanillati (acetovanillone, acido omovanillico ed alcol omovanillico), 4-vinilguaiacolo (nota speziata) e 4-idrossibenzenmetanolo.

Si evidenzia infine che, mentre il campione FP2 è caratterizzato da un maggiore contenuto di terpenoli totali, il campione FP3 presenta un maggior contenuto di norisoprenoidi e di alcoli superiori totali.

### 3.2.2. I profili dei terpeni glicosilati

Nella tabella 3.12 sono riportati i parametri di spettrometria di massa ad elevata risoluzione (HRMS) utilizzati per l'identificazione dei terpeni glicosilati ed i composti identificati nei vini di Fiano.

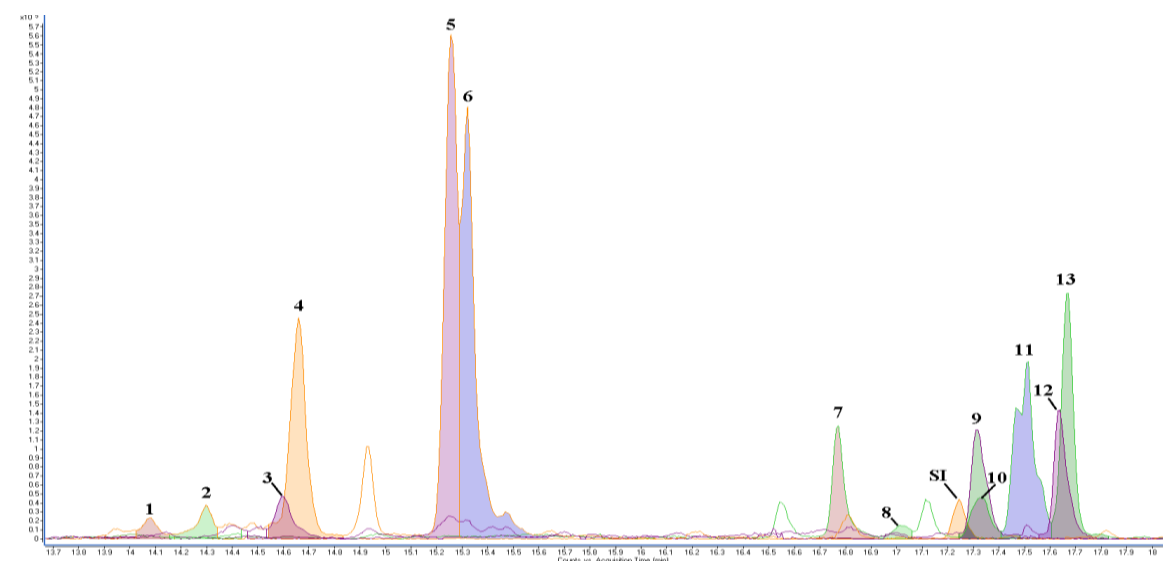
TERPENOLI GLICOSIDATI	RT (min)	formula	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	[M-H] <sup>-</sup> teorica	ppm
α-terpineolo-pentosil-esoside	16.76	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>	447.2239	447.2236	0.8
terpenolo isomero-pentosil-esoside	17.05	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>	447.2238	447.2236	0.4
linalolo-pentosil-esoside	17.34	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>	447.2256	447.2236	4.4
nerolo-pentosil-esoside	17.52	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>	447.2247	447.2236	2.6
geraniolo-pentosil-esoside	17.67	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>	447.2248	447.2236	2.8
linalolo-ramnosil-esoside	17.34	C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	461.2389	461.2392	0.7
geraniolo-ramnosil-esoside	17.67	C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	461.2384	461.2392	1.8
<i>p</i> -ment-2-ene-1,8-diolo-pentosil-esoside	13.71	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	463.2170	463.2185	3.3
<i>trans/cis</i> furan/piran linalolo ossido-pentosil-esoside	14.06	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	463.2194	463.2185	2.0
<i>trans/cis</i> furan/piran linalolo ossido-pentosil-esoside	14.29	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	463.2185	463.2185	0.1
7-idrossi geraniolo-pentosil-esoside	14.61	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>11</sub>	465.2337	465.2341	0.8
diendiolo I	14.67	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	463.2190	463.2185	1.0
<i>trans/cis</i> 8-idrossi linalolo-pentosil-esoside	15.21	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	463.2191	463.2185	1.3
Idrossiterpenolo isomero-pentosil-esoside	15.31	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	463.2178	463.2185	1.6

**Tabella 3.12** Parametri di spettrometria di massa ad elevata risoluzione (HRMS) utilizzati per l'identificazione dei terpenoli glicosilati.

La grandezza ppm indica lo scostamento in parti per milione tra la massa teorica della specie ionica [M-H]<sup>-</sup> determinata in modalità di ionizzazione negativa e la massa rilevata sperimentalmente. Tali valori oscillano tra 0.1 (isomero linalolo ossido-pentosil-esoside a RT 14.31) e 4.4 (linalolo-pentosil-esoside) e sono in accordo con il potere di risoluzione per queste masse dell'analizzatore a tempo di volo utilizzato (risoluzione 40000).

L'attribuzione dei composti isomerici è stata ottenuta sulla base dei tempi di ritenzione cromatografici riportati nel database *GrapeMetabolomics* sviluppato presso il laboratorio chimico del CRA-VIT (Flamini, et al., 2014).

In figura 3.14 è riportato l'Extract Ion Chromatogram (EIC) relativo ai segnali [M-H]<sup>-</sup> dei terpenoli glicosilati identificati nel campione di Fiano FP2.



**Figura 3.14** Extract Ion Chromatogram (EIC) dei segnali [M-H]<sup>-</sup> dei terpenoli glicosilati identificati nei vini Fiano mediante analisi UHPLC/QTOF (campione FP2). SI, *n*-epitil-β-D-glucopiranoside.

In tabella 3.13 sono elencati, in ordine di eluizione, i terpenoli glicosilati relativi all'EIC riportato in figura 3.14.

N° PICCO	RT	COMPOSTO
1	14.06	<i>trans/cis</i> furan/piran linalolo ossido-pentosil-esoside
2	14.29	<i>trans/cis</i> furan/piran linalolo ossido-pentosil-esoside
3	14.61	7-idrossigeraniolo-pentosil-esoside
4	14.67	diendiolo 1
5	15.21	<i>trans/cis</i> 8-idrossilinalolo-pentosil-esoside
6	15.31	idrossiterpenolo isomero-pentosil-esoside
7	16.76	α-terpineolo-pentosil-esoside
8	17.05	terpenolo isomero-pentosil-esoside
9	17.33	terpenolo isomero-ramnosil-esoside
10	17.34	linalolo-pentosil-esoside
11	17.52	nerolo-pentosil-esoside
12	17.66	terpenolo isomero-ramnosil-esoside
13	17.67	geraniolo-pentosil-esoside

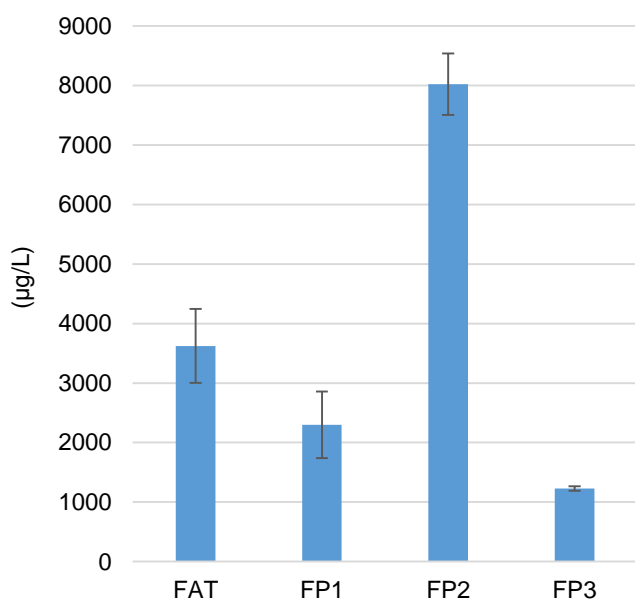
**Tabella 3.13** Terpeni glicosilati identificati nei vini Fiano (campione FP2)

In tabella 3.14 sono riportate le concentrazioni dei terpeni glicosilati nei campioni espressi in  $\mu\text{g/L}$  di standard interno *n*-eptil- $\beta$ -D-glucopiranoside.

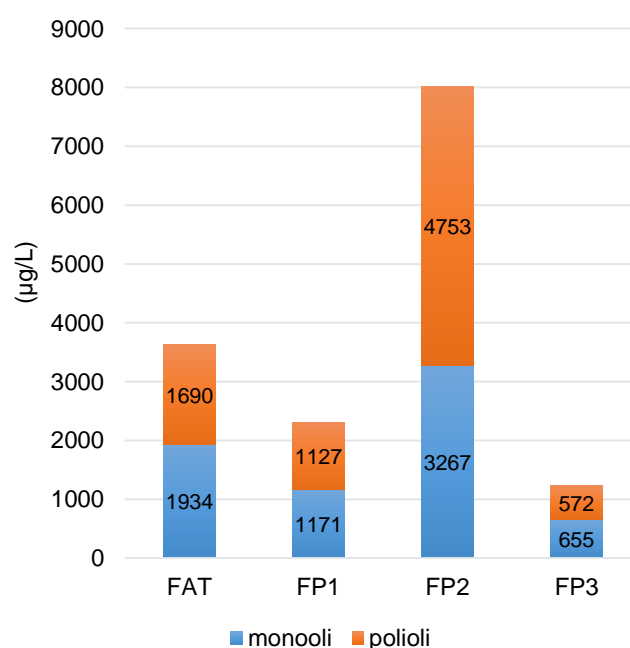
<b>Monoterpene glicosilato</b>	<b>RT min</b>	<b>FAT <math>\mu\text{g/L}</math></b>	<b>FP1 <math>\mu\text{g/L}</math></b>	<b>FP2 <math>\mu\text{g/L}</math></b>	<b>FP3 <math>\mu\text{g/L}</math></b>
$\alpha$ -terpineolo-pentosil-esoside	16.76	1163 $\pm$ 230	842 $\pm$ 201	371 $\pm$ 34	282 $\pm$ 7
terpenolo isomero pentosil-esoside	17.03	nd	nd	62 $\pm$ 4	nd
linalolo-pentosil-esoside	17.34	nd	nd	216 $\pm$ 6	24 $\pm$ 1
nerolo-pentosil-esoside	17.52	103 $\pm$ 19	56 $\pm$ 17	890 $\pm$ 75	88 $\pm$ 4
geraniolo-pentosil-esoside	17.66	355 $\pm$ 59	142 $\pm$ 32	783 $\pm$ 54	152 $\pm$ 8
linalolo ramnosil esoside	17.34	152 $\pm$ 29	59 $\pm$ 16	483 $\pm$ 6	43 $\pm$ 0
geraniolo ramnosil esoside	17.67	161 $\pm$ 25	72 $\pm$ 15	462 $\pm$ 34	66 $\pm$ 3
<i>p</i> -ment-2-ene-1,8-diolo-pentosil-esoside	13.70	94 $\pm$ 16	30 $\pm$ 8	nd	24 $\pm$ 1
<i>trans/cis</i> furan/piran linalolo ossido-pentosil-esoside	14.06	168 $\pm$ 20	150 $\pm$ 34	95 $\pm$ 12	61 $\pm$ 6
<i>trans/cis</i> furan/piran linalolo ossido-pentosil-esoside	14.29	112 $\pm$ 19	44 $\pm$ 7	154 $\pm$ 4	53 $\pm$ 2
7-idrossi geraniolo-pentosil-esoside	14.61	236 $\pm$ 28	65 $\pm$ 15	254 $\pm$ 11	42 $\pm$ 3
<i>trans/cis</i> 8-idrossi linalolo-pentosil-esoside	15.25	337 $\pm$ 51	137 $\pm$ 37	1744 $\pm$ 3	102 $\pm$ 7
Idrossiterpenolo isomero-pentosil-esoside	15.31	419 $\pm$ 69	370 $\pm$ 93	1623 $\pm$ 135	156 $\pm$ 1
diendiolo 1	14.67	324 $\pm$ 57	331 $\pm$ 85	883 $\pm$ 140	134 $\pm$ 5
<b>Precursori totali</b>		<b>3624<math>\pm</math>623</b>	<b>2300<math>\pm</math>560</b>	<b>8021<math>\pm</math>516</b>	<b>1228<math>\pm</math>39</b>

**Tabella 3.14** Terpeni glicosilati identificati nei campioni di vini Fiano. Le concentrazioni medie e la semidispersione per due analisi sono espresse in  $\mu\text{g/L}$  di standard interno *n*-eptil- $\beta$ -D-glucopiranoside. nd: non determinato.

**Figura 3.15** Istogramma relativo ai terpenoli glicosilati totali



**Figura 3.16** Istogramma relativo ai terpenoli glicosilati totali divisi in monooli e polioli



Come si può osservare dalla Figura 3.15, il campione FP2 risulta il più ricco di terpenoli glicosilati. Il campione di riferimento Fiano di Avellino (FAT) ed il campione FP1 presentano alti contenuti di  $\alpha$ -terpineolo diglicoside, diversamente da quanto riscontrato nell'analisi degli aromi liberi. Questo può dipendere dalle diverse condizioni di vinificazione che hanno determinato una minore idrolisi di questo composto. Come per i terpenoli liberi, il campione di Fiano FP2 in generale presenta i maggiori contenuti di terpenoli, in particolare dei dioli (Figura 3.16). In questi vini il nerolo è stato identificato solo sotto forma del precursore aromatico pentosil-esoside, ed è risultato presente in maggiore concentrazione nel campione FP2.



### **3.3. Efficienza dell'analisi UHPLC/QTOF per lo studio dei terpeni glicosilati dei vini**

L'assoluta mancanza di standard disponibili rende molto difficoltosa l'identificazione dei terpeni glicosilati. Solitamente la determinazione di questi precursori aromatici è effettuata tramite analisi GC/MS degli agliconi ottenuti dopo l'idrolisi enzimatica. Questo comporta una laboriosa procedura di preparazione del campione, aumentando il rischio di artefatti legati alla specificità dell'enzima utilizzato ed a perdite del campione.

Il metodo UHPLC/QTOF per la determinazione dei terpenoli glicosilati sviluppato per l'analisi delle uve (Flamini, et al., 2014) è stato applicato in questo lavoro di tesi per la prima volta all'analisi dei vini. Questo approccio si è rivelato particolarmente efficace, ed ha permesso la determinazione diretta di 14 terpenoli glicosidi evitando la complessa preparazione del campione e consentendo una parziale identificazione della natura degli zuccheri legati. In particolare, è stato possibile distinguere tra derivati pentosil-esosidi dai ramnosil-esosidi. L'uso dell'analizzatore ad alta risoluzione QTOF ha fornito un limitato numero di formule brute associabili ai segnali, riducendo la possibilità di false attribuzioni dei composti isobarici.

### 3.4. Studio del contenuto di metil antranilato e di furaneolo nei vini prodotti con uve di ibridi produttori diretti

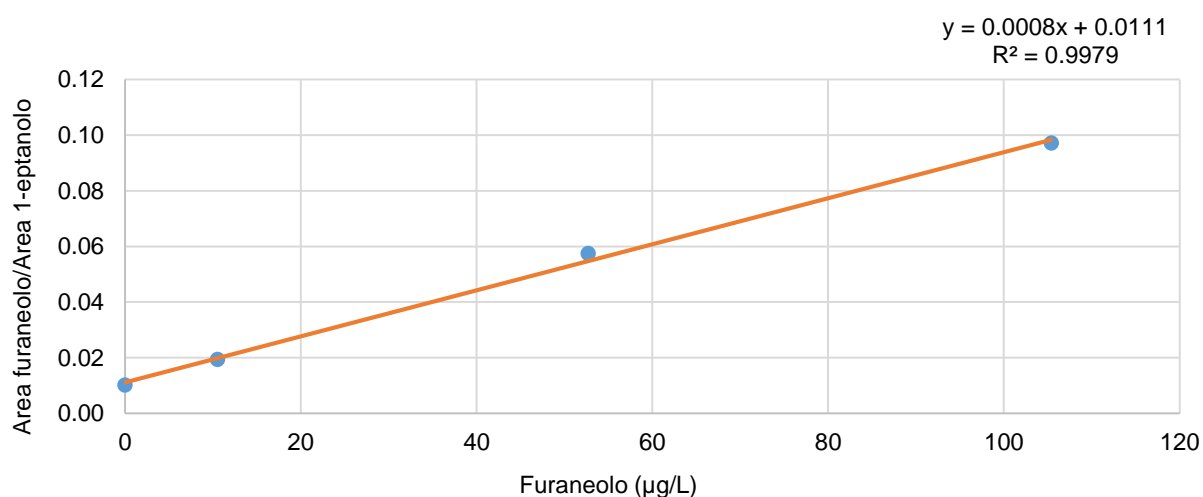
In questo lavoro di tesi è stato messo a punto un metodo per la preparazione del campione per la determinazione simultanea dei due composti nei vini mediante estrazione liquido-liquido con diclorometano ed analisi GC/MS dell'estratto.

L'equazione della retta di taratura del furaneolo nei vini rossi è risultata  $Y=0.0008x+0.0111$  ( $R^2=0.9979$ ), quella del metil antranilato  $Y=0.0154x+0.0084$  ( $R^2=0.9953$ ).

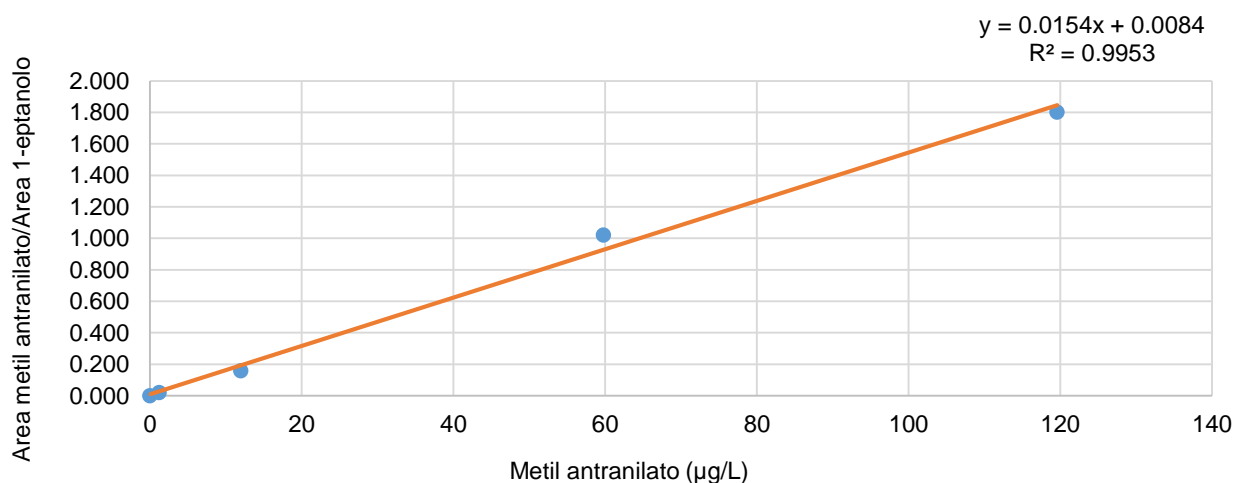
L'equazione della retta di taratura del furaneolo nei vini bianchi è risultata  $Y=0.0016x+0.0289$  ( $R^2=0.9889$ ), quella del metil antranilato nei vini bianchi  $Y=0.0243x+0.0144$  ( $R^2=0.9996$ ).

Con questo metodo il limite di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) dei due composti calcolati sul rapporto segnale/rumore  $S/N \geq 3$  per il LOD, e  $S/N \geq 10$  per il LOQ, sono risultati rispettivamente di 2  $\mu\text{g/L}$  e 20  $\mu\text{g/L}$  per il furaneolo, e rispettivamente di 1  $\mu\text{g/L}$  e 3  $\mu\text{g/L}$  per il metil antranilato.

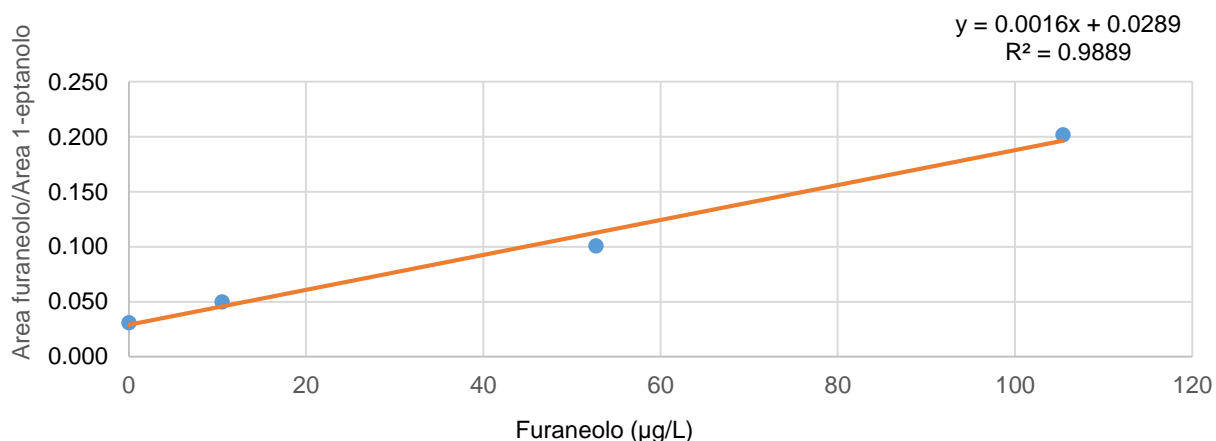
I grafici delle rette sono riportati nelle 3.17, 3.18, 3.19 e 3.20.



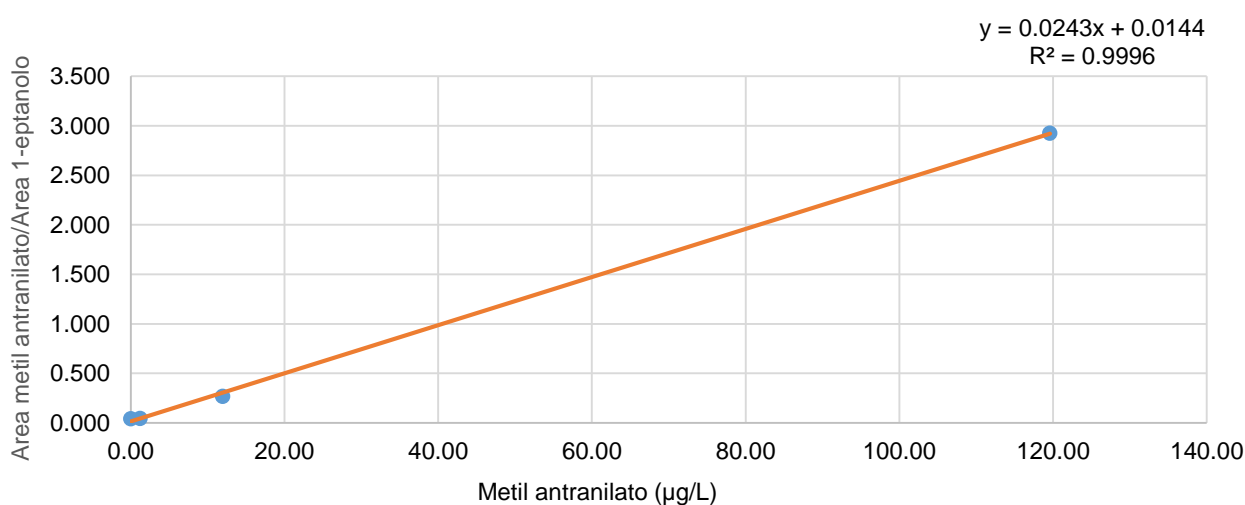
**Figura 3.17** Retta di taratura per la quantificazione del furaneolo nei vini rossi.



**Figura 3.18** Retta di taratura per la quantificazione del metil antranilato nei vini rossi.



**Figura 3.19** Retta di taratura per la quantificazione del furaneolo nei vini rossi.



**Figura 3.20** Retta di taratura per la quantificazione del metil antranilato nei vini rossi.

Dall'analisi delle equazioni di regressione delle rette di taratura si osserva che la concentrazione relativa all'intercetta sull'asse delle ordinate risulta essere sempre sotto il LOQ e pertanto le equazioni possono essere utilizzate senza commettere errori significativi. I valori calcolati sono di 1 e 0.0 µg/L rispettivamente per il furaneolo e il metil antranilato nei vini rossi, e di 1.3 e 1.2 µg/L rispettivamente per il furaneolo e il metil antranilato nei vini bianchi.

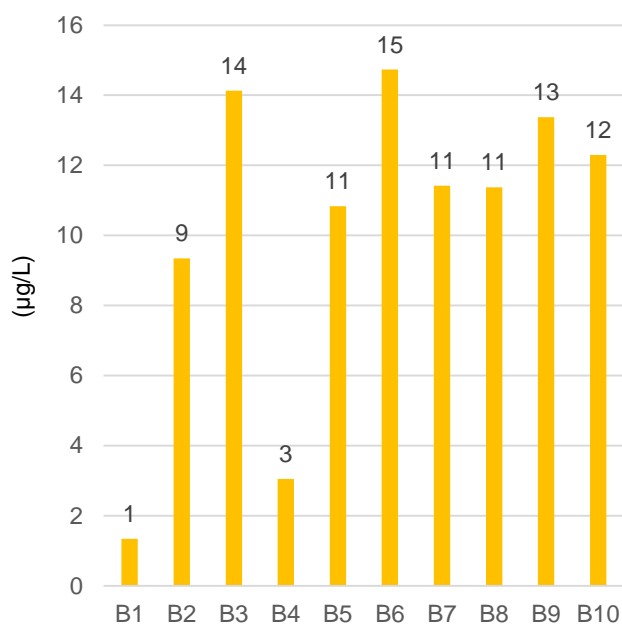
Con il metodo messo a punto sono stati analizzati 10 campioni di vini bianchi e 12 vini rossi allo scopo di determinare la concentrazione di furaneolo e metil antranilato al fine di una valutazione per la registrazione al registro nazionale delle varietà del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Per motivi di riservatezza i campioni sono stati genericamente chiamati Bianco e Rosso con i relativi codici.

In tabella 3.15 sono riportati i risultati delle analisi.

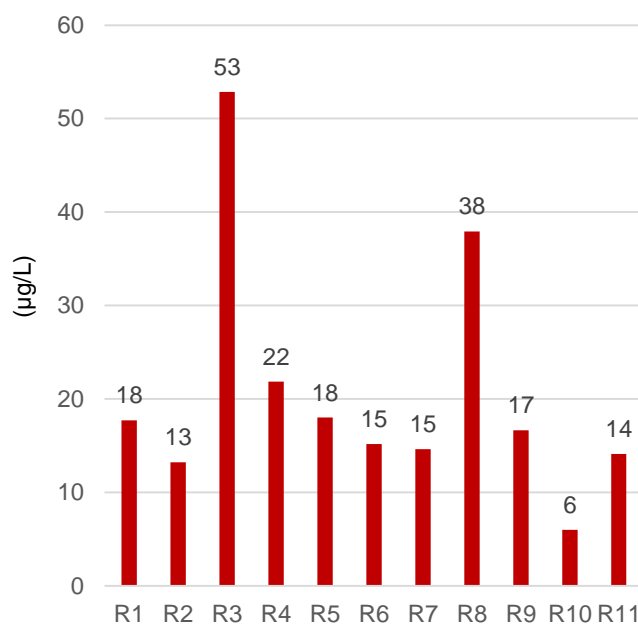
VINI BIANCHI	Codice	MA (ug/L)	Furaneolo (ug/L)	VINI ROSSI	Codice	MA (ug/L)	Furaneolo (ug/L)
Bianco 1	B1	1	1	Rosso 1	R1	nd	18
Bianco 2	B2	0	9	Rosso 2	R2	nd	13
Bianco 3	B3	1	14	Rosso 3	R3	nd	53
Bianco 4	B4	nd	3	Rosso 4	R4	0	22
Bianco 5	B5	1	11	Rosso 5	R5	1	18
Bianco 6	B6	2	15	Rosso 6	R6	0	15
Bianco 7	B7	0	11	Rosso 7	R7	2	15
Bianco 8	B8	nd	11	Rosso 8	R8	2	38
Bianco 9	B9	2	13	Rosso 9	R9	nd	17
Bianco 10	B10	nd	12	Rosso 10	R10	1	6
				Rosso 11	R11	1	14
				Rosso 12	R12	nd	nd

**Tabella 3.15** Concentrazioni di metil antranilato (MA) e di furaneolo ( $\mu\text{g/L}$ ) determinati nei campioni di vini prodotti da viti ibridi produttori diretti (nd= non determinato).

Nelle figure 3.21 e 3.22 sono riportati gli istogrammi relativi ai contenuti di furaneolo.



**Figura 3.21** Furaneolo ( $\mu\text{g/L}$ ) nei vini bianchi



**Figura 3.22** Furaneolo ( $\mu\text{g/L}$ ) nei vini rossi

Nei campioni di vino studiati, il contenuto di metil antranilato è stato determinato in concentrazioni uguali o poco superiori al LOD, mentre il furaneolo è risultato presente nei campioni R3, R4 e R8 sopra la soglia di quantificazione mentre in tutti gli altri campioni le concentrazioni erano comprese tra LOD e LOQ. Nel campione R12 i due composti non sono stati determinati.

# CAPITOLO 4

---

## Conclusioni

## 4.1. Conclusioni

Gli studi effettuati hanno portato alle seguenti conclusioni:

1. L'analisi GC/MS-EI accoppiata all'utilizzo dei database di spettri di frammentazione NIST ed ESTRATTI ha dimostrato una elevata potenzialità nell'identificazione dei composti volatili nei mosti e vini, e degli agliconi prodotti per idrolisi dei composti glicosilati dei mosti. La determinazione semiquantitativa dei composti, effettuata sulla base del segnale dello standard interno, ha consentito di eseguire lo studio comparativo dei profili aromatici dei mosti Semillon prodotti da uve provenienti da viti sfogliate e non. È stato evidenziato che la sfogliatura influisce positivamente nella biosintesi di terpenoli liberi e di norisoprenoidi glicosilati nelle uve, mentre per gli alcoli e composti benzenoidi liberi e glicosilati le variazioni sono risultate maggiormente influenzate dall'andamento climatico dell'annata.
2. In questo lavoro di tesi è stato applicato per la prima volta all'analisi dei vini il metodo UHPLC/QTOF sviluppato per lo studio dei terpenoli glicosilati nelle uve. Il metodo si è rivelato particolarmente efficace ed ha permesso di identificare 14 terpenoli glicosidi evitando l'idrolisi enzimatica e consentendo una parziale identificazione della natura degli zuccheri legati al composto aromatico, in particolare sono stati differenziati i derivati pentosil-esosidi ed i ramnosil-esosidi. L'uso dell'analizzatore ad alta risoluzione QTOF ha fornito un limitato numero di formule brute associabili ai segnali, riducendo la possibilità di false attribuzioni dei composti isobarici.
3. Nello studio dei composti liberi dei vini Fiano, il campione FP3 ha evidenziato un ricco profilo aromatico in termini di composti liberi, paragonabile al campione testimone Fiano di Avellino. Tale evidenza sperimentale è stata confermata dalla degustazione dei campioni. Nel campione di vino Fiano FP2 è stato però riscontrato un maggiore contenuto di terpenoli glicosilati rispetto al testimone, evidenziando un importante serbatoio di aromi che potrebbe esprimersi con l'affinamento del vino ed andare a sommarsi al già importante contenuto di terpenoli liberi evidenziato dall'analisi GC/MS.
4. Il metodo di SPE messo a punto per la quantificazione GC/MS del metil antranilato e del furaneolo nei vini è risultato soddisfacente per il primo composto, con un recupero del 50%, ma ha evidenziato una bassa percentuale di recupero del furaneolo (17%) con un conseguente LOQ maggiore. Questo è probabilmente dovuto alla più elevata polarità del furaneolo che ha portato ad una minore efficienza di estrazione.

- A.V. (2002). What is the Mass Spectrometry. ASMS.
- Barbante C. (2011). Spettrometria di massa. Dispensa corso di Chimica Analitica.
- Bellincontro A., De Santis D., Botondi R., Villa I. (2004). Different postharvest dehydration rates affect quality characteristics and volatile compounds of Malvasia, Trebbiano and Sangiovese grapes for wine production. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 84: 1791-1800.
- Bertrand A. Y. K., Guendes de Pinho P. (2007). Il ruolo dei componenti delle uve sulla qualità del vino. ARSIA Toscana.
- Blevins D.D., Burke M.F., (2008) Sorbent Extraction Technology. Varian
- Di Stefano, R., Borsa, D., Maggiarotto, G. Corino (1995) Terpeni e polifenoli di uve aromatiche a frutto colorato prodotte in piemonte. *L'Enotecnico*, XXXI(4), 75-85.
- Flamini R. (2008) *Hyphenated techniques in Grape and Wine Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd.Eds., ISBN 978-0-470-06187-9
- Flamini R., Traldi P. (2010). *Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd.Eds., ISBN 978-0-470-39247-8
- Flamini R., De Rosso M., Panighel A., Dalla Vedona A., De Marchi F., Bavaresco L. (2014). Profiling of grape monoterpene glycosides by UHPLC/QTOF. *Journal of Mass Spectrometry* 49: 1214-1222.
- Fregoni, M. (2005). *Viticultura di qualità*. Phytoline editore. ISBN 9788848120364
- Genovese A., Dimaggio R., Lisanti M., Piombino P., Moio, L. (2005). Aroma composition of red wines by different extraction method and gas chromatography-SIM/MASS spectrometry analysis. *Annali di chimica SCI*, 95: 383-394.
- Genovese A., Gambutti A., Piombino P., Moio, L. (2007). Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chemistry*, 103: 1228-1236.
- Gross J. (2011). *Mass Spectrometry (II ed.)*. Springer-Verlag. ISBN 978-3-642-10709-2
- Gunata Y., Bayonove C., Baumes R., Cordonnier R. (1985). The aroma of grapes. Extractions and determination of glycosidically bound fraction of some grape aroma components. *J of Chromatography* 331: 83-90.
- Hoffmann E., Stroobant V. (2007). *Mass Spectrometry*. Wiley & Sons. ISBN 978-0-470-03310-4
- Hübschmann H.-J. (2009). *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications (II ed.)*. Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co. ISBN 978-3-527-31427-0
- Mark T., Dunn G. (1985). *Electron Impact Ionization*. Springer-Verlag.
- Mc Lafferty F. (1993). *Interpretation of Mass Spectra*.

Moio L. (2012). Colori, odori ed enologia del Fiano. Regione Campania.

Moio L., Etievant P., Addeo F. (1993a). I componenti aromatici di impatto del vino Biancolella. *Vignevini*, 5: 71-76.

Moio L., Etievant P., Addeo F. (1993b). Impiego dell'analisi gas-cromatografica e olfattometrica nello studio dell'aroma del vino ottenuto dall'uva Falanghina. *L'enotecnico*, 12: 57-66.

Mordehai A., Fjeldsted J. (2009). Agilent Jet Stream Thermal Gradient Focusin Technology. Agilent Technologies, Inc.

Rebière L., Clark A., Schmidtke L., Prenzler P., Scollary G. (2010). A robust method for quantification of volatile compounds within and between vintages using headspace-solid-phase micro-extraction coupled with GC-MS-Application on Semillon wines. *Analytica Chimica Acta*, 660: 149-157.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. (1998). Trattato di enologia (Vol. II). Edagricole.

Salvatore F., (2014). Chimica Analitica Avanzata, Modulo B. Dispensa del corso.

Sarry J., Gunata Z. (2004). Plant e microbial glycoside hydrolase. *Food Chemistry* 87: 509-521.

Schreier P., Drawert F., Winkler F. (1976). Identification of volatile constituents from grape. *J Agric Food Chem* 24: 331-336.

Siegmund B., Bagdonaite K., Leitner E. (2008). Furaneol and mesifuran in strawberries-an analytical challenge. Expression of multidisciplinary flavour science - Proceedings of the 12th Weuman Symposium (p. 537-540). Blank I., Wust M., Yerezian C.

Strauss C., Dimitriadis E., Wilson B., Williams P. (1986). Studies on the hydrolysis of two megastigma-3,6,9-triols rationalizing the origins of some volatile C13 norisoprenoids of *Vitis Vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem*, 145-149.

Voirin S., Baunes R., Sapis J., Bayonove C. (1992). Analytical method for monoterpene glycosides in grape and wine. *J of Chromatography* 595: 269-281.

Williams P., Strauss C., Wilson B. (1980). Hydroxilated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of muscat grapes. *J Agric Food Chem* 28: 766-771.

[www.quattrocalici.it](http://www.quattrocalici.it).

[www.vinealia.org](http://www.vinealia.org).

[www.stepbio.it](http://www.stepbio.it)



Un grazie infinito lo rivolgo a:

- **Rossano Piazza**, per essermi stato vicino durante tutto il percorso universitario e per aver accettato l'incarico come relatore della tesi.
- **Riccardo Flamini**, per avermi accolto nel suo gruppo di lavoro, per la sua disponibilità e competenza.
- **Annarita Panighel**, per avermi supportato nella realizzazione della parte sperimentale e nella stesura della tesi con precisi e puntuali suggerimenti e soprattutto un grazie per l'accoglienza dimostrata.
- **Mirko De Rosso**, per l'aiuto nell'interpretazione e nel commento dei dati, ma soprattutto per le indispensabili pause caffè.
- **Antonio Dalla Vedova**, per i numerosi suggerimenti pratici e per la sincera amicizia.