ISTITUTO AGRARIO DI S. MICHELE A/A
1989
MAT
1
BIBLIOTECA

La presenza di Scopoletina come indicatore della modalità di invecchiamento dei distillati

The presence of Scopoletin as an indicator of ageing parameters in distillates

F. Mattivi (*), G. Versini (*), S. Sarti (**)
(*) Istituto Agrario Provinciale - S. Michele a/A, Trento - Italia
(**) Distilleria di Villa Zarri S.p.A. - Castelmaggiore, Bologna - Italia
(ricevuto il 16.12.88, accettato il 18.2.89)

Riassunto

Nell'ambito degli studi relativi alla proposta di un disciplinare per il Brandy Italiano d'Origine, si è voluto indagare la possibilità di impiego della concentrazione della Scopoletina come fattore capace di fornire utili indicazioni sulle modalità dell'invecchiamento. Si è messa a punto una metodica per H.P.L.C. - Fluorescenza avente i necessari requisiti di sensibilità, precisione e rapidità. Si è sondata la presenza di Scopoletina in estratti idroalcolici di rovere e in distillati prelevati da 90 botti di piccola capacità, provenienti da quattro zone diverse, per studiare il profilo della cessione nel tempo. Le variabili considerate sono la durata dell'invecchiamento, il tempo di precedente uso del fusto, la tostatura e la zona di provenienza del rovere. Si è confermato come l'invecchiamento dei distillati in fusti nuovi causi un notevole, progressivo aumento del tenore di Scopoletina. Si è verificato come la botte si impoverisca rapidamente nel tempo, paragonando le cessioni delle botti nuove con quelle usate 9 mesi e infine con fusti con 5 anni di precedente utilizzo. Si è notata una cessione più elevata nel rovere di Slavonia rispetto a roveri di provenienza francese.

Summary

Studies related to the proposal for the production regulations of Italian D.O.C. Brandy, gave way to the possibility of starting research work on the use of Scopoletin concentrations as a means capable of providing detailed information on ageing. An H.P.L.C. - Fluorescence method having the necessary sensitivity, precision, and rapidity requirements was developed. The presence of Scopoletin in hydroalcoholic extractions of oak wood was sought. Ninety wooden casks of small capacity from 4 different areas were used for the study of time induced cessions. Considered variables were: ageing time, previous lenght of time of barrel use, degree of wood toasting and origin of the oak-wood. It has been thereby ascertained how the ageing of distillates in new barrels causes a remarkable and progressive increase in Scopoletin content. Comparing the cessions from new barrels with those used up for 9 months and those having had a previous 5 years use, it was verified that the wooden-cask rapidly impoverishes itself through time. A higher cession level was recorded for Slavonian oak-wood as compared to French wood.

Parole chiave: *Brandy italiano, invecchiamento, Scopoletina.*
Key words: *Italian brandy, ageing, Scopoletin.*

Introduzione

La presenza di Scopoletina nelle bevande invecchiate in rovere, segnalata da Baldwin et al. nel 1967[2], ha dato spunto negli anni successivi per una serie di lavori volti

ad approfondire le conoscenze riguardo ai composti della famiglia delle Cumarine. Gli studi di Joseph et al.[4] hanno portato alla scoperta di altre Cumarine, presenti in quantità ancora inferiori, ed a significativi indizi della presenza di Glucosidi precursori, da cui la Scopoletina potrebbe facilmente liberarsi nel distillato per idrolisi acida od enzimatica. Le ricerche di Otsuka et al.[6] hanno fornito una tecnica di frazionamento che permette poi di dosare per fluorescenza questo composto, fornendo alcuni dati assai interessanti. Si vede infatti che la quantità di Scopoletina incrementa con l'età del distillato, sia nel Whisky che nel Brandy. Già da allora si poteva quindi intravedere un possibile utilizzo di questo composto come 'tracciante', inteso come sostanza capace di fornire informazioni riguardanti le modalità e/o la durata dell'invecchiamento. Questo è diventato possibile in tempi più recenti, grazie allo sviluppo delle tecniche di H.P.L.C. e di opportuni Detector specifici. In particolare, si segnalano i recentissimi lavori francesi di Tricard et al.[8] e di Puech et al.[7]. L'accurato studio di Puech fornisce una cinetica di estrazione della Scopoletina durante l'invecchiamento dell'Armagnac, che mette in evidenza una rapida estrazione del composto in funzione del tempo. In un recente lavoro di Bertrand e Segur, il contenuto di questa Cumarina è stato messo in relazione con la percezione del sapore astringente dei tannini nelle acqueviti d'Armagnac[3]. Nel corso di questo lavoro, nell'ambito degli studi relativi alla proposta di un disciplinare per il Brandy Italiano d'Origine[9], si è proceduto ad indagare la reale capacità di questo fattore di fornire utili indicazioni sulle modalità dell'invecchiamento.

L'utilizzo di una colonna in fase inversa di piccolo diametro permette di effettuare l'analisi in poco tempo, con un basso consumo di solvente. La completa automazione possibile con lo strumento impiegato permette di ottenere con facilità grandi numeri di analisi con un costo contenuto, rendendo così il metodo utile per controlli di routine sul distillato. L'intera metodica, dall'iniezione alla stampa dei risultati, richiede infatti 15 minuti.

Materiali e metodi

Si sono presi in esame distillati predisposti da un'opportuna sperimentazione per lo studio dell'invecchiamento in diversi legni ed in diversi cicli presso le cantine della ditta Villa Zarri.

I campioni di distillato vengono filtrati su membrana da 0.2 μm ed iniettati direttamente nel cromatografo. Viene dosata la sola Scopoletina, che è il picco principale del cromatogramma, come si vede nell'esempio di figura 1. La quantificazione viene effettuata con il metodo dello standard esterno. Dato che il campione non deve subire manipolazioni, la precisione del risultato analitico è conseguenza diretta di una accurata scelta dei parametri strumentali.

Strumentazione: Cromatografo Liquido Hewlett Packard 1090 M fornito di campionatore automatico e autoiniettore, con Detector a Fluorescenza Hewlett Packard 1046 A. Colonna fase inversa C18 Hypersil ODS 5μm, di dimensioni 200x2.1 mm, precolonna con eguale fase, 20x2.1 mm.

Le condizioni cromatografiche sono le seguenti: Solvente A - Acqua acidificata con Acido Fosforico (0.001 M); Solvente B - Acetonitrile. Il gradiente lineare va da 0 a 24% di B in 12 minuti. Il flusso è di 0.6 mL/min. Il Detector è impostato con eccitazione a 229 nm ed emissione a 454 nm, con filtro di cut off a 370 nm. Queste condizioni corrispondono alla massima sensibilità per la Scopoletina. Lavorando con guadagno del fotomoltiplicatore = 10 e con frequenza della lampada = 55 Hz, si ottiene un rapporto segnale/rumore superiore a cinque per iniezione di 10 pg di Scopoletina o 20 pg di Umbelliferone. Il campo di linearità è compreso tra i 10 pg e 10 ng per la Scopoletina, tra 20 pg e 20 ng per l'Umbelliferone. Lavorando a diversi valori del guadagno del Detector, la linearità si estende per entrambi a valori di 100 ng iniettati.

Su alcuni campioni si è acquisito lo spettro con il metodo dello stop flow. Lo studio di questi spettri ha permesso la conferma dell'identità della Scopoletina. Per quanto riguarda l'Umbelliferone, esso è presente in quantità trascurabili rispetto alla Scopoletina[4];

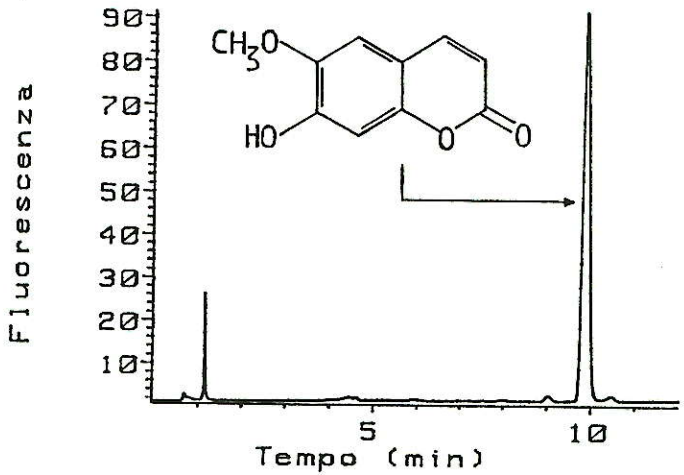

Fig. 1: Cromatogramma di un distillato commerciale, invecchiato in rovere americano, con evidenziato il picco della Scopoletina.

Fig. 1: Chromatogram of a commercial distillate, aged in American oak-wood, evidencing Scopoletin peak.

inoltre, per iniezione diretta non si riesce ad ottenere un picco pulito, come abbiamo riscontrato dagli spettri acquisiti su alcuni dei campioni dove il picco in questione era più rilevante. La Scopoletina è quindi l'unica Cumarina del rovere che può essere dosata per iniezione diretta.

In tab. 1 viene data la precisione del metodo che si ottiene ripetendo 15 volte l'iniezione di 10 μl di una soluzione standard alle concentrazioni tipiche (inferiori e superiori) di un distillato di vino invecchiato in rovere europeo, e alle concentrazioni più elevate (tipiche di uno Scotch Whisky). Si vede come sia preferibile utilizzare l'area anziché l'altezza per la quantificazione. La costanza del tempo di ritenzione permette una facile iden-

Tabella 1: Precisione del metodo, ottenuta per iniezione ripetuta di soluzione standard di Scopoletina (N = 15).

Table 1: Methodical accuracy, obtained through repeated injections of standard Scopoletin solutions (N = 15).

Guadagno del Detector	Tempo di ritenzione medio	Deviazione standard % sul tempo	Concentrazione (μg/L)	Deviazione standard % (area)	Deviazione standard % (altezza)
Detector gain	*Mean retention times*	*Time standard deviation*	*Concentrations (μg/L)*	*Standard deviation (area)*	*Standard deviation (height)*
13	9,837	0,16	9,8	3,19	3,05
10	9,832	0,09	98,0	0,72	1,60
10	9,857	0,10	294,0	0,55	1,16

tificazione in automatico. Si è voluto provare anche come vari la dispersione delle misure nel caso di utilizzo per un mese della stessa tavola di calibrazione, ripetendo ogni giorno una iniezione dello standard a conc. 98.0 μg/L. In questo caso la deviazione standard percentuale sul valore dell'area (N = 23) aumenta, diventando pari al 3.81%. E' pertanto consigliabile effettuare ogni giorno la ricalibrazione. Tale operazione non comporta una eccessiva perdita di tempo, essendo anch'essa eseguibile in automatico.

Studio della cinetica di estrazione

Il procedimento di affinamento del Brandy Italiano d'Origine[1] prevede un periodo di permanenza in fusti nuovi di piccole dimensioni, seguito da una maturazione in fusti usati. E' noto dal lavoro di Puech[7] come la cessione di Scopoletina sia estremamente scarsa nei fusti già sfruttati, per cui è prevedibile che il tenore finale di tale composto nel distillato finito sia principalmente dato dall'apporto della botte nuova.

Si sono fatti preparare dallo stesso bottaio quattro fusti con legno di rovere provenienti da due diverse regioni della Francia (Troncais e Limousin), e da due diverse zone di Slavonia, che chiameremo A e B. Le botti, da 350 litri ciascuna, sono state riempite con una soluzione idroalcolica a 70 gradi, portata a pH = 4 con acido acetico. L'evoluzione della cessione è stata seguita nel tempo fino a 18 mesi.

Si vede nella fig. 2, come in tutte e 4 le botti avvenga un incremento del contenuto in Scopoletina in funzione del tempo di permanenza in fusto nuovo. In questa prova risulta inoltre un tenore marcatamente più basso per il fusto proveniente dalla regione del Troncais.

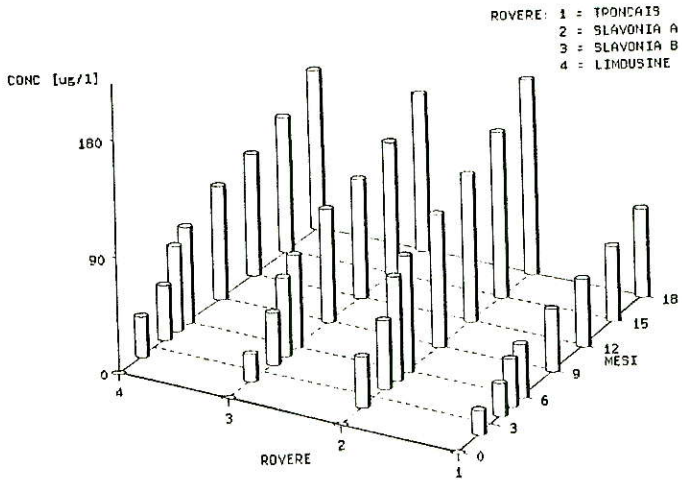

Fig. 2: Evoluzione della Scopoletina in botte nuova da 350 litri.

Fig. 2: Scopoletin evolution in a new 350 lts cask.

Influenza della tostatura

E' nota da tempo una stretta dipendenza tra la concentrazione in composti di degradazione della lignina e la tostatura della botte. Non è noto invece se e come la tostatura influenzi il tenore di Cumarine e quindi si è fatta una prova di verifica al riguardo.

100 g di trucioli di rovere di Slavonia B sono stati tostati per 90 minuti a 150 gradi, simulando una tostatura spinta, quale si può verificare sulla superficie interna della doga. Aliquote di 20 g di questi trucioli sono state estratte per 24 ore a riflusso con refrigerante a ricadere con 500 mL di soluzione di Etanolo 60% portata a pH = 4 con acido acetico. Lo stesso è stato fatto con eguale quantità di trucioli non tostati. Gli estratti sono stati analizzati, ed i risultati (tab. 2) mostrano come una siffatta tostatura non modifichi sensibilmente il contenuto di Scopoletina.

Il tenore di Scopoletina ottenuto per estrazione a caldo è dello stesso ordine di grandezza di quello che si ottiene lasciando in infusione per 16 mesi trucioli non tostati di diversa provenienza in distillati di vino a pieno grado (Etanolo 70%). I risultati sono riportati in tab. 3.

Una prova di estrazione per infusione sullo stesso Limousin di cui a tab. 3, però tostato fino a parziale carbonizzazione della superficie, ha mostrato la scomparsa del 70% della Scopoletina, probabilmente per degradazione termica.

Tabella 2: Tenore in Scopoletina del rovere di Slavonia B prima e dopo tostatura, determinato per estrazione a caldo in soluzione idroalcolica.

Table 2: Scopoletin content in B Slavonian oak-wood before and after its toasting, determined through a heat extraction in hydroalcoholic solution.

Tipo di trucioli	Concentrazione [mg/kg di trucioli]
Types of wood-chips	*Concentrations [mg/kg wood chips]*
Tostati (*Toasted*)	4,7
Non tostati (*Non toasted*)	5,2

Tabella 3: Estrazione a freddo di trucioli non tostati da parte di soluzione idroalcoliche (*) e distillati di vino (**).

Table 3: Cold extraction of non-toasted wood chips from hydroalcoholic solutions (*) and wine distillates (**).

Tipo di trucioli	Scopoletina [mg/kg]	Soluzione estraente
Types of wood-chips	*Scopoletin [mg/kg]*	*Extracting solution*
Limousin	4,7	(*)
Limousin	3,9	(**)
Troncais	3,6	(**)
Slavonia A	4,3	(**)
Slavonia B	8,8	(**)

Influenza della zona di provenienza del rovere

Nel corso di questo lavoro, abbiamo cercato di evidenziare l'effetto della zona di provenienza del rovere sulle cessioni di Scopoletina. Parliamo di influenza della zona, piuttosto che della specie, in quanto non è possibile, in pratica, differenziare tra le specie di rovere utilizzate. Infatti, l'habitat di diffusione naturale è quasi lo stesso per la *Quercus pedunculata (o robur)* e per la *Quercus sessilis* (o *petraea*), le due specie utilizzate in Europa per la costruzione di botti. E' pratica corrente inoltre il taglio contemporaneo delle due varietà, nel bosco, ed infine è molto difficoltosa e non sempre possibile la differenziazione del legno[5]. Per questi motivi, anche se è possibile prevedere che il rovere del Troncais sia costituito in prevalenza da *Q. sessilis*, rivolgeremo la nostra attenzione

alla differenziazione delle zone, considerando le diverse distribuzioni delle due varietà tra le possibili cause di eventuali disomogeneità di composizione. Secondo un lavoro di Joseph del 1971[4], la Scopoletina è più importante nel Cognac invecchiato in rovere di Limousin, rispetto al Troncais. Puech e Moutounet nel 1988[7] hanno dosato la Scopoletina in roveri di cinque regioni, mettendo in evidenza un tenore elevatissimo nella *Q. alba* di provenienza americana, con contenuto dalle 2.5 alle 13 volte superiore ai campioni europei.

Nella nostra ricerca abbiamo prelevato parecchi campioni di Brandy dalla citata cantina di invecchiamento, al fine di avere delle indicazioni statisticamente significative sulla variabilità di questo parametro. La Scopoletina è stata dosata in 28 botti da 350 L contenenti il distillato del 1986, con i risultati riportati in tab. 4.

In questa analisi si evidenzia innanzi tutto una sensibile variabilità, sottolineata dagli altivalori di deviazione standard del campione. I dati non permettono di differenziare tra di loro le due zone francesi. Notiamo invece, pur in presenza di una variabilità da botte a botte ancora più marcata, un tenore di Scopoletina significativamente più elevato nel rovere di Slavonia. Il rilevante contenuto di questa Cumarina nei roveri slavi è confermato anche dall'analisi di un'altra serie di distillati, relativi all'annata successiva (1987) e con 10 mesi di permanenza in fusto nuovo. I dati sono esposti in tab. 5. Si vede che dopo 10 mesi di permanenza in botte slava si ha già un valore pari all'85% di quello raggiungibile dopo 20 mesi in botte francese.

Tabella 4: Tenore in Scopoletina (μg/L) nel Brandy a pieno grado, dopo 20 mesi di permanenza in fusto nuovo da 350 litri.

Table 4: Scopoletin content (μg/L) in full proof Brandy, after a 20 months' stay in a new 350 lts. cask.

Regione di provenienza	Numero botti	Concentrazione media	Deviazione standard
Region of origin	*Number of casks*	*Mean concentrations*	*Standard deviation*
Limousin	6	102,1	13,7
Troncais	5	101,5	26,5
Totale Francia	11	101,8	19,4
Slavonia A	8	131,7	33,5
Slavonia B	9	154,8	34,4
Totale Slavonia	17	143,9	35,0

Tabella 5: Tenore in Scopoletina (μg/L) nel Brandy a pieno grado, dopo 10 mesi di permanenza in fusto nuovo da 350 litri.

Table 5: Scopoletin content (μg/L) in full proof Brandy, after a 10 months' stay in a new 350 lts. cask.

Regione di provenienza	Numero botti	Concentrazione media	Deviazione standard
Region of origin	*Number of casks*	*Mean concentrations*	*Standard deviation*
Limousin	2	64,1	—
Troncais	2	43,5	—
Totale Francia	4	53,8	13,2
Slavonia A	7	82,1	22,2
Slavonia B	5	90,2	19,3
Totale Slavonia	12	85,5	20,6

Esaurimento delle botti

Era nostro scopo anche studiare la velocità di esaurimento delle botti. Abbiamo provato ad impiegare per l'invecchiamento di un distillato di vino fresco alcuni fusti già usati per 9 mesi. Anche questa volta abbiamo analizzato il distillato dopo 10 mesi di permanenza. I risultati sono esposti in tab. 6. Il rallentamento delle cessioni risulta del tutto evidente confrontando i dati con quelli in tab. 5.

Una ulteriore evidenza dell'esaurimento della botte si ha con la seguente prova: abbiamo riempito con due partite omogenee di Brandy (provenienti dal primo invecchiamento in botte nuova) 22 fusti da 300 litri di Rovere Limousin usate 5 anni.

I risultati dell'analisi (tab. 7) dopo 12 mesi in fusto usato si possono confrontare con quelli di tab. 5: si riscontrano cessioni da parte delle botti nuove da un minimo di 5 ad un massimo di 27 volte rispetto alle cessioni delle botti usate. Il basso valore di deviazione standard indica che le differenze nel tenore di Scopoletina tra le botti usate sono quasi completamente sparite.

Tabella 6: Tenore in Scopoletina (μg/L) nel Brandy a pieno grado, dopo 10 mesi di permanenza in fusto nuovo da 350 litri al secondo impiego.

Table 6: Scopoletin content (μg/L) in full proof Brandy, after a 10 months' stay in a new 350 lts. cask used for the second time.

Regione di provenienza	Numero botti	Concentrazione media	Deviazione standard
Region of origin	*Number of casks*	*Mean concentrations*	*Standard deviation*
Limousin	6	36,9	7,4
Troncais	5	28,0	12,0
Totale Francia	11	32,9	10,4
Slavonia A	5	50,4	10,9
Slavonia B	4	52,9	7,0
Totale Slavonia	9	51,5	8,9

Tabella 7: Analisi di distillati posti per 9 mesi in botte nuova, e successivamente 12 mesi in botte usata. Le concentrazioni di Scopoletina sono in μg/L.

Table 7: Analysis of distillates after 9 months in new casks and 12 months in used casks. Scopoletin concentrations are in μg/L.

Partita di brandy	Numero di botti	Concentrazione media inizio	Concentrazione media fine	Crescita media	Deviazione standard
Brandy batch	*Number of casks*	*Mean concentrations beginning*	*Mean concentrations end*	*Mean growth*	*Standard deviation*
I	16	88,1	91,4	3,3	2,5
II	6	74,2	82,9	8,7	4,2

Conclusioni

La rapidità del metodo analitico e la possibilità di automazione lo rendono utilizzabile per controlli di routine sul distillato.

Si è confermato come l'invecchiamento dei distillati in fusti di rovere causi un progressivo aumento del tenore di Scopoletina, dipendente dall'età del fusto e dal tempo di permanenza nello stesso.

La variabilità delle cessioni di Scopoletina tra le botti nuove è molto elevata.
Si è notata una cessione media più elevata da parte del rovere slavo.
Si è verificato come la botte si impoverisca rapidamente nel tempo.
L'utilizzo per 10 mesi di fusti nuovi provoca cessioni superiori di un fattore da 5 a 27 rispetto all'uso di fusti con 5 anni di sfruttamento.

Ringraziamenti: si ringrazia la Sig.na Carla Sanchez dell'Istituto Agrario Prov. di S. Michele per il contributo alla parte analitica.

Bibliografia

1. ANONIMO (1987). *Bozza di Disciplinare di produzione dei Brandy a Denominazione di Origine Controllata*. Atti del Convegno sul Brandy Italiano d'Origine, Castelmaggiore (BO), 11 Dicembre; 61-63.
2. BALDWIN S., BLACK R.A., ANDREASEN A.A., ADAMS L. (1967). *Aromatic congener formation in maturation of alcoholic distillates*. J. Agr. Food Chem., (15): 381-385.
3. BERTRAND A. SEGUR M.-C. (1988). *Une approche de la degustation analytique des eaux-de-vie d'Armagnac*. Conn. Vigne Vin, (22): 233-235.
4. JOSEPH E., MARCHE M. (1972). *Contribution a l'etude du vieillissement du Cognac - identification de la scopoletine, de l'aesculetine, de l'ombelliferone, de la ß-methyl-ombelliferone, de l'aesculine, et de la scopoline, heterosides provenant du bois*. Conn. Vigne Vin, (6): 273-330.
5. KELLER K. (1987). *Differentes varietées de chenes et leur repartition dans le monde*. Conn. Vigne Vin, (21): 191-229.
6. OTSUKA K., KENIBAYASHI Y. (1974). *On the determination of scopoletin in aged distilled liquors*. Agr. Biol. Chem., (38): 1079-1080.
7. PUECH J.-L., MOUTOUNET M. (1988). *Liquid chromatographic determination of scopoletin in hydroalcoholic extract of oak wood and in matured distilled alcoholic beverages*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., (71): 512-514.
8. TRICARD C., SALAGOITY M.-H., SUDRAUD P. (1987). *La scopoletine: un marqueur de la conservation en futs de chene*. Conn. Vigne Vin, (21): 33-41.
9. VERSINI G., MATTIVI F., DALLA SERRA A., DELL'EVA M. (1987). *Invecchiamento e caratteristiche chimiche e organolettiche*. Atti del Convegno sul Brandy Italiano d'Origine, Castelmaggiore (BO), 11 Dicembre; 33-38.