

# MISURA E IMPATTO DEL 4-ETILCATECOLO IN VINO

G. Nicolini <sup>(1)</sup>, R. Larcher <sup>(1)</sup>, D. Bertoldi <sup>(1)</sup>, T. Nardin <sup>(1)</sup>, C. Puecher <sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup> FEM-IASMA Research Centre,

Via E. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN), Italia

<sup>(2)</sup> CAVIT S.C.

Via del Ponte di Ravina 31, 38100 Trento, Italia

roberto.larcher@iasma.it

## RIASSUNTO

Tra gli etilfenoli (EF), la presenza e il significato sensoriale del 4-etilcatecolo (4-EC) sono stati poco studiati. Il lavoro presenta un metodo HPLC-CEAS (coulometric electrode array system) per la misura del 4-EC senza preparativa e derivatizzazione, lineare fino a 1520 µg/L, preciso (RSD < 3 %) e con un limite di quantificazione (2.2 µg/L) ben sotto la soglia olfattiva di letteratura (s.o.; 50 µg/L). Si presenta anche un più economico approccio analitico alla misura del 4-EC per HPLC-FLD (detector fluorimetrico) che fornisce misure ben correlate con quelle in HPLC-CEAS ma con sensibilità molto minore (LOQ 185 µg/L). Il 4-EC era in contenuti significativamente maggiori nei vini rossi (fino a ca. 1600 µg/L in vini difettati), e qualche volta prossimo o superiore alla citata s.o. anche in vini bianchi e passiti. Il metodo per HPLC-FLD può fornire - assieme alla misura più importante del 4-etilfenolo - un'informazione addizionale ed economica. Solo aggiunte di 4-EC variabili tra i 100 ed i 800 µg/L davano vini sensorialmente percepiti come differenti incidendo meno pericolosamente sulla qualità aromatica rispetto agli altri EF.

## ABSTRACT

Of the ethylphenols (EPs), the presence and sensorial significance of 4-ethylcatechol (4-EC) in wine has been less investigated. The paper describes a method for the measure of 4-EC using HPLC with a coulometric electrode array system (CEAS) not requiring sample preparation or derivatization, linear up to 1520 µg/L, precise (RSD < 3 %) and with LOQ of 2.2 µg/L, far below the 4-EC olfactory threshold (o.t.; 50 µg/L) in literature. A cheaper fluorimetric approach (HPLC-FLD) is also described. Its results are well correlated with those by HPLC-CEAS but sensitivity is lower (LOQ 185 µg/L). 4-EC was significantly higher in red wines, up to about 1600 µg/L in defective wines, being sometimes close to or higher than the cited o.t. also in white and raisin wines. The HPLC-FLD could offer – simultaneously giving the much more important measure of 4-ethylphenol – a cheap and additional information. Only white and red wines spiked with at least 100-800 µg/L of 4-EC were different from the control but not judged negatively. 4-EC seems to affect wine aroma quality in a less dangerous manner than the other EPs.

## INTRODUZIONE

I fenoli volatili (FV) nel vino sono studiati ormai da 40 anni (Webb, 1967; Dubois e Brulè, 1970) ed oggi non è più in discussione che il tenore di etilfenoli nei rossi è sostanzialmente dovuto alla presenza di *Brettanomyces*. Questi composti, solitamente presenti in concentrazioni variabili da qualche decina a diverse centinaia di microgrammi per litro, in vini

indiscutibilmente ed irrimediabilmente difettati possono arrivare anche a tenori di qualche milligrammo determinando sentori che nel loro complesso vengono definiti come fenolici, da medicinale, farmacia, fumo, spezie ... (Montedoro e Bertuccioli, 1986; Rapp e Versini, 1996). Gli approcci analitici alla quantificazione dei fenoli volatili vedono in primo luogo la gascromatografia (GC) con vari detector - olfattometrico, a ionizzazione di fiamma (GC-FID) o a spettrometria di massa (GC-MS) - applicata a campioni preventivamente purificati e concentrati con processi di estrazione liquido-liquido o su fase solida (SPE), o con microestrazione (SPME) anche in spazio di testa (HS-SPME). In anni più recenti è stata utilizzata anche la tecnica in cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), con differenti detector - coulometrico (CEAS), MS-MS, Diode Array e fluorimetro (FLD) (Larcher *et al.*, 2007; Nicolini *et al.*, 2007; Caboni *et al.*, 2007) - e metodiche aventi nel loro complesso quelle caratteristiche di rapidità e costo che permettono e semplificano finalmente anche per questi la realizzazione di controlli di processo in vinificazione.

Tra gli etilfenoli, la presenza e il significato sensoriale del 4-etilcatecolo (4-EC) sono stati decisamente meno studiati e solo 2 metodi erano disponibili fino al 2007 (Hesford e Schneider, 2004; Hesford *et al.*, 2004; Carrillo e Tena, 2007), ambedue in GC-MS.

Il lavoro mette a confronto 2 metodiche HPLC per la determinazione del 4-EC, la prima utilizzante un detector coulometrico e la seconda uno fluorimetrico. Parallelamente sono stati indagati i contenuti di 4-EC in vini italiani e verificato il ruolo sensoriale di questo composto in vini bianchi e rossi.

## **MATERIALI E METODI**

### **Metodo HPLC-CEAS**

Si è utilizzato un HPLC Alliance 2695 (Waters Corp., Milford, MA) dotato di un detector elettrochimico coulometrico ad 8 elettrodi (5600A, ESA, Bedford, MA) impostati a potenziali da 100 a 700mV. Il sistema di misura era composto di 2 pacchetti di celle in serie, ognuna di 4 elettrodi di lavoro in grafite porosa, con elettrodo di riferimento allo stato solido Pd/H<sub>2</sub> inserito nella cella e contro elettrodo di Pt.

La separazione cromatografica è stata condotta in condizioni isocratiche (soluzione 50mM di NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> aggiustata a pH 3.40 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; ACN:MeOH, 65:30:5, in vol./vol./vol.) utilizzando una colonna LiChroCART RP-18e Purospher (125mm×3mm, 5 µm particle size; Merck, Darmstadt, Germany).

Il campione di vino veniva preventivamente passato su filtro da 0.45 µm (25 mm, PTFE; Alltech, Deerfield, IL). Il flusso era di 0.6 mL·min<sup>-1</sup>, il volume di iniezione di 10 µL ed il tempo analitico di 12-14 minuti (Larcher *et al.*, 2008).

### **Metodo HPLC-FLD**

La separazione è stata condotta su un HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) equipaggiato di detector fluorimetrico (lunghezza d'onda di eccitazione fissata a 282 nm e di emissione a 320 nm). La separazione era ottenuta sotto condizioni isocratiche utilizzando una colonna Zorbax Eclipse Plus C18 column (4.6 mm x 50 mm, 1.8 µm particle size; Agilent) e lo stesso eluente del metodo coulometrico. Il campione era filtrato a 0.45 µm. Il flusso era di 1.5 mL·min<sup>-1</sup>, il volume di iniezione era 10 µL ed il tempo di analisi 5 minuti.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Prestazioni e confronto tra le metodiche

La metodica HPLC-CEAS consente una accurata quantificazione del 4-EC ai potenziali di 180, 260 e 340 mV con un tempo di ritenzione di circa 4.8 minuti (Fig. 1).

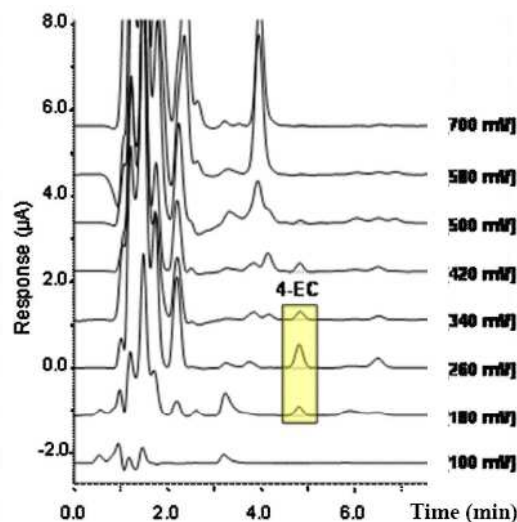


Figura 1: Separazione cromatografica di un vino rosso con metodo HPLC-CEAS per la quantificazione del 4-etilcatecolo

Ha mostrato di essere lineare fino a 1520  $\mu\text{g/L}$  (Segnale in  $\mu\text{C} = 0.0415 \mu\text{C} + 0.0141 \mu\text{C}\cdot\text{L}/\mu\text{g} \cdot \text{Concentrazione in } \mu\text{g/L}$ ;  $R^2=0.9995$ ) (Fig. 2) e molto precisa ( $\text{RSD} < 3\%$ ;  $n^\circ$  di ripetizioni per livello=10) al di sopra dei 2  $\mu\text{g/L}$ .

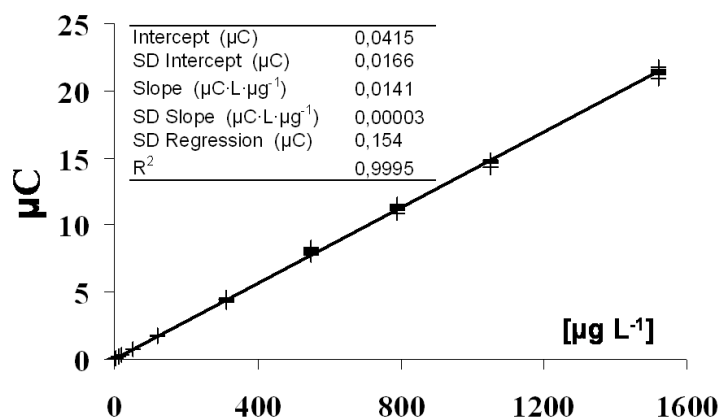


Figura 2: Curva di calibrazione e parametri di regressione del metodo HPLC-CEAS per la quantificazione del 4-etilcatecolo

Il limite di quantificazione è stato stimato pari a 2.2  $\mu\text{g/L}$  e quindi molto minore della soglia olfattiva di 50  $\mu\text{g/L}$  riportata in letteratura per il 4-EC (Hesford *et al.*, 2004).

La metodica HPLC-FLD consente una quantificazione del 4-EC con un tempo di ritenzione di 1.3 minuti (Fig. 3).

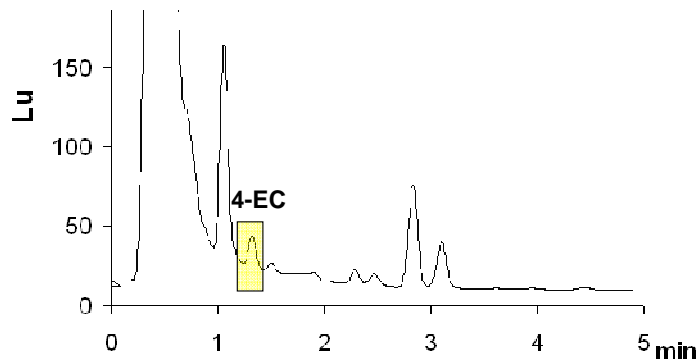


Figura 3: Separazione cromatografica di un vino rosso con metodo HPLC-FLD per la quantificazione del 4-etilcatecolo

E' lineare fino ad almeno 1000  $\mu\text{g/L}$  (Segnale in Lu =  $-0.46 \text{ Lu} + 0.118 \text{ Lu}\cdot\text{L}/\mu\text{g}$  · Concentrazione in  $\mu\text{g/L}$ ;  $R^2=0.9995$ ) (Fig. 4) e sufficientemente precisa ( $\text{RSD} < 3 \%$ ) oltre i  $200\mu\text{g/L}$ . Il limite di quantificazione è stato stimato pari a  $150\text{-}185 \mu\text{g/L}$ .

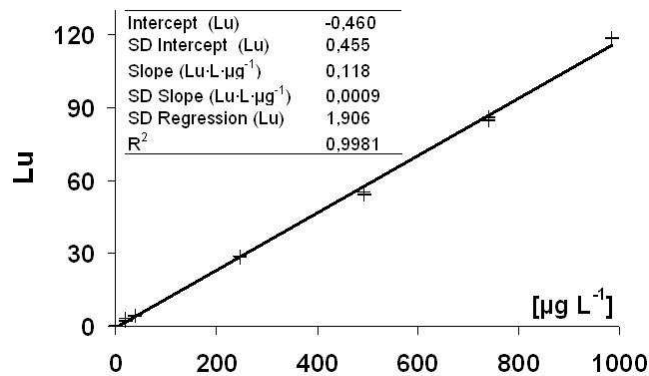


Figura 4: Curva di calibrazione e parametri di regressione del metodo HPLC-FLD per la quantificazione del 4-etilcatecolo

L'applicazione dell'analisi di regressione lineare proposta da Passing e Bablok (1983) ( Fig. 5) a 71 campioni analizzati con ambedue le metodiche ha mostrato che le misure ottenibili per il 4-EC sono ben correlate.

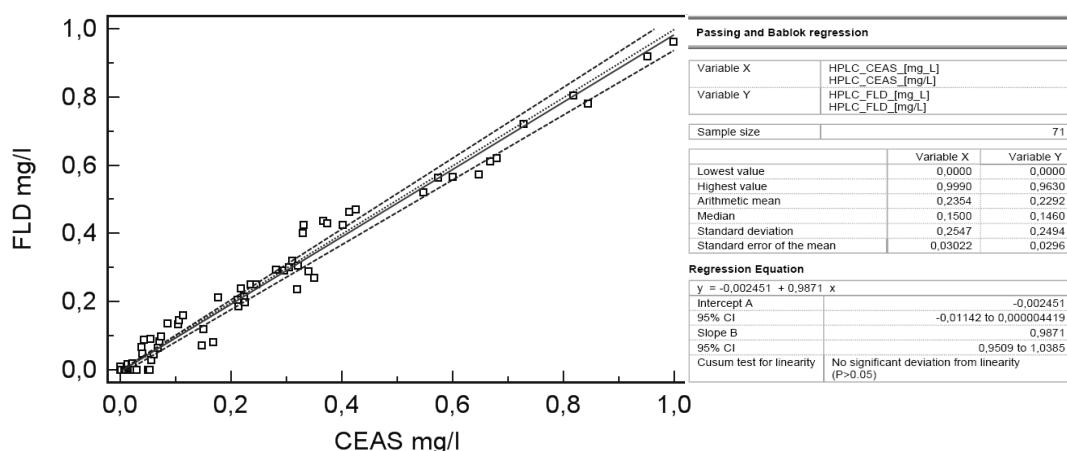


Figura 5: Grafico di correlazione dei 2 metodi ed analisi di regressione lineare secondo Passing e Bablok (1983)

### Applicazioni all'analisi di vini commerciali

Il contenuto di 4-EC è stato misurato in 153 vini rossi, 65 vini bianchi e 32 vini passiti commerciali, questi ultimi appartenenti all'unica tipologia Trentino Vin Santo DOC (Fig. 6).

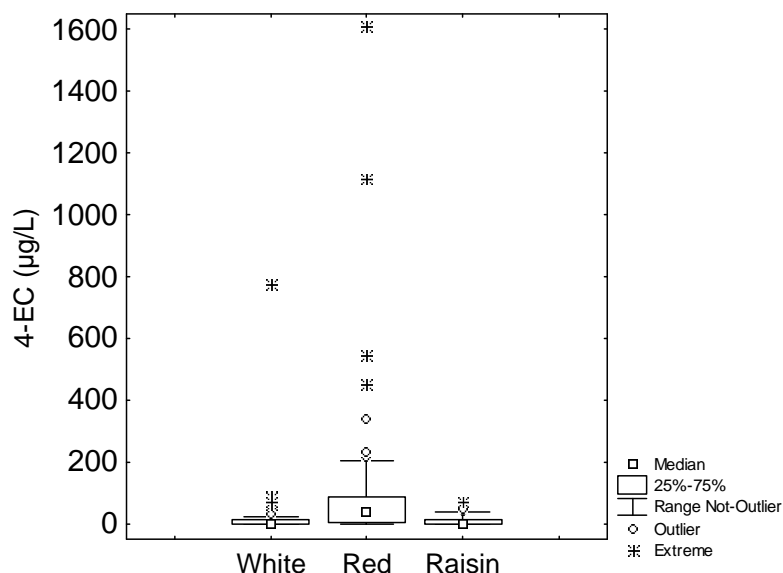


Figura 6: Distribuzione dei contenuti di 4-EC in 153 vini commerciali italiani.

Come atteso in relazione alla genesi del composto, i vini rossi hanno evidenziato contenuti significativamente maggiori (test di Tukey per numerosità di campioni diseguale;  $p < 0.001$ ) rispetto alle altre tipologie. Il composto era presente in quantità solitamente inferiori ai 200 µg/L circa, raggiungendo peraltro contenuti dell'ordine del mg/L in vini che, all'assaggio, erano percepiti come marcatamente difettati anche per presenza concomitante degli altri etilfenoli.

### Significato sensoriale

Alla luce della soglia olfattiva riportata da Hesford et al. (2004) pari a 50 µg/L, circa un quarto dei campioni di vini rossi da noi analizzati dovrebbe essere ritenuto come potenzialmente interferito da sentori riconducibili al 4-EC.

Il significato sensoriale del 4-EC è stato indagato anche da noi sottoponendo al giudizio di enologi professionali, avvezzi all'uso dei più tradizionali test di differenza, dei vini commerciali di elevata qualità e complessità aromatica. Tali vini - totalmente privi di difetti sensorialmente percepibili ed analiticamente assenti di 4-EC - sono stati artificialmente incrementati nel contenuto del fenolo. Dai dati di Tab. 1 si evince che erano percepiti come olfattivamente differenti al duo-trio test i vini bianchi nei quali il 4-EC era stato come minimo incrementato di quantità varianti tra 100 e 200 µg/L, ragionevolmente in relazione con la minore o maggiore ricchezza e complessità aromatica dei vini di partenza. Nel caso dei vini rossi differenze significative erano riscontrabili per aggiunte di 400-800 µg/L, con i valori più alti nel vino Teroldego nel quale erano totalmente assenti gli altri etilfenoli. Anche a questi elevati livelli, tuttavia, nessuno dei vini era ritenuto difettato o comunque negativamente interferito.

**Tabella 1: Risultati dei duo-trio test realizzati su vini artificialmente arricchiti di 4-etilcatecolo**

tipo vino	4-etil catecolo (µg/L)	4-etil fenolo (µg/L)	4-etil guaiacolo (µg/L)	N. giudici	risposte esatte	sign.
Chardonnay	50	< 2	< 2	16	10	n.s.
	100	< 2	< 2	16	12	*
	200	< 2	< 2	16	14	**
Traminer	50	< 2	< 2	16	9	n.s.
	100	< 2	< 2	16	11	n.s.
	200	< 2	< 2	16	13	*
Teroldego	200	< 2	< 2	20	13	n.s.
	400	< 2	< 2	32	17	n.s.
	800	< 2	< 2	32	26	***
Cabernet	200	190	86	22	13	n.s.
	400	190	86	32	22	*
	800	190	86	32	24	**
Merlot barrique	300	195	45	21	13	n.s.
	600	195	45	21	15	*
	900	195	45	21	16	*

## CONCLUSIONI

Le metodiche messe a punto consentono anche in HPLC la quantificazione accurata del 4-etilcatecolo nei vini, pur con una rilevante differenza in termini di sensibilità. La metodica in coulometria consente infatti la quantificazione anche a livelli di pochi µg/L, mentre in fluorimetria sono quantificabili solo contenuti superiori ai 150 µg/L.

Rispetto agli altri etilfenoli, il contributo aromatico del 4-EC non è apparso particolarmente negativo e le soglie di percezione sono risultate più elevate di quanto precedentemente riportato in letteratura per lo stesso composto. Esso contribuisce piuttosto all'aromaticità complessiva - per concentrazioni attorno alla soglia di differenza o anche superiori, in qualche caso fino al mg/L, - con note speziate, balsamiche, legnose e talvolta lontanamente da fumo.

In relazione alle soglie sensoriali, la metodica in fluorimetria - meno sensibile ma anche meno costosa - può essere utile nel controllo del 4-EC ove sia già applicata per la quantificazione, certamente più importante tecnologicamente, del 4-etilfenolo nel controllo di processo.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia Cavit S.C. per il supporto finanziario.

## BIBLIOGRAFIA

Caboni P., Sarais G., Cabras M., Angioni A., 2007. Determination of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in wines by LC-MS-MS and HPLC-DAD-Fluorescence. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 7288-7293.

Carrillo J., Tena M., 2007. Determination of ethylphenols in wine by in situ derivatisation and headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387: 2547–2558.

Dubois P., Brulè G., 1970. Étude des phénols volatiles des vins rouges. *C.R. Acad. Sci. Série D.*: 1797-1798.

Hesford F., Schneider K., 2004. Die Entdeckung eines dritten Ethylphenols als Mitverursacher des Brettanomyces-Fehltons. *Schweiz. Z. Obst- und Weinbau*, 13, 11-13.

Hesford F., Schneider K., Porret N.A., Gafner J., 2004. Identification and analysis of 4-ethyl catechol in wines tainted by Brettanomyces off-flavour. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55(3): 304A.

Larcher R., Nicolini G., Puecher Chr., Bertoldi D., Moser S., Favaro G., 2007. Determination of volatile phenols in wine using high-performance liquid chromatography with coulometric array detector. *Anal. Chim. Acta* 582: 55-60.

Montedoro G., Bertuccioli M., 1986. The flavour of wines, vermouth and fortified wines. *In: Food flavours*. I.D. Morton, A.J. MacLeod (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 171-238.

Nicolini G., Larcher R., Bertoldi D., Puecher C., Magno F., 2007. Rapid quantification of 4-ethylphenol in wine using high-performance liquid chromatography with a fluorimetric detector. *Vitis*, 46 (4): 202-206.

Passing H., Bablok W., 1983. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 21: 709-720.

Rapp, A.; Versini, G, 1996. Flüchtige phenolische Verbindungen in Wein. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 92(2): 42-48.

Webb, A.D., 1967. Wine flavor: volatile aroma compounds of wines. *In: The chemistry and physiology of flavours*. H.W. Schultz, E.A. Day, L.M. Libbey (Eds.), The AVI Publishing Company Inc., Westport Co., 203.