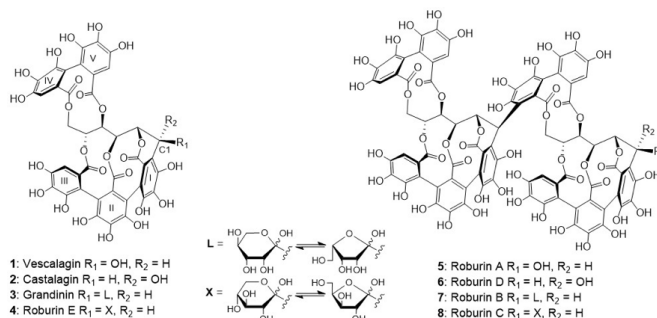


# Quantificazione degli ellagitannini in legno di quercia e Cognac

Fonte: articolo scientifico "Validation of a Mass Spectrometry Method to Identify and Quantify Ellagitannins in Oak Wood and Cognac during Aging in Oak Barrels." (Food Chem., 2020)<sup>1</sup>.

>>> Gli ellagitannini sono i principali composti fenolici estraibili del legno di quercia. Questi composti sono responsabili dell'elevata durabilità del legno e possono contribuire alla qualità organolettica del vino e dei distillati (colore, astringenza e amaro). Nonostante la loro importanza, la loro presenza e le forme in cui sono presenti nei distillati non sono ben note. Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di sviluppare e validare un metodo di analisi e di quantificare gli ellagitannini del legno di quercia nel Cognac. <<<



**Figura 1.** Strutture chimiche degli ellagitannini 1-8. L e X corrispondono rispettivamente a Lixosio e Xilosio (adattato da Gadrat *et al.*)<sup>1</sup>.

Per le loro proprietà, le botti di rovere sono da molto tempo parte integrante della produzione di vino e distillati. Esse forniscono un buon isolamento termico, hanno una notevole impermeabilità e soprattutto contribuiscono alla qualità organolettica di vini e distillati. Durante l'invecchiamento in botti di rovere, la composizione di vini e distillati cambia a causa del rilascio di composti del legno, che ne influenzano le proprietà organolettiche, come aroma e colore, e anche le sensazioni tattili e il gusto, come astringenza e amaro<sup>2</sup>. Tra questi composti, gli ellagitannini (tannini idrolizzabili) sono responsabili dell'elevata durabilità del legno<sup>3</sup>, mostrano attività antiossidante<sup>4</sup> e influiscono sull'amaro e sulla sensazione<sup>5</sup> di astringenza.

Finora sono stati identificati otto ellagitannini (Figura 1). Questi composti sono stati ampiamente studiati nel vino rosso<sup>6</sup>, ma molto raramente nei distillati, in particolare nel Cognac. A causa della loro elevata reattività e delle somiglianze strutturali, è difficile rilevare e quantificare gli ellagitannini nei distillati. Pertanto, lo scopo del nostro studio è stato quello di identificare e quantificare questi composti nel legno di quercia e nei distillati, utilizzando un metodo rapido e validandolo.

## Metodo di quantificazione degli ellagitannini

La sfida di questo lavoro è stata quella di sviluppare un metodo altamente selettivo, semplice e riproducibile per quantificare i singoli ellagitannini in legno di quercia e nell'acquavite. La combinazione cromatografia liquida ad alte prestazioni-triplo quadrupolo LC-QQQ è sembrata essere una tecnica potente per i composti fenolici<sup>1</sup>.

Per caratterizzare gli ellagitannini in legno di quercia e nel Cognac, è stato implementato un metodo di spettrometria di massa.

L'analisi del legno di quercia è stata effettuata su campioni di doghe conservati all'aperto per 36 mesi. Per l'analisi del Cognac sono stati utilizzati 20 campioni di acquavite invecchiati per 6 mesi in botti di rovere.

Tutte le concentrazioni sono state espresse come vescalagina-equivalenti. La quantificazione dei singoli ellagitannini è stata eseguita in modalità negativa ed essi sono stati identificati dalle seguenti masse: (-)-vescalagina e (-)-castalagina, monomeri e isomeri con un rapporto

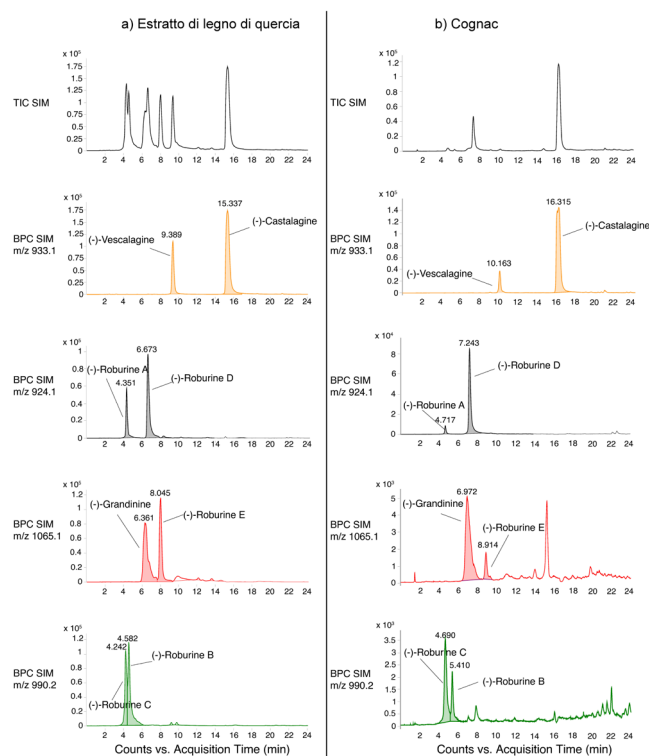
m/z identico di 933,0634 (C<sub>41</sub>H<sub>25</sub>O<sub>26</sub>); (-)-grandinina e (-)-roburina E, monomeri glicosilati con strutture simili e un rapporto m/z identico di 1065,1057 (C<sub>46</sub>H<sub>33</sub>O<sub>30</sub>); allo stesso modo, roburina A e D, due dimeri con un rapporto m/z identico di 1849,1241 (C<sub>82</sub>H<sub>49</sub>O<sub>51</sub>), ma essendo molecole bicariche, sono più facilmente osservabili in spettrometria di massa con un rapporto m/z di 924,5620; infine, roburina B e C, due dimeri glicosilati con un rapporto m/z identico di 1981,1664 (C<sub>87</sub>H<sub>57</sub>O<sub>55</sub>), ma come roburina A e D, sono molecole bicariche, quindi sono meglio osservabili a un rapporto m/z di 990,5831.

Gli otto ellagitannini di legno di quercia sono stati determinati in tutti i campioni e tutte le concentrazioni sono state misurate utilizzando la curva di calibrazione della vescalagina. La Figura 2 mostra gli otto cromatogrammi degli ellagitannini in base alla loro forma e al loro tempo di ritenzione determinati negli estratti di legno di quercia analizzati (Figura 2a) e nel Cognac (Figura 2b). Il metodo di quantificazione è stato validato<sup>1</sup> in termini di LOD, LOQ, sensibilità, linearità nel range di lavoro, ripetibilità e precisione. Per determinare la precisione, sono state iniettate successivamente cinque repliche di due concentrazioni intermedie (2 mg/L e 20 mg/L) della curva di calibrazione. La ripetibilità (RSD) era <2% a 2 mg/L e <1% a 20 mg/L, garantendo così una buona ripetibilità del metodo.

## Determinazione degli ellagitannini in campioni di legno di quercia

Per analizzare gli ellagitannini nel legno di rovere, sono state studiate 9 doghe prelevate da diverse posizioni di un pallet: 3 campioni nella parte inferiore, 3 nella parte mediana e 3 nella parte superiore del pallet<sup>1</sup>. Tutte le concentrazioni sono state espresse come milligrammi di vescalagina equivalenti per grammi di legno in base al fattore di diluizione. Le concentrazioni totali dei singoli ellagitannini variavano da 10,37 a 18,77 mg vescalagina equivalenti/g. L'analisi statistica ANOVA ha mostrato che il contenuto in ellagitannini dipendeva dalla posizione del legno all'interno del pallet.

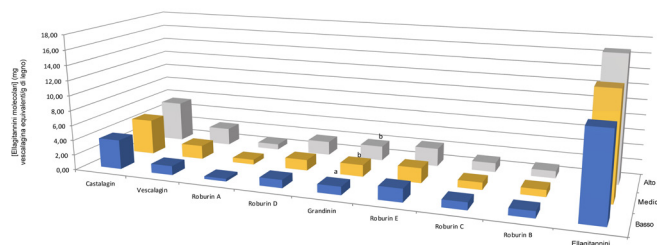
Con una significatività di  $p < 0,05$ , il contenuto di ellagitannini totali è significativamente differente a seconda della posizione delle doghe all'interno del pallet: il contenuto aumenta dall'alto (11,27 mg vescalagina equivalenti/g di legno) al fondo del pallet (16,72 mg vescalagina equivalenti /g di legno) (Figura 3). Questo era anche il caso della castalagina e della roburina D. Per gli altri ellagitannini le differenze osservate erano inferiori o non significative. Questo studio preliminare ha contribuito a ottimizzare il campionamento dei pezzi di legno per ottenere una buona rappresentatività delle concentrazioni di ellagitannini nel legno di quercia.



**Figura 2.** Analisi LC-MS/MS in modalità negativa di a) estratto di legno di quercia e b) Cognac, corrispondente agli ioni  $[M-H]^-$  degli ellagitannini (adattato da Gadrat *et al.* 2020<sup>1</sup>).

## ■ Determinazione degli ellagitannini in campioni di Cognac

Il metodo sviluppato in questo studio è stato anche applicato per quantificare gli ellagitannini nel Cognac. Venti campioni di giovane Cognac invecchiato in legno sono stati analizzati utilizzando quattro repliche per ogni "acquavite". Gli ellagitannini sono stati rilevati in tutti i campioni. I risultati hanno mostrato che le acquaviti giovani contenevano tutti gli otto ellagitannini. Tuttavia, ogni singolo ellagitannino aveva il proprio modello di estrazione. La castalagina rappresentava circa il 40-70% degli ellagitannini totali estratti. Questo monomero è l'ellagitannino maggioritario nel legno di quercia ed è più stabile del suo isomero, la vescalagina, a causa della posizione dell'idrossile sul carbonio 1. Il dimero di roburina D e il monomero glicosilato della grandinine sono gli ellagitannini più estraibili dopo la castalagina. In generale, la concentrazione totale di ellagitannini variava da 1,9 a 9,3 mg vescalagina equivalenti/L. Poiché le concentrazioni individuali di ellagitannina nel Cognac non erano mai state analizzate prima di questo studio, i valori osservati qui sono i primi ad essere riportati per tale distillato. Nei brandy, la somma di vescalagina e castalagina è stata riportata essere compresa tra 9 e 12 mg acido gallico equivalenti/L<sup>7</sup>. In un vino rosso francese Cabernet Sauvignon, la somma delle concentrazioni dei singoli ellagitannini variava da 0,6 a



**Figura 3.** Contenuto degli otto principali ellagitannini del legno prelevati da doghe a tre diversi livelli (basso, medio, alto) nel pallet; a-c mostra le differenze significative tra le diverse posizioni ( $p < 0,05$ ) (adattato da Gadrat *et al.*, 2020<sup>1</sup>).

15,5 mg castalagina equivalenti/L per sei e dodici mesi di invecchiamento in fusti di rovere, rispettivamente. I vini Cabernet Sauvignon italiani e americani presentavano una concentrazione totale tra 0,5 e 5,76 mg castalagina equivalenti/L e tra 0,6 e 12,4 mg castalagina equivalenti/L dopo sei e dodici mesi di invecchiamento rispettivamente. Come nel vino rosso, la castalagina è il componente più abbondante nel Cognac e rappresenta dal 68 al 79% della frazione totale di ellagitannini<sup>8</sup>.

## ■ Conclusione

Per la prima volta, gli ellagitannini di quercia contenuti nel Cognac sono stati quantificati con precisione utilizzando un metodo spettrometrico rapido e accurato. Questo metodo validato è stato applicato con successo al rilevamento e alla quantificazione degli otto principali ellagitannini di quercia in diversi campioni di legno di quercia e acquaviti (Cognac). ■

*Mathilde Gadrat*<sup>1,2</sup>, *Joel Lavergne*<sup>2</sup>, *Catherine Emo*<sup>2</sup>, *Pierre-Louis Teissedre*<sup>1</sup>, *Kleopatra Chira*<sup>1</sup>

1 Unité de recherche CEnologie, EA 4577, USC 1366 INRAE, ISVV, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, F33882 Villenave d'Ornon France  
2 Courvoisier SAS, 2 places du château, 16200 Jarnac, France

**1** Gadrat, M.; Lavergne, J.; Emo, C.; Teissedre, P.-L.; Chira, K. Validation of a Mass Spectrometry Method to Identify and Quantify Ellagitannins in Oak Wood and Cognac during Aging in Oak Barrels. *Food Chem.* 2020, 128223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128223>.

**2** Li, S.-Y.; Duan, C.-Q. Astringency, Bitterness and Color Changes in Dry Red Wines before and during Oak Barrel Aging: An Updated Phenolic Perspective Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019, 59 (12), 1840–1867. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1431762>.

**3** Scalbert, A.; Monties, B.; Dupouey, J. L.; Becker, M. Polyphénols Extractibles Du Bois de Chêne : Variabilité Interspécifique, Interindividuelle et Effet de La Duraminisation. *Bull. Liaison Groupe Polyphenol* 1986, No. 13, 617–619.

**4** Alañón, M. E.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; Gordon, M. H.; Pérez-Coello, M. S. A Study of the Antioxidant Capacity of Oak Wood Used in Wine Ageing and the Correlation with Polyphenol Composition. *Food Chem.* 2011, 128 (4), 997–1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.005>.

**5** Chira, K.; Teissedre, P.-L. Chemical and Sensory Evaluation of Wine Matured in Oak Barrel: Effect of Oak Species Involved and Toasting Process. *Eur. Food Res. Technol.* 2015, 240 (3), 533–547. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2352-3>.

**6** González-Centeno, M. R.; Chira, K.; Teissedre, P.-L. Comparison between Malolactic Fermentation Container and Barrel Toasting Effects on Phenolic, Volatile, and Sensory Profiles of Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65 (16), 3320–3329. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05497>.

**7** Canas, S.; Casanova, V.; Pedro Belchior, A. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Portuguese Wine Aged Brandies. *J. Food Compos. Anal.* 2008, 21 (8), 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.001>.

**8** González-Centeno, M. R.; Chira, K.; Teissedre, P.-L. Ellagitannin Content, Volatile Composition and Sensory Profile of Wines from Different Countries Matured in Oak Barrels Subjected to Different Toasting Methods. *Food Chem.* 2016, 210, 500–511. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.139>.