

Els principals reptes pel al desenvolupament dels mètodes d'anàlisi de 3-alkil-2-metoxipirazines (MPs) en mostos i vins han estat aconseguir uns límits de detecció inferiors a 1 ng/L i uns percentatges de recuperació alts. En aquest capítol es comenten les principals qüestions plantejades i les solucions adoptades, així com els passos realitzats per arribar als mètodes desenvolupats.

Per a la concentració i aïllament dels analits s'han estudiat les possibilitats de diferents tècniques d'anàlisi d'aromes, bàsicament l'extracció líquid-líquid, l'extracció en fase sòlida, la destil·lació i la microextracció en fase sòlida de l'espai de cap (HS-SPME), així com diferents combinacions de les mateixes. La HS-SPME ha proporcionat els millors resultats i ha constituït la base dels mètodes per a la determinació de les MPs en mostos i vins que s'han desenvolupat.

4.1. Materials

Degut a les exigències pròpies de la determinació de mostres a nivell d'ultra-traces, tots els analits, i patrons interns (ISs) utilitzats, així com els reactius i solucions han estat de gran puresa i tots ells han estat tractats amb el màxim rigor pel que fa a la seva conservació. El material de laboratori ha estat constantment objecte d'una neteja escrupulosa. Finalment, tots els materials d'extracció han estat usats d'acord amb les instruccions dels fabricants a fi d'optimitzar-ne el rendiment i la duració.

4.1.1 Analits i patrons interns

Al llarg d'aquest treball s'han emprat sobretot 4 patrons interns diferents: la pirazina, la 2-etil-pirazina, la tetrametilpirazina i la 3-isopropil-2-metoxipirazina. La Taula 1 resumeix els analits i patrons interns emprats, indicant el número del *Chemical Abstracts Service* (CAS) de cadascun d'ells.

Les pirazines són sensibles a la fotodegradació (1), per la qual cosa, al llarg d'aquest treball s'ha tingut especial cura per tal d'assegurar que aquest factor no fos una font de biaix dels resultats. Totes les solucions que contenien pirazines han estat conservades en botelles de vidre de color ambre i en tots els processos que podien implicar una exposició dels analits a la llum, l'equipament que contenia les pirazines s'ha tapat amb una peça de roba negra o bé amb paper d'alumini. S'ha fet un estudi d'estabilitat de les pirazines durant l'emmagatzematge en condicions de foscor a -20°C en què s'han comparat els pics dels patrons emmagatzemats durant diferents períodes de temps amb els d'una solució acabada de preparar a fi de detectar possibles diferències quantitatives. I s'ha conclòs que les pirazines estudiades són estables almenys durant 19 mesos.

	COMPOST			MW	Nº CAS	BP (°C)
ANALITS	2-metoxipirazina	MP	C ₅ H ₆ N ₂ O	110,1	3149-28-8	61 (29mm Hg)
	3-metil-2-metoxipirazina	MEMP	C ₆ H ₈ N ₂ O	124,1	2847-30-5	
	3-etil-2-metoxipirazina	ETMP	C ₇ H ₁₀ N ₂ O	138,2	25680-58-4	
	3-isopropil-2-metoxipirazina	IPMP	C ₈ H ₁₂ N ₂ O	152,2	25773-40-4	
	3-sec-butil-2-metoxipirazina	SBMP	C ₉ H ₁₄ N ₂ O	166,2	24168-70-5	218-219
	3-isobutil-2-metoxipirazina	IBMP	C ₉ H ₁₄ N ₂ O	166,2	24683-00-9	214-215
PATRONS INTERNES	pirazina	PY	C ₄ H ₄ N ₂	80,1	290-37-9	115-116
	2-etilpirazina	ETPY	C ₆ H ₈ N ₂	108,2	13925-00-3	152-153
	tetrametilpirazina	TMPY	C ₈ H ₁₂ N ₂	136,2	1124-11-4	190
	3-isopropil-2-etoxipirazina	IPEP	C ₉ H ₁₄ N ₂ O	166,2	72797-16-1	

Taula 1. Analits i patrons interns emprats al llarg d'aquesta tesi. MW: pes molecular; Nº CAS: número del *Chemical Abstracts Service*; BP: punt d'ebullició a 760 mm Hg.

4.1.2. Reactius i solucions

Els dissolvents emprats en aquesta tesi, tots de Scharlab (Barcelona) i de qualitat HPLC o Pestipur, han estat els següents: acetona, diclorometà, acetat d'etil, hexà, pentà, etanol i èter etílic.

El desenvolupament de mètodes analítics a nivell d'ultra-traces és molt exigent pel que fa a la neteja. En conseqüència, en la feina del dia a dia, la neteja més escrupulosa de tot el material de laboratori ha estat de la màxima importància. Igualment, els dissolvents emprats, han estat tractats amb la màxima cura a fi d'obtenir i mantenir les condicions òptimes de puresa requerides. Tota l'aigua de qualitat MilliQ emprada als procediments de HS-SPME ha estat bullida durant 20 min i refredada a temperatura ambient abans de l'inici de l'experimentació. L'etanol s'ha purificat de la següent manera: es prepara una solució de 300 mL d'etanol i 700 mL d'aigua MilliQ, s'hi afegeix 100 mL de diclorometà, s'agita en un embut de decantació durant 5 min i es separa el diclorometà. Es destil·la la fase hidro-alcohòlica, descartant els primers 25 mL i recuperant aproximadament uns 250 mL de destil·lat. Aquest procediment de neteja s'ha aplicat a tot l'etanol utilitzat per als mètodes en què intervenia la tècnica de LLE amb diclorometà. L'èter etílic utilitzat s'ha netejat de peròxids abans de la seva utilització. El procediment de neteja ha estat el següent: Es prepara una solució reductora pesant 18 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, afegint-hi 110 mL de H_2O i 6 mL de H_2SO_4 concentrat i agitant. Es posa 500 mL d'èter etílic en un embut de decantació d'1 L i s'hi afegeix 5 mL de la solució reductora. S'agita, es decanta i es separa la fase aquosa. Es repeteix el procés 4 vegades. Es renta 4 vegades amb 100 mL d'aigua MilliQ. S'asseca amb CaCl_2 durant un mínim de 24 h i es filtra (2).

Les solucions mare s'han preparat de la següent manera: les solucions de 200 mg/L afegint 5 mg del patró i portant a 25 mL amb el dissolvent; les solucions d'1 mg/L afegint 1 mL de la solució mare de 200 mg/L i portant a 200 mL amb el dissolvent. Les solucions de treball, de concentracions més baixes, s'han preparat a partir d'aquestes. Per tal de facilitar la dissolució dels patrons en solucions aquoses, principalment als mostos i vins, les solucions emprades s'han preparat en etanol.

4.1.3. Material d'extracció

Les principals tècniques d'extracció utilitzades al llarg d'aquesta tesi han estat l'extracció líquid-líquid (LLE), l'extracció en fase sòlida (SPE) i la micro-extracció en fase sòlida de l'espai de cap (HS-SPME). A continuació es comenta el material emprat en cadascuna d'aquestes tècniques.

Els cartutxos de SPE utilitzats han estat proveïts per Varian (Zug, Suïssa) i contenen 500 mg de sorbent i una capacitat de 2,8 mL. La Taula 2 resumeix les característiques de les principals fases estacionàries emprades. Els procediments de condicionament de les mateixes s'han realitzat segons indicació del fabricant.

INTERACCIÓ	SORBENT	ESTRUCTURA
POLAR	2OH: Diol	$\begin{array}{c} \\ \text{---Si---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH---CH}_2 \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \quad \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$
	Si: Sílice	$\begin{array}{c} \\ \text{---Si---OH} \\ \end{array}$
BESCANVI DE CATIONS	SCX: Àcid benzensulfònic	$\begin{array}{c} \\ \text{---Si---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---} \langle \text{benzene ring} \rangle \text{---SO}_3\text{---} \\ \end{array}$

Taula 2. Característiques de les principals fases de SPE utilitzades.

Als experiments en què s'ha treballat amb solucions dels analits s'ha emprat el format de cartutx de SPE. En canvi, l'aplicació d'aquesta tècnica a mostres reals ha requerit l'ús de resines en pols, les quals permeten ajustar-ne la quantitat necessària en funció de les característiques del mètode. Les resines en pols emprades han estat les següents: fase SCX (*Amberlyst 36* proveïda per Aldrich); fase Si (gel de Si de 230-400 *mesh*, de Scharlab). Aquesta darrera resina ha estat dessecada al forn a 100°C durant 30 min abans d'utilitzar-la, a fi d'eliminar l'aigua absorbida durant l'emmagatzematge degut a la seva hidrofília.

Les fibres de SPME utilitzades (totes proveïdes per Supelco) han estat les següents: Polidimetilsiloxà de 100 µm de gruix de fase estacionària (FT), Polidimetilsiloxà/Divinilbenzè de 65 µm FT, Poliacrilat de 85 µm FT, Carboxen/Polidimetilsiloxà de 75 µm FT, i Carbowax/Divinilbenzè de 65 µm FT. Totes les fibres són d'1 cm de longitud. Abans del seu ús, cada fibra ha estat netejada i condicionada a la temperatura recomanada pel proveïdor inserint-la, durant un temps mínim de 20-30 min, en un injector de GC. Aquest injector, d'iguals característiques que l'emprat per a l'anàlisi, no està connectat a cap columna, de manera que permet la neteja de la fibra sense contaminar la columna de treball. En injectar les fibres al GC per tal d'analitzar els extractes, el temps de desorció a l'injector han estat d'1 min en tots els casos. La HS-SPME s'ha realitzat amb vials de 100, 50 i 25 mL de capacitat, capsulats amb *septums* de silicona que tenen Teflon a la cara interna (en contacte amb la mostra). Per a la realització de l'extracció s'introdueix la fibra de SPME a l'espai de cap a través del *septum*, mitjançant una xeringa especial de SPME (Supelco). D'aquesta manera es manté el segellat hermètic durant l'extracció.

4.2. Mostres

El desenvolupament dels mètodes d'anàlisi ha requerit l'ús de vins lliures de metoxipirazines i per això s'han emprat vins de les varietats Garnatxa i Ull de llebre. Pel que fa als mostos lliures de pirazines, s'ha utilitzat raïm aixafat manualment. Els mostos i vins usats als experiments de determinació de les MPs pertanyen a les varietats Cabernet sauvignon i Merlot, i tots ells procedeixen del celler experimental del Mas dels Frares de la Facultat d'Enologia de Tarragona, de la Universitat Rovira i Virgili.

El vi sintètic emprat al llarg d'aquest treball ha estat preparat de la següent manera: 120 mL d'etanol es dipositen en un vas de precipitats, s'hi afegeix 4 g d'àcid L-tartàric i H₂O, s'agita, s'ajusta el pH a 3,0-3,5 amb NaOH i es porta a 1 L amb H₂O.

4.3. Condicions cromatogràfiques

Degut a les necessitats pròpies de l'anàlisi d'ultra-traces, les condicions cromatogràfiques emprades, sobretot pel que fa al volum d'injecció, els gasos i voltatge del detector, així com la programació de temperatura del forn, s'han ajustat de tal manera que proporcionen la màxima sensibilitat. A continuació es detalla l'equip cromatogràfic emprat, les condicions d'injecció i de detecció i les diferents columnes emprades, les quals s'han anat canviant al llarg d'aquest treball en funció de les necessitats dels mètodes desenvolupats.

Totes les anàlisis s'han realitzat mitjançant un equip de GC Hewlett Packard 5890 II, els senyals del qual són enviats a un ordinador per a la seva recollida, enregistrament i integració de les àrees dels pics.

Injector: En totes les injeccions realitzades, la temperatura de l'injector ha estat de 250°C i la injecció s'ha realitzat en mode *splitless* durant 1 min. Els volums d'injecció s'han incrementat tot el possible a fi de disminuir els límits de detecció. En tots els casos, els volums màxims s'han calculat mitjançant el programa *Pressure-flow calculator*, facilitat per Agilent, i considerant les característiques del solvent, la temperatura i la pressió de l'injector, i el volum intern de la peça de vidre de l'injector o *liner*. En el cas de la injecció de fibres de SPME aquesta peça s'ha substituït per un *inlet* de 0,75 mm de ID, el qual millora l'eficàcia cromatogràfica (3).

Detector: Tota la feina desenvolupada al llarg d'aquest treball s'ha dut a terme mitjançant un detector de nitrògen-fòsfor (NPD). Els valors de voltatge que emprats normalment han estat de 2,5 a 3,7 Volts, fent petits ajusts entre anàlisis per tal de mantenir la línia de base a 30 pA. La temperatura del detector s'ha mantingut a 250°C en tots els casos. Els fluxos de gasos han estat

els següents: gas auxiliar (N₂): 30 mL/min; H₂: 5 mL/min; i aire: 90-100 mL/min. Aquestes condicions s'han mantingut al llarg de tot el treball experimental.

Columnes: S'han emprat columnes capil·lars de fase polar i apolar. Les de fase polar han estat les següents: HP-INNOWAX Carbowax 20M, Polietilenglicol de 50 m, 0,20 mm de diàmetre intern (ID) i 0,20 µm de gruix de la fase estacionària (FT); i CP-WAX 57 CB (VARIAN-CROMPACK) Carbowax 20M, Polietilenglicol d'alta polaritat, de 50 m, 0,25 mm ID i 0,20 µm FT. La columna de fase apolar emprada ha estat la SPB-35 (SUPELCO) Poli(35%-difenil-65%-dimetilsiloxà) de 30 m, 0,25 mm ID i 0,25 µm FT.

Amb la HP-INNOWAX ha estat difícil separar la IPMP i l'ETMP, tal com es descriu a la bibliografia (4, 5). Però aquests compostos s'han aconseguit separar parcialment amb el següent programa: 30°C, 30°C /min fins 140°C, 10 min. La Fig. 1 presenta un cromatograma dels patrons sota aquestes condicions.

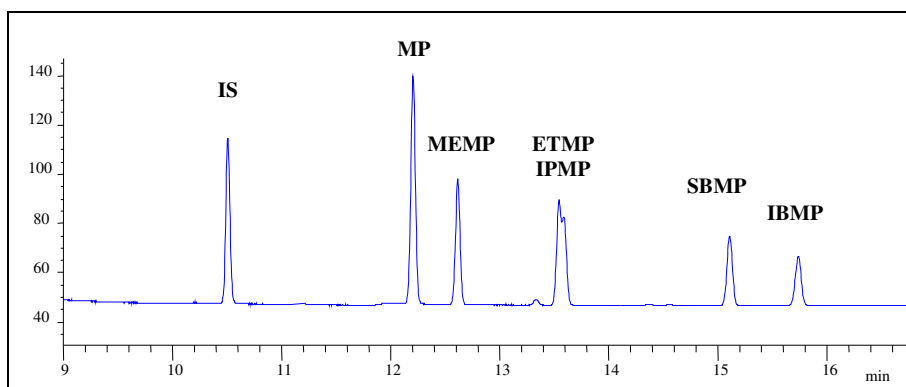


Fig. 1. Separació dels patrons amb la columna HP-INNOWAX. Solució de 50 µg/L de MPs en diclorometà. IS: Pirazina.

En canvi, la columna SPB-35 ha proporcionat una bona separació d'aquests analits amb un programa de temperatura molt semblant: 30°C, 25°C/min fins 100°C, 30 min, com es pot veure a la Fig. 2.

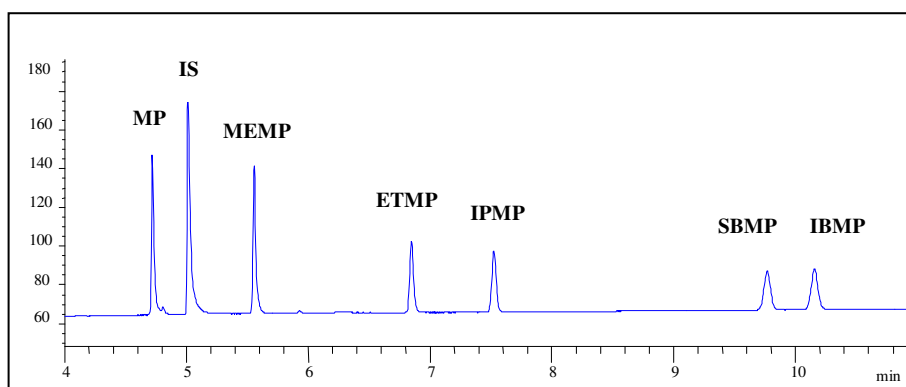


Fig. 2. Separació dels patrons amb la columna SPB-35. Solució de 80 µg/L de MPs en hexà. IS: Etil-pirazina

Finalment, la columna CB-WAX-57CB, malgrat que és de fase similar a la HP-INNOWAX, ha donat excel·lents resultats de separació amb aquesta darrera seqüència de temperatura, que és la que s'ha utilitzat més. La Fig. 3 presenta un cromatograma dels patrons obtingut amb aquesta columna. Per a identificar els analits s'ha utilitzat la columna SPB-35 en combinació amb la CB-WAX-57CB.

Fluxos de gasos: S'ha utilitzat He com a gas portador, amb una pressió de cap de columna de 180 kPa. El flux de divisió o *Split vent* s'ha mantingut a 50-52 mL/min i el flux de la purga o *Purge vent*, a 2-2,4 mL/min. Els fluxos de columna eren els següents: 0,9 mL/min amb la HP-INNOWAX; 0,8 mL/min amb la CP-WAX 57 CB; i 2,5 mL/min amb la SPB-35 (de longitud molt més reduïda).

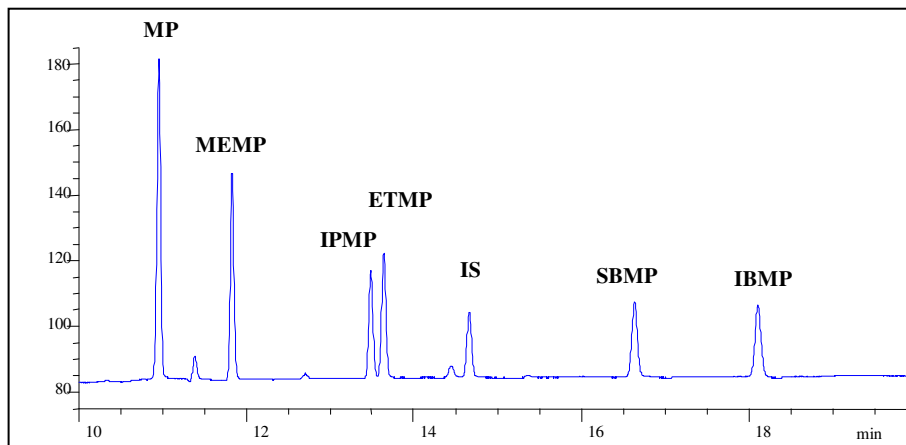


Fig. 3. Separació dels patrons amb la columna CP-WAX-57CB. Solució de 200 µg/L de MPs en etanol. IS: 3-Isopropil-2-etoxipirazina.

4.4. Calibratge i límits de detecció

Els detalls de les rectes de calibratge més importants amb què es s'ha treballat són recollits a la Taula 3. Es pot observar que en tots els casos hi ha una excel·lent linealitat de la resposta.

Degut a les característiques pròpies de la injecció dels extractes obtinguts per SPME, el calibratge amb la columna CP-WAX-57CB no s'ha fet per injecció directa sinó que s'han injectat fibres de Poli-dimetilsiloxà/divinilbenzè (PDMS/DVB) amb les quals s'han extret solucions aquoses tamponades a pH 5 i addicionades. El procediment de la microextracció ha estat el següent: en un vial de SPME es dipositen 10 mL de la solució que conté els estàndards, 3 g de NaCl, un agitador magnètic, es capsula, es diposita en un bany termostatitzat a 30°C i s'extreu durant 4 h per SPME amb protecció de la llum. Destaca el fet que el calibratge s'ha realitzat en el rang 0,1-100 ng/L, molt inferior al rang de treball per injecció directa. Això demostra que la tècnica que HS-SPME proporciona una sensibilitat 10.000 vegades més gran que la injecció directa.

			MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
INJECCIÓ DIRECTA	HP-INNOWAX	a	-0,043	-0,119	*	-0,128	-0,139	-0,129
	Interval: 10-1000 ng/mL	b	0,771	0,853	*	1,038	1,094	1,015
	IS: tetrametilpirazina, 110 ng/mL	r ²	0,997	0,997	*	0,996	0,996	0,996
	SPB-35	a	0,067	0,037	0,024	0,025	0,105	0,026
	Interval: 4-1000 ng/mL	b	0,871	0,702	0,541	0,553	0,450	0,569
	IS: etilpirazina, 100 ng/mL	r ²	0,999	0,999	0,999	0,999	0,996	0,999
HS-SPME	CP-WAX-57CB	a	0,016	0,005	0,257	0,027	0,042	0,075
	Interval: 0,1-100 ng/L	b	0,061	0,285	0,619	0,830	0,814	0,801
	IS: isopropil-etoxipirazina, 10 ng/L	r ²	0,992	1,000	1,000	1,000	0,999	0,999

Taula 3. Paràmetres de les rectes de calibratge obtingudes amb les diferents columnes. $y = a + b x$; on x = concentració (MP) / concentració (IS); i y = àrea (MP) / àrea (IS). *La ETMP no s'ha pogut determinar amb la HP-INNOWAX degut a que coelueix amb la IPMP.

El criteri per a la determinació dels límits de detecció ha estat l'usual: la concentració d'analít més baixa que dóna un pic cromatogràfic d'una alçada 3 vegades superior a la del soroll de fons. Els límits de detecció cromatogràfics obtinguts amb el detector proveït d'una perla nova poden ser fins i tot 10 vegades més baixos que amb una perla desgastada. Els límits de detecció per injecció directa apareixen a la Taula 4.

	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
INJECCIÓ DIRECTA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2

Taula 4. Límits de detecció cromatogràfics (ng/mL) determinats per injecció directa.

Si bé aquests límits de detecció són realment baixos, són del tot insuficients per a la determinació de MPs en vins per injecció directa. En efecte, assumint que per a la correcta quantificació dels vins reals cal que el mètode permeti la determinació de nivells d'1 a 100 ng/L, es pot assumir que els límits de detecció del mètode complet haurien de ser, com a màxim, de l'ordre de 0,1 ng/L. És a dir, unes 10.000 vegades inferiors als obtinguts per injecció directa.

4.5. Resultats i discussió

El desenvolupament del treball experimental que aquí es presenta ha consistit en l'aplicació de diferents tècniques d'anàlisi d'aromes a la determinació de les MPs en vins a nivells de ng/L. Tenint en compte que a la bibliografia es descriu la presència de l'ordre de 2-40 ng/L de MPs en vins (6-11), aquestes són les concentracions d'interès a partir de les quals s'ha treballat. Així doncs, el repte perseguit al llarg de tot el treball experimental ha estat el desenvolupament d'un mètode fiable amb uns límits de detecció adequats a aquestes concentracions.

Havent descartat la possibilitat de determinar els analits per injecció directa, s'ha procedit a l'estudi, per separat, dels mètodes d'extracció i concentració amb l'objectiu d'optimitzar-los independentment i després poder-los combinar entre sí en les millors condicions. Els mètodes d'extracció provats han estat els següents: extracció líquid-líquid; extracció en fase sòlida; i microextracció en fase sòlida de l'espai de cap. També s'ha provat la destil·lació, tant en medi àcid com en medi bàsic. Dins els mètodes de concentració dels extractes s'ha provat el corrent de N₂, la destil·lació a baixa pressió i la columna de rectificació. En aquest apartat es comenten detalladament els resultats obtinguts amb cada tècnica i amb les combinacions de les mateixes.

Els criteris emprats per a determinar la validesa de cada mètode d'extracció i concentració assajat han estat els següents: absència d'interferències a la regió cromatogràfica d'interès; obtenció de percentatges de recuperació alts en vins naturals; límits de detecció apropiats; rapidesa, fiabilitat i comoditat. Per al càlcul dels percentatges de recuperació s'ha pres la relació entre la quantitat determinada per anàlisi cromatogràfica (aplicant les rectes de calibratge) i la quantitat addicionada a la mostra.

Cal tenir en compte que, quan es treballa a nivell d'ultra-traces en una mostra tan complexa com el most o el vi i s'ha de desenvolupar un mètode amb un factor de concentració de 10.000, totes

les substàncies presents al sí de la mostra esdevenen un problema, ja que el propi mètode actua com a 'amplificador' de les interferències. Per aquest motiu en alguns experiments preliminars s'ha treballat amb vins sintètics i fins i tot amb aigua destil·lada, ja que de vegades fins i tot els vins sintètics presenten pics a la línia de base.

4.5.1. Concentració dels extractes

L'extracció de volums de mostra de 1.000 mL i concentració a 0,1 mL ha constituït el primer intent d'aconseguir un factor de concentració de l'ordre de 10.000, el qual, amb un bon percentatge de recuperació, ha de permetre situar els nivells de MPs de l'extracte per damunt dels límits de detecció del NPD, que són de l'ordre de 0,1-4 ng/mL.

Els primers assajos realitzats s'han centrat en l'optimització de la concentració de solucions de MPs ja que en tots els mètodes en què s'ha aplicat una LLE es requereix un pas de concentració de l'extracte.

Inicialment, considerant que els punts d'ebullició de les MPs són relativament alts, s'ha provat la concentració a sequedat. Per a això s'han fet diferents de concentració d'una solució de 10 ng/mL de MPs a sequedat per corrent de N₂ i posterior resuspensió amb hexà per tal d'injectar-la. Donat que en tots els casos les recuperacions han estat baixes o nul·les, aquesta tècnica s'ha desestimat.

S'han comparat les recuperacions obtingudes mitjançant tres mètodes de concentració diferents: corrent de N₂, destil·lació amb columna de rectificació (Kuderna-Danish) i destil·lació a baixa pressió. Aquesta darrera s'ha realitzat en condicions de buit per trompa d'aigua, sense refrigerant a la columna de condensació i bany a temperatura ambient. En tots els casos s'ha seguit el Procediment 1.

PROCEDIMENT 1: CONCENTRACIÓ DE SOLUCIONS

MOSTRA: 10 mL d'una solució de 10 ng/L de MPs en el solvent adequat.

CONCENTRACIÓ: La mostra es concentra (corrent de N₂, columna de rectificació o destil·lació a baixa pressió) fins a 100 µL, s'hi afegeix 100 µL d'una solució 100 ng/mL d'etilpirazina (IS). S'agita, es concentra fins a 100 µL i s'analitza per GC-NPD.

COLUMNA: SPB-35

Els resultats obtinguts es presenten a la Taula 5. La concentració de solucions de pentà per destil·lació a baixa pressió presenta el problema de l'ebullició sobtada al moment de tancar el buit i per això s'ha descartat. Per altra banda, a les proves realitzades amb columna de rectificació amb solucions de diclorometà i acetat d'etil, els temps de concentració eren extremadament llargs, de manera que aquest mètode també s'ha desestimat per a aquests dissolvents.

		MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
PENTÀ	Corrent	65,3 (13,2)	73,5 (11,1)	80,7 (10,0)	83,8 (10,1)	84,7 (6,6)	86,2 (7,0)
	Rectificació	45,6 (40,5)	48,8 (39,9)	49,2 (37,9)	50,8 (35,2)	48,6 (35,5)	47,5 (35,5)
	Destil·lació	-	-	-	-	-	-
DICLOROMETÀ	Corrent	43,2 (14,2)	59,3 (14,9)	69,0 (17,0)	65,3 (18,3)	80,1 (21,1)	80,8 (19,4)
	Rectificació	-	-	-	-	-	-
	Destil·lació	45,0 (28,9)	78,4 (22,1)	87,0 (8,6)	96,0 (12,4)	108,5 (7,2)	111,5 (7,1)
ACETAT D'ETIL	Corrent	56,2 (25,9)	52,4 (26,2)	57,0 (25,7)	55,5 (26,2)	59,6 (25,5)	61,0 (25,7)
	Rectificació	-	-	-	-	-	-
	Destil·lació	50,5 (13,0)	42,0 (11,1)	39,3 (9,9)	41,4 (10,8)	74,4 (14,7)	76,2 (15,5)

Taula 5. Percentatges de recuperació obtinguts en la concentració per corrent de N₂, columna de rectificació i destil·lació a baixa pressió. Mitjanes (n=5) i desviació estàndard relativa (%).

S'observa que els millors mètodes de concentració són el corrent de N₂ amb pentà i diclorometà i la destil·lació a baixa pressió amb diclorometà, ja que els percentatges de recuperació que proporcionen són acceptables per a tots els analits i sobretot per a la IPMP, la SBMP i la IBMP. Posteriorment s'ha utilitzat més la concentració per corrent de N₂ ja que aquest mètode és el més ràpid i senzill.

4.5.2. Extracció líquid-líquid

Aquesta ha estat la primera tècnica d'extracció amb què s'ha treballat i és la més simple que s'ha provat. Considerant els resultats d'optimització de la concentració dels extractes esmentats anteriorment, els extractants estudiats han estat el pentà i el diclorometà. El procediment seguit ha estat el número 2. Inicialment s'ha treballat amb vi sintètic per tal de simplificar l'optimització del mètode. La Taula 6 i la Fig. 4 presenten els resultats obtinguts aplicant el Procediment 2 a un vi sintètic.

PROCEDIMENT 2: EXTRACCIÓ LÍQUID LÍQUID

MOSTRA: 1 L de vi sintètic addicionat amb 100 ng/L de MPs

CONCENTRACIÓ: Es diposita la mostra en un embut de decantació, s'hi afegeix 30 g de NaCl, s'ajusta a pH 9 amb una solució NaOH i s'hi posen 50 mL d'extractant. S'agita, es decanta i s'asseca amb Na₂SO₄ anhidre. Es concentra amb corrent de N₂ fins a 100 µL, s'hi afegeixen 100 µL de solució 100 ng/mL d'etilpirazina (IS), es concentra fins a 100 µL i s'analitza per GC.

COLUMNA: SPB-35

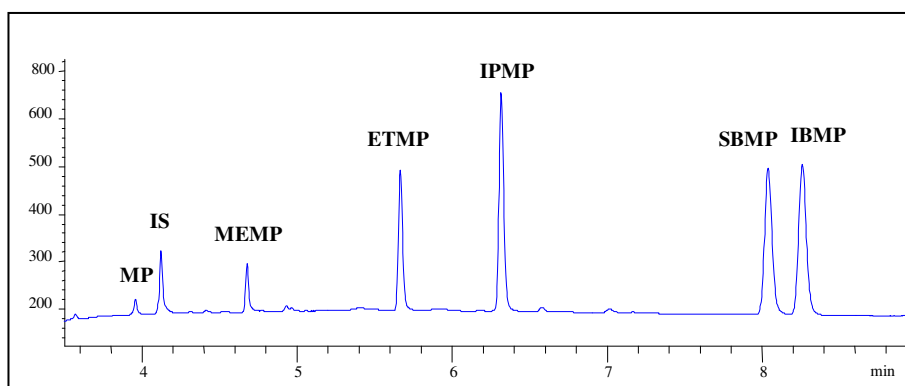


Fig. 4. Resultat obtingut aplicant el Procediment 2 a un vi sintètic addicionat amb 100 ng/L de MPs. IS: etilpirazina.

S'observa que, en el cas del vi sintètic, les recuperacions pels tres compostos de major interès són acceptables, superiors al 85%. Les MPs amb substituents més petits presenten les recuperacions més baixes degut a que l'extracció d'aquests compostos amb solvents de baixa polaritat resulta menys afavorida.

	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
PENTÀ	5,1 (20,4)	10,0 (26,0)	47,7 (34,0)	91,7 (39,8)	86,7 (34,5)	93,9 (36,1)
DICLOROMETÀ	18,8 (10,9)	32,6 (8,8)	69,1 (10,0)	89,0 (11,7)	75,6 (9,4)	86,8 (8,8)

Taula 6. Percentatges de recuperació obtinguts aplicant el Procediment 2 a un vi sintètic addicionat amb 100 ng/L de MPs. Mitjanes (n=5) i desviació estàndard relativa (%).

Donats els bons resultats obtinguts amb vi sintètic, s'ha aplicat aquest procediment a vins negres. Però amb l'agitació manual del vi es forma escuma i emulsions. Per aquest motiu s'han fet proves d'extracció amb pentà comparant l'agitació manual, per ultrasons i magnètica. L'agitació magnètica proporciona els millors resultats: es forma emulsió, però en menor grau que amb els altres dos mètodes d'agitació. Aquesta tècnica s'ha aplicat a un vi negre addicionat de 100 ng/L de MPs. Però els cromatogrames obtinguts presenten gran quantitat d'interferències que coelueixen amb els analits i no es pot quantificar, com es pot veure a la Fig. 5.

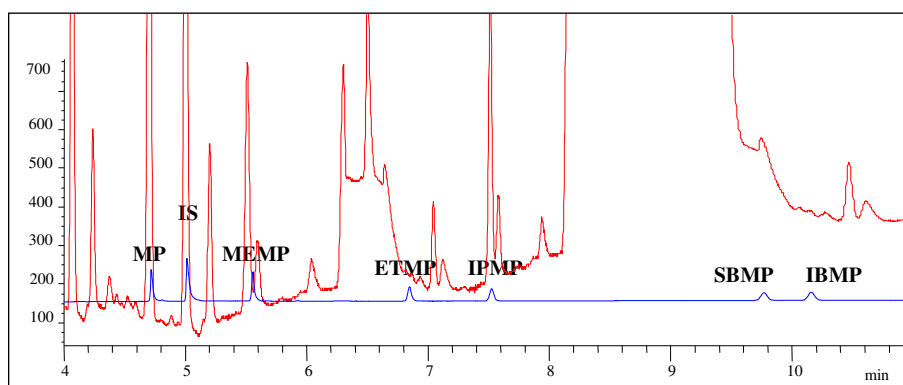


Fig. 5. Resultat obtingut aplicant el Procediment 2 (vermell) a un vi negre addicionat amb 100 ng/L de MPs, comparat amb els patrons (blau) de 80 µg/L de MPs en hexà . IS: Etilpirazina.

Per tant s'ha conclòs que, malgrat la selectivitat del detector, no és possible la determinació de MPs en vins negres mitjançant la simple extracció líquid-líquid degut a les interferències ocasionades pels compostos presents al vi.

4.5.3. Extracció en fase sòlida

Arrel dels problemes esmentats a l'apartat anterior s'ha plantejat l'aplicació de la tècnica de SPE, la qual, com s'ha vist al capítol anterior, ha estat aplicada a l'anàlisi de MPs en raïm, most i vi i en alguns casos ha tingut èxit. A la revisió bibliogràfica es pot veure que s'han emprat fases d'interacció apolar, d'octadecilsilà (C18) (1) i fases d'interacció polar, de sílice (Si) (12). Però els millors resultats s'han obtingut amb la fase de bescanvi de cations amb un grup funcional sulfònic (SCX) (6, 10, 11, 13-16).

Així doncs, s'han realitzat una sèrie d'experiments destinats a optimitzar l'extracció en fase sòlida a fi d'emprar aquesta tècnica, sigui directament o bé com a pas previ a l'extracció líquid líquid. En aquest apartat es comenten els assaigs realitzats i els resultats obtinguts amb les fases de bescanvi de cations forts i d'interacció polar.

Pel que fa a la fase apolar, s'han realitzat alguns assaigs amb fase C18 per tal d'avaluar la seva aplicabilitat directa al vi però s'ha vist que les interferències presents a la matriu, sobretot els polifenols, la saturen. S'ha provat d'eliminar aquests compostos amb un tractament previ amb poli(vinilpolipirrolidona), però se'n requereix una quantitat molt gran i no s'han detectat MPs als extractes en cap cas, probablement degut a la manca de recuperació en aquest tipus d'extracció. També s'ha provat la capacitat de neteja d'aquesta fase aplicada als extractes obtinguts per extracció líquid-líquid amb pentà, però els resultats no han estat bons i finalment s'ha descartat la fase apolar.

SPE de bescanvi iònic. Donats els bons resultats trobats a la revisió bibliogràfica per a la resina de bescanvi catiònica forta (SCX), s'ha plantejat la seva aplicació als extractes obtinguts per extracció líquid-líquid o bé per destil·lació, de manera similar a la dels mètodes revisats.

En primer lloc s'ha fet un estudi del % de recuperació de l'extracció amb resina de SCX aplicada a solucions de 10 ng/mL de MPs en aigua. El mètode consisteix en l'adsorció de les MPs a la resina a pH 1, l'elució amb H₂O a pH 12 i posterior extracció líquid-líquid amb pentà. Els resultats obtinguts es presenten a la Taula 7. Com s'observa, els percentatges de recuperació són molt alts i per tant s'ha conclòs que aquest procediment de SPE amb resina SCX pot ser aplicat a la determinació de les MPs en solució aquosa.

	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
SCX	#	93,8 (14,2)	*	87,4 (10,7)	72,9 (10,1)	88,0 (10,3)

Taula 7. Recuperacions obtingudes (%) aplicant la tècnica de SPE de fase SCX a solucions de 10 ng/mL de MPs en aigua. Mitjanes (n=7) i desviació estàndard relativa (%). # la 2-metoxipirazina no s'ha pogut determinar degut a que coelueix amb una interferència. * L'ETMP no s'ha inclòs en aquest assaig ja que amb la columna HP-INNOWAX aquest compost no es separa de la IPMP.

Donats els excel·lents resultats obtinguts, s'ha provat d'aplicar aquesta tècnica directament al vi. Degut a que les substàncies interferents presents a la matriu, entre ells els polifenols, queden adsorbits a la resina i la inactiven, s'ha fet un tractament previ del vi amb poli(vinilpolipirrolidona) per tal d'eliminar aquests compostos, de manera semblant als assajos realitzats amb la SPE de fase apolar. Després de diferents proves s'ha observat que la neteja d'interferències no és suficient per a l'anàlisi de les MPs i s'ha desestimat aquesta possibilitat, de manera que s'ha conclòs que la tècnica de SPE de fase SCX no es pot aplicar directament al vi.

SPE de fase polar. S'ha determinat la recuperació de la tècnica de SPE de fases diol (2OH) i Sílice (Si) aplicada a solucions de MPs en pentà i diclorometà. El procediment consisteix en fer passar 1 mL de solució 10 ng/mL de MPs pels cartutxos de SPE prèviament activats i eluïr amb un dissolvent més polar (èter etílic o acetat d'etil); afegir 100 µL d'una solució de 100 ng/mL d'etilpirazina (IS) a l'eluat i analitzar-lo per GC. Els resultats obtinguts es presenten a la Taula 8.

Si bé l'acetat d'etil proporciona bons resultats, s'ha estudiat també l'èter etílic, el qual permet la concentració per corrent de N₂ enlloc de per columna de rectificació. L'elució amb èter etílic s'ha estudiat amb pentà degut a que aquest solvent és el que proporciona millors resultats en l'extracció líquid-líquid.

FASE	SOLVENT	ELUIENT	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
2OH	Diclorometà	Acetat d'etil	18,3 (9,1)	5,2 (2,0)	69,6 (4,9)	88,2 (6,8)	83,3 (2,3)	84,0 (4,7)
	Pentà	Acetat d'etil	59,9 (7,9)	41,3 (6,0)	77,9 (5,1)	93,9 (3,5)	96,4 (5,6)	99,7 (4,8)
	Pentà	Èter etílic	82,1 (7,2)	84,6 (2,8)	69,3 (0,7)	71,9 (1,4)	88,1 (6,0)	86,5 (0,2)
Si	Diclorometà	Acetat d'etil	38,3 (5,9)	39,1 (8,6)	88,0 (9,5)	100,5 (7,3)	106,4 (8,3)	103,6 (4,1)
	Pentà	Acetat d'etil	40,1 (8,2)	40,2 (6,2)	84,7 (7,0)	96,5 (1,3)	99,4 (2,7)	91,9 (2,4)
	Pentà	Èter etílic	73,2 (8,7)	74,0 (2,9)	79,1 (6,5)	91,7 (2,6)	89,2 (4,1)	98,4 (5,3)

Taula 8. Recuperacions (%) de la SPE de fase polar aplicada a solucions de 10 ng/mL de MPs en pentà i diclorometà. Mitjanes (n=5) i desviació estàndard relativa (%).

S'observa que els percentatges de recuperació són alts, especialment per a la IBMP, la SBMP i la IPMP. Així doncs s'ha conclòs que la SPE d'interacció polar, tant amb fase 2OH com amb fase Si, pot ser un bon mètode per a la separació de les MPs en solucions orgàniques de pentà i diclorometà.

S'ha provat la SPE (2OH) aplicada als extractes concentrats obtinguts per extracció líquid-líquid amb pentà i diclorometà. En el cas dels vins addicionats amb 100 ng/L de MPs, els cromatogrames presenten línies de base molt netes i s'hi han pogut identificar els analits. Ara bé, quan s'ha aplicat la mateixa tècnica a vins addicionats de 10 ng/L de MPs, s'ha observat que la línia de base no és prou neta degut a que l'efecte de neteja de la SPE (2OH) no és suficient. Per aquest motiu, aquesta tècnica s'ha descartat.

També s'ha provat d'aplicar la SPE (Si) als extractes de vins negres obtinguts per extracció líquid-líquid. Des dels primers assaigs s'ha observat que la major part d'interferències de l'extracte es queden retingudes a la resina de Si i no elueixen amb l'èter etílic, de manera que és molt efectiu en la neteja d'interferències. Després d'una sèrie de proves s'ha arribat a un mètode final, que es detalla al Procediment 3. Per tal de calcular-ne les recuperacions s'ha repetit per

quintuplicat en un vi negre i també se n'ha fet el blanc. Les recuperacions obtingudes es recullen a la Taula 9 i la Fig. 5 presenta un cromatograma obtingut amb aquest mètode.

PROCEDIMENT 3: EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA DE FASE SI
<p>MOSTRA: 1 L de vi negre addicionat amb 10 ng/L de MPs</p> <p>PRE-TRACTAMENT: S'afegeix a la mostra 40 g de NaCl, s'ajusta el pH a 12 amb NaOH i s'hi posen 75 mL de pentà. Es deixa 2h en agitació magnètica suau a temperatura ambient, atmosfera de N₂ i a la foscor. Es decanta, es separa la fase orgànica i s'asseca amb Na₂SO₄ anhidre.</p> <p>EXTRACCIÓ: Es passa l'extracte per una bureta de vidre que conté 3 g de resina Si (prèviament assecada a 100°C durant 30 min, temperada i activada passant-hi 15 mL de pentà). S'elueix amb 15 mL d'èter etílic purificat (lliure de peròxids), assecat i filtrat, i es recull l'eluat.</p> <p>CONCENTRACIÓ: L'eluat es concentra a 100 µL per corrent de N₂, s'hi afegeix 100 µL d'una solució 100 ng/mL de tetrametilpirazina (IS) en acetat d'etil, s'agita, es concentra a 100 µL per corrent de N₂ i s'analitza per GC.</p> <p>COLUMNA: HP-INNOWAX</p>

Els percentatges de recuperació obtinguts són alts, sobretot per la IPMP, la SBMP i la IBMP. Aquests resultats són especialment interessants si es considera que el nivell de MPs del vi és de 10 ng/L.

	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
SI	35,2 (4,4)	68,4 (37,2)	*	74,6 (30,6)	83,2 (30,7)	107,3 (8,4)

Taula 9. Percentatges de recuperació obtinguts aplicant el Procediment 3 a 1 L de vi negre addicionat de 10 ng/L de MPs. Mitjanes (n=5) i desviació estàndard relativa (%). * L'ETMP no s'ha inclòs en aquest assaig ja que amb la columna HP-INNOWAX aquest compost no es separa de la IPMP.

Per tant s'ha conclòs que aquest mètode pot ser vàlid per a la determinació de MPs en vi negre a nivells de 10 ng/L. Ara bé, com es veu a la Fig. 6, el pic de la IBMP apareix molt a prop d'una interferència que no s'ha pogut separar ni eliminar, de manera que no ha estat possible considerar aquest mètode com a definitiu.

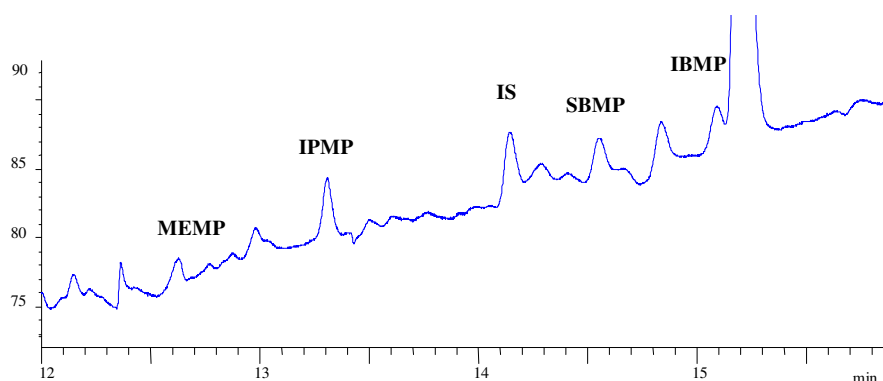


Fig. 6. Resultat obtingut aplicant el Procediment 3 a 1 L de vi negre addicionat amb 10 ng/L de MPs. IS: Tetra-metil-pirazina.

4.5.4. Destil·lació

Donat que la neteja d'interferències obtinguda per LLE i per SPE és insuficient, s'ha considerat la possibilitat de destil·lar prèviament el vi, a fi d'aprofitar les bones recuperacions proporcionades per ambdues tècniques d'extracció. En aquest apartat es comenten els experiments realitzats per tal de provar l'eficàcia de la combinació de la destil·lació amb aquestes dues tècniques d'extracció. En primer lloc s'ha considerat la destil·lació en medi bàsic, en què es destil·len les pirazines eliminant així les interferències menys volàtils. Posteriorment s'ha estudiat la destil·lació en medi àcid, en la qual les pirazines, ionitzades, romanen al residu de la destil·lació i s'eliminen els compostos més volàtils.

Destil·lació en medi bàsic. Com s'ha vist, la SPE de fase SCX, si bé pot proporcionar bones recuperacions, presenta el problema que les interferències saturen la resina. Per això s'ha provat de fer una destil·lació prèvia a l'aplicació d'aquesta tècnica d'extracció. Val a dir que hi ha moltes referències bibliogràfiques en què es fan servir procediments semblants. Aquests procediments inclouen una destil·lació a pressió atmosfèrica a pH 5-6; una SPE de fase SCX del destil·lat a fi d'atrapar els compostos bàsics, entre ells les MPs; una elució amb aigua a pH 10, una extracció amb diclorometà en condicions d'alta força iònica (NaCl) i finalment una

concentració per evaporació espontània (6, 7, 10, 11, 13, 16). Per altra banda, s'ha descrit a la bibliografia que l'increment del pH fa disminuir la solubilitat de les pirazines en medi aquós (17).

Així doncs, s'ha posat a punt un procediment similar que inclou la destil·lació del vi després d'ajustar-lo a pH 10, l'extracció del destil·lat a pH 1,0 amb una resina SCX, l'elució amb H₂O a pH 10, l'extracció de l'eluat amb pentà o diclorometà i la concentració per corrent de N₂ de la fase orgànica. Aquest mètode s'ha aplicat a un vi sintètic addicionat amb 100 ng/L de MPs i s'han fet proves a pressió atmosfèrica i també a baixa pressió, amb buit per trompa d'aigua. Donat que les recuperacions obtingudes, tant amb pentà com amb diclorometà, han estat inferiors al 25% en tots els casos, aquesta tècnica s'ha desestimat.

També s'ha provat un mètode basat en la destil·lació i posterior extracció líquid-líquid del destil·lat, a fi de combinar els bons resultats de recuperació obtinguts amb la tècnica de LLE amb la neteja d'interferències que proporciona la destil·lació. A més, s'ha trobat a la bibliografia un mètode semblant, basat en la destil·lació seguida d'extracció líquid-líquid i anàlisi per GC-NPD, que permet la determinació de pirazines (entre elles la MP, la MEMP i la IBMP) a nivell de 100 ng/L en cervesa (18).

En primer lloc s'ha estudiat en quina fracció del destil·lat apareixen les MPs i s'ha observat que, per a 1 L de vi, cal recollir els primers 250 mL de destil·lat. Aleshores s'ha procedit a l'optimització de l'extracció líquid-líquid del destil·lat. A fi d'agilitzar aquest procés s'ha treballat amb una solució hidro-alcohòlica sintètica (50% EtOH - 50% H₂O MilliQ). Així doncs s'ha estudiat la capacitat que tenen els dissolvents de diferents polaritats per a extreure les MPs en aquest medi. Els dissolvents estudiats han estat l'acetat d'etil, el diclorometà i l'hexà. Aquesta extracció s'ha realitzat seguint, bàsicament, el Procediment 2, d'extracció líquid-líquid, amb la diferència que, en el cas del diclorometà, s'afegeix aigua a la mostra a fi d'obtenir una bona separació de la fase orgànica. D'aquesta manera s'han extret mostres de volums de 10 mL

de destil·lat sintètic i amb concentracions de MPs relativament altes (10 ng/mL), cosa que permet la seva determinació per injecció directa després de l'extracció. Els resultats obtinguts es presenten a la Taula 10, on s'observa que les recuperacions, si bé no molt altes, són satisfactòries, sobretot en el cas de l'extracció amb diclorometà.

EXTRACTANT	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
HEXÀ	9,6 (7,7)	15,7 (9,5)	39,3 (9,7)	66,5 (10,9)	61,5 (11,6)	65,5 (10,3)
DICLOROMETÀ	32,8 (8,9)	49,2 (8,2)	81,6 (9,1)	88,7 (8,6)	71,9 (6,1)	80,3 (7,6)
ACETAT D'ETIL	20,3 (14,4)	26,0 (17,2)	48,6 (14,9)	65,5 (11,9)	61,2 (9,9)	71,1 (11,8)

Taula 10. Recuperacions obtingudes per LLE d'un destil·lat de vi sintètic addicionat amb 10 ng/mL de MPs. Mitjanes (n=5) i desviació estàndard relativa (%).

Aquests resultats han conduït al desenvolupament del Procediment 4, per a la determinació de les MPs a nivells de ng/L, basat en la destil·lació en medi bàsic i posterior extracció líquid-líquid. Donat que l'extracte del destil·lat presenta moltes interferències, la major part de les quals es troben a la primera fracció del destil·lat, els assaigs s'han realitzat amb vi sintètic. Aquest mètode s'ha provat amb pentà i amb diclorometà. Els resultats es presenten a la Taula 11.

PROCEDIMENT 4: DESTIL·LACIÓ EN MEDI BÀSIC I EXTRACCIÓ LÍQUID-LÍQUID
MOSTRA: 1 L de vi sintètic addicionat amb 10 ng/L de MPs
PRE-TRACTAMENT: S'ajusta el pH de la mostra a 9 amb una solució de NaOH i es destil·la, recollint els primers 250 mL de destil·lat en un recipient que conté unes gotes de HCl concentrat (pH final: 1).
EXTRACCIÓ: El destil·lat es diposita en un embut de decantació, s'hi afegeixen 40 g de NaCl, 600 mL de H ₂ O MilliQ, s'ajusta el pH a 10 amb NaOH, i s'hi posen 20 mL d'extractant. S'agita manualment 5 min, es decanta, es separa la fase orgànica i s'asseca amb Na ₂ SO ₄ anhidre.
CONCENTRACIÓ: Es concentra la fase orgànica per corrent de N ₂ fins a 100 µL, s'hi afegeix 100 µL de solució 100 ng/mL de IS (etilpirazina), es concentra fins a 100 µL i s'analitza per GC.
COLUMNA: SPB-35

S'observa que les recuperacions no són molt altes i que el millor extractant és el pentà. L'aplicació d'aquest procediment a un vi negre ha resultat en una línia de base amb moltes interferències i no ha estat possible fer la determinació de les MPs. Així doncs, s'ha conclòs que la neteja d'interferències que proporciona aquest mètode no és suficient per a la seva aplicació a vins negres i s'ha descartat.

	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
PENTÀ	3,8 (19,9)	13,4 (24,2)	26,9 (15,2)	49,6 (19,2)	70,3 (18,8)	76,5 (13,7)
DICLOROMETÀ	1,8 (15,5)	12,5 (4,5)	18,7 (18,2)	56,5 (22,3)	53,0 (18,0)	52,0 (13,6)

Taula 11. Percentatges de recuperació obtinguts aplicant el Procediment 4 a 1 L de vi sintètic amb 10 ng/L de MPs. Mitjanes (n=5) i desviació estàndard relativa (%).

Destil·lació en medi àcid. S'ha provat de destil·lar del vi en medi fortament àcid fins a sequedat a fi d'eliminar les substàncies interferents i obtenir els clorhidrats de pirazina al residu sec. La posterior resuspensió en medi alcalí seguida de l'extracció líquid-líquid podria permetre l'anàlisi per GC-NPD. Després d'una sèrie de proves s'ha observat que apareixen igualment gran quantitat d'interferències al cromatograma i s'ha conclòs que la tècnica de concentració a sequedat per destil·lació en medi àcid no és vàlida com a mètode de neteja d'interferències en l'anàlisi de MPs a nivell d'ultra-traces, per la qual cosa s'ha desestimat.

També s'ha assajat la destil·lació en medi àcid i posterior extracció líquid-líquid, a fi d'eliminar les interferències volàtils i separar les pirazines ionitzades, retingudes al residu de destil·lació. En efecte, les pirazines, amb valors de pKa inferiors a 2, es troben protonades a aquests valors baixos de pH (19). Així doncs, s'ha desenvolupat el Procediment 5, que es descriu a continuació.

PROCEDIMENT 5: DESTIL·LACIÓ EN MEDI ÀCID I EXTRACCIÓ LÍQUID-LÍQUID

MOSTRA: 1 L de vi sintètic addicionat amb 10 ng/L de MPs.

PRE-TRACTAMENT: S'afegeix HCl concentrat a la mostra fins a obtenir un pH inferior a 1 i es destil·la al buit (amb trompa d'aigua), amb el bany a temperatura ambient, fins reduir el volum a 500 mL.

EXTRACCIÓ: El romanent de la destil·lació es diposita en un embut de decantació, es neutralitza amb NaOH, s'hi afegeixen 40 g de NaCl i 25 mL de pentà, i es fa una extracció líquid-líquid amb agitació manual durant 5 min. Es decanta, es separa la fase orgànica i s'asseca amb Na₂SO₄ anhidre.

CONCENTRACIÓ: Es concentra la fase orgànica per corrent de N₂ fins a 100 µL, s'hi afegeix 100 µL de solució 100 ng/mL d'etilpirazina (IS), es concentra fins a 100 µL i s'analitza per GC.

COLUMNA: SPB-35

Els resultats obtinguts es presenten a la Taula 12. S'observa que les recuperacions obtingudes pels analits més importants són altes, superiors al 80%. Així doncs s'ha comprovat que aquest mètode permet la quantificació de les MPs en vins sintètics addicionats amb 10 ng/L de MPs. Ara bé, quan s'ha aplicat el procediment a vins naturals s'ha observat que les interferències són massa grans i no es distingeixen els pics de les MPs.

	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
DESTIL·LACIÓ I LLE	45,0 (26,2)	34,8 (30,9)	75,9 (40,3)	83,3 (35,3)	92,1 (39,2)	95,9 (38,7)

Taula 12. Percentatges de recuperació obtinguts aplicant el Procediment 5 a 1 L de vi sintètic addicionat amb 10 ng/L de MPs. Mitjanes (n=5) i desviació estàndard relativa (%).

Aleshores s'ha provat d'aplicar una destil·lació en medi àcid seguida d'una extracció líquid-líquid i posterior SPE de fase Si, combinant els procediments prèviament optimitzats per separat. S'ha vist que la neteja d'interferències d'aquesta tècnica, aplicada a 1 L de vi negre addicionat amb 10 ng/L de MPs, no és suficient, de manera que s'ha desestimat.

4.5.5. Micro-extracció en fase sòlida de l'espai de cap

Aquesta tècnica s'ha aplicat a l'anàlisi d'aliments (20, 21) i concretament a la determinació de compostos aromàtics del vi (22-27). La gran capacitat de concentració dels analits i de neteja de les interferències que presenta han conduït al plantejament de la seva aplicació a l'anàlisi de les MPs en mostos i vins, cosa que, a l'inici d'aquest treball experimental, no s'havia aplicat encara, de manera que aquest plantejament ha estat pioner dins aquest camp, com també ho ha estat el fet de combinar-la amb la GC-NPD, aprofitant la sensibilitat i selectivitat d'aquest detector.

El primer pas per al desenvolupament del mètode d'extracció de les MPs per HS-SPME ha estat la posada a punt de les condicions d'extracció: selecció de la fibra i optimització de la força iònica, temperatura i temps d'extracció. L'aplicació del procediment optimitzat ha permès el desenvolupament dels mètodes de determinació de les MPs en mostos i vins, els quals s'expliquen més endavant.

Selecció de la fibra. Per tal de triar la fibra més adequada per l'extracció de les MPs s'ha treballat amb vi sintètic i en condicions de força iònica elevada i pH bàsic a fi d'afavorir el pas de les MPs a l'espai de cap. S'han provat quatre tipus diferents de fibres i de cadascun d'ells s'han assajat tres unitats diferents. El mètode emprat ha estat el següent: En un vial de HS-SPME de 100 mL de capacitat s'introdueixen 50 mL de vi sintètic addicionat amb 10 ng/mL de MPs, 2,5 g de NaCl, s'ajusta el pH a 9 amb NaOH 1N i es capsula amb un *septum*. S'agita, s'introdueix la fibra i es deixa en contacte amb l'espai de cap en agitació magnètica i amb protecció de la llum, en un bany d'aigua a 30°C, durant 30 min. Passat aquest temps, la fibra es transfereix a l'injector del GC per tal de realitzar la seva anàlisi. Els resultats obtinguts es presenten a la Taula 13 i a la Fig. 7.

S'observa que, per als analits de més interès, la fibra de Pòlidimetilsiloxà/Divinilbenzè (PDMS/DVB) proporciona els millors resultats. Aquesta va ser la fibra triada per a prosseguir l'experimentació. Destaca també el fet que les pirazines que s'adsorbeixen millor, en general, són la IBMP, la SBMP i la IPMP, seguides, de lluny per la MEMP i la MP.

Cal assenyalar que, en aquest assaig, la presència d'alcohol no impedeix l'anàlisi cromatogràfica dels analits degut als alts nivells en què es troben. De fet, en aquesta primera aproximació a la tècnica de HS-SPME s'ha treballat a nivells de MPs 1.000 vegades superiors als de les mostres naturals. Per això en aquest assaig també s'ha observat que aquesta tècnica proporciona una gran sensibilitat, de manera que és possible treballar amb volums de 10 mL i a nivell de 10 ng/L. I s'ha vist que el patró intern inicialment emprat, la tetrametilpirazina, presenta un nivell d'extracció molt més baix que els analits. Per aquest motiu, en el posterior desenvolupament dels mètodes per a la determinació de les MPs en mostos i vins, s'ha triat un altre patró intern, la 3-isopropil-2-etoxipirazina, que conté un grup alcoxi, i per tant propietats químiques més semblants a les dels analits.

FIBRA	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
PDMS	3.431 (41,8)	11.920 (26,4)	*	94.342 (30,5)	234.705(23,4)	184.317 (21,2)
PDMS/DVB	7.785 (39,1)	26.910 (27,9)	*	231.253(15,1)	431.983 (19,3)	298.434 (25,9)
CARBOXEN/PDMS	69.261 (24,5)	49.193 (30,2)	*	160.479 (48,8)	182.996 (20,8)	85.060 (31,7)
POLIACRILAT	4.324 (31,3)	7.135 (22,8)	*	45.489(11,8)	86.315 (35,3)	67.145 (17,3)
CW/DVB		13.079 (35,0)	*	34.349 (42,1)	56.223 (39,4)	48.332 (27,9)

Taula 13. Àrees absolutes dels pics obtinguts amb els diferents tipus de fibra. Mitjanes (n=3 fibres diferents) i desviació estàndard relativa (%). * No s'ha treballat amb l'ETMP degut a que la columna emprada era la HP-INNOWAX, amb la qual aquest analit no es separa de l'IPMP.

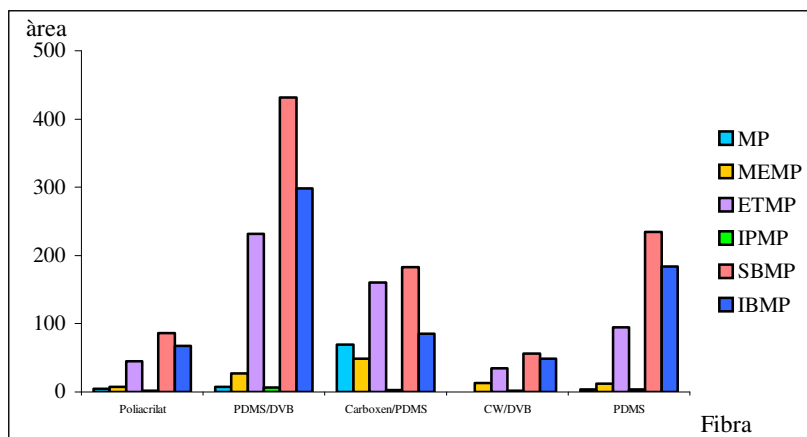


Fig. 7. Àrees dels pics obtinguts amb els diferents tipus de fibra.

S'ha provat d'aplicar la tècnica de HS-SPME (amb fibres de PDMS/DVB) directament a una mostra de vi negre addicionat amb 100 ng/L de MPs. El resultat ha estat un cromatograma amb moltes interferències en el qual els pics de les MPs gairebé no es distingeixen. Ara bé, la seva aplicació als mostos sí que ha estat exitosa, com s'explica més endavant.

Optimització de les condicions de SPME. Posteriorment a la tria de la fibra s'ha realitzat una sèrie d'assaigs per tal d'optimitzar les condicions de força iònica, temperatura i temps d'extracció. En tots els casos s'ha treballat amb solucions aquoses addicionades de MPs, seguint els següents passos: 10 mL d'una solució de H₂O MilliQ tamponada a pH 3,5 amb àcid tartàric i addicionada amb 10 ng/L de les MPs es dipositen en un vial de SPME de 25 mL, s'hi afegeix 1 mL d'una solució de 100 ng/L de 3-isopropil-2-etoxipirazina (IS) i el NaCl. Es capsula el vial amb un *septum*, s'hi posa una fibra de SPME de PDMS/DVB en contacte amb l'espai de cap i es deixa en un bany termostatitzat en agitació magnètica a la foscor. Finalment es retira la fibra, s'injecta al GC i s'hi deixa durant 1 min a 250°C per a la desorció dels analits i l'anàlisi cromatogràfica amb la columna CP-WAX-57CB.

Pel que fa a la força iònica, s'han provat concentracions de NaCl de 0,1, 0,2, 0,3 i 0,4 g/mL. La Taula 14 i la Fig. 8 presenten els resultats obtinguts. S'observa que per a concentracions més

altes de NaCl s'obtenen pics cromatogràfics d'àrees més grans. Això és degut al fet que l'increment de la força iònica de la solució fa augmentar la tendència dels analits a passar a l'espai de cap i conseqüentment a la fibra de SPME. Aquests resultats coincideixen amb la bibliografia, ja que s'ha descrit que l'addició de NaCl a les solucions aquoses incrementa significativament les quantitats de compostos extrets (productes de Maillard, entre ells les pirazines) per la fibra de SPME (28). Ara bé, a partir de 0,3 g/mL ja no s'observa increment sinó que la resposta és constant o fins i tot menor, de manera que s'ha pres 0,3 g/mL com a valor òptim.

NaCl (g/mL)	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
0,1	771 (58,1)	1.137 (32,3)	2.215 (45,4)	4.761 (16,7)	5.399 (18,3)	4.280 (15,9)
0,2	482 (7,5)	778 (5,2)	1.953 (9,0)	3.856 (13,9)	3.923 (12,8)	3.979 (9,4)
0,3	1.864 (9,7)	2.431 (10,5)	4.765 (8,3)	7.995 (7,4)	7.357 (10,5)	8.352 (9,6)
0,4	1.964 (9,3)	2.553 (18,2)	4.772 (20,0)	7.066 (14,1)	6.244(16,3)	7.110 (12,8)

Taula 14. Àrees dels pics obtinguts amb diferents nivells de força iònica aplicant el mètode de HS-SPME a temperatura ambient i amb 60 min d'extracció. Mitjanes (n=3) i desviació estàndard relativa (%).

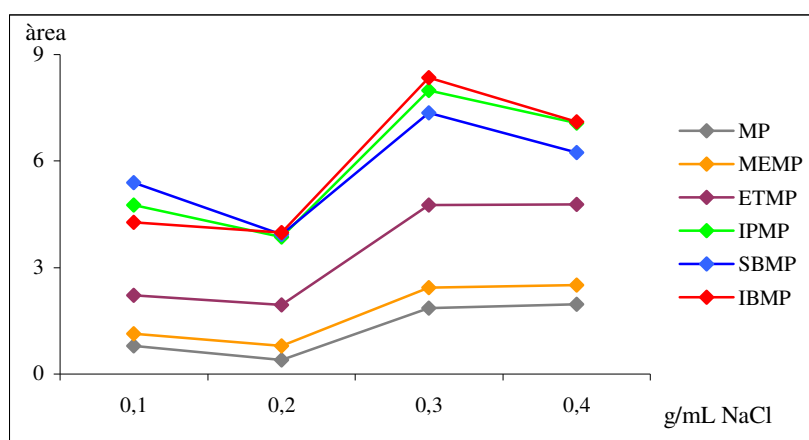


Fig. 8. Increment de l'àrea dels pics amb l'augment de la força iònica.

Per a la optimització de la temperatura de l'extracció s'han realitzat proves a 20, 30, 40, 50 i 60 °C. Donat que en un experiment preliminar s'ha observat que una durada d'extracció superior als 60 min. millora la mida dels pics, aquest experiment s'ha fet amb durades de 100 min. Els resultats es presenten a la Taula 15 i a la Fig. 9.

T (°C)	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
20	1,1 (53,1)	2,8 (22,2)	6,6 (12,9)	13,5 (22,1)	14,3 (29,4)	12,8 (19,5)
30	2,2 (12,4)	5,2 (7,1)	11,4 (9,0)	19,1 (10,4)	18,1 (9,6)	17,8 (11,0)
40	3,2 (59,4)	5,1 (9,0)	12,9 (17,1)	17,4 (14,1)	15,6 (12,3)	16,7 (14,2)
50	2,6 (7,1)	3,5 (7,6)	12,5 (0,4)	17,1 (3,7)	16,9 (0,7)	19,0 (7,1)
60	2,1 (60,8)	2,2 (64,1)	9,2 (64,3)	13,7 (65,4)	13,7 (59,5)	16,1 (64,4)

Taula 15. Àrees dels pics obtinguts amb diferents temperatures aplicant el mètode de HS-SPME amb 0,3g/mL de NaCl i una durada d'extracció de 100 min. Mitjanes (n=3) i desviació estàndard relativa (%).

S'observa que la temperatura d'extracció que proporciona les àrees de pics més grans és 30°C. Així doncs aquesta és la temperatura que s'ha fixat per al mètode de SPME. També es veu que a 60°C hi ha un increment important de la desviació estàndard. Tot plegat és degut al fet que les temperatures més altes poden incrementar la presència dels analits a l'espai de cap, però també poden afavorir la desorció de la fibra.

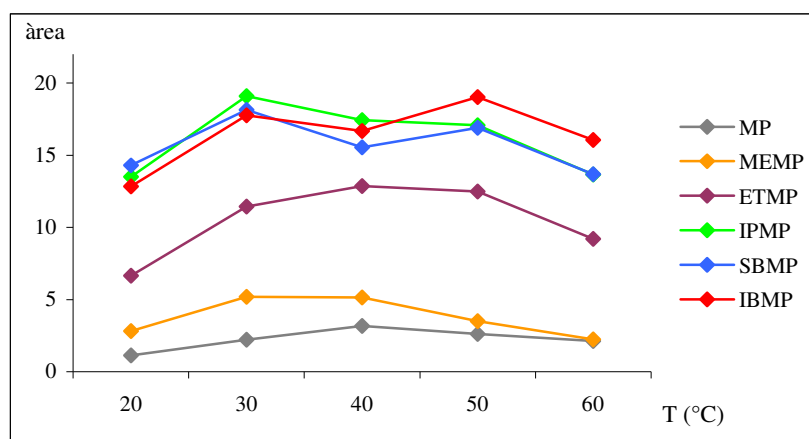


Fig. 9. Variació de les àrees dels pics amb l'increment de la temperatura d'extracció.

S'ha fet una optimització de la durada de la microextracció. En diferents experiments previs s'ha vist que durades superiors a 1 i a 2 hores milloren els resultats, de manera que s'han provat durades de 0,5 a 14 h, com es veu a la Taula 16 i a la Fig. 10.

h	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
0,5	985 (38,1)	2.093 (39,8)	4.473 (39,8)	8.182 (40,9)	7.741 (42,7)	7.971 (41,1)
1	1.413 (36,5)	3.668 (32,3)	8.088 (30,7)	14.632 (32,1)	14.550 (33,5)	13.557 (31,1)
1,5	1.342 (23,7)	4.173 (22,6)	9.340 (22,4)	15.215 (24,7)	14.310 (24,5)	14.416 (24,9)
1,7	2.208 (12,4)	5.197 (7,1)	11.449 (9,0)	19.090 (10,4)	18.146 (9,6)	17.782 (11,0)
2	1.670 (20,6)	5.808 (25,1)	12.897 (24,6)	20.030 (20,4)	18.493 (19,0)	19.095 (20,3)
2,5	1.885 (28,5)	6.838 (28,7)	15.408 (29,1)	22.352 (27,8)	21.025 (28,5)	22.269 (31,2)
3	2.331 (12,0)	7.852 (14,8)	17.515 (17,1)	26.940 (8,1)	24.910 (8,1)	26.513 (4,2)
4	1.973 (2,6)	8.781 (3,1)	21.224 (7,7)	28.483 (3,5)	25.818 (1,2)	28.639 (3,1)
6	2.870 (17,4)	8.039 (12,0)	22.257 (6,7)	28.805 (4,7)	26.458 (5,8)	30.318 (7,5)
8	1.616 (21,1)	7.848 (11,5)	19.173 (5,9)	22.931 (1,9)	21.510 (0,7)	23.625 (5,7)
14	1.525 (4,8)	5.812 (16,2)	17.511(10,8)	28.539 (9,5)	23.732 (18,3)	28.983 (6,4)

Taula 16. Àrees dels pics obtinguts amb diferents durades d'extracció aplicant el mètode de HS-SPME amb 0,3g/mL de NaCl i a una temperatura de 30°C. Mitjanes (n=3) i desviació estàndard relativa (%).

Segons els resultats obtinguts s'ha conclòs que, en les condicions descrites, la fibra de PDMS/DVB triga unes 3-4 h a estabilitzar-se i proporcionar la màxima sensibilitat. Aparentment, a partir d'aquest temps, s'estabilitza o fins i tot disminueix la sensibilitat. Així doncs s'ha fixat en 4 h el temps d'extracció per al mètode de HS-SPME.

Aquest resultat no és sorprenent si es té en compte que les MPs no són molt volàtils i per tant probablement triguen un temps relativament llarg per a passar a l'espai de cap i adsorbir-se a la fibra. Aquesta observació està d'acord amb la bibliografia, ja que s'ha descrit que les pirazines passen molt lentament a l'espai de cap (17).

Per tant, les condicions idònies per a la microextracció de les MPs a l'espai de cap són les següents: fibres de PDMS/DVB, força iònica de 0,3 g/mL de NaCl, temperatura de 30°C i temps d'extracció de 4 h. Amb aquestes condicions fixades, s'ha provat d'aplicar la tècnica de HS-SPME a mostos i vins.

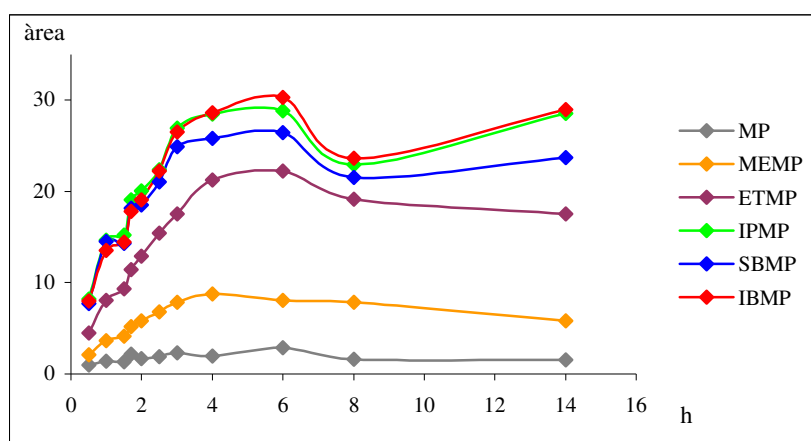


Fig. 10. Variació de les àrees dels pics amb l'increment del temps d'extracció.

4.6. Determinació en mostos

El procediment optimitzat de HS-SPME ha donat excel·lents resultats en mostos adicionats de 10 ng/L de MPs ja des de les primeres proves, amb una excel·lent neteja de les interferències i una bona sensibilitat. Per a això s'ha procedit a la posada a punt del Procediment 6, que és un mètode relativament senzill i ràpid. La Fig. 11 presenta el cromatograma d'un most, obtingut mitjançant aquesta tècnica.

PROCEDIMENT 6: MICRO-EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA DE L'ESPAI DE CAP**MOSTRA:** 10 mL de most

EXTRACCIÓ I CONCENTRACIÓ: Es diposita la mostra en un vial de SPME de 20 mL, que conté 3 g de NaCl i un agitador magnètic. S'hi afegeix 1 mL d'una solució 100 ng/L de 3-isopropil-2-etoxipirazina i es capsula. El vial es posa dins un bany isotèrmic a 30°C amb agitació magnètica constant i protecció de la llum. Es posa una fibra de PDMS/DVB en contacte amb l'espai de cap durant 4 h. Llavors es retira la fibra, s'injecta al GC i s'hi deixa desorbir durant 1 min a 250°C per a fer l'anàlisi cromatogràfica.

COLUMNA: CP-WAX-57CB

S'observa la bona resolució dels pics i l'excel·lent neteja d'interferències de la línia de base. Així doncs s'ha conclòs que aquest mètode, basat en la microextracció en fase sòlida de l'espai de cap amb fibres de PDMS/DVB, permet la determinació de les MPs en mostos.

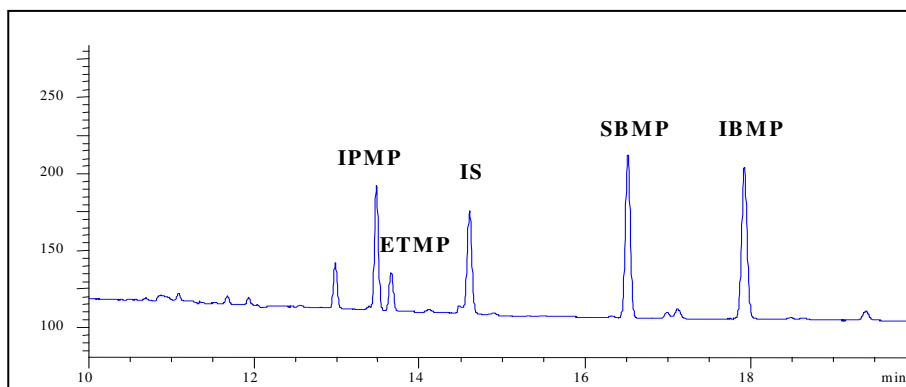


Fig. 11. Resultat obtingut mitjançant el Procediment 6, corresponent a un most de Merlot amb uns 22, 16 i 11 ng/L d'IBMP, SBMP i IPMP, respectivament.

Per tal de realitzar l'estudi dels percentatges de recuperació i dels límits de detecció del Procediment 6, s'ha procedit a la construcció de les rectes de calibratge, les quals s'han realitzat aplicant aquest mètode a solucions aquoses tamponades a pH 5 i addicionades amb nivells de 0,1-100 ng/L de MPs. En tots els casos hi ha una bona linealitat de la resposta, amb un bon coeficient de correlació ($r^2 > 0,99$), com es pot observar a la Fig. 12.

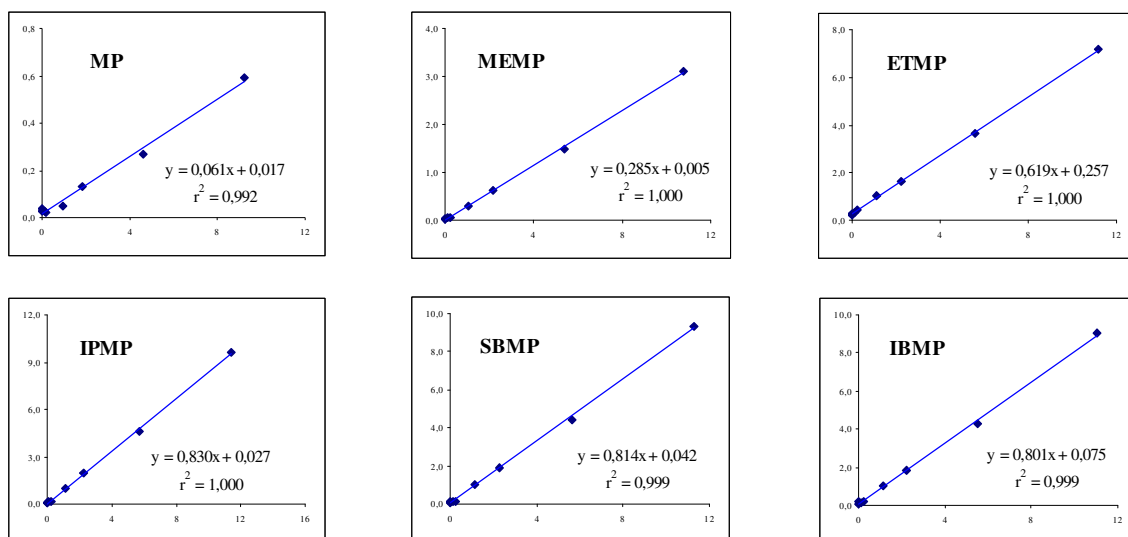


Fig. 12. Rectes de calibratge obtingudes aplicant el Procediment 6 a solucions adicionades amb 0,1-100 ng/L de MPs. IS: Etilpirazina, 10 ng/L. $y = a + b x$; on $x =$ concentració (MP) / concentració (IS); i $y =$ àrea (MP) / àrea (IS).

Per a la determinació dels límits de detecció del mètode s'ha emprat un most lliure de MPs i se n'han fet extraccions amb addicions de MPs progressivament més baixes, així com un blanc. El mateix most s'ha utilitzat en la determinació dels percentatges de recuperació. Per a això s'han determinat 6 mostres d'aquest most adicionat amb 10 ng/L dels patrons. Les recuperacions i els límits de detecció obtinguts es presenten a la Taula 17.

	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
%R	43,3 (35,3)	56,5 (30,8)	58,2 (19,8)	94,1 (29,5)	109,4 (17,2)	108,2 (13,2)
DL (ng/L)	1,0	1,0	0,5	0,1	0,1	0,1

Taula 17. Recuperacions (%R) i límits de detecció (DL) obtinguts aplicant el Procediment 6 a un most adicionat. S'indiquen les mitjanes (n=5) i la desviació estàndard relativa (%) de les recuperacions, realitzades amb most adicionat de 10 ng/L de MPs.

Comparant aquests límits de detecció amb els determinats per injecció directa, de l'ordre de 0,1-4 ng/mL, com s'ha vist anteriorment, s'observa que la HS-SPME és unes 10.000 vegades més sensible que la injecció directa. Aquesta superior sensibilitat fa que aquesta tècnica sigui especialment adient per a l'anàlisi de MPs en raïm, most i vi.

Pel que fa a les recuperacions, com es pot veure, els analits més importants (IBMP, SBMP i IPMP) presenten recuperacions molt altes; l'ETMP presenta una bona recuperació i les recuperacions més baixes són les de la MP i la MEMP, les quals també presenten les desviacions estàndard relatives més altes.

Considerant la linealitat, els límits de detecció i els percentatges de recuperació que proporciona, es conclou que el Procediment 6 permet la determinació de les MPs en mostos a nivells de ng/L, que és el rang d'interès ja que aquest compostos es troben en aquestes concentracions en mostres naturals i tenen rellevància a nivell sensorial.

Aquest mètode s'ha aplicat amb èxit a l'anàlisi de mostos naturals i s'ha utilitzat en l'estudi de les evolucions de les MPs al raïm durant el procés de maduració, que s'explica al següent capítol.

4.7. Determinació en vins

Com s'ha comentat anteriorment, l'aplicació de la tècnica de HS-SPME directament al vi no permet la determinació de les MPs. Això es pot atribuir al fet que l'etanol competeix amb els analits per la fibra, resultant en recuperacions molt baixes quan l'etanol és present a la mostra (23, 29).

Per tant, s'ha vist que l'aplicació de la tècnica de HS-SPME al vi requereix d'un pas preliminar de neteja d'interferències que n'elimini l'etanol. El procediment de destil·lació en medi àcid anteriorment optimitzat i que proporciona una bona recuperació ha resultat especialment apropiat per a aquest fi. Com s'ha comentat, aquest mètode també aprofita el fet que a nivells de pH inferiors a 1-2, les MPs estan protonades i la seva volatilitat disminueix (19). D'aquesta manera, amb la destil·lació s'elimina l'etanol però les MPs queden retingudes al residu de la destil·lació, el qual és posteriorment extret mitjançant la tècnica de HS-SPME. Aquestes

premisses han conduït al desenvolupament del Procediment 7, el qual ha donat excel·lents resultats i ha constituït un mètode fiable i pràctic per a la determinació de les MPs en vi.

PROCEDIMENT 7: DESTIL·LACIÓ EN MEDI ÀCID I MICRO-EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA DE L'ESPAI DE CAP

MOSTRA: 10 mL de vi.

PRE-TRACTAMENT: Es diposita el vi en un matràs de destil·lació de 25 mL de capacitat, s'hi afegeix 1 mL d'una solució de 100 ng/L de IS (Isopropiletoxipirazina) i s'acidifica amb HCl concentrat fins a pH 0,5. Es destil·la al buit amb trompa d'aigua i a temperatura ambient fins a reduir-ne el volum al 50%.

EXTRACCIÓ I CONCENTRACIÓ: El romanent de la destil·lació es transfereix a un vial de SPME de 20 mL, que conté 3 g de NaCl i un agitador magnètic. S'hi afegeix 1 mL d'una solució 100 ng/L de IPEP, es neutralitza i es capsula. El vial es posa dins un bany isotèrmic a 30°C amb agitació magnètica constant i protecció de la llum. Llavors es posa una fibra de PDMS/DVB en contacte amb l'espai de cap durant 4 h. Finalment es retira la fibra, s'injecta al GC i s'hi deixa desorbir durant 1 min a 250°C per a fer l'anàlisi cromatogràfica.

COLUMNA: CP-WAX-57CB

Per a l'estudi de les recuperacions i els límits de detecció s'ha emprat un vi negre lliure de MPs. Aquest vi s'ha addicionat amb 10 ng/L dels analits i el patró intern en el cas de l'estudi de les recuperacions i amb concentracions progressivament més baixes dels patrons per a la determinació dels límits de detecció. Les rectes de calibratge utilitzades han estat les mateixes que per al mètode dels mostos, ja que el procés de HS-SPME és el mateix. Els resultats obtinguts es presenten a la Taula 18.

Aquest mètode ha donat un excel·lent resultat, ja que els cromatogrames obtinguts presenten una línia de base molt neta d'interferències a la zona de les MPs i els pics dels analits es distingeixen bé. La Fig. 13 il·lustra el cromatograma d'un vi obtingut mitjançant el Procediment 7. S'observa la bona resolució dels pics i l'excel·lent neteja d'interferències de la línia de base.

	MP	MEMP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
%R	36,2 (41,7)	31,0 (40,3)	78,3 (31,7)	80,5 (17,6)	100,7 (11,9)	104,7 (16,2)
DL (ng/L)	4,0	4,0	1,0	0,3	0,3	0,3

Taula 18. Recuperacions (%R) i límits de detecció (DL) obtinguts aplicant el Procediment 7 a un vi addicionat. Mitjanes (n=5) i desviació estàndard relativa (%) de les recuperacions, realitzades amb vi addicionat de 10 ng/L de MPs.

Els límits de detecció d'aquest procediment són baixos i apropiats per a l'anàlisi de les MPs d'interès enològic en vins negres. A més, aquest mètode proporciona uns percentatges de recuperació molt alts per als analits de més interès, IBMP, SBMP i IPMP, amb desviacions estàndard relatives acceptables considerant que es tracta d'anàlisi d'ultra-traces. Finalment, la recuperació de l'ETMP és acceptable i les de la MEMP i la MP són baixes; i les desviacions estàndard per a aquests tres darrers compostos són altes.

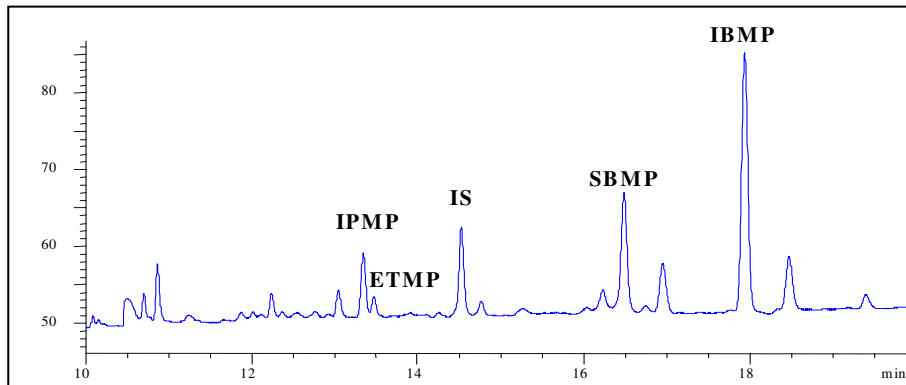


Fig. 13. Resultat obtingut mitjançant el Procediment 7, corresponent a un vi de Merlot amb uns 28, 10 i 4 ng/L d'IBMP, SBMP i IPMP, respectivament.

La comparació dels valors de recuperació obtinguts amb els Procediments 6 i 7 permet observar que el procés de neteja d'interferències per destil·lació en medi àcid és apropiat ja que no suposa una pèrdua de sensibilitat. Aquests resultats eren previsibles, tenint en compte les excel·lents recuperacions obtingudes amb el mètode prèviament optimitzat, de destil·lació en medi àcid.

Considerant la linealitat, els límits de detecció i els percentatges de recuperació que proporciona, es conclou que el Procediment 7 permet la determinació de la IBMP, la SBMP, la IPMP i l'ETMP en vins a nivell de ng/L, que és el rang d'interès, en el qual es troben aquests compostos en mostres naturals i tenen rellevància a nivell sensorial.

Aquest mètode s'ha aplicat amb èxit a la determinació de les MPs de vins naturals i s'ha fet un estudi de la influència de diferents factors vitícoles i enològics en els seus continguts al producte final, els resultats del qual es presenten al proper Capítol.

Conclusions

Les principals conclusions obtingudes al llarg d'aquesta part del treball experimental són les següents:

1. Per les seves característiques químiques i cromatogràfiques, així com la seva absència en mostres naturals, la 3-isopropil-2-etoxipirazina és un patró intern idoni per a la determinació de 3-alquil-2-metoxipirazines en mostos i vins.
2. En condicions òptimes, els límits de detecció del detector de nitrògen-fòsfor (NPD) per injecció directa d'una solució de 3-alquil-2-metoxipirazines són de 0,1-0,2 ng/mL.
3. La tècnica de concentració per corrent de nitrogen proporciona bons resultats de recuperació per a la 3-isopropil-, la 3-*sec*-butil- i la 3-iso-butil-2-metoxipirazina en solució en pentà i en diclorometà.
4. L'extracció líquid-líquid amb pentà seguida d'una extracció en fase sòlida de fase Sílice (Si), eluïnt amb èter etílic i concentrant per corrent de N₂ permet la determinació de nivells de l'ordre de 10 ng/L de 3-alquil-2-metoxipirazines en vins negres, si bé al cromatograma hi pot aparèixer una interferència molt propera al pic de la 3-isobutil-2-metoxipirazina.
5. La destil·lació en medi àcid seguida de l'extracció líquid-líquid del romanent proporciona recuperacions molt altes de les MPs en vins sintètics, però la neteja d'interferències que proporciona és insuficient per a la determinació de MPs en vins negres a nivell de ng/L.
6. La tècnica de micro-extracció en fase sòlida de l'espai de cap proporciona una sensibilitat 10.000 vegades més gran que la injecció directa i una excel·lent neteja d'interferències.

7. El procediment desenvolupat per a l'anàlisi de mostos, basat en la microextracció en fase sòlida de l'espai de cap, permet la determinació de les MPs en mostos a nivells de ng/L. Aquest mètode proporciona uns percentatges de recuperació superiors al 94% per a la IPMP, la SBMP i la IBMP, i uns límits de detecció de 0,1 ng/L per a aquests tres compostos.

8. El procediment desenvolupat per a l'anàlisi de vins, basat en la destil·lació en medi àcid i posterior microextracció en fase sòlida de l'espai de cap, permet la determinació de les MPs en vins a nivells de ng/L. Aquest mètode proporciona uns percentatges de recuperació superiors al 80% per a la IPMP, la SBMP i la IBMP, i uns límits de detecció de 0,3 ng/L per a aquests tres compostos.

Al final d'aquest capítol es presenten les reproduccions de dos articles que recullen els mètodes desenvolupats per a l'anàlisi de 3-alkyl-2-methoxypyrazines en mostos i vins, respectivament. El primer es titula *Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres*, i té la referència *Journal of Chromatography A*, **2000**, 880, 93-99. El segon article és titulat *Headspace Solid-phase Microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines*, i té la referència *Journal of Chromatography A*, **2002**, 953, 1-6.

Bibliografía

01. Heymann, H.; Noble, A. C.; Boulton, R. B. Analysis of Methoxypyrazines in Wines. 1. Development of a Quantitative Procedure. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 268-271.
02. Perrin, D. D.; Armarego, WLF Purification of laboratory chemicals, Pergamon Press, Oxford, **1987**.
03. Yang, X.; Peppard, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1925-1930.
04. Augustyn, O.P.H.; Rapp, A. Aroma components of *Vitis vinifera* L. cv. Chenin blanc grapes and their changes during maturation. *S. Afr. J. Enol. Viti.*, **1982**, *3*, 47-51.
05. Mihara, S.; Enomoto, N. Calculation of retention indices of pyrazines on the basis of molecular structure. *J. Chromatogr.* **1985**, *324*, 428-430.
06. Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Boyd, S. Determination of Methoxypyrazines in Red Wines by Stable Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1734-1738.
07. Hashizume, K.; Samuta, T. Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 194-198.
08. Kotseridis, Y.; Baumes, R. L.; Bertrand, A.; Skouroumounis, G. K. Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay. *J. Chromatogr. A.* **1999**, *841*, 229-237.
09. Kotseridis, Y.; Anocibar-Beloqui, A.; Bayonove, Cl.; Baumes, R. L.; Bertrand, A. Effects of selected viticultural and enological factors on levels of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in wines. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1999**, *33*, 19-23.
10. Lacey, M. J.; Allen, M. S.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V. Methoxypyrazines in Sauvignon blanc Grapes and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 109-112.
11. Roujou-de-Boubée, D.; Leeuwen, C. Van; Dubordieu, D. Organoleptic impact of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine on Red Bordeaux and Loire wines. Effect of environmental conditions on concentrations in grapes during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4830-4834.
12. Bayonove, C.; Cordonnier, P.; Dubois, P. Étude d'une fraction caractéristique de l'arôme du raisin de la variété Cabernet sauvignon; mise en évidence de la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine. *C.R. Acad. Sc. Paris. Série D.* **1975**, *281*, 75-78.
13. Harris, R. L. N.; Lacey, M. J.; Brown, W. V.; Allen, M. S. Determination of 2-methoxy-3-alkylpyrazines in wine by gas chromatography / mass spectrometry. *Vitis.* **1987**, *26*, 201-207.
14. Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V. Contribution of Methoxypyrazines to Sauvignon blanc Wine Aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 109-112.
15. Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Boyd, S. Methoxypyrazines in red wines: occurrence of 2-methoxy-3-(1-methylethyl) pyrazine. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 769-772.
16. Hashizume, K.; Umeda, N. Methoxypyrazine content of Japanese red wines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 802-805.
17. Baudron, S.; Belin, J-M., Voilley, A. Main factors affecting headspace analysis of some pyrazines produced by microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, *39*, 2176-2179.
18. Hérent, M-F.; Collin, S. Pyrazine and thiazole structural properties and their influence on the recovery of such derivatives in aroma extraction procedures. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1975-1980.
19. Delahunty, C. M.; Conner, J. M.; Piggott, J. R.; Paterson, A. Perception of heterocyclic nitrogen compounds in mature whisky. *J. Inst. Brew.* **1993**, *99*, 479-482.
20. Prosen, H.; Zupancic-Kralj, L. Solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 272-282.
21. Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszym, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *880*, 35-62.
22. Vas, G.; Koteleky, K.; Farkas, M.; Dobo, A.; Vekey, K. Fast screening method for wine headspace compounds using solid-phase microextraction (SPME) and capillary GC technique *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 100-104.
23. Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile sulphides and disulphides in wine aroma. *J. Chromatogr. A.* **1998**, *808*, 211-218.
24. Mestres, M.; Sala, C.; Martí, M. P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction of sulphides and disulphides using carboxen-polydimethylsiloxane fibers in the analysis of wine aroma. *J. Chromatogr. A.* **1999**, *835*, 137-144.
25. Mestres, M.; Martí, M. P.; Busto, O.; Guasch, J. Simultaneous analysis of thiols, sulphides and disulphides in wine aroma by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1999**, *849*, 293-297.

26. Mestres, M.; Martí, M. P.; Busto, O.; Guasch, J. Analysis of low-volatility organic sulphur compounds in wines by solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *881*, 583-590.
27. Whiton, R.S.; Zoecklein; B.W. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of wine aroma compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 379-382.
28. Coleman, W.M.III A study of the behavior of polar and nonpolar Solid-Phase Microextraction fibers for the extraction of Maillard reaction products. *J. Chromatogr. Sci.* **1997**, *35*, 245-258.
29. Hartmann, P.J.; McNair, H.M.; Zoecklein, B.W. Measurement of 3-alkyl-2-methoxypyrazine by headspace solid-phase microextraction in spiked model wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 285-288.

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

Journal of Chromatography A, 880 (2000) 93-99

**HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION METHOD FOR DETERMINING
3-ALKYL-2-METHOXPYRAZINES IN MUSTS BY MEANS OF
POLYDIMETHYLSILOXANE-DIVINYLBENZENE FIBRES**

C. Sala, M. Mestres, M. P. Martí, O. Busto, J. Guasch*

Departament de Química Analítica i Química Orgànica (Unitat d'Enologia, CeRTA), Facultat d'Enologia de

Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Ramón y Cajal 70, E-43005 Tarragona, Spain



Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane–divinylbenzene fibres

C. Sala, M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch*

Departament de Química Analítica i Química Orgànica (Unitat d'Enologia, CeRTA), Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Ramón y Cajal 70, E-43005 Tarragona, Spain

Abstract

A method for determining 2-methoxypyrazine, 3-methyl-, 3-ethyl-, 3-isopropyl-, 3-*sec.*-butyl- and 3-isobutyl-2-methoxypyrazine in musts is described. It involves headspace solid-phase microextraction (SPME) and determination by capillary gas chromatography using nitrogen–phosphorous detection. Pyrazines were satisfactorily separated under isothermal conditions, and quantification was carried out using 3-isopropyl-2-ethoxypyrazine as the internal standard. Ionic strength, time and temperature were studied in order to make SPME as efficient as possible. The developed method enabled detection limits at the 0.1 ng l^{-1} levels for some of the analytes. The method was successfully applied to identify and quantify different 3-alkyl-2-methoxypyrazines in experimental musts of Cabernet Sauvignon and Merlot. Their evolution during the ripening was also monitored. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Must; Food analysis; Headspace analysis; Wine; Extraction methods; Alkylmethoxypyrazines; Pyrazines; Aroma compounds

1. Introduction

3-alkyl-2-methoxypyrazines are aromatic compounds present among the flavours of a wide range of foods, such as bell peppers, asparagus, peas and potatoes [1,2]. These compounds have also been found in Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc, Cabernet Franc and Merlot wines, where they can be important to the variety aroma [3–6]. Although their concentration can vary due to climatic conditions and pruning techniques [7], it has been established that they can be present at ng l^{-1} level in wines [4,7–14].

These concentrations are enough to influence the wine aroma [15]. Indeed, the threshold of 3-isobutyl-

2-methoxypyrazine has been established to be between 2 ng l^{-1} in water or white wines [9] and 10 ng l^{-1} in red wines [4], so it can strongly influence the character of those wines even at very low concentrations.

Such low concentrations have made identification and quantification of 3-alkyl-2-methoxypyrazines difficult [16,17], for their analysis requires very sensitive analytical techniques and a great concentration of the analytes. Stable isotope dilution with gas chromatography–mass spectrometry [10,13,14] has been used to determine 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. However, those techniques are time consuming and expensive.

Solid-phase microextraction (SPME) is a simple rapid solvent-free and inexpensive technique that has been recently developed [18]. Devices for SPME

*Corresponding author.

E-mail address: qaelnol@fe.urv.es (J. Guasch)

consist of a piece of fused-silica fiber of about 1 cm in length coated with a polymer phase. This fibre is placed in contact with the sample, by either immersing it in a liquid or placing it in the headspace of the sample. The polymer is capable of extracting some of the compounds present in the sample, so partitioning and concentrating them. Then the extracted compounds are directly transferred into a GC injector port, where they are thermally desorbed.

SPME has been used for flavour analysis, especially by sampling the headspace of wines (HS-SPME) [19–26]. Recent works have also shown that SPME using fibres of polydimethylsiloxane (PDMS) and Carbowax–divinylbenzene (CW–DVB) were very effective in the analysis of volatile and semivolatile Maillard reaction products, between which there were some 3-alkyl-2-methoxypyrazines [27].

The aim of this study was to develop a method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of gas chromatography with nitrogen–phosphorous detection (GC–NPD) with HS-SPME.

2. Experimental

2.1. Equipment and chromatographic conditions

Chromatographic analyses were made on a Hewlett-Packard 5890 II gas chromatograph equipped with a nitrogen–phosphorous detector (NPD). The injection was made in the splitless mode for 1 min at 250°C using an inlet of 0.75 mm I.D. that improved the GC resolution [18]. Detector signals were sent to a HP Chemstation, where they were collected, integrated and recorded.

A CP-WAX 57 CB (50 m×0.25 mm I.D. 0.2- μ m film thickness) fused-silica capillary column was used as the analytical column. Carrier gas was high-purity helium and was flowing through the column at 0.8 ml min⁻¹ (head pressure, 180 kPa; split flow, 52 ml min⁻¹; purge flow, 2 ml min⁻¹). The make-up gas to the detector was nitrogen at 24 ml min⁻¹. The H₂ flow was 4 ml min⁻¹ and the air flow, 100 ml min⁻¹. Injector and detector were held at 250°C. The oven temperature was 30°C for 1 min, then it was raised at 25°C min⁻¹ to 100°C, and held for 20

min. Finally, the temperature was raised at 25°C min⁻¹ to 180°C for 20 min to purge the column. A SPB-35 (30 m×0.25 mm I.D. 0.25- μ m film thickness) fused-silica capillary column, operating under the same chromatographic conditions, was used to confirm the pyrazines previously identified with the analytical column.

2.2. Reagents and solutions

Pyrazine compounds were all supplied by Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). They were as follows: 2-methoxypyrazine (MOPI), 3-methyl-2-methoxypyrazine (MEMP), 3-ethyl-2-methoxypyrazine (ETMP), 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPMP), 3-*sec*-butyl-2-methoxypyrazine (SBMP) and 3-*iso*-butyl-2-methoxypyrazine (IBMP). 3-Isopropyl-2-ethoxy-pyrazine (IPEP) was used as internal standard (I.S.), and was provided by Pyrazine Specialties (Atlanta, GA). The purity of all standards was above 97%. HPLC-grade ethanol absolute was provided by Scharlau, (Barcelona, Spain). Freshly boiled deionized water was used to prepare all solutions.

Stock solutions of 200 μ g ml⁻¹ of each pyrazine and I.S. were prepared in absolute ethanol. They were stored in darkness at -23°C until use. A global standard solution containing 2 μ g ml⁻¹ of each analyte and a solution containing 2 μ g ml⁻¹ of the I.S. were prepared by dilution of the stock solutions in water. Finally, six calibration solutions in the range 2–100 ng l⁻¹ were prepared by suitable dilution of the global solutions in water. The concentration of I.S. in all calibration solutions was 10 ng l⁻¹. Recovery and detection limits studies were carried out using a pyrazine-free must into which 10 ng l⁻¹ of the standards were dissolved.

The manual SPME device and fibers used in this study were purchased from Supelco (Bellefonte, USA). The following fibres were used: PDMS 100 μ m, polydimethylsiloxane–divinylbenzene (PDMS–DVB) 65 μ m, Carboxen–poly-dimethylsiloxane (Carboxen–PDMS) 75 μ m, and CW–DVB 65 μ m. They were conditioned and cleaned after use by inserting them into a GC injector at the recommended temperatures. They were immediately used to prevent contamination. Operating temperatures were the same as those used for conditioning.

2.3. Grapes and musts

Samples were collected from the vineyards of Merlot and Cabernet Sauvignon of the experimental fields of the Facultat d'Enologia de Tarragona (Universitat Rovira i Virgili) at Constantí (Tarragona). Samples of grapes were collected during the ripening and the harvest day. They were manually pressed at the laboratory and the juice was analysed. Musts after 1 day of maceration were collected from the fermentation tanks in the experimental cellar of the faculty. Three replicates of each kind of musts were taken in all cases.

Red grapes were used to prepare a pyrazine-free must that was used as control must in the recovery and detection limits experiments.

2.4. HS-SPME of musts

One millilitre of a 100 ng l^{-1} solution of IPEP was added to an aliquot of 10 ml sample of must, which was placed in a 20 ml vial for SPME. Three grams of NaCl and a little magnetic stirrer were added. It was thickly capped with a PTFE faced silicone septum, put in an isothermal bath at 30°C and continuously stirred. By means of the stainless-steel needle of the SPME holder, the PDMS fiber was then introduced into the headspace and allowed contact with it for 4 h. The fibre was fully exposed in the middle of the headspace all the time. As methoxypyrazines are photosensitive [16] the overall microextraction process was done in the darkness.

Then, the fibre was pulled into the needle sheath and the SPME device was removed from the vial and inserted into the injection port of the GC for thermal desorption at 250°C for 1 min. All analyses were made in duplicate.

3. Results and discussion

All pyrazines were separated with both columns in less than 20 min. Although some problems in the chromatographic separation of ETMP and IPMP have been described in the literature [28], we have found that they appeared close, but clearly separated, when the 57CB column is used. A chromatogram of a solution containing all the analytes is shown in Fig. 1. IPEP was chosen as I.S. because it belongs to the series of 3-alkyl-2-alkoxypyrazines and it has not been referred to in the literature as present in musts. Furthermore, this compound was absent from the analysed samples.

In the analytical method developed, several SPME variables were studied: SPME fibre, ionic strength, temperature and time of extraction. Experiments were carried out with water buffered at pH 3.5 with tartaric acid and spiked with 10 ng l^{-1} of each pyrazine. IPEP was used as internal standard at a concentration level of 10 ng l^{-1} . As stirring usually improves the extraction, all experiments were done under constant stirring conditions [29].

Satisfactory levels of pyrazine recoveries for the PDMS fibers have been reported in the literature

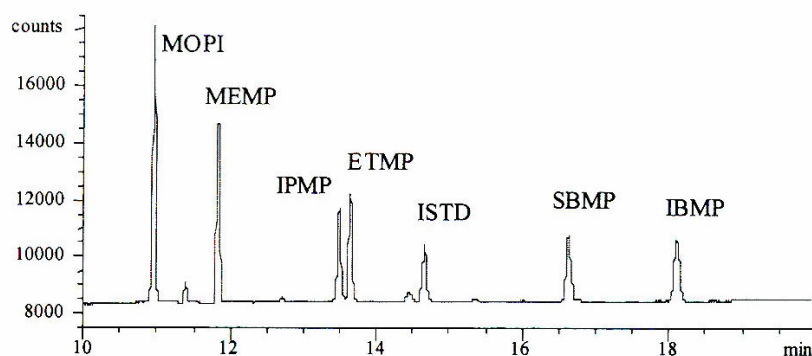


Fig. 1. Standards separated with the 57CB column (direct injection of $1 \mu\text{l}$ of a $200 \mu\text{g l}^{-1}$ solution in ethanol). I.S. is 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPEP).

[27], although among the fibres studied in the present work, the PDMS–DVB fibre showed the best results for the extraction of the pyrazines.

The tendency of the analytes to pass to the headspace and, therefore, to the fiber, can be accelerated by ionic strength [18]. NaCl amounts of 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 g ml⁻¹ were tested. It was observed that the chromatographic signal increased as the amount of NaCl increased, but for amounts higher than 0.3 g ml⁻¹ the response became constant. So, 0.3 g ml⁻¹ was chosen as the optimum value.

3-Alkyl-2-methoxypyrazines do not have a high volatility, so the time for them to reach the equilibrium among the coated-fiber, the headspace and the sample solution was expected to be long. As the diffusion of the analytes through the three system phases is essential in the HS-SPME technique [18], the effect of the time in the extraction of the analytes was optimised. Periods from 30 min to 14 h were tested and compared. Results showed that a minimum of 4 h is required to reach the equilibrium, as shown in Fig. 2, where the influence of the time in the extraction of 3-alkyl-2-methoxypyrazines by the PDMS–DVB fibre can be observed.

Although high temperatures can increase the presence of analytes in the headspace, desorption can also be enhanced at higher temperatures. In order to find the best temperature for extracting the 3-alkyl-2-methoxypyrazines, the effect of temperatures from

20°C to 40°C in the extraction of the analytes was checked. Results showed that the best recoveries were obtained at 30°C. The influence of temperature in the extraction of 3-alkyl-2-methoxypyrazines by the PDMS–DVB fiber can be seen in Fig. 3.

Having studied the extraction parameters, calibration curves, using the internal standard method, were built and the linearity range and the limits of detection and quantification of the method were estimated.

Five replicates of six standard solutions in the range 2–100 ng l⁻¹ of each analyte, all of them with a content of I.S. of 10 ng l⁻¹ were analysed. The mean values were used to construct the calibration graphs by plotting the peak-area ratios against the concentration ratios. Regression, slope and origin intercept were calculated by linear least-squares regression. Good linearity was obtained in the range 2–100 ng l⁻¹ for all the analytes. In all cases, the correlation coefficient was good ($r^2 > 0.99$). Table 1 shows the chromatographic retention times and coefficients of the calibration curves for each analyte.

A pyrazine-free must (pH 3.5) spiked with low levels of pyrazines was used to establish the detection limits of the overall method. Fig. 4 shows a chromatogram of a pyrazine-free must spiked with 10 ng l⁻¹ of each standard and I.S. The lowest concentration detectable at a signal-to-noise ratio of

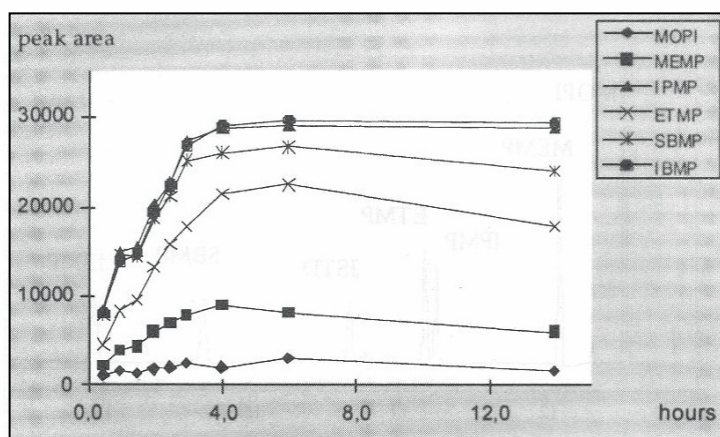


Fig. 2. Influence of time on the extraction of 3-alkyl-2-methoxypyrazines by PDMS–DVB fibres ($n=3$).

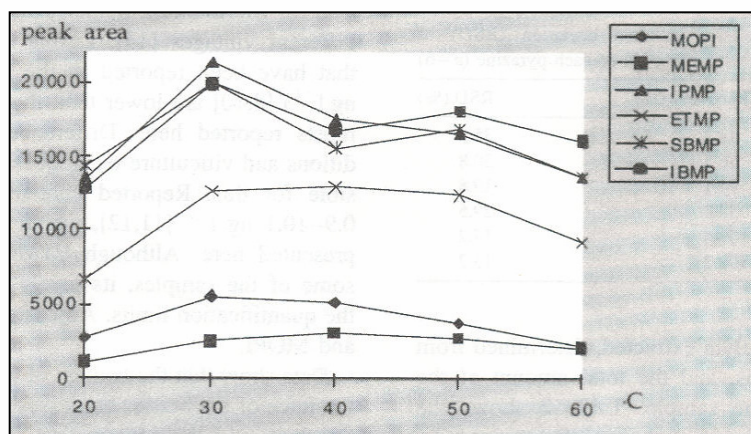


Fig. 3. Influence of temperature on the extraction of 3-alkyl-2-methoxypyrazines by PDMS–DVB fibres ($n=3$).

Table 1
Chromatographic retention times and coefficients of calibration line ($n=6$)^a

Pyrazines	RRT	Calibration line		
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> ²
MOPI	0.75	0.016	0.061	0.992
MEMP	0.81	0.005	0.285	1.000
IPMP	0.92	0.027	0.830	1.000
ETMP	0.93	0.257	0.619	1.000
SBMP	1.13	0.042	0.814	0.999
IBMP	1.23	0.075	0.801	0.999

^a RRT, relative retention time = $t_R(\text{pyrazine})/t_R(\text{I.S.}) \times t_R(\text{I.S.}) = 15.3$ min. Calibration graph: slope (*b*), intercept (*a*) and correlation coefficient (*r*²).

3 was 0.1 ng l^{-1} for IPMP, SBMP and IBMP, 0.5 ng l^{-1} for ETMP and 1 ng l^{-1} for MEMP and for MOPI.

Because of the low detection limits and the range of linearity, the method enables the six pyrazines to be determined in musts at the ng l^{-1} level. Such a level is useful because the human olfactory thresholds for the most significant methoxypyrazines are about $2\text{--}10 \text{ ng l}^{-1}$ [4,9].

The recovery of the overall method was tested with a pyrazine-free must spiked with 10 ng l^{-1} of each pyrazine. Six samples were prepared and extracted, according to the method described. The recoveries were evaluated as the quotient between

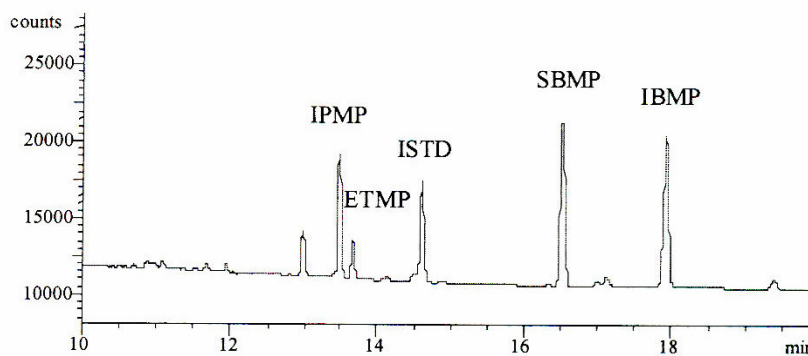


Fig. 4. Chromatogram of a sample of Merlot (must after 1 day of maceration), prepared according to the described method.

Table 2
Mean recoveries and relative standard deviation (RSD) of pyrazines in musts spiked with 10 ng l^{-1} of each pyrazine ($n=6$)

Pyrazines	Recovery (%)	RSD (%)
MOPI	43.3	35.3
MEMP	56.5	30.8
IPMP	94.1	19.8
ETMP	58.2	29.5
SBMP	109.4	17.2
IBMP	108.2	13.2

the amount of the analyte extracted, determined from the calibration graphs, and the total amount of the analyte spiked in the sample. Table 2 shows the results for recoveries of each analyte. As can be seen, the most important analytes IBMP, SBMP and IPMP showed very good recoveries (90–105%) with standard deviation less than 20%. ETMP showed also good recovery (60–70%). MOPI and MEMP were found to have the lowest recovery, so having the highest standard deviation.

The method proposed was successfully applied to experimental musts. The chromatogram of a sample of Merlot can be seen in Fig. 4. IBMP, SBMP, IPMP and ETMP and 3-ethyl-2-methoxypyrazine were identified in the samples.

Pyrazine contents of the samples are shown in Table 3. These results match those found in the literature. Reported levels of IBMP are $3.6\text{--}56.3 \text{ ng l}^{-1}$ [4,8–11,13], although, more recently, mean values of $12\text{--}13 \text{ ng l}^{-1}$ for Cabernet Sauvignon and

4–8 for Merlot were obtained in Bordeaux wines of different vintages [14]. Levels of SBMP in wines that have been reported in the literature ($0.05\text{--}1.9 \text{ ng l}^{-1}$) [8,10] are lower than the levels of SBMP in musts reported here. Differences in climatic conditions and viticulture techniques [7] may be responsible for this. Reported contents of IPMP are of $0.9\text{--}10.1 \text{ ng l}^{-1}$ [11,12], which matches the results presented here. Although ETMP was identified in some of the samples, its levels were always below the quantification limits. Any sample showed MEMP and MOPI.

Data show that the content of methoxypyrazines in the juice of the berries decreases with the ripening of the fruit, and the content found on the harvest day are the lowest. But the day after the harvest these contents increase considerably, thus suggesting that maceration of the skins can increase the content of methoxypyrazines in the future wines.

4. Conclusions

The method described allows the determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts at ng l^{-1} levels, which are below their sensory threshold. It provides high recoveries, limits of detection at the $0.1\text{--}1 \text{ ng l}^{-1}$ level and a range of linearity of $2\text{--}100 \text{ ng l}^{-1}$. On account of its simplicity and rapidity, the method seems to be adequate for oenological laboratory work.

Table 3
Pyrazine contents in experimental musts^a

		Yield (ml g^{-1})	pH	Percentage (v/v) (ap.)	IBMP		SBMP		IPMP	
					(ng l^{-1})	SD	(ng l^{-1})	SD	(ng l^{-1})	SD
Merlot										
10 August 1998	r1	0.466	3.83	9.0	21.7	5.0	15.8	5.3	11.2	4.3
21 August 1998	r2	0.426	3.77	10.7	10.4	3.6	10.7	3.8	6.3	2.3
01 September 1998	h1	0.419	3.59	10.9	5.6	2.7	2.7	1.7	2.1	1.2
02 September 1998	h2	0.419	3.91	11.7	19.4	5.3	18.1	5.4	8.2	3.1
Cabernet Sauvignon										
21 August 1998	r1	0.362	3.38	8.5	18.8	5.4	11.4	4.7	4.5	0.4
08 September 1998	r2	0.361	3.60	10.9	4.1	1.0	2.8	1.8	<q.l.	–
15 September 1998	h1	0.366	3.71	11.1	2.2	0.6	<q.l.	–	<q.l.	–
16 September 1998	h2	0.366	3.83	10.9	10.0	2.2	2.6	1.9	<q.l.	–

^a SD=standard deviation; r1, first ripening sampling; r2, second ripening sampling; h1, harvest day; h2, must after 1 day of maceration; <q.l., below quantification limits.

The method has been applied to experimental musts of Cabernet Sauvignon and Merlot, and analytes have been monitored along the ripening and harvest. 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine, 3-*sec*-butyl-2-methoxypyrazine, 3-isopropyl-2-methoxypyrazine and 3-ethyl-2-methoxy-pyrazine have been found in the musts. Their contents decrease during the ripening and the lowest contents were found in the harvest day. Maceration seems to enhance concentration levels, suggesting that 3-alkyl-2-methoxypyrazines could be present in the grape skins.

Acknowledgements

We thank the CICYT (Project No. ALI 97-0765) for their financial support.

References

- [1] P.A. Luning, T. Rijk, H.J. Wichers, J.P. Roozen, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 977.
- [2] J.A. Maga, Pyrazine update, *Food Reviews Int.* 8 (1992) 479.
- [3] C. Bayonove, R. Cordonnier, P. Dubois, *CR Acad. Sci. Paris, D* 281 (1975) 75.
- [4] Y. Kotseridis, A. Anocibar Belcoqui, A. Bertrand, J.P. Doazan, *Am. J. Enol. Vitic.* 49 (1998) 44.
- [5] K. Hashizume, N. Umeda, *Biosci Biotechnol. Biochem.* 60 (1996) 802.
- [6] K. Hashizume, S. Kida, T. Samuta, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4382.
- [7] M.S. Allen, M.J. Lacey, *Vitic. Enol. Sci.* 48 (1993) 211.
- [8] R.L.N. Harris, M.J. Lacey, W.V. Brown, M.S. Allen, *Vitis* 26 (1987) 201.
- [9] M.S. Allen, M.J. Lacey, R.L.N. Harris, W.V. Brown, *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (1991) 109.
- [10] M.S. Allen, M.J. Lacey, S. Boyd, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1734.
- [11] M.J. Lacey, M.S. Allen, R.L.N. Harris, W.V. Brown, *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (1991) 103.
- [12] M.S. Allen, M.J. Lacey, S. Boyd, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 769.
- [13] Y. Kotseridis, R. Baumes, G.K. Skouroumounis, *J. Chromatogr. A* 824 (1998) 71.
- [14] Y. Kotseridis, R. Baumes, A. Bertrand, G.K. Skouroumounis, *J. Chromatogr. A* 841 (1999) 229.
- [15] H. Masuda, S. Mihara, *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 584.
- [16] H. Heymann, A.C. Noble, R.B. Boulton, *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 268.
- [17] J.O.K. Boison, R.H. Tomlinson, *J. Chromatogr.* 522 (1990) 315.
- [18] X. Yang, T. Peppard, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1925.
- [19] D. De la Calle, S. Magnaghi, M. Reichenbaecher, K. Dancer, *J. High Resolut. Chromatogr.* 19 (1996) 257.
- [20] D. De la Calle, M. Reichenbaecher, K. Dancer, C. Hurlbeck, C. Baertzsich, K.H. Feller, *J. High Resolut. Chromatogr.* 20 (1997) 665.
- [21] D. De la Calle, M. Reichenbaecher, K. Dancer, C. Hurlbeck, C. Baertzsich, K.H. Feller, *J. High Resolut. Chromatogr.* 21 (1998) 373.
- [22] G. Bas, L. Gal, J. Arangi, A. Dobo, K. Vekey, *J. Chromatogr. Sci.* 36 (1998) 505.
- [23] G. Bas, K. Koteleky, M. Farkas, A. Dobo, K. Vekey, *Am. J. Enol. Vitic.* 49 (1998) 100.
- [24] M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 808 (1998) 211.
- [25] M. Mestres, C. Sala, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 137.
- [26] M. Mestres, C. Sala, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 293.
- [27] W.M. Coleman, *J. Chromatogr. Sci.* 35 (1997) 245.
- [28] O.P.H. Augustyn, A. Rapp, J. Wyk, *South African J. Enol. Vitic.* 3 (1982) 53.
- [29] Z. Zhang, M.J. Yang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 66 (1994) 844.

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

Journal of Chromatography A, 953 (2002) 1-6

HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION ANALYSIS OF 3-ALKYL-2-METHOXPYRAZINES IN WINES

C. Sala, M. Mestres, M. P. Martí, O. Busto, J. Guasch*

Departament de Química Analítica i Química Orgànica (Unitat d'Enologia, CeRTA), Facultat d'Enologia de

Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Ramón y Cajal 70, E-43005 Tarragona, Spain



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 953 (2002) 1–6

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines[☆]

C. Sala, M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch*

Departament de Química Analítica i Química Orgànica (Unitat d'Enologia, CeRTA), Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Ramón y Cajal 70, E-43005 Tarragona, Spain

Received 12 June 2001; received in revised form 5 February 2002; accepted 5 February 2002

Abstract

A procedure to determine 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines is described. It is based on the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) technique after a clean-up of the sample by distillation (previously acidified to pH 0.5) to remove ethanol and other volatile compounds that can interfere in the SPME. Determination is performed by means of capillary gas chromatography using a nitrogen–phosphorus detector. The method allows quantification of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine, 3-*sec*-butyl-2-methoxypyrazine and 3-isopropyl-2-methoxypyrazine at their natural concentration levels and below their sensory thresholds in Cabernet Sauvignon and Merlot wines. The method was successfully applied to experimental red wines and the evolution of their pyrazine contents during the winemaking process was monitored. Pyrazine content increased during the first maceration day but did not change significantly during alcoholic and malolactic fermentation. Final contents in wines were 12–27 ng/l of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine and 5–10 ng/l of 3-*sec*-butyl-2-methoxypyrazine © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Headspace analysis; Solid-phase microextraction; Wine; Food analysis; Aroma compounds; Alkylmethoxypyrazines; Pyrazines

1. Introduction

3-Alkyl-2-methoxypyrazines are very potent odorous compounds which occur widely in natural products, such green peas and bell peppers [1–3]. 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP), 3-*sec*-butyl-2-methoxypyrazine (SBMP) and 3-isopropyl-2-meth-

oxypyrazine (IPMP) have been reported to be present at very low concentrations (ng/l) among the aroma components of Cabernet sauvignon, Merlot noir and Sauvignon blanc wines, where they contribute to the vegetative/herbaceous/bell pepper character of these wines [4–11]. Although the concentrations of these compounds are very low, they can influence the wine aroma because of their extremely low sensory thresholds. Indeed, sensory thresholds for IPMP, SBMP and IBMP are 1–2 ng/l in water [1,12]. It has been reported that the sensory threshold of IBMP in red wines is higher, about 10–16 ng/l [10,11].

Due to the extremely low concentrations at which

[☆]Presented at the 30th Scientific Meeting of the Spanish Group of Chromatography and Related Techniques/1st Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Valencia, 18–20 April 2001.

*Corresponding author.

E-mail address: qaelnol@fe.urv.es (J. Guasch).

3-alkyl-2-methoxypyrazines occur in wines, their identification and quantification is very difficult. The presence of ibmp in Cabernet Sauvignon grape juice was reported for the first time in 1975 [13] and later was found in Sauvignon blanc wines [4]. Since then, several methods for analysing 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines have been reported [14,15].

Accurate quantification of IBMP in wines, with detection limits below its sensory threshold, was achieved by GC–MS using a deuterium labeled internal standard [5]. Though the stable isotope dilution method is very laborious, because it involves distillation of wine and extraction of IBMP by cation-exchange resin and liquid–liquid extraction, it has been used for the determination of pyrazines in wines [6–8]. This method has been modified to enable the use of a commercial non-labeled internal standard [16] and used in the study of pyrazines in must and wines [17,18].

Also, a simple and quick method, using liquid–liquid extraction and GC–MS has recently been described [10]. Nevertheless, detection limits of the method are very close to the sensory threshold of the analytes and it has been improved by using the stable isotopic dilution assay [19].

Thus, determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines requires very sensitive and selective techniques as well as the ability to greatly concentrate the analytes. Recently, we have developed a method based on headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection (GC–NPD) for the analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts [20]. This method provides high recoveries and detection limits at 0.1 ng/l level for IBMP and SBMP.

HS-SPME is a relatively new technique that allows a solventless extraction together with a concentration of volatile compounds [21–23]. It has been applied for the determination of volatile compounds in foods and beverages [24–26] and particularly for the analysis of wine aroma [27–35]. The technique is based on the use of a polymer-coated silica fiber that is housed in a stainless-steel needle of a modified syringe. This special device allows the exposure of the fiber to the headspace above a sample wherein the volatile compounds are extracted by and concentrated on the polymer phase. Then, the

device allows the removal of the fiber from the headspace and its transfer into the injection port of the gas chromatograph, where the compounds extracted are thermally desorbed. A technique based on HS-SPME coupled with GC–MS/flame ionization detection (FID) has been used to analyse pyrazines and other Maillard reaction products, reaching detection limits at the $\mu\text{g/l}$ -level [36]. Because of its sensitivity, low cost and time saving, the SPME technique is better than the classical techniques of sample treatment.

The aim of this study was to set up a method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines by means of HS-SPME with GC–NPD, taking into account the previously developed method for must analysis [20], which was modified in order to adapt it to the determination of the same compounds in wines.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Analyte standards were all supplied by Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). They were the following: 2-methoxypyrazine (MP) [3149-28-8], 3-methyl-2-methoxypyrazine (MEMP) [2847-30-5], 3-ethyl-2-methoxypyrazine (ETMP) [25680-58-4], IPMP [25773-40-4], SBMP [24168-70-5] and IBMP [24683-00-9]. 3-Isopropyl-2-ethoxy-pyrazine (IPEP) [72797-16-1] was used as internal standard and was provided by Pyrazine Specialties (Atlanta, GA, USA). The purity of all standards was above 97%.

Stock solutions of 200 $\mu\text{g/ml}$ of each pyrazine were prepared in HPLC-grade absolute ethanol. They were stored in darkness at $-23\text{ }^\circ\text{C}$ until use. Stability tests proved that pyrazines stored like this are perfectly stable for more than 20 months. All solutions prepared from these stock solutions were used for a maximum of 1 month and care was taken to avoid photodegradation [14] of the pyrazines.

A global standard solution containing 2 $\mu\text{g/ml}$ of each analyte and a solution containing 2 $\mu\text{g/ml}$ of IPEP were prepared by dilution of the stock solutions in freshly boiled deionized water. A pyrazine-free wine spiked with suitable amounts of these solutions was used to prepare the samples for the study of

recoveries and detection limits of the HS-SPME method for wines. Samples of this wine with 10 ng/l of each standard and IPEP were used to study the recoveries, and samples with progressively lower concentrations of the analytes and IPEP (10 ng/l) were used to find out the detection limits.

2.2. Musts and wines

Experimental wines of the varieties Merlot and Cabernet Sauvignon were made at the experimental cellar of the Facultat d'Enologia de Tarragona (Universitat Rovira i Virgili) at Constantí (Tarragona, Spain). Samples were collected after each

without losing the protonated pyrazines. Subsequent neutralisation of the ethanol-free solution allowed the SPME of pyrazines without any interference. Thus, the final procedure for wines was the following: 10 ml of wine was spiked with 1 ml of IPEP (100 ng/l), acidified with HCl and distilled on a rotary evaporator at low pressure (water pump) and room temperature. After reducing the volume of the sample to 50%, the resulting solution was neutralised with NaOH (pH 7) and transferred into a 20-ml vial containing 3 g of NaCl and a magnetic stirrer. The vial was thickly capped with PTFE-faced silicone septum and the SPME extraction was performed at 30 °C during 4 h with constant stirring. After ex-

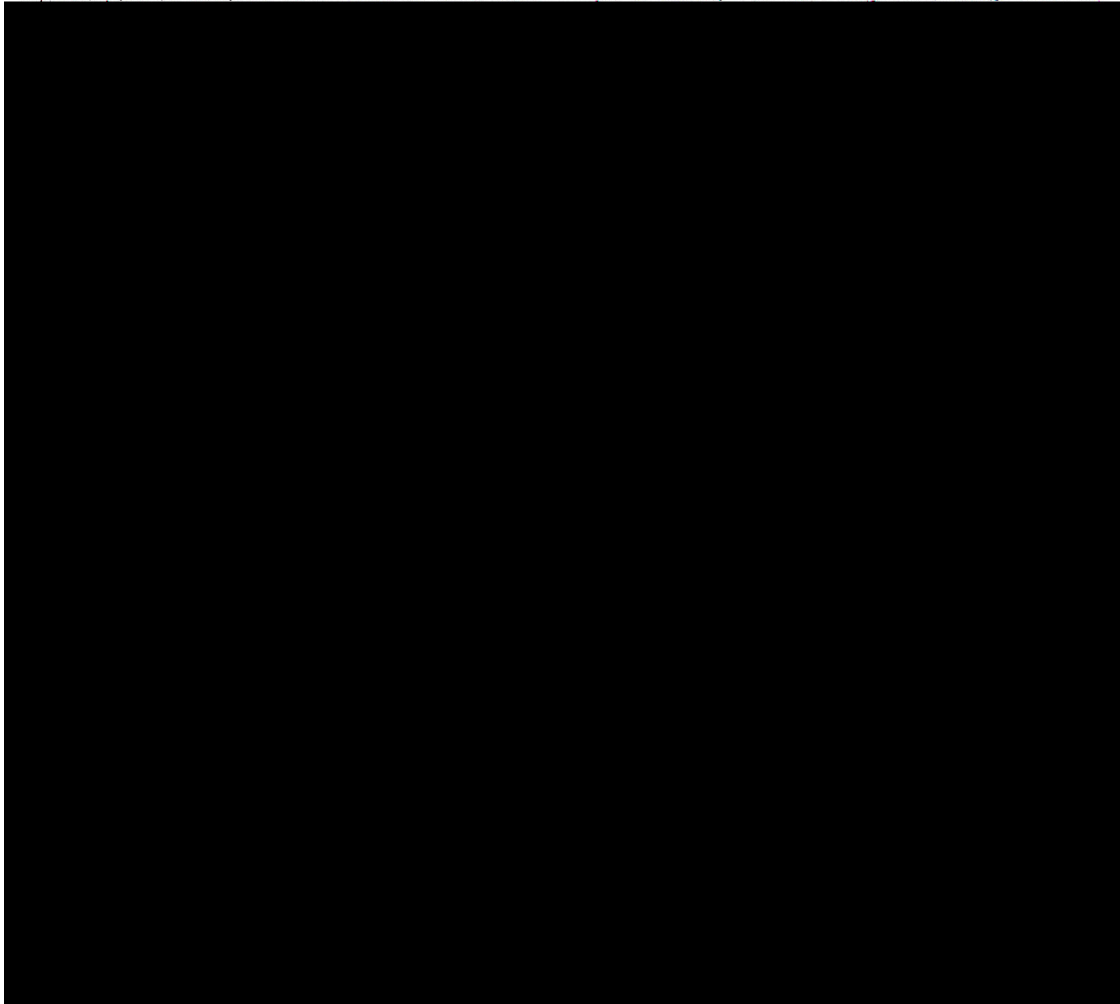


Table 1
Analytical parameters of the HS-SPME method for wines

Pyrazines	Recovery \pm SD (%)	LOD (ng/l)
MP	36.2 \pm 15.1	4.0
MEMP	31.0 \pm 12.5	4.0
ETMP	78.3 \pm 24.8	1.0
IPMP	80.5 \pm 14.2	0.3
SBMP	100.7 \pm 12.0	0.3
IBMP	104.7 \pm 17.0	0.3

Mean recoveries and standard deviations (SD) for the extraction of 10 ml of a pyrazine-free red wine spiked with 10 ng/l of pyrazines ($n=6$). Percentages are calculated from the values obtained by the method, using the calibration curves published in Ref. [20]. Limits of detection (LODs) of the overall method.

was achieved under these conditions on both columns, the same oven program was used for both of them.

3. Results and discussion

The HS-SPME parameters (fibre coating, temperature, ionic strength, and extraction time) were optimised for the analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts in our previous work [20]. A good chromatographic separation of the target pyrazines was obtained in less than 20 min with the CP-Wax 57 CB column. Using IPEP as internal standard (I.S.), the calibration graphs showed a very good correlation

($r^2 > 0.99$). These were constructed, as in the previous study [20], with five replicates of six standard solutions in the range 2–100 ng/l of each analyte, all of which contained I.S. at 10 ng/l. Regression, slope and intercept values were calculated by the linear least-squares method.

The HS-SPME method for analysing pyrazines in wines shows very high mean recoveries (Table 1), with acceptable standard deviations. For the most important analytes, SBMP and IBMP, recovery is about 100%. IPMP and ETMP showed mean recoveries from 78 to 80%, MEMP and MP were found to have the lowest mean recoveries (31–36%) and the highest relative standard deviations. These recoveries are good enough for quantification of IBMP, SBMP, IPMP and ETMP in red wines. Besides, the chromatograms obtained with this method show a clean baseline in the region of the analytes, proving that the HS-SPME method provides a good clean-up of the sample, together with a high concentration of the analytes (Figs. 1 and 2).

Limits of detection, with a signal-to-noise ratio of 3, are 0.3 ng/l for IPMP, SBMP and IBMP, and 1 ng/l for ETMP (Table 1). MEMP and MP show higher detection limit levels. The method is suitable for the quantification of 3-alkyl-2-methoxypyrazines at their natural concentration levels in Cabernet sauvignon and Merlot wines.

SBMP and IBMP were identified in both experimental wines (Figs. 1 and 2), and the peak of the

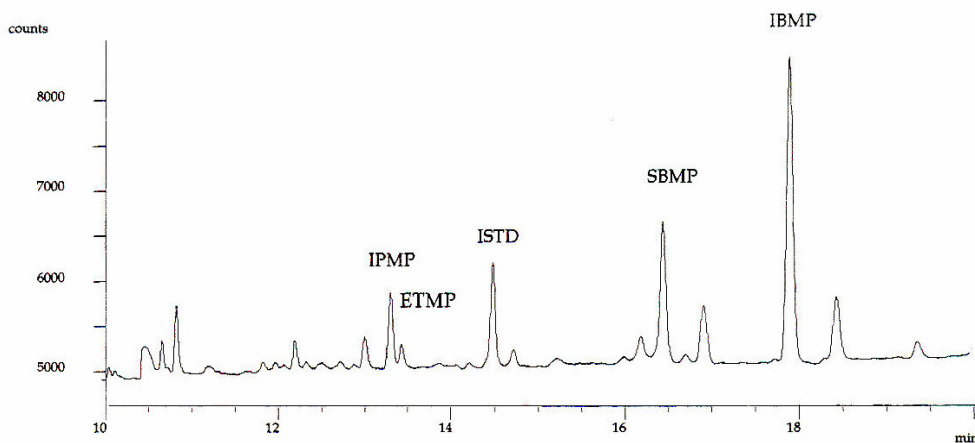


Fig. 1. Chromatogram of a Merlot wine sample analysed using the proposed procedure.

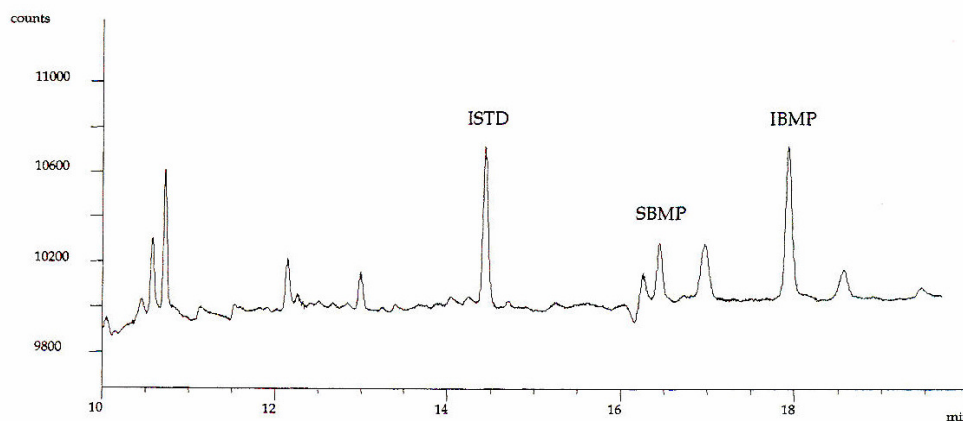


Fig. 2. Chromatogram of a Cabernet sauvignon wine sample analysed using the proposed procedure.

former was in all cases smaller than that of the later. IPMP was clearly identified and quantified in Merlot wines. The concentrations of this compound were clearly lower than those of both SBMP and IBMP. IPMP was not identified in the analysed wines and, although it was identified in some Cabernet sauvignon musts, its contents were generally very close to the detection limits and quantification could not be achieved. ETMP was identified in some Merlot wines and its peak can be observed in Fig. 1. However, the concentration of this compound was always too low to be quantified.

Pyrazine concentrations at the harvest were very low (Table 2). However, there is an important increase in the pyrazine contents throughout the winemaking process, which agrees with data published in the literature [37]. A possible explanation for these results is that 3-alkyl-2-methoxypyrazines

occur mainly in the skins of the fruits and they pass to the grape juice during maceration. This hypothesis is supported by the fact that, according to the results presented here, the main increase in the pyrazine content took place during the first maceration day. Moreover, pyrazine contents showed a slight increase or remained constant during alcoholic fermentation, and malolactic fermentation did not alter significantly their concentrations either.

4. Conclusions

A procedure for the analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines was developed as an adaptation of a previously described HS-SPME method. The method allows the determination of the most relevant pyrazines (IBMP, SBMP and IPMP) in wines, with

Table 2

Ranges of pyrazine contents of the three samples and their evolution throughout the winemaking process of experimental musts and wines

Samples	Pyrazine (ng/l)					
	Merlot			Cabernet sauvignon		
	IBMP	SBMP	IPMP	IBMP	SBMP	IPMP
1	3.4–8.6	1.0–4.4	1.0–3.2	1.7–2.9	–	–
2	13.6–24.1	12.1–22.5	4.7–10.3	8.1–12.4	1.3–4.8	–
3	17.5–35.1	4.5–15.7	2.4–7.4	10.6–15.5	2.4–4.5	–
4	18.8–38.0	4.2–15.1	2.5–6.1	8.2–16.3	3.4–5.8	–

Samples: (1) musts collected on harvest day; (2) musts collected after 1 day of maceration with the solid parts; (3) wines at the end of alcoholic fermentation; (4) wines at the end of malolactic fermentation. All samples were analysed in duplicate.

detection limits at the 0.3 ng/l level, and recoveries higher than 80%. The presented HS-SPME method allows quantification of these pyrazines in red wines at their natural concentration levels, below their sensory thresholds. This method can be suitable for oenological laboratory work because of its simplicity and rapidity.

Acknowledgements

We thank the CICYT (project ALI 97-0765) for their financial support.

References

- [1] K.E. Murray, J. Shipton, F.B. Whitfield, *Chem. Ind.* 1 (1970) 897.
- [2] K.E. Murray, F.B. Whitfield, *J. Sci. Food Agric.* 26 (1975) 973.
- [3] J.A. Maga, *Food Rev. Int.* 8 (1992) 479.
- [4] O.P.H. Augustyn, A. Rapp, J. Van Wyk, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 3 (1982) 53.
- [5] R.L.N. Harris, M.J. Lacey, W.V. Brown, M.S. Allen, *Vitis* 26 (1987) 201.
- [6] M.J. Lacey, M.S. Allen, R.L.N. Harris, W.V. Brown, *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (1991) 103.
- [7] M.S. Allen, M.J. Lacey, S. Boyd, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1734.
- [8] M.S. Allen, M.J. Lacey, S.J. Boyd, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 769.
- [9] J. Marais, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 19 (1998) 10.
- [10] Y. Kotseridis, A. Anocibar Beloqui, A. Bertrand, J.P. Doazan, *Am. J. Enol. Vitic.* 49 (1998) 44.
- [11] D. Roujou de Boubee, C. Van Leeuwen, D. Dubourdiou, *J. Agric. Food. Chem.* 48 (2000) 4830.
- [12] M.S. Allen, M.J. Lacey, R.L.N. Harris, W.V. Brown, *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (1991) 109.
- [13] C. Bayonove, R. Cordonnier, P. Dubois, *C. R. Acad. Sci. (Paris) Ser. D* 281 (1975) 75.
- [14] H. Heymann, A.C. Noble, R.B. Boulton, *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 268.
- [15] J.O.K. Boison, J.H. Tomlinson, *J. Chromatogr.* 522 (1990) 315.
- [16] K. Hashizume, N. Umeda, *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 (1996) 802.
- [17] K. Hashizume, S. Kida, T. Samuta, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4382.
- [18] K. Hashizume, T. Samuta, *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (1999) 194.
- [19] Y. Kotseridis, R.L. Baumes, A. Bertrand, G.K. Skouroumounis, *J. Chromatogr. A* 841 (1999) 229.
- [20] C. Sala, M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 93.
- [21] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [22] R. Eisert, J. Pawliszyn, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 27 (1997) 103.
- [23] J. Pawliszyn, *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [24] H. Takaoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35.
- [25] X. Yang, T. Peppard, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1925.
- [26] A. Steffen, J. Pawliszyn, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2187.
- [27] M. De la Calle, S. Magnaghi, M. Reichenbaeher, K. Danzer, *J. High Resolut. Chromatogr.* 19 (1996) 257.
- [28] M. De la Calle, M. Reichenbaeher, K. Danzer, C. Hurlbeck, C. Baertzs, K.H. Feller, *J. High Resolut. Chromatogr.* 20 (1997) 665.
- [29] M. De la Calle, M. Reichenbaeher, K. Danzer, C. Hurlbeck, C. Baertzs, K.H. Feller, *J. High Resolut. Chromatogr.* 21 (1998) 373.
- [30] G. Vas, L. Gal, J. Aragi, A. Dobo, K. Vekey, *J. Chromatogr. Sci.* 36 (1998) 505.
- [31] G. Vas, L. Gal, K. Koteleky, M. Farkas, A. Dobo, K. Vekey, *Am. J. Enol. Vitic.* 49 (1998) 100.
- [32] M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 808 (1998) 211.
- [33] M. Mestres, C. Sala, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 137.
- [34] M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 293.
- [35] M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 583.
- [36] W.M. Coleman, *J. Chromatogr. Sci.* 35 (1997) 245.
- [37] M.S. Allen, *Aust. Grapegrower Winemaker June* (1994) 22.