

El desenvolupament de mètodes per a l'anàlisi de les 3-alquil-2-metoxipirazines (MPs) en vins és molt difícil degut a la pròpia complexitat de la matriu vinosa i sobretot als continguts extremadament baixos a què aquests compostos es troben a les mostres. Així doncs l'analista té el repte d'aïllar, identificar i quantificar compostos aromàtics que es troben en quantitats molt petites dins una massa d'altres substàncies que són presents a nivells de concentració que els superen en molts ordres de magnitud.

En aquest capítol es resumeixen les tècniques per a l'anàlisi de MPs descrites a la literatura i es comenten els diferents aspectes de separació, anàlisi cromatogràfica i paràmetres analítics. Finalment el capítol recull un article amb una revisió bibliogràfica sobre aquest tema.

### **3.1. Extracció de les 3-alquil-2-metoxipirazines en vins**

Degut a la dificultat que presenta la separació de les MPs en raïm, most i vi, els mètodes que s'han descrit a la literatura sovint es basen en combinacions de diferents tècniques de separació. La classificació d'aquests mètodes és difícil degut a la seva complexitat. Malgrat tot, considerant la tècnica principal en què es basen, es poden dividir en els següents tipus: extracció líquid-líquid (LLE), extracció en fase sòlida (SPE) i microextracció en fase sòlida (SPME).

#### **3.1.1. Extracció líquid-líquid**

Aquesta tècnica és la més simple i la més generalment emprada en la determinació de compostos aromàtics d'aliments. La seva aplicació a l'anàlisi de MPs exigeix un sistema de detecció molt sensible i almenys un pas selectiu. La Taula 1 resumeix les principals característiques dels mètodes basats en la LLE, que es comenten a continuació.

**FREÓ 11.** S'han descrit tres mètodes diferents, basats en la LLE amb Freó 11, que permeten l'anàlisi de MPs en vins (1-3). L'objectiu d'aquests procediments és l'anàlisi general d'aromes de vins més que no pas específicament la determinació de les MPs. En els tres casos l'extracte obtingut per LLE es concentra per columna de rectificació o bé per destil·lació a baixa pressió, presentant factors de concentració de 1.000 a 5.000 (Taula 1), els quals, dins el context de la determinació de MPs en vins, són relativament baixos.

Un d'aquests mètodes va permetre detectar 3-etil-2-metoxipirazina (ETMP), 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP) i, amb menys fiabilitat, 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP), en raïms de Sauvignon blanc per primera vegada (1). Si bé aquests compostos no es van poder quantificar, aquest treball va ser important perquè va suggerir que aquestes MPs podrien ser responsables de l'aroma típica d'aquesta varietat, cosa que es va confirmar posteriorment. Alguns detalls del procediment són descrits en un treball anterior (4).

SOLVENT		MOSTRA		CONCENTRACIÓ	VOLUM FINAL (µL)	CF*	REF.
TIPUS	VOLUM (mL)	TIPUS	VOLUM				
Freó 11	50	Raïm	2 x 250 g	Columna de rectificació	30-50	5.000	(1)
Freó 11	250	Vi	95 mL	Destil·lació a baixa pressió	25-75	1.267-3.800	(2)
Freó 11	2 x 250	Vi	1.100 mL	Columna de rectificació	1,1-110	10-1.000	(3)
Èter etílic	3 x 25	Vi	200 mL	Destil·lació a baixa pressió i corrent N <sub>2</sub>	200	2.000	(6)
Èter etílic / hexà (1/1 v/v)	4 + 2 + 2	Vi	50 mL	Corrent de N <sub>2</sub>	(4 x) 200	62,5	(7)
Èter etílic / hexà (1/1 v/v)	3 x 5	Raïm i vi	Vi: 250 mL; Raïm: 1.000 g	Corrent de N <sub>2</sub>	100	1.000	(8)

**Taula 1.** Principals paràmetres de les tècniques d'extracció líquid-líquid per a la determinació de MPs de raïm, most i vi. \*CF: Factor de concentració = volum inicial de la mostra / volum de l'extracte final.

El procediment que va permetre la determinació d'IBMP en vins per primera vegada és relativament complex. Es basa en la LLE mitjançant un aparell específicament dissenyat per a l'extracció i concentració, incloent dos estadis d'evaporació a baixa temperatura i al buit (2). Els resultats obtinguts indiquen un nivell extraordinàriament alt (500 ng/L) d'IBMP en un vi de Burdeus, de fet el nivell més alt que s'ha descrit mai a la bibliografia, cosa que suggereix un possible biaix en la determinació.

Un mètode general per a l'anàlisi d'aromes en vins, basat en una LLE amb Freó 11, ha permès detectar IPMP i IBMP en vins negres. L'objectiu del mètode és la determinació del nombre, tipus, i importància relativa dels compostos aromàtics amb impacte en l'aroma dels vins analitzats, de les varietats Merlot noir, Cabernet Sauvignon i Garnatxa. La LLE del vi amb Freó 11 és seguida d'una concentració per columna de rectificació i finalment s'analitzen les fraccions àcida i neutra (3).

**DICLOROMETÀ.** La determinació de MPs per LLE amb diclorometà ha resultat en una manca d'evidència de la presència d'aquests compostos en una mostra de 170 L de vi de Cabernet sauvignon de forta aroma 'herbàcia'. Aquest complex mètode consisteix en una LLE amb 12 extraccions successives fins a un total de 5,5 L de diclorometà. El procés d'extracció dura 21 dies i inclou una re-extracció del vi prèviament alcalinitzat (pH 12). Després d'eliminar els àcids lliures dels extractes, s'assequen i concentren a baixa temperatura per destil·lació al buit. Finalment s'analitzen les fraccions de punts d'ebullició baixos, mitjans i alts (5). El fet que no s'hagin detectat MPs amb aquest mètode en una mostra tan gran de vi demostra que la recuperació i selectivitat del mètode són fonamentals per a l'anàlisi de les MPs en vins.

**ÈTER ETÍLIC.** Un mètode basat en una simple LLE amb èter etílic, seguit de la concentració per corrent de N<sub>2</sub> ha permès aïllar i determinar la IBMP en vins negres (6). Aquest procediment és pràctic ja que es pot dur a terme en menys d'una hora.

**ÈTER ETÍLIC/HEXÀ.** S'han descrit dos mètodes semblants per a la determinació d'IBMP en vins de Merlot noir. Ambdós es basen en la LLE amb una mescla d'èter etílic i hexà, seguida d'una concentració per corrent de N<sub>2</sub> (9, 10). La principal avantatge d'aquesta mescla de solvents és que forma un nivell d'emulsió més baix que altres extractants. Aquests procediments són ràpids (cal menys d'una hora per a l'aïllament i concentració) i relativament simple, però no selectius.

### 3.1.2. Extracció en fase sòlida

La identificació d'IBMP en raïm de Cabernet sauvignon per primera vegada es va aconseguir mitjançant un procediment bastant complex, basat en la destil·lació al buit de raïm premsat, una LLE del destil·lat amb pentà, una SPE amb gel de sílice i una posterior concentració (9). El mètode per a la LLE amb pentà és descrit en un treball previ (10): el destil·lat passa, en forma de petites gotes, a través d'una columna de vidre plena de pentà.

Posteriorment s'han descrit altres mètodes basats en la combinació de la destil·lació amb la SPE, les principals característiques dels quals són recollides a la Taula 2. El tipus de SPE emprada és d'extracció apolar, amb fase octadecil (C18) o bé d'extracció per bescanvi de cations, amb fase de grup funcional d'àcid benzensulfònic (SCX). Aquesta darrera ha conduït al desenvolupament d'alguns dels millors mètodes d'anàlisi de MPs en raïm, most i vi.

**OCTADECILSILÀ (C18).** La quantificació de la IBMP i la IPMP en una matriu vinosa s'ha intentat fer mitjançant una SPE de fase C18. El mètode consisteix en la destil·lació amb arrossegament de vapor d'un vi a pH 5, recollint el destil·lat en una solució àcida; el destil·lat s'extreu per SPE de fase C18 i s'elueix amb metanol; finalment hi ha una separació per HPLC de fase inversa amb detecció per llum ultraviolada (11). La destil·lació amb arrossegament de vapor es fa per tal de separar els compostos no volàtils, alguns dels quals (sobretot fenols)

coelueixen amb la IBMP en les condicions cromatogràfiques descrites (12). Degut a la seva manca de sensibilitat i selectivitat, aquest mètode només s'ha pogut aplicar a vins blancs lliures de MPs i addicionats amb els analits, a nivell de ng/L (12).

FASE	MOSTRA		PRETRACTAMENT	ELUCIÓ	CONCENTRACIÓ	VOL. FINAL (µL)	CF*	REF.
	TIPUS	VOLUM						
C-18	Vi	500 mL	Destil·lació amb arrossegament de vapor	Metanol	HPLC (fase inversa)	5.000	100	(11)
SCX	Vi	200 mL	Destil·lació	Aigua, pH 10	LLE (diclorometà) i evaporació espontània	10	20.000	(13)
		300 mL	Espai de cap dinàmic					
SCX	Vi	240 mL	Destil·lació	Aigua, pH 10	LLE (diclorometà) i evaporació espontània	20	12.000	(15)
SCX	Raïm i vi	Raïm: 1 kg; vi: 300 mL	Destil·lació	Aigua, pH 10,5	LLE (diclorometà) i evaporació sota corrent de N <sub>2</sub>	5	60.000	(19)
SCX	Raïm, most i vi	Raïm: 1 kg; most i vi: 250 mL	Destil·lació amb arrossegament de vapor	Solució 10% NaOH	LLE (diclorometà) i evaporació sota corrent de N <sub>2</sub>	10	25.000	(18)

**Taula 2.** Principals paràmetres de les tècniques de SPE. \*CF: Factor de concentració = volum inicial de la mostra / volum de l'extracte final.

**BESCANVI DE CATIONS (SCX).** Diferents mètodes han tret profit de la baixa volatilitat i el caràcter bàsic de les MPs. Si bé aquests compostos són bases en solució, s'ha vist que una resina SCX amb un grup funcional sulfònic pot atrapar les pirazines presents en un destil·lat de vi. El primer mètode basat en aquesta tècnica (13) ha resultat ser tan interessant i fiable que molts autors l'han emprada, amb petits canvis que aporten millores sobretot pel que fa a la sensibilitat (14-17). El procediment original va permetre la quantificació de les MPs en vins per primera vegada (13). Així doncs es va identificar IPMP, IBMP i SBMP en Sauvignon blanc i es van determinar a concentracions inferiors al seu llindar de detecció sensorial. Aquest procediment inclou una separació dels compostos volàtils de la matriu del vi per destil·lació a pressió atmosfèrica a pH 5-6; una SPE de fase SCX a fi d'atrapar els compostos bàsics, entre els quals les MPs; l'elució amb aigua a pH 10, una extracció amb diclorometà en condicions d'alta força

iònica (NaCl); i finalment una concentració per evaporació espontània. Malgrat els baixos percentatges de recuperació (5-15%), l'elevat factor de concentració (20.000) (Taula 2) permet l'anàlisi de les MPs en vins.

Una de les millores d'aquest procediment es centra en incrementar els percentatges de recuperació i consisteix en l'ús d'una quantitat més gran de resina SCX i en el tractament per destil·lació amb arrossegament de vapor (18). Aquesta destil·lació és molt més ràpida i proporciona recuperacions altes: es recupera el 85-100% de la IBMP de la mostra, mentre que la destil·lació a pressió atmosfèrica només permet recuperar un 6% d'aquest compost (18). Per altra banda, el factor de concentració (25.000) és força alt, cosa que proporciona molta sensibilitat al mètode.

En una altra modificació del mètode original es repassa el procediment de preparació de la mostra descrit en una publicació posterior (17) i s'aporten diferents millores (19). Els canvis més importants són l'ús la 2-metil-3-n-propil-pirazina com a patró intern, i el fet d'emprar una quantitat de resina SCX més alta per a l'extracció del destil·lat. Amb aquestes millores s'han aconseguit recuperacions de l'ordre del 86%-103%, junt amb un elevat factor de concentració: 60.000 (19).

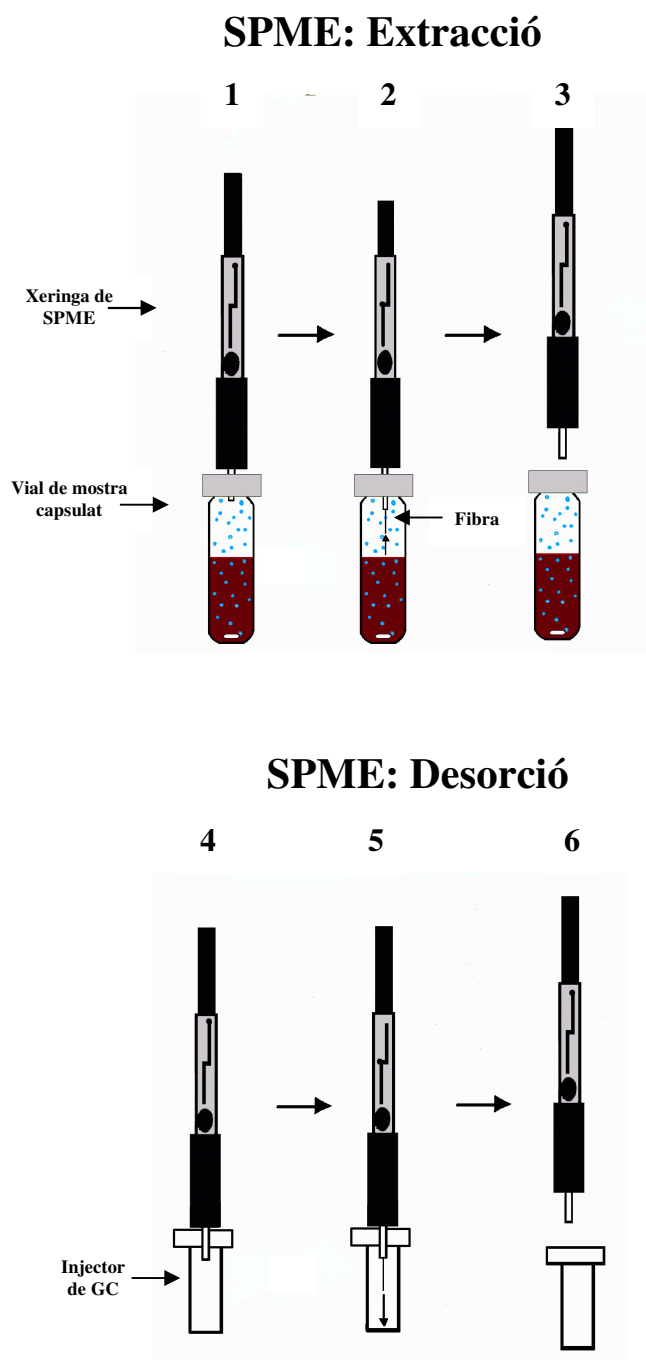
### **3.1.3. Microextracció en fase sòlida**

La SPME és una tècnica de preparació de mostra relativament nova que utilitza una fibra de sílice fosa, de molt petites dimensions, recoberta amb una fase estacionària. Els analits d'interès són alhora extrets i concentrats en aquesta fase i posteriorment la fibra s'injecta directament al GC mitjançant una xeringa especial. Els compostos extrets s'alliberen a l'alta temperatura de l'injector i s'analitzen per cromatografia.

La Fig. 1 il·lustra el procediment que cal seguir així com l'aspecte i funció de la xeringa especial que es requereix. S'observa que, en el procés de la microextracció, primer s'introdueix la mostra en un vial hermèticament tancat amb un *septum*. Després de condicionar i/o netejar la fibra, es perfora el *septum* amb l'agulla i, prement l'èmbol de la xeringa, es desembeina la fibra de tal manera que queda exposada a la mostra. Aleshores tenen lloc els processos d'extracció i concentració simultàniament. Després es puja l'èmbol de la xeringa per tal de retornar la fibra a l'interior de l'agulla que la protegeix i es retira l'agulla del vial. Per tal d'injectar l'extracte al GC cal seguir un procés semblant: es forada el *septum* de l'injector de GC i es baixa l'èmbol a fi que la fibra quedi exposada a una elevada temperatura (200-300°C). Així es produeix una desorció instantània dels analits a l'interior de l'injector des d'on entren a la columna cromatogràfica per a ser analitzats. La temperatura i durada de l'extracció, l'agitació, el pH i la força iònica del medi, el volum de mostra i el tipus de fibra són variables que cal optimitzar a la hora de posar a punt una tècnica d'extracció per SPME.

Els atractius principals d'aquesta tècnica són el baix cost, la simplicitat d'ús i la rapidesa, així com la seva gran sensibilitat, ja que presenta una gran capacitat de concentració dels compostos volàtils. Una altra avantatge és el fet que s'evita l'ús de dissolvents orgànics (20-22).

La SPME es pot aplicar a mostres sòlides, líquides o gasoses i n'hi ha dues variants. En una d'elles la fibra es submergeix a l'interior de la mostra líquida i en l'altra, molt més utilitzada, la fibra s'exposa a l'espai de cap de la mostra o *headspace* (HS-SPME). L'adequació de la variant a utilitzar dependrà dels analits i del tipus de mostra a analitzar. Mentre que la primera s'utilitza en mostres netes i per a analits no massa volàtils, la segona és més adient en el cas de compostos volàtils o bé per a l'anàlisi de matrius complexes. Una avantatge addicional d'aquesta darrera és el fet que proporciona una vida més llarga de la fibra.



**Fig. 1.** Procediment de microextracció en fase sòlida. 1. Perforació del sèptum del vial. 2. Exposició de la fibra: extracció i concentració. 3. Replegament de la fibra i retirada de l'agulla. 4. Perforació del sèptum del GC. 5. Exposició de la fibra: desorció tèrmica. 6. Replegament de la fibra i retirada de l'agulla.



La HS-SPME s'ha aplicat a la determinació dels compostos volàtils d'aliments i begudes (23, 24), així com a l'anàlisi de l'aroma del vi (25-31). A l'inici del treball presentat en aquesta memòria, aquesta tècnica no havia estat aplicada a l'anàlisi de MPs en raïm, most i vi. Val a dir, però, que les seves característiques la fan especialment adient per a aquest tipus d'anàlisi, motiu pel qual es va considerar el seu estudi, com es detalla a la part experimental.

## **3.2. Paràmetres cromatogràfics**

En aquest apartat es comenten els sistemes de detecció i les condicions cromatogràfiques emprades als principals mètodes per determinar MPs en raïm, most i vi, els quals són resumits a la Taula 3.

Degut a la seva sensibilitat, especificitat i fiabilitat, la tècnica generalment emprada per a analitzar MPs en raïms, mostos i vins és la GC. L'ús de HPLC per a l'anàlisi de les MPs en vins (11) no ha tingut èxit degut a que els límits de detecció a què es pot arribar per HPLC són superiors als requerits per a l'anàlisi de les MPs.

### **3.2.1. Sistemes de detecció**

La determinació de les MPs en raïm, most i vi exigeix sistemes de detecció molt sensibles i selectius. A continuació es comenten els principals detectors emprats, que són de tipus instrumental o bé aprofitant la superior sensibilitat del nas humà per aquests compostos, mitjançant la tècnica de l'olfactimetria.

**DETECTORS INSTRUMENTALS.** El detector que ha estat emprat amb més èxit en l'anàlisi de les MPs és el d'espectrometria de masses (MSD) (Taula 3). En canvi, el de nitrògen-fòsfor (NPD) s'ha utilitzat relativament poc, malgrat que és molt sensible i permet la determinació selectiva de compostos nitrogenats. Finalment, l'aplicació del detector d'ionització de flama (FID) ha estat sobretot com a complement de l'anàlisi per olfactimetria (1, 5, 9).

En el context de l'anàlisi de les MPs, els límits de detecció del MSD són relativament alts, de manera que l'ús d'aquest detector exigeix un procediment que proporcioni una bona recuperació i un factor de concentració molt alt. En dues ocasions s'ha descrit la identificació incerta de la IBMP degut a la manca de sensibilitat d'aquest detector, malgrat que l'extracte analitzat procedia de la concentració de l'aroma d'una gran quantitat de raïm de Cabernet sauvignon (9) i de Sauvignon blanc (1). La sensibilitat necessària per al primer mètode fiable per a la determinació de les MPs es va aconseguir amb un MSD amb ionització d'electrons (EI) i de cations (CI) (13). Més endavant, una modificació d'aquest mètode aplicava EI enlloc de CI cosa que és possible degut als alts percentatges de recuperació obtinguts mitjançant altres millores del mètode (19).

El NPD s'ha emprat en la determinació de MPs en vins com a complement de la tècnica d'olfactimetria, de la mateixa manera que el FID, però amb l'avantatge que el NPD és més específic: el cromatograma obtingut per FID d'un extracte d'una mostra no permetia distingir els pics de les MPs adicionades, cosa que va ser possible amb el cromatograma obtingut per NPD (4). Les característiques de sensibilitat i selectivitat d'aquest detector van conduir al plantejament de la seva aplicació a l'anàlisi de les MPs en el treball que aquí es presenta, malgrat que no havia estat emprat anteriorment per a aquest fi.

INJECTOR	COLUMNA	DETECTOR	SEPARACIÓ	ANALITS	REF.
<i>Splitless</i>	CW 20 M (23 m, 0,25 mm ID)	MSD	LLE Freó 11	Aromes del vi	(4)
<i>Splitless</i>	DB-WAX (50 m, 0,25 mm ID)	FID, NPD, MSD (EI, CI)	LLE Freó 11	Aromes del vi	(2)
PTV: 20°C, 6 s, 200°C/min fins 190°C	DB-WAX (60 m x 0,32 mm ID, 0,5 µm FT)	MSD (EI), olfactimetria	LLE Freó 11	Aromes del vi	(3)
	CW 20 M (44 m)	MSD, FID	LLE diclorometà	Aromes del vi	(5)
	CW 20 M (127 m, 0,75 mm ID)	FID	LLE diclorometà	Aromes del vi	(5)
IV: 100 µL	CW 20 M (305 cm, 4 mm ID)	FID, olfactimetria	LLE diclorometà	Aromes del vi	(5)
<i>Splitless</i>	CW 20 M (50 m, 0,25 mm ID, 0,2 µm FT)	MSD (EI)	LLE èter/hexà	IBMP, β-damascenona, α- i β-ionona, terpenols lliures i alcohols C-6	(7)
<i>Splitless</i>	CW 20 M (50 m, 0,25 mm ID, 0,2 µm FT)	MSD (EI)	LLE èter o bé èter/hexà	IBMP, β-damascenona, α- i β-ionona	(6, 8)
<i>On column</i> , trampa de retenció. IV: 3-6 µL	BP20 (25 m, 0,33 mm ID, 1,0 µm FT)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IBMP	(13)
<i>On column</i> , trampa de retenció. IV: 3-6 µL	DB-Wax (30 m, 0,32 mm ID, 0,5 µm FT)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IPMP, IBMP	(15)
<i>Splitless</i>	DB-WAX, (60 m, 0,32 mm ID, 0,25µm FT)	MSD (EI)	SPE SCX	IPMP, SBMP, IBMP	(19)
<i>Splitless</i>	BP 20 (50 m x 0,22 mm ID; 0,25 µm FT)	MSD (CI)	SPE SCX	IBMP	(18)
<i>On column</i> , trampa de retenció. IV: 3-6 µL	DB-1 (60 m, 0,32 mm ID, 1,0 µm FT)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IPMP, IBMP	(15)
<i>On column</i> , trampa de retenció. IV: 3-6 µL	DB-1701 (30 m, 0,32 mm ID, 1,0 µm FT)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IPMP, IBMP	(18)
PTV: 20°C, 6 s, 200°C/min fins 190°C	BP-5 (50 m, 0,32 mm ID, 1,0 µm FT)	MSD (EI), olfactimetria	LLE Freó 11	Aromes del vi	(3)
<i>On column</i> , trampa de retenció. IV: 3-6 µL	BP5 (25 m, 0,33 mm ID, 0,5 µm FT)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IBMP	(13)
<i>On column</i> , trampa de retenció. IV: 3-6 µL	BP5 (50 m, 0,32 mm ID, 1,0 µm FT)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IPMP, IBMP	(15)
<i>Splitless</i>	Reoplex 400 (150 m, 0,46 mm ID)	MSD	LLE Freó 11	Aromes del vi	(1)
<i>Splitless</i>	Reoplex 400 (150 m, 0,46 mm ID)	FID	LLE Freó 11	Aromes del vi	(1)
<i>Split</i> : 30:1	Reoplex 400 (65 m, 0,25 mm ID)	FID, NPD	LLE Freó 11	Aromes del vi	(1)
<i>Split</i> : 30:1	Reoplex 400 (65 m, 0,25 mm ID)	FID	LLE Freó 11	Aromes del vi	(1)
<i>Splitless</i>	SE-54 (30 m, 0,25 mm ID)	FID, NPD, MSD (EI, CI)	LLE Freó 11	Aromes del vi	(2)
	SE-30 (60 m)	MSD	LLE diclorometà	Aromes del vi	(5)

**Taula 3.** Condicions cromatogràfiques dels mètodes basats en GC. PTV: (Injecteur amb) Vaporització de temperatura programable. *Split*: amb divisió de flux. *Splitless*: sense divisió de flux. *On column*: (injecció) en fred a la columna. IV: Volum d'injecció. ID: Diàmetre Intern. FT: Gruix de la capa.

A la primera publicació sobre la presència de MPs en raïm ja s'observa que els cromatogrames obtinguts amb el FID no presenten un pic definit a la regió on es percebia l'olor de pebrot verd, de manera que no es va poder quantificar la IBMP d'un extracte de raïm de Cabernet sauvignon altament concentrat (9). Degut a la seva manca de selectivitat, el FID s'ha emprat sobretot per a relacionar les regions cromatogràfiques que presenten olor amb els pics detectats per olfactimetria (4, 5, 9). I en un dels mètodes revisats aquest detector s'utilitza com a complement del MSD mitjançant un sistema de divisió de flux al final de la columna (2).

**OLFACTIMETRIA.** Aquesta tècnica consisteix en substituir el detector utilitzat en cromatografia de gasos pel nas d'una persona capaç de percebre, descriure i quantificar la intensitat aromàtica dels compostos que elueixen de la columna cromatogràfica (32, 33). El seu interès principal és degut a que permet relacionar les dades obtingudes mitjançant l'anàlisi per GC amb les que s'obtenen per anàlisi sensorial. Així doncs, és possible construir per cada mostra el cromatograma de la seva aroma o aromagrama i separar la percepció aromàtica d'un compost de la influència d'altres constituents d'una barreja complexa de substàncies. Si bé cal tenir present la naturalesa variable d'aquesta informació, la seva anàlisi pot ser utilitzada per a avaluar l'impacte de cada compost en el conjunt de l'aroma estudiat. L'olfactimetria ha estat aplicada amb èxit en el camp de l'anàlisi d'aliments (34, 35) i concretament en l'estudi de l'aroma del vi (36).

Considerant les dificultats que l'analista ha d'afrontar en la identificació de les MPs, és lògic que s'hagi emprat l'avantatge dels baixos llindars de detecció sensorials d'aquests compostos per tal de detectar-los als complexos extractes de les mostres analitzades. La tècnica de l'olfactimetria ha estat molt útil en l'anàlisi qualitativa de les MPs en raïms, mostos i vins, degut a que la sensibilitat del nas humà per a les MPs és més alta que la dels sistemes de detecció disponibles.

L'olfactimetria va ser clau en la primera detecció i identificació de la IBMP en raïm de Cabernet sauvignon. Aquest compost va ser identificat de manera incerta i es va considerar el responsable de l'aroma 'de pebrot verd' característic del Cabernet sauvignon. Si bé no es va aconseguir confirmar la identitat del compost amb fiabilitat per MSD, es va poder confirmar que els temps de retenció i l'olor detectats eren els mateixos que els de la IBMP en cinc columnes cromatogràfiques diferents (9). En una altra ocasió, la comparació dels temps de retenció de les regions cromatogràfiques que presentaven les olors característiques amb els dels estàndards d'ETMP, IPMP i IBMP va permetre confirmar la identificació d'aquests compostos en raïms de Sauvignon blanc (1).

També s'ha emprat l'olfactimetria per a comparar la fiabilitat de dues tècniques alternatives per a l'extracció de compostos aromàtics, l'un basat en l'extracció líquid-líquid i una tècnica alternativa basada en l'extracció de l'espai de cap dinàmic. Es va observar que les intensitats aromàtiques detectades per olfactimetria eren molt més baixes que les obtingudes per LLE i es va concloure que el mètode de l'espai de cap era menys eficient (1).

Finalment, la intensitat relativa de l'olor de cada compost es pot determinar mitjançant la tècnica d'anàlisi de la dilució dels extractes de les aromes (AEDA). Aquesta tècnica consisteix en l'anàlisi per olfactimetria de diferents dilucions successives dels extractes: l'olor dels compostos més intensos o que es troben en major quantitat encara es percep després de moltes dilucions. D'aquesta manera es pot tenir una mesura aproximada de quina és la contribució de cada compost al conjunt total de l'aroma, de manera que es pot relacionar la informació de les anàlisis química i sensorial. La tècnica de l'AEDA s'ha aplicat a vins negres elaborats amb les varietats Merlot noir, Cabernet sauvignon i Garnatxa, i s'ha trobat la IPMP i la IBMP entre les aromes de major impacte sensorial presents als vins analitzats (3).

### 3.2.2. Condicions cromatogràfiques

L'anàlisi d'ultra-traces exigeix la màxima sensibilitat, junt amb una bona separació cromatogràfica dels analits. En conseqüència, molts autors que han treballat en aquest camp han ajustat molt les condicions cromatogràfiques per tal d'aconseguir els millors resultats possibles.

La injecció en fred a la columna, anomenada *on column*, permet acomodar volums de 3-6 µL, cosa que augmenta considerablement la sensibilitat. Aquest tipus d'injecció s'ha emprat amb èxit en la determinació de MPs en vins (13). També s'ha utilitzat l'injector amb vaporització de temperatura programable (PTV) per tal d'aconseguir una gran resolució cromatogràfica, injectant en fred i apujant sobtadament la temperatura fins a 190°C mitjançant una rampa de 200°C / min (3).

La programació de temperatura del forn es pot utilitzar per a millorar la sensibilitat, aprofitant l'efecte solvent. Aquesta tècnica consisteix en iniciar el programa amb una temperatura més baixa (més de 10°C per dessota) del punt d'ebullició del solvent. Aleshores, mitjançant un increment ràpid de la temperatura es supera molt ràpidament aquest punt. Finalment s'inicia la programació de temperatura que permet la separació cromatogràfica dels pics. L'efecte solvent s'ha emprat per incrementar al màxim la sensibilitat del GC-MSD (13).

Pel que fa a les columnes cromatogràfiques, es pot assenyalar que les més emprades són les capil·lars de sílice fosa, de fase polietilenglicol (columnes polars) i les de fase poli-(5%-difenil-95% dimetilsiloxà) (columnes apolars) (Taula 3). La comparació dels temps de retenció obtinguts amb 5 columnes de fases estacionàries molt diferents s'ha emprat per a identificar els compostos per GC (9). S'ha observat que la ETMP i la IPMP no es poden separar mitjançant diferents columnes Reoplex 400 en diferents condicions cromatogràfiques, però es poden separar parcialment amb una Carbowax 20 M. Aquesta separació insuficient va reduir la

fiabilitat de la primera identificació d'aquests compostos en raïms de Sauvignon blanc (1). La separació entre aquestes dues MPs s'aconsegueix amb una columna apolar tipus OV-101 (37).

### 3.3. Calibratge i paràmetres analítics

A banda de la sensibilitat i selectivitat, la recuperació i la fiabilitat del mètode tenen un paper important a l'hora d'aconseguir determinar compostos a l'ordre de magnitud en què es troben les MPs a les mostres de raïm, most i vi. Els detalls sobre els patrons interns, les recuperacions, els límits de detecció, la linealitat i la reproductibilitat dels mètodes revisats són resumits a la Taula 4.

PATRO INTERN	% R	DL (ng/L)	RSD (%)	REF.
Acetofenona		1.000		(2)
3-([1,1- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-isobutil 2-MP		2 (s/n=3)	3,4 % (n=3, 11 ng/L IBMP)	(6)
MEMP		2	5,3 % (n=7, 15 ng/L IBMP)	(7)
3-([1,1- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-isobutil 2-MP	90%	2 (s/n=3)	4,7 % (n=5, 30 ng/L IBMP)	(8)
Tetrametilpirazina	IBMP: 53 (4,1 mg/L) IPMP: 14 (5,6 mg/L)	1.200		(11)
3-isobutil-2-( <sup>2</sup> H <sub>3</sub> )-MP	5-10%	0,1 (MEMP)		(13)
3-isobutil- i 3-isopropil- 2-( <sup>2</sup> H <sub>3</sub> )-MP				(15)
3-isobutil- i 3-isopropil- 2-( <sup>2</sup> H <sub>3</sub> )-MP		0,15	2,4 - 4,1 % (n=2, IBMP) 0,5 - 7,5 % (4 mostos, IBMP) 0 - 28,6 % (4 mostos, IPMP)	(17)
3-isobutil- 2-( <sup>2</sup> H <sub>3</sub> )-MP			4,3 % (n=5, 15,4 ng/L IBMP)	(18)
2-metil-3-n-propil-pirazina	86 - 103 % (30 ng/L)	IBMP: <0,5 IPMP, SBMP: <1,0	3,0 % (40,4 ng/L IBMP) 5,2% (30,1 ng/L SBMP); 3,0% (30,9 ng/L IPMP)	(19)

**Taula 4.** Paràmetres analítics dels mètodes basats en GC. % R: Percentatges de recuperació; DL: límits de detecció; RSD (%): desviació estàndard relativa

La determinació de les MPs en raïm, most i vi no és possible si els límits de detecció del mètode són massa alts (3, 11). Mitjançant un sistema de detecció molt sensible s'han aconseguit límits de detecció de l'ordre de 2 ng/L amb procediments que proporcionen factors de concentració de 60-2.000 (6-8), els quals són insuficients per a la determinació de MPs en mostos i vins. Ara bé,

per arribar a límits de detecció inferiors a 1 ng/L es requereixen factors de concentració superiors a 10.000 (13, 17, 19).

L'obtenció de resultats fiables és molt difícil quan es treballa a nivell d'ultra-traces. El fet que els mètodes han d'estar molt ben optimitzats en termes de sensibilitat i selectivitat fa que aquests tendeixin a ser complicats i cada pas afegeix més problemes cara a la fiabilitat del mètode. L'analista ha de treballar de manera extremadament acurada per tal d'evitar la contaminació. Els mètodes que publiquen la linealitat i reproductibilitat presenten bons resultats. En efecte, la linealitat és generalment alta, amb una  $r^2$  superior a 0,9 (7, 8, 13, 15, 17-19). I els valors de la desviació estàndard relativa són inferiors al 10% (6-8, 17-19).

**PATRONS INTERNS.** Si la tria i ús correctes del patró intern és sempre crítica per a la fiabilitat d'un mètode analític, en el cas de la quantificació de les MPs en raïm, most i vi, això és encara més important degut al nivell d'exigència d'aquesta anàlisi.

Apart de la utilització de l'acetofenona (2), els patrons interns utilitzats han estat les pròpies pirazines i els seus isòtops. La 3-metil-2-metoxipirazina s'han emprat com a patró intern degut a la semblança de la seva estructura química a la de la IBMP (7). Malgrat que en una ocasió es va publicar que certs vins japonesos contenen de l'ordre de 500 ng/Kg de tetra-metil-pirazina (38), no s'ha tornat a descriure la presència d'aquest compost en vins en els darrers 30 anys. I la tetrametilpirazina s'ha emprat com a patró intern per a la quantificació de MPs en vins (11). Ara bé, en considerar l'ús d'aquest compost com a patró intern caldria tenir en compte que s'ha descrit que no és estable sota condicions de destil·lació amb arrossegament de vapor (11). Finalment, la 2-metil-3-n-propil-pirazina s'ha emprat com una alternativa fiable al patró intern marcat isotòpicament (19).

Els majors atractius de la tècnica de la dilució d'isòtops són la seva simplicitat i exactitud. Amb aquesta tècnica, el patró intern i l'analit són químicament idèntics, ja que el patró intern és el



propí analític. L'ús de la detecció per MSD permet distingir l'estàndard afegit i, amb les condicions cromatogràfiques adients, la IBMP marcada isotòpicament elueix 2-3 segons abans que la IBMP (13). La interferència deguda a compostos isotòpics naturals es pot evitar emprant anàlegs bi- o tri-deuterats. Al primer mètode fiable per a la determinació de MPs en mostres de vins, el paper de la 3-isobutil-2-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metoxipirazina va ser clau (13). I diverses modificacions del mateix mètode es basaven en l'ús del mateix patró intern (15, 18). Posteriorment, una de les millores d'aquest mètode va consistir en incloure l'ús simultani de dos patrons interns: la 3-isobutil- i la 3-isopropil-2-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metoxipirazina (14, 16, 17). El desenvolupament d'un mètode relativament senzill per a la síntesi d'un anàleg bideuterat de la IBMP (6), en què la marca radioactiva és a la cadena lateral isobutílica i no pas al grup metoxi, la 3-[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-isobutil-2-metoxipirazina, ha simplificat l'ús del patró intern marcat radioactivament i s'ha emprat amb èxit en diferents treballs (8).

## Conclusions

Cal no subestimar la dificultat de la determinació de les 3-alkuil-2-metoxipirazines (MPs) en raïm, most i vi, ja que s'ha requerit molt d'esforç per tal de desenvolupar alguns mètodes fiables. I, si bé s'ha demostrat que aquesta quantificació és possible, caldrà treballar molt encara per tal d'aconseguir mètodes totalment optimitzats i validats. Les principals conclusions d'aquest capítol són les següents:

1. La complexitat de la matriu vinosa i els continguts extremadament baixos a què es troben les MPs al raïm, most i vi exigeixen procediments analítics que proporcionin la màxima sensibilitat i selectivitat.
2. Els límits de detecció requerits per a l'anàlisi de les MPs en raïm, most i vi són inferiors a 1 ng/L. L'aplicació de la cromatografia de gasos requereix un mètode amb factor de concentració de 10.000 o superior.
3. El MSD, tant en mode d'ionització de cations com d'electrons, és el detector que ha estat aplicat amb més èxit en l'anàlisi de MPs. El NPD s'ha emprat relativament poc en l'anàlisi d'aquests compostos, malgrat la seva sensibilitat i selectivitat. L'olfactimetria és molt adient per a l'anàlisi qualitativa de les MPs, ja que el nas humà és més sensible que els detectors instrumentals. El FID és un bon complement d'aquesta tècnica, però la seva manca de selectivitat el fa poc útil en la determinació de les 3-alkuil-2-metoxipirazines.
4. L'ús de la destil·lació junt amb d'extracció en fase sòlida ha conduït al desenvolupament dels millors mètodes per a l'anàlisi de les MPs en raïm, most i vi.

5. Degut a les seves característiques de sensibilitat, rapidesa i simplicitat, la tècnica de la microextracció en fase sòlida de l'espai de cap resulta especialment idònia per a l'anàlisi de les MPs en raïm, most i vi.

Al final d'aquest capítol es presenta l'article titulat *Determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes, musts and wines: a review*, presentat a la revista *Journal of Agriculture and Food Chemistry* el Juny de 2004. Aquest treball recull una revisió bibliogràfica sobre els mètodes, descrits fins ara, per a la determinació de les MPs en raïm, most i vi.

## Bibliografia

1. Augustyn, O. P. H.; Rapp, A.; Wyk, J. Some Volatile Aroma Components of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1982**, *3*, 53-60.
2. Boison, J. O. K.; Tomlinson, R. H. New sensitive method for the examination of the volatile flavor fraction of cabernet sauvignon wines. *J. Chromatogr.* **1990**, *522*, 315-327.
3. López, R.; Ferreira, V.; Hernández, P.; Cacho, J. F. Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 1461-1467.
4. 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.
5. Slingsby, R. W.; Kepner, R. E.; Muller, C. J.; Webb, A. D. Some volatile components of *Vitis vinifera* variety Cabernet sauvignon wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1980**, *31*, 360-363.
6. Kotseridis, Y.; Baumes, R.; Skouroumounis, G. K. Synthesis of labelled [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] β-damascenone, [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>] α-ionone, and [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>] β-ionone, for quantification in grapes, juices and wines. *J. Chromatogr. A.* **1998**, *824*, 71-78.
7. Kotseridis, Y.; Anocibar, A.; Bertrand, A.; Doazan, J. P. An Analytical Method for Studying the Volatile Compounds of Merlot noir Clone Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 44-48.
8. 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.
9. 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.
10. Bayonove, C.; Cordonnier, R. Recherches sur l'arôme du Muscat. *Ann. Technol. Agric.* **1971**, *20* 347-355.
11. 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.
12. Noble, A.C.; ElliottFisk, D.L.; Allen, M.S. Vegetative flavor and methoxypyrazines in Cabernet Sauvignon. *Fruit Flavors.* **1995**, *596*, 226-234.
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. Determination of Methoxypyrazines in Red Wines by Stable Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1734-1738.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Hashizume, K.; Umeda, N. Methoxypyrazine content of Japanese red wines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 802-805.
20. Eisert, R.; Pawliszyn, J. New trends in Solid-Phase Microextraction. *C. R. Anal. Chem.* **1997**, *27*, 103-135.
21. Pawliszyn, J. Solid-Phase Microextraction: Theory and practice. Wiley-VCH. New York, 1997.
22. Prosen, H.; Zupancic-Kralj, L. Solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 272-282.
23. Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *880*, 35-62.
24. X. Yang, T. Peppard. Solid-phase microextraction for flavor analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1925-1930.
25. De la Calle, D.; Reichenbaecher, M.; Danzer, K.; Hurlbeck, C.; Baertzs, C.; Feller, K. H. Analysis of wine bouquet components using headspace solid-phase microextraction-capillary gas chromatography. *High Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 373-377.
26. 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.

- 27., 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. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Acree, T.; Barnard, J.; Cunningham, D.G. A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chem.* **1984**, *14*, 273-286.
33. Noble, A.C. Sensory and instrumental evaluation of wine aroma. A: Analysis of Foods and Beverages, Headspace Technique, G. Charalambous (Ed.). Academic Press, New York. **1978**, 203-228.
34. Fors, S. M.; Olofsson, K. Alkylpyrazines, volatiles formed in the Maillard reaction. I. Determination of odour detection thresholds and odour intensity functions by dynamic olfactometry. *Chem. Senses.* **1985**, *10*, 287-296.
35. Luning, P. A.; Rijk, T.; Wichers, H. J.; Roozen, J. P. Gas chromatography, mass spectrometry, and sniffing port analyses of volatile compounds of fresh bell peppers (*capsicum annuum*) at different ripening stages. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 977-983.
36. Ferreira, V.; López, R.; Aznar, M. Olfactometry and aroma extract dilution analysis of wines. A: Analysis of taste and aroma, J. F. Jackson and H. F. Linskens, Eds. Springer-Verlag, Berlin. 2002, 89-122.
37. Mihara, S.; Enomoto, N. Calculation of retention indices of pyrazines on the basis of molecular structure. *J. Chromatogr.* **1985**, *324*, 428-430.
38. Kosuge, T.; Zenda, H.; Tsuji, K.; Yamamoto, T.; Narita, H. Studies on flavor components of foodstuffs. Part I. Distribution of tetramethylpyrazine in fermented foodstuffs. *Agr. Biol. Chem.* **1971**, *35*, 693-696.