

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Bioquímica i Biotecnologia



Tesi Doctoral

**3-ALQUIL-2-METOXIPIRAZINES EN MOSTOS I
VINS: DETERMINACIÓ ANALÍTICA I ESTUDI DE LA
INFLUÈNCIA D'ALGUNS FACTORS VITIVINÍCOLES**

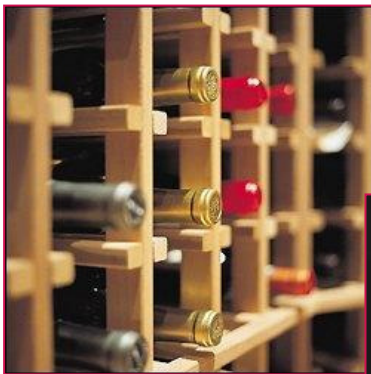
CRISTINA SALA CAMPS

Tarragona, 2004

EL VI

No podia faltar el vi damunt la taula.
Una solemnitat, un ritu que venia
des de la nit: el vi encenia la taula,
encenia la casa, encenia la vida.
Una vella litúrgia el posava a la taula.
Una vella litúrgia nocturna, inescrutable,
encenia la sang, palpitava en els ulls.

Vicent Andrés Estellés - Xavier Batllés
Crònica d'un temps, Ovidi Montllor





UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Bioquímica i Biotecnologia

**3-ALQUIL-2-METOXIPIRAZINES EN MOSTOS I
VINS: DETERMINACIÓ ANALÍTICA I ESTUDI DE LA
INFLUÈNCIA D'ALGUNS FACTORS VITIVINÍCOLES**

Memòria presentada per la
CRISTINA SALA CAMPS
per assolir el grau de Doctora
per la Universitat Rovira i Virgili
Tarragona, juliol de 2004

El Dr JOSEP GUASCH TORRES, Catedràtic d'Universitat, i la Dra OLGA BUSTO BUSTO, Professora Titular d'Universitat, membres del Departament de Química Analítica i Química Orgànica, a la Facultat d'Enologia de Tarragona de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFIQUEN

Que el treball aquí presentat i que duu per títol **“3-ALQUIL-2-METOXIPIRAZINES EN MOSTOS I VINS: DETERMINACIÓ ANALÍTICA I ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA D'ALGUNS FACTORS VITIVINÍCOLES”**, ha estat realitzat per la CRISTINA SALA CAMPS, sota la direcció dels sotasignants, en el Grup de Química Analítica Enològica i dels Aliments del Departament de Química Analítica i Química Orgànica d'aquesta Universitat i que tots els resultats presentats són fruit de les experiències realitzades per l'esmentada doctoranda.

Tarragona, 7 de Juliol de 2004

Dr. Josep Guasch Torres

Dra Olga Busto Busto



Aquest treball ha constituït una de les línies de recerca del Grup de Química Analítica Enològica i dels Aliments de la Universitat Rovira i Virgili, i tots els resultats que es presenten en aquesta memòria són fruit dels experiments realitzats al Laboratori d'Instrumentació Analítica de la Facultat d'Enologia de Tarragona.

El treball que aquí es presenta és el fruit d'un gran esforç personal, l'èxit del qual no hagués estat possible sense l'ajut, més o menys directe, d'un seguit de persones a les quals vull agrair de tot cor el seu recolzament.

En primer lloc vull mencionar els meus pares, la Rosa Camps i en Pere Sala, que m'han donat la vida i el seu amor. Sempre els tinc presents en tot el que faig i a tot arreu on sóc. També la meva família, en particular en Lluís Prat i la Carme Sala, per la seva comprensió i ajut incondicionals. A tots els meus amics, amb qui sé que sempre puc comptar, i en especial, la Cristina, en Manel i l'Ada, així com la Dani, en Joan Carles, la Júlia i la Martina, que m'han acompanyat en moments difícils.

És impossible detallar totes les coses que haig d'agrair a l'Eudald Torres, un home magnífic, de la més alta talla humana i intel·lectual, que ocuparà sempre un espai molt privilegiat del meu cor. Moltes gràcies per tot.

Als meus directors de Tesi, el Dr. Josep Guasch i la Dra. Olga Busto, dues persones de remarcables qualitats humanes que m'han guiat al llarg de tot aquest camí, vull agrair-los la paciència i la confiança que han dipositat en mi, així com la seva constància a ajudar-me i animar-me a tirar endavant.

Al meu tutor, Dr. Fernando Zamora, per la seva amistat i pel seu interès i disponibilitat a ajudar-me, sobretot en la

part d'aquest treball més directament relacionada amb l'Enologia.

Vull agrair els bons consells del Dr. Lluís Arola, que m'han orientat en la meua carrera professional. I al Dr. Albert Mas, per la seva cordialitat.

Als meus companys de laboratori, la Pili, la Montse Mestres, la Montse Miracle, la Yolanda, en Marc i la Dolors, així com els companys del laboratori de Bioquímica, sobretot en Josep Valls, per la seva amistat i simpatia.

També els companys del Grup de Quimiometria i Qualimetria, sobretot en Ricard, en Jaume, en Jordi i en Joan, amb els quals he compartit moments inoblidables.

Volia fer un esment especial al personal de serveis de la Facultat d'Enologia, per la seva professionalitat i paciència: la Xose, la Imma, l'Helena, en Joan Rufí, la Tere, la Maria, en Ciscu i en Pep.

A la Marta Conde i a la Lourdes Jané, companyes de feina durant un temps, per la seva amistat que el temps no esborra.

I would like to express my thanks to the Company Sara Lee and, in particular, to Paco Güell, Amanda Heath and Pieter Stroek, for their comprehension regarding the flexibility on holidays and timetable required to achieve this work, and for encouraging me to finish it.

I also would like to mention Mr. Cees van Biezen, one of my favorite perfumers and a

dear friend, who has expressed his interest and support regarding this work.

Vull agrair al meu company de feina, en Carles Feliu, la seva amistat i paciència, i l'ajut desinteressat que m'ha donat cada vegada que he hagut de faltar per motiu d'aquest treball.

Finalment, volia mencionar molt especialment en Zacarias Iracheta, que m'ha regalat la seva companyia a la fase final d'aquest treball, i m'ha brindat el seu ajut i el seu meravellós somriure. Gràcies per tot. I a la seva família: la Carme, la Montserrat, en Lluís, la Judit i la Clàudia, pel caliu humà que m'han ofert i la seva companyia en moments molt entranyables.

A tots, moltes gràcies!!!

Dedico aquest treball als meus
pares,
La Rosa Camps i en Pere Sala

ÍNDEX

Objectius	3
Capítol 1	
Introducció	7
Bibliografia	15
Capítol 2.- Influència en l'aroma del vi	
2.1. Les pirazines	19
2.2. Presència en raïms, mostos i vins	23
2.2.1. Continguts a les diferents varietats de <i>Vitis vinifera</i>	23
2.2.2. Contribució a la distinció varietal dels vins	27
2.2.3. Efecte en la qualitat del vi	29
2.3. Influència d'alguns factors vitícoles i enològics	31
2.3.1. La maduració del raïm	32
2.3.2. Factors edafoclimàtics	35
2.3.3. Factors vitícoles	39
2.3.4. Factors enològics	42
2.3.5. Altres factors	44
Conclusions	46
Bibliografia	48
<i>Factors affecting the presence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes and wines. A review</i>	53
Capítol 3.- Determinació	
3.1. Extracció de les 3-alkyl-2-metoxipirazines en vins	61
3.1.1. Extracció líquid-líquid	61
3.1.2. Extracció en fase sòlida	64
3.1.3. Microextracció en fase sòlida	66
3.2. Paràmetres cromatogràfics	69
3.2.1. Sistemes de detecció	69
3.2.2. Condicions cromatogràfiques	74
3.3. Calibratge i paràmetres analítics	75
Conclusions	78
Bibliografia	80
<i>Determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes, musts and wines: a review</i>	85

PART EXPERIMENTAL**Capítol 4.- Desenvolupament dels mètodes analítics**

4.1. Materials	97
4.1.1. Analits i patrons interns	97
4.1.2. Reactius i solucions	98
4.1.3. Material d'extracció	100
4.2. Mostres	101
4.3. Condicions cromatogràfiques	102
4.4. Calibratge i límits de detecció	105
4.5. Resultats i discussió	107
4.5.1. Concentració dels extractes	108
4.5.2. Extracció líquid líquid	110
4.5.3. Extracció en fase sòlida	112
4.5.4. Destil·lació	117
4.5.5. Micro-extracció en fase sòlida de l'espai de cap	122
4.6. Determinació en mostos	128
4.7. Determinació en vins	131
Conclusions	135
Bibliografia	137
<i>Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres</i>	141
<i>Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines</i>	151

Capítol 5.- Estudi de la influència d'alguns factors vitivinícoles

5.1. Presa de mostra	160
5.1.1. Maduració i vinificació	161
5.1.2. Vinyes i tractaments	162
5.2. Resultats i discussió	165
5.2.1. Evolució durant la maduració	166
5.2.2. Insolació	168
5.2.5. Irrigació	174
5.2.6. Densitat de plantació	178
Conclusions	182
Bibliografia	184
<i>Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the Vitis vinifera variety Cabernet sauvignon</i>	189
<i>Contents of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts and wines from Vitis vinifera variety Cabernet sauvignon: influence of irrigation and plantation density</i>	197

Conclusions



OBJECTIUS



CAPÍTOL 1



CAPÍTOL 2

Influència en l'aroma del vi



CAPÍTOL 3

Determinació



CAPÍTOL 4

Desenvolupament dels mètodes analítics



CAPÍTOL 5

Influència d'alguns factors vitivinícoles



CONCLUSIONS

Entre les varietats de *Vitis vinifera* més abundants d'arreu del món s'hi troba el Sauvignon blanc, el Cabernet Sauvignon, el Cabernet Franc i el Merlot noir. L'estudi de les seves aromes és de gran interès en el camp de l'enologia degut a la seva importància econòmica, ja que s'empren en la producció de vins de gran qualitat. Les 3-alquil-2-metoxipirazines (MPs), concretament la 3-isobutil-, la 3-*sec*-butil- i la 3-isopropil-2-metoxipirazina, formen part de les seves aromes varietals.

A l'inici del treball que aquí es presenta, la informació referent als continguts de MPs en mostos i vins era molt escassa, inexistent en el cas de la nostra terra. La revisió bibliogràfica va revelar la necessitat d'un mètode fiable per a l'anàlisi de les MPs en mostos i vins que fos fàcil d'implementar. Per altra banda, hi havia poca informació precisa referent a l'evolució d'aquests compostos durant el procés de maduració del raïm i d'elaboració del vi. Finalment, hi havia poques dades sobre la influència de les tècniques de poda i conducció de la vinya, l'exposició a la llum del sol, la irrigació o la densitat de plantació en els continguts de MPs en mostos i vins. Tota aquesta informació és de gran interès per als productors, ja que els pot ajudar a optimitzar la qualitat del vi des de l'inici de la producció del raïm i durant tot el procés d'elaboració del vi.

Les MPs, especialment la 3-isobutil-2-metoxipirazina, poden tenir una gran influència en la qualitat dels vins en què es troben, ja que els poden donar notes 'de vegetal' i 'de pebrot verd' que, en alguns casos, poden ser desfavorables. El principal repte per a l'estudi de les MPs en mostos i vins és el nivell extremadament baix en què s'hi poden trobar, de l'ordre de ng/L. El seu estudi és de gran interès en aquest rang degut a que els seus llindars de percepció sensorial són del mateix ordre.

Amb aquestes perspectives, es van establir els següents objectius:

1. Establir un mètode per tal de quantificar la 3-isobutil-2-metoxipirazina, la 3-*sec*-butil-2-metoxipirazina i la 3-isopropil-2-metoxipirazina en mostos i vins.
2. Determinar els nivells d'aquests compostos en Cabernet sauvignon i fer-ne un seguiment durant la maduració del raïm i l'elaboració del vi.
3. Estudiar l'efecte d'alguns factors vitícoles (la insolació, la poda i conducció de la vinya, la densitat de plantació i la irrigació) en els continguts de les MPs en mostos i en vins.

Dins el context de l'anàlisi sensorial del vi, la paraula 'aroma' té diferents significats. En primer lloc, és sinònim de 'substància aromàtica'. Aquest terme s'utilitza també per a designar el conjunt de substàncies aromàtiques del vi (parlem, per exemple, de 'l'aroma del Cabernet sauvignon'). Finalment, la paraula 'aroma' fa referència a 'l'olor', és a dir la impressió que el vi produeix al sentit de l'olfacte sigui per via orthonasal o bé retronasal. Cal aclarir que la impressió que fan les substàncies aromàtiques només és perceptible a través del sentit de l'olfacte. El sentit del gust, situat a la llengua, és el que permet detectar els aspectes d'acidesa, dolçor, amargor i salabor. Per altra banda, les sensacions tàctils permeten la percepció de la força alcohòlica, l'efervescència i l'astringència. Tots aquests sentits, junt amb el de la vista, que permet apreciar els matisos del color, són emprats en la degustació del vi.

L'aroma del vi és la seva característica sensorial més important, però també és l'atribut més difícil de descriure i de mesurar. Les aromes específiques dels vins procedents de diferents varietats són el resultat dels particulars conjunts de substàncies aromàtiques presents al raïm. L'estudi d'aquestes aromes varietals ha atret l'atenció científica degut a la seva importància en la qualitat del vi, si bé en alguns casos la seva determinació és metodològicament difícil, ja que hi ha moltes substàncies aromàtiques que són molt potents però presents en concentracions tan baixes que la seva determinació és difícil.

Les substàncies aromàtiques del vi pertanyen a diferents grups químics. Els principals són els següents: a) alcohols (com l'hexanol i els hexenols, d'olors herbàcies, o el 2-feniletanol, d'olor de rosa); b) ésters (com el butirat d'etil, o el cinamat d'etil, d'olors fruitades); c) acetats (com l'acetat d'isoamil o l'acetat hexil, amb olors de plàtan i de pera respectivament); d) els àcids volàtils (com l'àcid acètic i el propiònic, que fan olor de vinagre, o l'àcid butíric i l'isobutíric, que fan olor de formatge); e) els àcids grassos (com l'hexanoic i el decanoic, d'olors sabonoses); f) els terpenols (com el linalol, o el geraniol, d'olors florals característiques); g) els

fenols volàtils (com l'eugenol, que fa olor de clau d'espècie); h) els compostos carbonilats (com l'acetoïna o el diacetil, d'olors làctiques i de mantega); i) els compostos sofrats lleugers i pesats (com el disulfur de dimetil i el metionol, respectivament, tots dos amb olor de col), que generalment es consideren defectes de l'aroma del vi; j) els compostos nitrogenats, entre els quals destaquen les 3-alquil-2-metoxipirazines (MPs), que fan olor de pebrots verds (1, 2).

El creixent coneixement sobre els continguts en substàncies aromàtiques del vi i la seva optimització durant els processos de cultiu de la vinya i d'elaboració del vi ha representat probablement l'avenç més important de la indústria vinícola de finals del segle XX. Aquest coneixement està en constant expansió, especialment gràcies al desenvolupament de noves tècniques d'anàlisi.

Es coneixen unes 10.000 varietats diferents de *Vitis vinifera*, i França, Itàlia, Portugal i Espanya gaudeixen d'una notable riquesa en varietats autòctones. Però desafortunadament l'estudi de les característiques i aptituds d'aquestes varietats és encara un camp de recerca clarament subdesenvolupat. De totes les varietats de vinya existents, n'hi ha ben poques d'importantes a nivell internacional i la majoria d'aquestes són franceses. Entre les més conegudes cal citar el Cabernet sauvignon, el Pinot noir, el Syrah, el Merlot noir, el Chardonnay, el Sauvignon blanc i el Sémillon. Aquestes varietats són de gran importància econòmica degut a que s'utilitzen en la producció de vins de qualitat. Ara bé, no són pas les més plantades, en termes de superfície de vinya ocupada per elles, ja que d'altres varietats, com la Carinyena o la Garnatxa, ocupen àrees molt més grans, si bé es destinen a la producció de vins de menor qualitat. A les vinyes de Nord-Amèrica, Austràlia i Sud-Àfrica es tendeix a plantar grans superfícies de monovarietals i els vins produïts sovint es comercialitzen com a tals.

Dins el grup de varietats de raïm considerades 'aromàtiques', el Cabernet sauvignon és de les més abundants a la regió de Burdeus, però també a les zones vitícoles d'arreu del món.

Conseqüentment, l'estudi de les seves aromes és molt interessant per a l'enologia (3-5). Catalunya no és una excepció d'aquesta tendència i el Cabernet sauvignon és actualment una varietat de particular interès en la producció de vins catalans. Aquest fet és el que ha propiciat l'estudi de l'anàlisi de l'aroma de mostos i vins obtinguts a partir de Cabernet sauvignon, ja que les recents descobertes en el camp de l'enologia han demostrat que com més es coneix l'aroma del vi, millor és la qualitat i la competitivitat dels productes que se n'obtenen.

Les pirazines són compostos abundants i àmpliament distribuïts a la natura. La seva presència en productes naturals es va indicar per primera vegada en 1888 (7). Després de la introducció, cap al 1960, de mètodes analítics més avançats en la recerca d'aromes, es va trobar que les pirazines són presents en una àmplia varietat d'aliments i que són particularment importants en productes torrats com el cafè, cacau i fruits secs (8). Dins el grup de les pirazines hi ha dos subgrups importants: les alquilpirazines i les metoxipirazines.

Les alquilpirazines s'han identificat principalment en aliments cuits, com les patates fregides, les carns rostides, els ous cuits, les ametlles i avellanes torrades, el cafè, el cacau, el te, la xocolata, certs tipus de formatge, el rom, els whiskies, i fins i tot al fum del tabac (9). Les alquilpirazines contribueixen de manera important a les aromes característiques d'aquests productes.

S'han trobat MPs en certs insectes de les ordres *coleoptera* i *lepidoptera*, on pot ser que actuïn com a components de les olors d'alarma o bé com a hormones de rastre (10-12). Aquests compostos també s'han trobat en microorganismes, contribuint a les seves olors característiques. Per exemple, s'ha descrit la presència de 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP) en *Penicillium* i *Pseudomonas*; i de 3-sec-butil-2-metoxipirazina (SBMP) en *Cedecea davisae* (12, 13-15). Finalment, moltes plantes contenen MPs que són part de les seves aromes característiques (9). Aquest és el cas de la IPMP, la SBMP i la 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP), les quals són

responsables de les aromes verdes i terroses de molts vegetals frescos, com les patates, els pèsols o els pebrots verds (16-20).

Donat que la IPMP, la SBMP i la IBMP es troben en moltes plantes, la seva presència en *Vitis vinifera* no és sorprenent i la IBMP ja es va identificar en raïms de Cabernet sauvignon en 1975 (18). Els autors van mencionar que aquest compost es trobava en quantitats molt petites, tot i que presentava una olor molt clara identificada com ‘de pebrots verds’ i van suggerir que podria ser responsable de l’olor verda característica del Cabernet sauvignon. Aquest treball va ser molt important per al camp de l’enologia ja que va representar un pas endavant en el coneixement de l’aroma del Cabernet sauvignon. Posteriorment, molts altres autors han continuat aquest tema de recerca, del qual el treball que aquí es presenta forma part.

Les MPs són aromes primàries característiques del Cabernet sauvignon, però també del Merlot noir, el Sauvignon blanc i el Cabernet franc, entre d’altres. Les MPs més importants pel que fa a la seva presència i potencial influència en l’aroma del vi són la IBMP, la SBMP i la IPMP (21-25).

El caràcter ‘vegetal’ que les MPs aporten als vins es considera un factor de baixa qualitat, sobretot en vins negres, ja que s’associa a la manca de maduresa del raïm al moment de la verema. No obstant, en certs casos, com el dels vins blancs secs elaborats a partir de Sauvignon blanc, les notes verdes poden aportar frescor i s’accepta que el caràcter que aporten les MPs no disminueix la qualitat organolèptica del vi (26). Així doncs, hi ha un interès general en conèixer com els nivells de MPs poden afectar l’aroma del vi i quins factors poden afectar-ne les concentracions al producte final.

L’anàlisi sensorial és la única eina que ens permet conèixer de quina manera la composició aromàtica del vi pot tenir un impacte en el consumidor. Ara bé, quan el que cal és verificar la influència de les condicions de creixement de la vinya i dels processos de vinificació en la

composició aromàtica del vi cal recórrer a les tècniques d'anàlisi química, ja que els efectes dels assaigs vitícoles en l'aroma del vi poden ser massa subtils o complexos per a ser detectats o interpretats mitjançant l'anàlisi sensorial. Per tant, el desenvolupament de noves tècniques per a la identificació i quantificació dels compostos aromàtics individuals pot contribuir a la millora de la recerca en viticultura. I per a això es requereix un equipament més complex i el desenvolupament de mètodes d'anàlisi fiables. El present treball va néixer a fi de contribuir a la millora de la tècnica requerida en aquest aspecte.

Cal no subestimar el repte de determinar les MPs en mostos i vins, ja que, com hem dit, aquests compostos es troben en matrius molt complexes a nivells d'ultra-traça (ng/L). Malgrat aquests continguts tan baixos, aquests compostos poden influir en l'aroma i la qualitat del vi perquè els seus llindars de percepció sensorial són al mateix nivell i conseqüentment l'anàlisi d'aquestes ultra-traces resulta d'interès enològic. Per tant, la identificació i quantificació de MPs en mostos i vins és realment difícil ja que requereix tècniques molt sensibles i selectives i alhora una gran capacitat de concentració.

Històricament, el principal problema amb l'anàlisi de MPs en raïms i vins ha estat la manca de sensibilitat de les tècniques analítiques disponibles. Aquest repte ha estat tan difícil que, si bé les primeres dades sobre la presència de IBMP en raïms de Cabernet sauvignon es va publicar en 1975 (18) i, més tard, diferents autors es van animar a treballar en aquesta línia de recerca (5, 27, 28), el primer mètode fiable (si bé complex i llarg d'executar) no es va publicar fins 12 anys més tard. En efecte, el 1987, les MPs es van poder quantificar per primera vegada en vins de Sauvignon blanc (21, 29). Aquest mètode encara s'està utilitzant, si bé amb diferents millores (22, 30), i també s'han desenvolupat altres mètodes, més ràpids i senzills (24, 31).

Malgrat les dificultats que la determinació de MPs a nivells tan baixos comporta, diferents autors han aconseguit identificar-les i quantificar-les en raïms, mostos i vins de Cabernet

sauvignon, Sauvignon blanc, Merlot noir, Cabernet franc, Sémillon i Xynomavro, entre d'altres (21-25). El present treball és una aportació al desenvolupament d'una metodologia analítica fiable, ràpida, senzilla, econòmica i fàcil d'implementar en un laboratori enològic, per a l'anàlisi de MPs en mostos i vins.

La possibilitat de conèixer amb precisió els continguts de MPs en raïm, most i vi, i poder fer-ne un seguiment durant el procés de maduració del raïm i d'elaboració del vi és d'un gran interès per als productors. En efecte, aquesta informació els podria permetre ajustar la poda, l'exposició del raïm al sol, el nivell de premsat, el temps de maceració i fins i tot el cupatge dels vins per tal d'obtenir un producte final de la màxima qualitat.

L'objectiu fonamental del treball que aquí es presenta ha estat el desenvolupament d'un mètode basat en la cromatografia de gasos amb detector de nitrògen-fòsfor per tal de poder quantificar les 3-alquil-2-metoxipirazines d'interès enològic en mostos i en vins. Una vegada establert aquest mètode, s'ha fet un seguiment dels nivells d'aquests compostos durant la maduració del raïm i l'elaboració del vi. Finalment, s'ha estudiat la possible influència de certes condicions de creixement i maduració del raïm en els continguts de MPs en raïms i vins: exposició a la llum solar, irrigació, poda i conducció de la vinya, i densitat de plantació.

La tècnica de la microextracció en fase sòlida de l'espai de cap (HS-SPME) es basa en l'ús d'una fibra de sílice recoberta d'un polímer, la qual s'exposa a l'espai de cap de la mostra a fi d'extreure i concentrar els analits. Aquesta tècnica té una gran capacitat de concentració, de manera que proporciona molta sensibilitat en la determinació (32, 33). També és relativament selectiva, ja que només absorbeix els compostos volàtils i, en funció de les característiques del polímer emprat i de les condicions del mètode, pot permetre d'absorbir-ne més els uns que els altres. Degut al seu baix cost, rapidesa i senzillesa, aquesta tècnica ha despertat l'interès de molts investigadors i es troba actualment consolidada i en procés de desenvolupament de noves

fibres i sistemes d'extracció. De fet, ja s'ha aplicat a la determinació de compostos volàtils d'aliments i begudes (32) i particularment a l'anàlisi de les substàncies aromàtiques del vi (34-38). Degut als excel·lents resultats de sensibilitat i selectivitat que proporciona, la tècnica de HS-SPME ha tingut un paper protagonista al present treball.

Aquesta memòria, dividida en cinc parts, s'ha estructurat de manera que s'inclouen els articles derivats de l'experimentació realitzada precedits d'una àmplia discussió dels principis, els processos i els estudis preliminars que han donat lloc als resultats finals.

Al present capítol s'inclou l'explicació de com es va originar la idea de treballar en aquest camp específic de coneixement, el seu interès per a la societat i en particular per a l'enologia.

La presència de MPs en mostos i vins i la seva influència en l'aroma i la qualitat del vi es discuteix al segon capítol. Hi ha una introducció a les pirazines, la seva estructura i propietats químiques i la seva presència a la natura. També hi ha una discussió de les propietats sensorials de les MPs, la seva presència en raïms, mostos i vins, i el seu efecte en l'aroma i la qualitat del vi. Els factors vitícoles i enològics que poden afectar-ne les concentracions al producte final també es comenten. Finalment, hi ha una revisió bibliogràfica sobre tots aquests temes.

El tercer capítol es concentra en l'anàlisi de les MPs en raïms, mostos i vins. Inclou una discussió general sobre les diferents tècniques que s'han emprat en la part experimental. Finalment, hi ha una revisió bibliogràfica sobre la literatura referent als diferents mètodes analítics per a l'anàlisi de MPs en raïms, mostos i vins.

La part experimental s'ha realitzat íntegrament al Laboratori d'Instrumentació Analítica de la Facultat d'Enologia de Tarragona de la Universitat Rovira i Virgili. Aquesta part és resumida als capítols quart i cinquè.

El desenvolupament de mètodes per a la determinació de MPs en mostos i vins es resumeix al capítol quart, el qual inclou un resum dels experiments preliminars que s'han realitzat i que han constituït la base dels mètodes definitius desenvolupats. En aquesta part s'han explorat diferents tècniques per a la concentració i aïllament de MPs en vins, des de la simple extracció líquid-líquid fins a les tècniques més innovadores de microextracció en fase sòlida de l'espai de cap (HS-SPME), i inclou la destil·lació i l'extracció en fase sòlida, així com diferents combinacions d'aquestes tècniques. La tècnica de HS-SPME ha permès desenvolupar dos mètodes per a la determinació de MPs en mostos i en vins, els quals també són recollits en aquest capítol.

Els mètodes prèviament desenvolupats s'han emprat en la determinació dels continguts de MPs en mostos i vins experimentals i per a fer el seguiment de la seva evolució durant el procés de maduració del raïm i d'elaboració del vi. També s'ha dut a terme un estudi sobre la influència de diferents factors vitícoles en l'evolució dels continguts de les MPs durant aquest procés. Tots els resultats obtinguts són resumits al cinquè capítol. Els diferents factors que poden afectar la maduració del raïm es comenten també en aquest capítol. I es presenten els resultats obtinguts en l'estudi de com l'exposició a la llum del sol, la poda i conducció de la vinya, la densitat de plantació i la irrigació poden afectar als continguts de MPs en mostos i vins.

Finalment es presenten les principals conclusions d'aquest treball i algunes recomanacions per a possibles futures línies de recerca. En efecte, com en tots els treballs d'investigació, els resultats recollits en aquesta memòria condueixen al plantejament de moltes noves qüestions i nous camps per explorar, els quals poden ser de l'interès de futurs investigadors.

Bibliografia

1. Bertrand, A.; Guedes de Pinho, P.; Anocibar Beloqui, A. Les constituants organiques majoritaires du vin, les constituants volatils: teneurs trouvées, exemples d'analyses. *Feuillets verds OIV*. **1994**, FV971 2129/170294.
2. Étievant, P. X. *Wine*. Volatile compounds in foods and Beverages, Maarse H. Ed.. Marcel Dekker Inc. New Cork. **1991**, 483-546.
3. Allen, M. S. Commercial support for methoxypyrazine flavour research. *Austr. Grapegr. Winem.* **1994**, 366, 22-23.
4. Kotseridis, Y.; Razungles, A.; Bertrand, A.; Baumes, R. Differentiation of the Aromas of Merlot and Cabernet Sauvignon Wines Using Sensory and Instrumental Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 5383-5388.
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. Wolpert, J.A.; Kasimatis, A.N.; Verdegaal, P.S. Viticultural Performance of Seven Cabernet Sauvignon Clones in the Northern San Joaquin valley, California. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, 46, 437-441.
7. Morin, E.C., C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. **1888**, 106, 360.
8. Takken, H. J.; van der Linde, L. M.; Boelens, M.; van Dort, J. M. Olfactive Properties of a Number of Polysubstituted Pyrazines. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, 23, 638-642.
9. Maga, J. A. Pyrazine update. *Food Rev. Int.* **1992**, 8, 479-558.
10. Moore, B. P.; Brown, W. V. Identification of warming odour components, bitter principles and antifeedants in an aposematic beetle: *Metriorrhynchus rhipidus* (Coleoptera: Lycidae). *Insect Biochem.* **1981**, 11, 493-499.
11. Rothschild, M.; Moore, B. P.; Brown, W. V. Pyrazines as warming odour components in the Monarch butterfly, *Danaus plexippus*, and in moths of the genera *Zygaena* and *Amata* (Lepidoptera). *Biol. J. Linnean Soc.* **1984**, 23, 375-380.
12. Leete, E.; Bjorklund, J. A.; Reineccius, G. A.; Cheng, T. B. *Biosynthesis of 3-Isopropyl-2-methoxypyrazine and other alkylopyrazines: widely distributed flavour compounds*. Bioformation of flavours, Patterson, R.L.S., Charlwood, B. V., MacLeod, G. and Williams, A. A, Eds.; Royal Society of Chemistry, Cambridge, U. K, **1992**, 75-95.
13. Cheng, T.B.; Reineccius, G. A.; Bjorklund, J. A.; Leete, E. Biosynthesis of 2-Methoxy-3-isopropylpyrazine in *Pseudomonas perolens*. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 1009-1012.
14. Gallois, A.; Kergomard, A.; Adda, J. Study of the Biosynthesis of 3-Isopropyl-2-Methoxypyrazine Produced by *Pseudomonas taetrolens*. *Food Chem.* **1988**, 28, 299-309.
15. McIver, R. C.; Reineccius, G. A. Synthesis of 2-Methoxy-3-Alkylpyrazines by *Pseudomonas perolens*. Biogeneration of Aromas, Parliament, T.H.; Croteau, R. Eds. *ACS Symposium Series* 317, Washington, DC, **1986**, 266-274.
16. BATTERY, R. G.; Seifert, R. M.; Guadagni, D. G.; Ling, L. C. Characterization of Some Volatile Constituents of Bell Peppers. *J. Agr. Food Chem.* **1969**, 17, 1322-1327.
17. BATTERY, R. G.; Seifert, R.M.; Lundin, R. E.; Guadagni, D. G.; Ling, L. C. Characterisation of an important aroma component of bell peppers. *Chem. Ind.* **1969**, 4, 490-491.
18. 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.
19. Murray, K. E.; Shipton, J.; Whitfield, F. B. 2-Methoxypyrazines and the flavour of green peas (*Pisum sativum*). *Chem. Ind.* **1970**, 7, 897-898.
20. Maga, J. A. Sensory and stability properties of added methoxypyrazines to model and authentic wines. In *Flavours and Off-Flavours*, Proceedings of the 6th International Flavor Conference; Charalambous, G. Elsevier, Amsterdam, **1990**, 61-70.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Hashizume, K.; Samuta, T. Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, 50, 194-198.
26. Roujou-de-Boubée, D. The 'plant' aroma characteristic of wines. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1999**, 33, 145-146.

27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Hashizume, K.; Kida, S.; Samuta, T. Effect of steam treatment of grape cluster stems on the methoxypyrazine, phenolic, acid, and mineral content in red wines fermented with stems. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4382-4386.
31. 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.
32. Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszym, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *880*, 35-62.
33. Prosen, H.; Zupancic-Kralj, L. Solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 272-282.
34. De la Calle, D.; Reichenbaecher, M.; Danzer, K.; Hurlbeck, C.; Baertzsch, C.; Feller, K. H.. *High Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 373-377.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.

En aquest capítol es descriuen les propietats químiques i sensorials de les pirazines. Es fa una revisió bibliogràfica de la seva presència i continguts en raïms, mostos i vins, així com la seva influència en la qualitat aromàtica del vi. També es revisen els factors vitícoles i enològics que poden determinar els continguts d'aquests compostos als raïms i als vins finals. Finalment, hi ha una discussió de com la manipulació d'alguns d'aquests factors pot contribuir a la millora de la qualitat del vi.

2.1. Les Pirazines

Les pirazines són compostos heterocíclics aromàtics de sis àtoms, dos dels quals són nitrogen en posició *para*. Dins el context de les aromes dels vins, les pirazines més importants són la 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP), la 3-*sec*-butil-2-metoxipirazina (SBMP), la 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP) i la 3-etil-2-metoxipirazina (ETMP). Totes elles són representades a la Fig. 1.

El parell de nitrògens de les pirazines determina les seves propietats àcid-base. Així, les pirazines estan protonades a nivells de pH extremadament baixos i són menys volàtils. En canvi, a nivells de pH neutres, bàsics, o lleugerament àcids, les pirazines no estan ionitzades, són més volàtils i més solubles en solvents orgànics.

Les pirazines tenen olors molt intenses i generalment es considera que tenen una contribució positiva a la qualitat de l'aroma dels aliments. Efectivament, aquests compostos són parcialment responsables de les aromes característiques de molts aliments, tant frescos com cuinats (1, 2) i s'han utilitzat àmpliament com a constituents d'aromes o components de perfums (3). Durant els darrers 20 anys, la indústria de les aromes s'ha interessat molt en la identificació i estudi de les propietats sensorials de les pirazines (4) i se n'han identificat més de 100 en aliments, moltes

de les quals són incloses a les llistes *Generally Recognized as Safe* (GRAS) de la *US Food & Drug Administration* (FDA) i *Flavor and Extract Manufacturers Association* (FEMA). La Taula 1 presenta les pirazines més importants dins el camp de les aromes d'aliments, junt amb la descripció olfactiva de cadascuna d'elles.

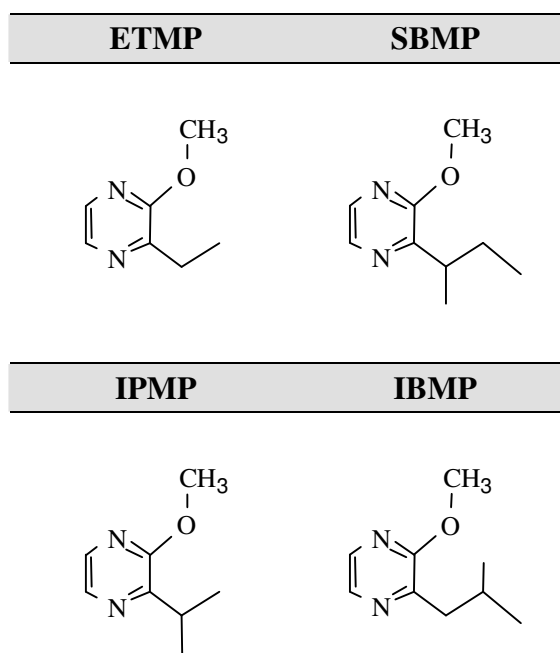


Fig. 1. Pirazines més importants dins el camp de l'enologia.

Segons el seu origen, estructura química i propietats sensorials, es poden distingir dos grups principals de pirazines: les substituïdes per grups alquil i les substituïdes per grups alquil-alcoxi. Dins aquest darrer grup, els compostos més importants són les 3-alkil-2-metoxipirazines (MPs). Les alquilpirazines s'associen generalment amb les aromes d'aliments tractats tèrmicament, mentre que les alquil-alcoxipirazines es troben principalment en vegetals crus (2, 3).

Com es pot veure a la Taula 1, les alquilpirazines tenen sovint una olor que recorda els aliments rostits (5) i són en part responsables de les aromes agradables de la carn rostida, el cacau i els cereals (6).

ALQUILPIRAZINES		
C ₄ N ₂		dolç, moresc, avellana torrada
C ₅ H ₆ N ₂	2-metil-	verd, xocolata, fruit sec, pollastre rostit, carn
C ₆ H ₆ N ₂	2-vinil-	fruit sec, cafè
C ₆ H ₈ N ₂	2-etil-	fruit sec, rostit, rom, mantega de cacauet, fusta
C ₆ H ₈ N ₂	2,3-dimetil-	herba, xocolata, pollastre/cacauet/patata rostits
C ₆ H ₈ N ₂	2,5-dimetil-	cacau, fusta, herba, pollastre/patata rostits
C ₆ H ₈ N ₂	2,6-dimetil-	fruit sec, rostit, dolç, xocolata, cacau, cafè
C ₇ H ₁₀ N ₂	2-etil-3-metil-	fruit sec, rostit, patata crua, terra
C ₇ H ₁₀ N ₂	2-etil-5-metil-	fruit sec, rostit, herba
C ₇ H ₁₀ N ₂	2,3,5-trimetil-	herba, avellana torrada, cacau, patata cuita
C ₇ H ₁₀ N ₂	2-propil-	verd, vegetal
C ₇ H ₁₀ N ₂	2-isopropil-	menta, verd
C ₇ H ₈ N ₂	2-metil- 5-vinil-	cafè
C ₇ H ₈ N ₂	2-(1-metil- vinil)-	cremat
C ₈ H ₁₂ N ₂	2,3-dietil-	terra, avellana torrada, patata cuita, fruit sec
C ₈ H ₁₂ N ₂	2-propil- 3-metil-	fruit sec
C ₈ H ₁₂ N ₂	2-propil-3-metil-	fruit sec
C ₈ H ₁₂ N ₂	5-isopropil- 2-metil-	verd
C ₈ H ₁₂ N ₂	2-butil-	menta, verd
C ₉ H ₁₄ N ₂	2,3-dietil- 5-metil-	avellana torrada, carn, vegetal
C ₉ H ₁₄ N ₂	2-butil- 3-metil-	anís
C ₉ H ₁₄ N ₂	2-isobutil- 3-metil-	verd
C ₉ H ₁₄ N ₂	2-propil- 3,5-dimetil-	avellana, cremat
C ₉ H ₁₄ N ₂	2-propil- 3,6-dimetil-	avellana, cremat
C ₁₀ H ₁₅ N ₂	2-isobutil- 3,5-dimetil-	verd
C ₁₀ H ₁₅ N ₂	2-isobutil- 3,6-dimetil-	verd
C ₁₀ H ₁₅ N ₂	2-butil- 3,5-dimetil-	dolç, terra
C ₁₀ H ₁₅ N ₂	2-butil- 3,6-dimetil-	dolç, terra
ALQUIL-ALCOXIPIRAZINES		
C ₅ H ₆ N ₂ O	metoxi-	dolç, fruit sec, cacau
C ₆ H ₈ N ₂ O	3-metil-2-metoxi-	xocolata, cacau, ametlla torrada, cacauet
C ₇ H ₁₀ N ₂ O	3-etil-2-metoxi-	patata crua, terra, pebrot verd
C ₇ H ₁₀ N ₂ O	3-metil- -etoxi-	verd
C ₈ H ₁₂ N ₂ O	3-isopropil-2-metoxi-	terra, pebrot verd, patata crua, pèsol
C ₈ H ₁₂ N ₂ O	3-etil-2-etoxi-	patata crua
C ₈ H ₁₂ N ₂ O	3-isopropil-2-metoxi-	terra, pèsol verd, pebrot verd, patata crua
C ₈ H ₁₂ N ₂ O	6-metil-2-propoxi-	fusta verda
C ₈ H ₁₂ N ₂ O	3-metil-2-propoxi-	fusta, fruita, verda
C ₈ H ₁₂ N ₂ O	3-metil-2-isopropoxi-	dolça, fruita, verda
C ₉ H ₁₄ N ₂ O	3-sec-butil-2-metoxi-	pebrot verd, pèsol verd
C ₉ H ₁₄ N ₂ O	3-isopropil-2-etoxi-	nou rostida
C ₉ H ₁₄ N ₂ O	3-isobutil-2-metoxi-	pebrot verd, pèsol verd

Taula 1. Descripcions olfactivas de les pirazines més importants dins les aromes d'aliments (16)

També s'observa que les pirazines substituïdes amb els grups alquil de menys de cinc àtoms de carboni tendeixen a presentar olors que s'han descrit com 'de cremat', 'de rostit', 'de torrat', 'herbàcies', 'de fruits secs', 'de caramel de cafè i llet' i 'de xocolata'. En canvi, les pirazines

substituïdes per grups alquil de més de cinc àtoms de carboni fan olors ‘terroses’ i ‘verdes’, amb notes més aviat aromàtiques i fustoses. Finalment, les 3-alkil-2-metoxipirazines tenen olors característiques que són fortament verdes i una mica terroses, amb notes ‘de rostit’, ‘de fruit sec’ i algunes de ‘florals’ (4, 7).

Algunes pirazines trobades en aliments cuits o rostits es poden produir durant el procés d’escalfament per reaccions de Maillard. D’altres es poden formar per reaccions no enzimàtiques entre precursors potencials trobats al medi (1, 8, 9). Finalment, algunes pirazines són indubtablement d’origen biosintètic, produïdes per reaccions enzimàtiques que poden ser úniques de l’espècie en què es troben. Per exemple, s’ha descrit que els bacteris *Halomonas venusta* i *Cedecea davisae* produeixen SBMP (10). I que *Pseudomonas* produeix IPMP (11, 12). Les pirazines trobades als aliments que no han sofert tractament tèrmic són principalment alquil-alcopirazines, s’originen per rutes biosintètiques i també es poden trobar en certs aliments fermentats, com els formatges (13). Finalment, la ruta de biosíntesi de les MPs en raïm no és encara ben coneguda, si bé se sap que es tracta de metabolits secundaris del catabolisme dels aminoàcids (14, 15).

Les MPs poden unir-se de forma específica i de tal manera que saturen certs receptors olfactius. Dins una sèrie de compostos d’estructura semblant, les 3-pentil-pirazines presenten el llinard de percepció més baix independentment del substituent de la posició 2. Aquests dos factors suggereixen l’existència d’una relació estructura-olor i que hi ha un receptor específic per a aquests compostos, com il·lustra la Fig. 2. Segons aquesta teoria, el grup pentil ocuparia una ‘butxaca’ hidrofòbica en la cavitat dels *loci* actius del receptor i l’anell de la pirazina restaria a la capa hidrofílica, ja que aquesta part de la molècula és soluble en aigua (17, 18).

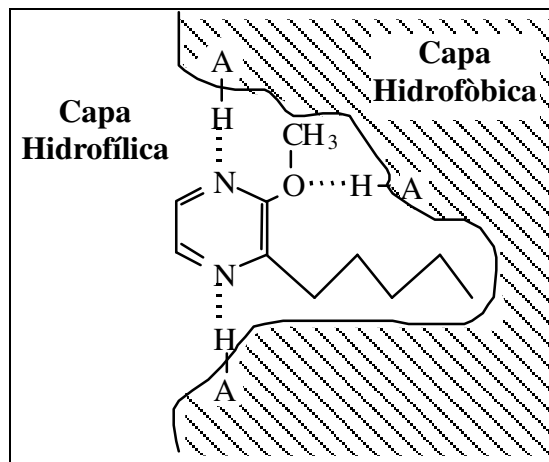


Fig. 2. Interacció del receptor específic de la 2-metoxi-3-pentilpirazina.

2.2. Presència en raïms, mostos i vins

Les MPs es consideren responsables de l'aroma característica que es troba sovint en vins de Sauvignon blanc, Sémillon, Merlot noir, Cabernet franc i Cabernet sauvignon, la qual s'ha descrit com a 'herbàcia', 'verda', 'vegetal', 'de pebrots verds' i 'd'espàrrecs' (19-23).

2.2.1. Continguts a les diferents varietats de *Vitis vinifera*

Les Taules 2 i 3 presenten els continguts d'IBMP, IPMP i SBMP que es poden trobar a la bibliografia. S'observa que generalment la IBMP és la més abundant, la IPMP i la SBMP es troben en quantitats més baixes, i l'ETMP i la MEMP només s'han detectat en alguns casos i sempre en quantitats inferiors. Així doncs, es pot dir que, en general, la MP més important al raïm i al vi és la IBMP.

VARIETAT	ORIGEN	ESTADI	COLLITA	MTV	IBMP	IPMP	SBMP	REF.
Sauvignon blanc	Austràlia				0,5-79			(19)
	Austràlia			19,8	8 - 16			(19)
	Austràlia			23,9	< 3			(19)
	Japó	30a	1997		101,2	48,7		(24)
	Austràlia	e	1987		22,2	35,4	1,1	(20)
	Austràlia	e	1988		27,0	30,7	1,6	(20)
	Austràlia	e	1987		19,4	78,5	6,8	0,6 (20)
	Austràlia	e	1987		20,2	8,6	0,6	(20)
	Austràlia	e	1987		19,6	12,1	0,6	0,1 (20)
	Austràlia	l	1987		22,2	1,3	1,0	(20)
	Austràlia	l	1988		27,0	0,6	0,3	(20)
	Austràlia	l	1987		19,4	13,4	1,3	(20)
	Austràlia	l	1987		20,2	11,5	0,5	(20)
	Austràlia	l	1987		19,6	9,5	0,5	0,5 (20)
	Japó	h	1997			0,5	0,2	(24)
Cabernet sauvignon	Austràlia			23,9	0,5-189			(19)
	Japó	10a	1997		18,6	6,9		(24)
	Japó	30a	1997		96,2	16,2		(24)
	Japó	50a	1997		143,0	2,7		(24)
	Japó	70a	1997		23,0	0,6		(24)
	França	e	1997		100			(25)
	França	e	1996		30-45			(25)
	França	l	1996		10 - 20			(25)
	Japó	h	1995		17,5			(26)
	Japó	h	1997		1,5	< 0,2		(24)
	França	most	1996		4-20			(27)
Merlot noir	Japó	30a	1997		227,3	15,4		(24)
	França	e	1997		60			(25)
	França	l	1997		20			(25)
	Japó	h	1997		0,9	< 0,2		(24)
	França	most	1996		5-12,9			(27)
Pinot noir	Japó	30a	1997		1,4	0,4 ± 0,2		(24)
	Japó	h	1997		< 0,2	< 0,2		(24)
Muscat Baley A	Japó	30a	1997		0,3	< 0,2		(24)
	Japó	h	1997		< 0,2	< 0,2		(24)
Semillon	Japó	30a	1997		307,0	40,3		(24)
	Japó	h	1997		2,6	0,3		(24)
Chardonnay	Japó	30a	1997		33,3	2,3		(24)
	Japó	h	1995		5,3			(24)
	Japó	h	1997		0,2	<0,2		(24)
Riesling	Japó	30a	1997		54,7	6,4		(24)
	Japó	h	1997		0,3	<0,2		(24)

Taula 2. Continguts d'IBMP, IPMP i SBMP en raïm i most (promitjos, ng/L). MTV: temperatura mitjana al mes de la maduració (°C). 10a, 30a, 50a i 70a: 10, 30, 50 i 70 dies després de l'antesi, respectivament; v: verolat; e, m i l: estadis primerenc, mitjà i tardà de maduració del raïm, respectivament; h: collita.

VARIETAT	ORIGEN	COLLITA	MTV	IBMP	IPMP	SBMP	REF.
Sauvignon blanc	Austràlia		19,4-27,0	18	2	< 1	(19)
	Austràlia i Nova Zelanda	1984-5		6,8	1,3	< 1	(20)
				4,7			(28)
	França			6-38	2-4	0-2	(20)
	Nova Zelanda			25,9	4,4		(20)
	Nova Zelanda	1985			35	< 6	< 0,5
Cabernet sauvignon	Austràlia		18,0	3,6 – 56,3			(19, 22, 30)
	França			5-30			(25)
	França	1995		11 – 15			(25, 27)
	França	1996		8-19			(27)
	Japó	1975-88		5-28			(31)
	Japó	1989	23,5	17			(31)
	Japó	1990	23,3	4			(31)
	Japó	1991	23,2	10			(31)
	Japó	1992	22,6	9			(31)
	Japó	1993	21,7	35			(31)
	Japó	1994	23,6	3			(31)
	Japó	1995		25,3			(26)
	Japó	1996		6,5	0,2		(32)
> 80% Cabernet s	Austràlia		22,7	3,6			(22, 30)
	Austràlia		23,6	6,2 – 7,6			(22, 30)
	Austràlia		21,2	9,1			(22, 30)
	Austràlia		19,8	11,2			(22, 30)
	Austràlia		20,0	12,3			(22, 30)
	Austràlia		22,7	17,1			(22, 30)
	Austràlia		18,0	26,1			(22, 30)
	Nova Zelanda		17,9-18,8	27,6 – 28,6			(22, 30)
Merlot noir	França			4-23			(25)
	França			5,1-10,8			(32-34)
	França	1993		9-16			(32-34)
	França	1994		6,5-13			(32-34)
	França	1995		3,7 – 7,5			(27)
	França	1996		3-16			(27)
	França	1996		6-12			(27, 35)
	Japó	1989-94		11			(31)
	Japó	1996		0,8	0,2-0,3		(32)
Cabernet franc	França			6-34			(25)
	França			8,5-12,1			(32-34)
	França	1995		4-5			(27)
	França	1996		2-11			(27)
	Japó	1987-92		14			(31)
Pinot noir	França	1983		<0,7		0,1 – 0,2	(22)
Muscat Baley A	Japó	1989-94		1			(31)
Chardonnay	Japó	1995		11,6			(26)
Zweigeltrebe	Japó	1983-91		3			(31)
Xynomavro	Grècia	1995		15-33			(32-34)

Taula 3. Continguts d'IBMP, IPMP i SBMP en vins (mitjanes, ng/L). MTV: temperatura mitjana al mes de la maduració (°C).

S'observa que la IBMP s'ha trobat invariablement present a totes les mostres en què s'han identificat MPs i els seus continguts eren sempre els més alts. S'ha vist que aquesta MP és la més abundant a les diferents parts del raïm (llavors, pells i peduncles) de Cabernet sauvignon, així com al vi (31). A més, és probable que aquest compost tingui un impacte en l'aroma del vi, ja que els continguts que se n'ha trobat són sovint més grans que el seu llindar de percepció sensorial, 10-16 ng/L en vi negre (13, 25, 33) i 1-8 ng/L en vi blanc (28).

La IPMP s'ha identificat en raïms i vins de Sauvignon blanc, Cabernet sauvignon, Merlot noir i Pinot noir; en raïm de Sémillon, Chardonnay i Riesling; i en rapes de Muscat. Generalment, els continguts d'aquest compost en vins són inferiors als d'IBMP (20, 24, 32). S'ha descrit que el llindar de percepció sensorial d'aquest compost és de 2 ng/L tant en aigua i vi sintètic com en vi blanc i negre (13, 28, 36, 37). Donats els continguts tan baixos en què es troba, és improbable que aquesta MP contribueixi a l'aroma del vi.

La SBMP s'ha trobat en raïms i vins de Sauvignon blanc, Cabernet sauvignon, Merlot noir i Pinot noir (20, 22, 30, 38). S'ha suggerit que, degut a les baixes concentracions en què es troba, molt probablement la SBMP no té impacte sensorial en vins (22). Considerant que el seu llindar de percepció sensorial en aigua és de 1 ng/L (4, 39), no es pot descartar la possibilitat que el compost pugui tenir un impacte en l'aroma dels vins de Cabernet sauvignon i de Merlot, però caldria investigar quin és el seu llindar de percepció en vins negres.

Si bé s'ha descrit la presència d'ETMP en raïm de Sauvignon blanc (40), sembla que és improbable que aquest compost arribi a nivells suficients per a contribuir a l'aroma del vi. Això és degut al fet que el seu llindar de detecció sensorial en aigua és de 400-425 ng/L (37, 41). Possiblement per aquest motiu als treballs en què s'ha analitzat les MPs en raïms i vins generalment no s'ha estudiat aquest compost.

L'anàlisi d'un vi particularment ric en MPs (que contenia uns 35 ng/L d'IBMP) va establir un nivell màxim de 3-metil-2-metoxipirazina (MEMP) de 0,1 ng/L (29). Com que el llindar de detecció sensorial d'aquest compost és de 3.000-7.000 ng/L en aigua (4, 17, 37, 42), sembla altament improbable que tingui cap contribució a l'aroma del vi.

2.2.2. Contribució a la distinció varietal dels vins

S'ha demostrat que hi ha una clara relació entre la concentració d'IBMP i la presència d'una nota característica 'vegetal' o 'de pebrots verds' als vins de Cabernet sauvignon i de Sauvignon blanc. L'anàlisi sensorial de mostres de vi blanc addicionades de diferents concentracions creixents d'IBMP (0, 1, 2, 4, 8, 16 i 32 ng/L) ha confirmat la contribució de la IBMP a l'aroma 'vegetal' en aquest tipus de vi (28). La regressió lineal de la puntuació d'intensitat de l'aroma 'vegetal' en 8 vins de Sauvignon blanc comercials ha indicat una relació positiva molt altament significativa amb els nivells d'IBMP trobats. Els vins de concentracions més altes (> 26 ng/L) i més baixes (< 12 ng/L) es podien diferenciar clarament en base a la nota 'vegetal' detectada per tast (28, 36). També s'ha investigat la relació entre el caràcter 'de pebrot verd' i els continguts d'IBMP en 50 vins negres de Burdeus i del Loire. S'ha trobat que hi ha una relació lineal entre les puntuacions d'intensitat d'aroma determinades per tast i els continguts d'IBMP. Els vins sense caràcter 'de pebrot verd' contenien una mitjana de 10 ng/L d'IBMP; els que es considerava que en tenien un gust feble, en contenien uns 15 ng/L; i per damunt d'aquest valor la percepció d'aquest caràcter era entre mitjana i forta. Per tant s'ha estimat que el llindar de percepció per damunt del qual el caràcter 'de pebrot verd' de la IBMP és intens (per aquest tipus de vins) és d'uns 15 ng/L (25).

S'ha suggerit que la IBMP és un compost-impacte de l'aroma del Cabernet sauvignon, ja que s'ha observat que un vi negre (que no contenia aquesta varietat) fortament addicionat d'aquest

compost presentava la nota característica ‘de pebrot verd’ i recordava l’aroma d’aquests vins (43). També s’ha observat que es tracta d’un compost rellevant en l’aroma d’aquests vins ja que s’hi troba en quantitats superiors al seu llindar de percepció sensorial (44). Ara bé, s’ha vist que són els continguts relatius en què es troba, més que no pas únicament la seva presència, els que determinen la distinció varietal. En un estudi per detectar les substàncies aromàtiques característiques de les varietats Merlot noir, Cabernet sauvignon i Garnatxa mitjançant la tècnica de Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) s’ha concretat que, si bé la IPMP i la IBMP eren presents entre les substàncies oloroses més importants, no hi havia compostos-impacte característics d’una sola varietat i que les diferències entre varietats eren més quantitatives que no pas qualitatives (45). Aquestes diferències qualitatives també s’han observat en vins de Burdeus de diferents anyades fets a partir de Cabernet sauvignon, Merlot noir i Cabernet franc: d’entre 89 vins, els de Merlot noir presentaven sempre concentracions més baixes d’aquest compost (25).

Per altra banda, s’ha vist que la nota de ‘pebrot verd’ no estableix una diferència aromàtica entre les varietats Cabernet sauvignon i Merlot noir. Un pannel de tast format per experts va proporcionar una llista inicial de 20 atributs per a la descripció de les notes d’aquestes varietats. Després de revisar-los i seleccionar-los es va arribar a un inventari de 12 descriptors finals. El descriptor ‘pebrot verd’ es trobava dins aquesta llista, la qual incloïa, entre d’altres, ‘pruna’, ‘taronja’, ‘cirera’, ‘pebre’, ‘caramel’ o ‘cafè’. El descriptor ‘pebrot verd’ era comú a les dues varietats i per tant no contribuïa a la diferenciació entre les mateixes, cosa que sí que feia el descriptor ‘caramel’, el qual presentava puntuacions més altes per als vins de Merlot noir (46).

Pel que fa a la varietat Sauvignon blanc, s’ha vist que les MPs no són les úniques substàncies importants pel que fa a la distinció varietal, ja que també hi ha diferents molècules sofrades,

com la 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona, l'acetat de 3-mercaptohexil o bé el 3-mercaptohexan-1-ol, que tenen una important contribució a l'aroma d'aquests vins (47-49).

Per tant, es pot dir que la 'distinció varietal' dels vins que contenen IBMP seria deguda a diferències en els continguts relatius d'aquest compost i probablement també a la influència d'altres substàncies presents a l'aroma. Tot plegat porta a la conclusió que la comprensió de com les MPs poden contribuir a la distinció de les diferents varietats en què es troben i fins a quin punt poden actuar com a compostos-impacte olorosos requereix encara molta feina de recerca.

2.2.3. Efecte en la qualitat del vi

Les dades disponibles referents a la influència de les MPs en la qualitat del vi són molt limitades i es basen principalment en les opinions dels autors o dels productors. Per aquest motiu seria interessant poder disposar de dades que indiquessin en quins vins és positiu o negatiu l'efecte de les MPs i quins nivells de presència d'aquest compost són recomanables. L'obtenció d'aquesta informació requerirà sens dubte la combinació de l'anàlisi sensorial amb la determinació dels continguts de MPs en vins procedents de diferents regions i anyades.

Les aromes 'vegetals' i 'de pebrot verd' són generalment considerades com a perjudicials per a la qualitat de l'aroma dels vins negres (25, 33, 50). A les anyades dolentes, el caràcter 'herbaci' i 'vegetal' de les MPs sovint resulta força evident, però a les bones anyades, aquesta nota resulta equilibrada (38). Les següents MPs són considerades responsables de les 'males olors herbàcies' dels vins: l'ETMP ('de pebrot' i 'terrosa'), la IPMP ('de pebrot', 'terrosa', 'de florit' i 'de celler'), la IBMP ('de pebrot', 'terrosa', 'de pèsol', i 'de patata') (41). Una nota massa forta 'd'api', 'de vegetal fresc' i 'de mongeta verda' a les aromes dels vins de Sauvignon blanc també es considera un defecte (51). A més el caràcter 'vegetal' que la IBMP proporciona s'associa al

raïm immadur i això sovint està lligat a una extracció més baixa de color i de tanins, junt amb una manca de finesa aromàtica, i tot plegat és en detriment de la qualitat del producte final (25).

Ara bé, s'ha vist que la presència d'IBMP pot ser compatible amb els vins d'alta qualitat fins i tot quan supera el seu llimar de percepció sensorial en vins degut a que la seva complexitat aromàtica pot admetre nivells relativament alts d'aquest compost sense que siguin massa dominants. S'han analitzat els continguts de MPs en sis vins d'alta qualitat de Burdeus (de les anyades 1982 i 1983) i s'hi ha trobat un rang de 7-15 ng/L d'IBMP (38). Aquests resultats estan d'acord amb les dades obtingudes en l'anàlisi d'una sèrie de vins francesos de gran qualitat (*Grand Cru Classé*) de les varietats Merlot noir, Cabernet franc i Cabernet sauvignon, de les regions de Margaux, Fronsac, Graves, Moulins, Pomerol, St Emilion, i Pauillac (anyades 1995 i 1996), ja que s'ha vist que la qualitat d'aquests vins no era pas afectada negativament per la presència d'IBMP. Aquest compost s'ha identificat a tots els vins i els nivells trobats eren de 2-14 ng/L, i en gairebé totes les mostres de Cabernet sauvignon eren de 11-14 ng/L, per damunt del seu llimar de detecció sensorial en vins negres (27).

Les MPs, especialment la IBMP, han estat considerades (sobretot pels productors d'Austràlia i de Sud-Àfrica) importants en l'aroma de la varietat Sauvignon blanc i la nota 'herbàcia' d'aquests vins s'ha acceptat generalment com a característica de la varietat, de manera que s'ha reconegut com un aspecte positiu de la qualitat del vi (21, 23). S'ha descrit una correlació positiva entre les puntuacions dels vins de Sauvignon blanc i els nivells de MPs que presentaven (21). Ara bé, per aconseguir una bona qualitat és important que aquesta aroma varietal estigui en harmonia amb altres característiques del vi (21). La presència d'IBMP pot donar complexitat aromàtica i caràcter varietal als vins de Sauvignon blanc, essent un factor positiu de qualitat, sempre i quan aquesta nota no sigui massa dominant, sinó que estigui en equilibri i complementada amb altres notes herbàcies i fruitades (23, 52). Per exemple, a les zones càlides

d'Austràlia, la intensitat aromàtica de l'aroma varietal del Sauvignon blanc pot ser massa feble i hi ha un interès a incrementar-ne els nivells, mentre que en algunes regions més fredes de Nova Zelanda els productors poden estar preocupats si la intensitat d'aquesta nota és dominant (21). A la pràctica, un rang de continguts d'IBMP de 8-20 ng/L s'ha considerat desitjable per als vins de Sauvignon blanc (38). Però en àrees fredes se'n poden assolir nivells superiors a 20-25 ng/L, massa alts per a ser equilibrats per altres notes de l'aroma, de manera que s'ha recomanat l'aplicació de certes pràctiques vitícoles per a moderar-los (19).

2.3. Influència d'alguns factors vitícoles i enològics

L'enorme interès que té per a l'enologia el tema de la influència potencial dels continguts de MPs en la qualitat del vi ha incentivat l'estudi de com les pràctiques vitícoles i enològiques poden afectar els nivells d'aquests compostos, ja que tot plegat podria permetre l'optimització dels nivells de MPs mitjançant les pràctiques pròpies dels processos de cultiu de la vinya i d'elaboració del vi.

Els estudis sobre com les pràctiques vitícoles poden afectar els nivells de MPs són difícils perquè és molt difícil separar, i controlar independentment, tots els diferents aspectes que influeixen en el creixement de la vinya. De fet, la nutrició i la disponibilitat d'aigua influeixen en el vigor de la vinya, el qual determina l'ombra que produeix la canòpia, i aquesta afecta la maduració del raïm. Per tant, aquests estudis requereixen assaigs molt ben controlats, dissenyats específicament per a obtenir la informació clau, i cal fer un seguiment de tots els possibles factors que poden influir en els resultats. Les publicacions sobre les dades recollides també haurien de reflectir tots aquests factors, els quals són essencials per a la comparació de diferents treballs. Els resultats podrien ajudar als productors a prendre les decisions apropiades a fi d'optimitzar la qualitat del vi. La informació sobre els nivells de MPs a les pells i a la polpa del

raïm podria ser clau per a l'enòleg perquè el moment de la verema, la intensitat de la premsada, la freqüència de remuntatges per dia i la durada de la maceració poden influir directament en els continguts d'IBMP en vins. A més, aquestes dades es podrien fer servir per a comparar diferents anyades, regions i sòls (33, 35).

2.3.1. La maduració del raïm

Els viticultors saben que els raïms de Cabernet o de Merlot noir tenen una aroma 'herbàcia' o 'vegetal' quan no són madurs (53). En concordança amb aquesta percepció, s'ha trobat que els nivells de MPs disminueixen progressivament i ràpidament amb la maduresa del raïm en aquestes varietats (22, 38). També s'ha descrit que, durant la maduració del raïm, hi ha una correlació molt clara entre la caiguda de l'àcid màlic i la de la IBMP, independentment de la varietat de raïm, el tipus de sòl, la densitat de plantació, l'anyada o les condicions meteorològiques (25). En mostos de Sauvignon blanc, els continguts d'IBMP, IPMP i SBMP són alts al verolat i decreixen ràpidament amb l'increment de la maduresa del raïm. S'ha observat que més del 96% del nivell d'IBMP del verolat (inicialment, superior als 30 ng/L) ja no és present al raïm de sis a vuit setmanes més tard: al moment de la verema (20, 36, 54). La disminució dels continguts d'IBMP s'esdevé principalment als estadis inicials de la maduració del raïm, abans que l'acumulació de sucre (glucosa i fructosa) arribi al 50% del seu valor final (20). Un cop s'ha arribat a la maduresa tècnica, els nivells d'IBMP romanen constants (27).

Com a conseqüència d'aquests canvis en les concentracions al llarg del procés de maduració, es pot trobar un ampli rang de nivells de MPs al raïm. Així doncs, el principal factor que influeix en els continguts d'IBMP d'un vi és la maduresa del raïm que es vinifica, el qual pot variar amb les condicions climàtiques d'un any per l'altre. Aquest efecte s'ha observat en una sèrie de vins japonesos de Cabernet sauvignon (elaborats anualment des de 1989 fins a 1994 i

amb continguts d'IBMP que anaven de 3 a 35 ng/L). En aquestes mostres, la correlació de la regressió lineal entre els continguts d'IBMP i els valors de sucres era significativa: les mostres elaborades a partir de raïm més madur presentaven continguts d'IBMP més baixos, mentre que amb l'acidesa total i els valors de pH, la correlació era força alta però no significativa (31). També s'ha vist que un endarreriment de 15 dies a la verema pot disminuir molt la concentració d'IBMP, cosa que s'ha observat en dues mostres de vins de Xynomavro: als darrers 15 dies de maduració del raïm, els nivells d'IBMP van disminuir des de 31-33 fins a 15-17 ng/L (34).

El coneixement de com evolucionen les MPs durant la maduració del raïm i quina és la influència de les condicions ambientals a la vinya (especialment durant els primers estadis de desenvolupament) podria proporcionar una manera per a controlar l'aroma del futur vi. També seria d'interès conèixer millor quina és la rotació de MPs al raïm, és a dir, si els nivells que es poden mesurar són el producte de molècules que són constantment produïdes i degradades, o bé si aquests nivells són el producte de processos més lents o més a llarg termini. En termes pràctics, els estudis sobre la rotació de les MPs podrien ajudar a entendre l'escala de temps en què es produeix la resposta (en termes de nivells de MPs) al canvis en les condicions ambientals de la vinya; per exemple quan caldria exposar el fruit al sol, en quin estadi es pot requerir un estrès hídric, o quan caldria fer una aclarida (54).

La observació de la disminució dels continguts d'IBMP durant la maduració ha conduït a investigar la seva evolució al raïm durant l'estadi primerenc de desenvolupament. S'ha assenyalat que al raïm immadur ja es poden detectar diferències en els continguts de MPs entre vuit varietats diferents de *Vitis vinifera*. I s'ha descrit que els cultius en què el raïm presentava continguts alts de MPs quan era immadur, després de madurar també tenia nivells relativament alts d'aquests compostos. Les concentracions de MPs al raïm immadur són més altes que les del raïm madur. Si bé els continguts d'IPMP i d'IBMP s'incrementen durant l'estadi primerenc del

desenvolupament, després els continguts d'IPMP disminueixen abans del verolat, mentre que els d'IBMP disminueixen ràpidament després del verolat (24). Aquestes dades preliminars demostren l'interès potencial d'una línia de recerca centrada en la comprensió de com evolucionen les MPs al raïm immadur i com les pràctiques vitícoles en poden determinar els continguts.

EQUILIBRI ENTRE FORMACIÓ I DEGRADACIÓ. La observació de l'efecte de l'exposició de la llum del sol en raïms immadurs de Cabernet sauvignon ha conduït a l'elaboració d'una interessant teoria sobre la dinàmica de formació i degradació de MPs i l'evolució dels seus continguts durant el desenvolupament i maduració del raïm. En essència, la teoria és la següent: a) la llum actuaria com a promotor de la formació biològica de les MPs i també com a factor de destrucció d'aquests compostos; b) la creació de MPs estaria estretament relacionada amb l'estadi de desenvolupament del raïm i durant el procés de maduració hi hauria un canvi en el metabolisme del raïm; c) als estadis primerencs la quantitat de MPs formades biològicament seria superior a la quantitat degradada per la llum, però en estadis de desenvolupament més tardans (propers i posteriors al verolat) l'equilibri seria l'oposat (24).

Si bé la fotodegradació de les MPs és coneguda des de fa molt de temps (55), l'estudi de la dinàmica de la formació biològica de MPs en raïm immadur conjuntament amb la fotodegradació ha obert un camp de recerca extremadament interessant. En efecte, el coneixement de com les condicions de desenvolupament del raïm immadur poden influir en l'aroma dels futurs vins, com es pot predir i fins i tot actuar per optimitzar-los podria ajudar als productors a millorar la qualitat dels seus productes.

2.3.2. Factors edafoclimàtics

Mentre que la principal font de variació de les concentracions de MPs en raïm és la maduresa del fruit, els nivells d'aquests compostos en vins responen fortament a les condicions climàtiques i de cultiu de la vinya (19). Això és degut a que les pràctiques vitícoles que tenen una influència en l'exposició del raïm al sol afecten els continguts de MPs durant el procés de maduració del raïm i conseqüentment determinen els nivells que en té el raïm al moment de la verema (19, 25, 54). S'ha descrit que les concentracions de MPs disminueixen amb l'increment de la temperatura i de l'exposició a la llum del sol, i una anyada més càlida produeix una disminució dels continguts de pirazina més pronunciada que no pas una anyada més freda (19, 23). Generalment s'admet que els vins de Cabernet sauvignon procedents d'àrees càlides solen tenir aromes 'vegetals' o 'herbàcies' menys pronunciades que no pas els vins d'aquesta varietat procedents d'àrees més fredes (22).

Les variacions en els continguts de MPs degudes a les diferències en les condicions climàtiques, la regió d'origen i l'anyada són difícils de separar, ja que tots aquests factors estan connectats i en realitat tots ells tenen a veure amb les condicions macro, meso i microclimàtiques. Si bé es requerirà molta feina de recerca abans no es disposi d'informació fiable i precisa que pugui ser d'utilitat per a la millora del cultiu de la vinya, s'han apuntat una sèrie de suggeriments que es poden tenir en compte. S'ha recomanat que les varietats que tendeixen a tenir quantitats de MPs més altes, com el Cabernet sauvignon, s'haurien d'evitar a les regions més fredes, en què els vins produïts podrien tenir unes aromes excessivament 'herbàcies' i 'vegetals' (38). I s'ha suggerit que les condicions climàtiques fredes podrien exigir certes accions específiques de cara al cultiu de la vinya destinades a moderar els nivells relativament alts de MPs que s'hi generen (19). Per altra banda, s'ha proposat la producció de vins de Sauvignon blanc amb concentracions més altes de MPs: les vinyes s'haurien de cultivar en àrees fredes o bé en pendents obagues a les àrees més càlides; la canòpia també es podria manipular per tal d'obtenir

una temperatura relativament baixa i una reducció de l'exposició a la llum del sol, cosa que teòricament beneficiaria la producció de les MPs i la seva retenció durant la maduració del raïm (23). Ara bé, cal no subestimar els possibles efectes negatius de les baixes temperatures i de la manca d'exposició a la llum del sol en la salut de la vinya i en la qualitat del raïm i del vi.

LA TEMPERATURA. S'ha observat que els nivells de MPs tendeixen a ser més alts a les anyades més fredes. En canvi, a les anyades més càlides hi pot haver un efecte més pronunciat de disminució dels nivells d'IBMP, arribant a nivells inferiors al seu llindar de percepció sensorial (20, 23). Les condicions de temperatura de maduració tenen una influència molt gran en els nivells d'IBMP en vins de Sauvignon blanc (19, 21): les condicions més fredes poden conduir a nivells més alts de MPs i per tant a potenciar les aromes 'vegetals' del raïm de Sauvignon blanc (20, 54). Amb el Merlot noir s'han observat resultats similars: L'anàlisi de mostres procedents de les anyades 1993 i 1994 va revelar que les mostres de 1994 tenien el grau d'alcohol més alt i el nivell d'IBMP més baix en tots els casos (33). La mateixa conclusió s'ha tret amb mostres de Cabernet sauvignon de Japó. En una sèrie de vins d'aquesta varietat elaborats cada any des de 1989 fins a 1994 i amb continguts d'IBMP de 3 a 35 ng/L s'ha vist que la correlació de la regressió lineal entre els continguts d'IBMP i les condicions climàtiques era bastant alta, suggerint la possibilitat de que aquestes condicions climàtiques podrien afectar els continguts d'IBMP en vins (31).

S'ha observat també que la temperatura de maduració té un efecte més gran en els nivells d'IBMP que no pas en l'acumulació de sucres. Així doncs, a estadis comparables d'acumulació de sucres, en una anyada més càlida hi ha una concentració d'IBMP més baixa que en una anyada més freda. Així doncs, en zones relativament càlides, els nivells de MP en raïms de Sauvignon blanc poden caure per dessota del llindar de percepció sensorial molt abans de que s'arribi a un nivell acceptable de maduresa del raïm per a la verema (20, 22, 36).

Si es disposés de més dades referents a la influència de la temperatura durant la maduració del raïm i en els nivells de MPs als vins finals, aquesta informació podria contribuir a la presa de decisions relatives al grau de maduració òptim per a procedir a la verema.

LA HUMITAT. S'ha observat que els vins de Cabernet sauvignon d'una anyada més assolellada i menys humida (1996) presentaven continguts d'IBMP més baixos (uns 10-30 ng/L), mentre que els vins elaborats a partir de raïm de la mateixa vinya però d'una anyada més plujosa (1997) en presentaven nivells molt més alts (20-100 ng/L). Això s'ha atribuït al fet que, en aquesta darrera anyada, va ploure molt durant els mesos de juny i de juliol, cosa que va resultar en la restitució de les reserves d'aigua del sòl, afavorint un creixement important de la vinya fins a la verema. Per això, malgrat que els mesos de setembre i d'octubre de 1997 van ser més càlids, més assolellats i menys humits que el 1996, el raïm va madurar en pitjors condicions pel que fa a la qualitat del vi (25). Així doncs, sembla que un nivell d'humitat més alt durant el mes anterior al verolat podria causar continguts superiors d'IBMP, cosa que donaria suport a la teoria que el raïm immadur determinaria els continguts d'aquesta MP als vins finals (24). La influència de la disponibilitat d'aigua en els continguts de MPs als vins és un altre interessant tema d'estudi que encara no s'ha abordat.

CONDICIONS MACROCLIMÀTIQUES. El principal factor que marca les diferències en els continguts de MPs entre anyades és el de les condicions macroclimàtiques. En aquest sentit s'ha observat que, en dos anys consecutius amb marcades diferències en la temperatura, els raïms procedents de les mateixes vinyes presentaven diferències en els nivells de MPs. Amb un mateix nivell d'acumulació de sucre, les mostres de l'any més fred presentaven continguts més alts d'aquest compost (20).

S'han descrit algunes relacions interessants entre la regió d'origen i la nota 'vegetal' dels vins o bé el seu contingut d'IBMP. Els vins de Cabernet sauvignon procedents de les regions més

càlides tendeixen a presentar aquesta nota menys accentuada (56). Els vins de Sauvignon blanc procedents de Nova Zelanda són considerats posseïdors d'aromes 'vegetals' més pronunciades que no pas els vins Australians de la mateixa varietat. Això està d'acord amb el fet que la IBMP es troba en concentracions significativament més altes als vins de Nova Zelanda (12 – 6 - 34,5 ng/L) que als d'Austràlia (0,6 - 14,6 ng/L) (20, 21). Aquest fet pot reflectir les condicions climàtiques generalment més fredes a les vinyes de Nova Zelanda i el superior vigor de la vinya amb el conseqüent efecte d'ombrejat de la canòpia generats per la més gran abundància d'aigua i la millor fertilitat del sòl (20, 22, 28, 36).

La revisió bibliogràfica indica algunes coincidències en els nivells d'IBMP trobats en vins de Cabernet sauvignon procedents de Burdeus, a les anàlisi realitzades per diferents grups de treball: 10-14 ng/L (27) i 10,6-14,9 ng/L (22). I també s'han trobat diferències importants en els continguts d'aquest compost entre vins procedents de regions diferents: mentre que els de Burdeus contenen els esmentats nivells, les concentracions trobades en vins procedents de Nova Zelanda eren més altes: 27,6 - 28,6 ng/L (22). Finalment, també s'han trobat diferències en els nivells de MPs entre diferents regions Australianes: a les regions més fredes (Adelaide Hills, Great Western, i Coonawarra, amb una temperatura mitjana de 19,4 - 20,2°C al mes del verolat) la IBMP es trobava en raïm de Sauvignon blanc a nivells més alts, de 8 a 16 ng/L, que en l'àrea més càlida (Wagga Wagga, amb una temperatura mitjana de 23,9°C al mes del verolat), amb nivells inferiors als 3 ng/L, a estadis comparables de maduresa del raïm (19, 20).

Si bé no hi ha encara dades per a poder extreure conclusions clares, els resultats comentats suggereixen que, en termes generals, la mateixa regió podria produir vins amb nivells semblants de MPs, mentre que hi podria haver variacions en els continguts de MPs degudes a la regió d'origen; en aquest cas sembla que les condicions macroclimàtiques serien el factor determinant d'aquestes diferències.

Els continguts de MPs poden estar afectats per l'anyada de diferents maneres en funció de la varietat de raïm. S'ha observat que, si bé els nivells d'IBMP de les anyades 1995 i 1996 eren semblants per a les varietats Cabernet franc (5 i 6 ng/L) i Cabernet sauvignon (12 i 13 ng/L), en canvi, els vins de Merlot noir presentaven diferències entre aquestes anyades. Els vins d'aquesta varietat de 1995 presentaven continguts d'IBMP més baixos (4 ng/L) que no pas els vins de 1996 (8 ng/L). Aquestes diferències s'han explicat pel fet que el 1996 la verema del Merlot noir va estar afectada per pluges mentre que el 1995 els raïms d'aquesta varietat van madurar molt. Les altres varietats, en canvi, no van ser afectades de la mateixa manera (27).

2.3.3. Factors vitícoles

Els viticultors saben que l'exposició del fruit a la llum del sol influeix en el caràcter del Cabernet sauvignon i del Sauvignon blanc (21). I s'ha trobat per anàlisi sensorial que els vins de Cabernet sauvignon procedents de plantes menys exposades a la llum del sol presentaven una aroma 'vegetal' més intensa que els del control, els quals havien tingut una exposició normal a la llum del sol (57). Per això són d'especial interès el vigor de la vinya, l'espampolament i la poda, tots ells factors determinants de l'exposició del fruit a la llum del sol i que es poden manipular a fi d'aconseguir que les mateixes vinyes donin lloc a un producte de millor qualitat.

S'ha observat que hi ha una associació entre els vins amb intensitat d'aroma 'vegetal' més alta i els sòls argilosos, profunds, més rics en nutrients i amb major capacitat d'absorció d'aigua. I a la inversa, els vins més fruitats, amb més aroma de baies són associats amb sòls arenosos, poc profunds, pobres en nutrients i amb poca capacitat de retenció de l'aigua. Tot plegat s'atribueix al fet que els sòls pobres en nutrients i amb poca capacitat de retenció d'aigua produeixen vinyes menys vigoroses, de canòpia molt oberta, exposant més el fruit a la llum solar (58).

L'ESPAMPOLAMENT. S'ha demostrat per avaluació sensorial que els vins de Cabernet sauvignon i de Sauvignon blanc procedents de vinyes amb canòpies que fan molta ombra tendeixen a presentar un caràcter 'herbaci' accentuat. També s'ha observat que l'espampolament (abans del verolat) de les vinyes de Sauvignon blanc disminueix el caràcter 'herbaci' del vi resultant (21). Això és degut a que les concentracions de MPs disminueixen amb l'increment de l'exposició a la llum del sol que s'obté amb l'espampolament (54). També s'ha observat que intensitats de llum del 16%, el 26% i el 58%, aconseguides per manipulació de la canòpia del Cabernet sauvignon, resultaven en percentatges d'IBMP d'aproximadament 60%, 40% i 30%, respectivament (54). Finalment, s'ha descrit que els tractaments primerencs (amb el fruit encara immadur) d'espampolament són més efectius que els tractaments tardans (al verolat) (51). Per tant, seria de gran interès per als viticultors conèixer l'efecte dels tractaments d'espampolament, especialment als estadis primerencs de desenvolupament del raïm, en els continguts de MPs i la intensitat de la nota 'vegetal' detectada als vins.

LA PODA. Diferents tècniques de poda poden donar lloc a diferències importants en els nivells d'IBMP (19, 54). Això es pot explicar per la influència que la poda té en l'exposició del fruit a la llum del sol. Els dos sistemes de poda més comuns, Guyot i Cordó Royat, requereixen d'un sistema de conducció, el qual facilita la bona exposició del fruit a la llum del sol. Els fruits de les vinyes podades en vas tendeixen a estar menys exposats a la llum del sol, degut a que les fulles els tapen, si bé això depèn molt del vigor assolit per la planta. La poda mínima (o poda zero) consisteix en no podar les vinyes. Aquesta tècnica es va desenvolupar a Austràlia i és de particular interès a les zones més càlides en què es fa molta producció a baix cost. A diferència de les vinyes podades, que tenen pocs sarments de creixement relativament vigorós, les vinyes no podades produeixen molts petits sarments. Si la poda mínima es practica en regions càlides, de clima sec, els sarments paren de créixer a començaments d'estiu; d'aquesta manera la canòpia pot restar relativament oberta i hi ha una bona exposició del fruit a la llum. Ara bé, si el

clima és més fred i més humit i el sòl és fèrtil, els sarments poden continuar creixent i el raïm pot quedar immers dins vàries capes de fulles i sotmès al microclima originat per la canòpia (59, 60).

La tècnica de poda pot tenir gran influència en els nivells de MPs en vins de Cabernet sauvignon. S'ha comparat la poda en cordó i la poda mínima, que representen diferències extremes de mida i distribució dels sarments, productivitat, mida del fruit i exposició del raïm a la llum del sol. Independentment de les diferències de productivitat, les vinyes de poda mínima donaven fruits amb concentracions de MPs vuit vegades més baixes que les vinyes podades en cordó. Això s'ha explicat pel fet que aquest sistema de poda proporciona una canòpia relativament lliure i oberta, amb molts petits raïms de gra petit ben exposats. Per tant, amb aquest sistema de poda l'exposició a la llum del sol seria més alta. Aquests resultats demostren el potencial que tenen les tècniques de poda per a influir en l'aroma del vi final. Ara bé, caldria estudiar específicament si és l'exposició del fruit a la llum del sol o la relació d'àrees entre les fulles i el fruit el que més influeix (19).

LA DENSITAT DE PLANTACIÓ. La informació disponible sobre la influència de la densitat de plantació en els continguts de MPs al raïm és escassa i aquest factor no s'ha separat del factor sòl. Per tant caldrà investigar més per tal d'entendre quina és la influència de cadascun d'aquests factors per separat. S'ha vist que els vins de Cabernet sauvignon procedents de vinyes de Burdeus amb baixa densitat de plantació que creixen en sòls de sorra i al·luvions tendeixen a produir vins amb un caràcter 'vegetal' perceptible fins i tot en anys en què les condicions climàtiques afavoreixen la maduració del fruit. Els resultats analítics donen suport a la hipòtesi que això podria ser degut a que aquests vins tenien continguts més alts de MPs. Així ho proven les diferències en els continguts d'IBMP als raïms de Cabernet sauvignon entre les mostres procedents de les vinyes de sòls de sorra i al·luvions amb una densitat de plantació de 3.500

plantes/ha i les de sòls de grava amb una densitat de plantació de 7.500 plantes/ha. Al final del verolat els continguts eren més alts (uns 45 ng/L) a les mostres de les primeres vinyes que no pas a les de les segones (uns 30 ng/L) (25).

2.3.4. Factors enològics

S'ha descrit que quan es segueix el mateix procediment de vinificació, els continguts d'IBMP en vins negres només depenen dels nivells d'aquesta aroma al raïm. Les concentracions d'IBMP en vins negres (Cabernet sauvignon, Cabernet franc i Merlot noir) veremats en quatre dates diferents properes a la maduresa s'han comparat amb els dels seus corresponents raïms i s'ha observat una tendència lineal en tots els casos, de tal manera que els continguts més baixos en raïms donaven lloc a continguts proporcionalment igual de baixos als vins resultants, i viceversa (27). Així doncs, els nivells d'IBMP al vi final es podrien predir si se'n conegués la concentració al raïm i la dinàmica d'evolució del procés de vinificació seguit. L'estudi d'aquest camp de recerca podria ser molt útil ja que permetria la predicció, el control i eventualment la modificació dels nivells de MPs mitjançant les pràctiques enològiques. A continuació es comenta com aquestes tècniques poden influir en els nivells d'IBMP trobats als vins.

EL PREMSATGE. S'ha observat que les pells, la polpa i la rapa contenen més MPs que no pas el corresponent suc del raïm (24, 26, 31). Les possibilitats que aquestes MPs tenen de passar al vi depenen molt del procés de vinificació i el premsatge n'és probablement un dels factors determinants.

Els vins de segones tendeixen a tenir un caràcter 'herbaci' més fort que no pas els de primeres (34). La comparació dels continguts d'IBMP dels vins de primeres amb els vins de segones de les varietats Merlot noir i Cabernet franc va mostrar que els vins de segones presentaven nivells més alts d'IBMP: 10,8 respecte a 5,1 ng/L en Merlot noir i 12,1 respecte a 8,5 ng/L en Cabernet

franc (33, 34). Aquestes diferències es poden explicar per l'efecte potenciador de l'extracció de MPs de les pells i les llavors del raïm que tindria la premsada.

Si bé els continguts de MPs a la rapa són més alts que no pas a les corresponents llavors, pells i most (26, 31), tenen poca influència en les concentracions de MPs als vins finals degut a que s'extreuen poc. A més, els nivells de MPs a les rapes varien menys amb l'anyada que no pas els continguts de MPs als mostos i als vins (31).

LA FERMENTACIÓ. Després de la fermentació, els vins negres presenten continguts de MPs més alts (en alguns casos, fins a dues i tres vegades més) que els seus corresponents mostos abans de la fermentació. Això s'ha atribuït al fet que les MPs podrien estar localitzades a les parts sòlides dels grans de raïm i serien extretes durant la fermentació alcohòlica (22, 31, 36, 38, 61). S'ha descrit que les MPs en vins de Cabernet sauvignon no només deriven de la polpa sinó també d'altres parts dels grans del raïm (31) i s'ha demostrat que les pells i llavors del raïm són elements importants en l'augment dels continguts d'IBMP: el seguiment de la fermentació de mostres amb i sense les llavors i pells del raïm va mostrar que, en absència d'aquests elements, no hi havia increment dels continguts d'IBMP sinó que, de fet, disminuïen lleugerament (un 10% aproximadament) en tots els casos (61).

S'ha suggerit que aquest increment dels continguts de MPs pot ser degut a l'extracció produïda per l'etanol generat durant la fermentació alcohòlica o bé a certes soques específiques de llevats que alliberarien les MPs dels seus precursors específics (61). Una hipòtesi alternativa és que l'extracció es produiria per la difusió deguda al contacte entre el most i les estructures trencades i que els moviments deguts a la pròpia fermentació facilitarien aquest procés.

L'endarreriment en el procés de fermentació (amb pells i llavors en contacte amb el most) pot produir un retard en l'increment de MPs al most, fins i tot després d'un període de 100 hores. Aquest efecte s'ha observat en la comparació entre mostres de most fermentades després d'una

inoculació immediata o endarrerida del llevat. I s'ha vist que, fins a l'inici de la fermentació, l'increment del nivell de MPs era molt baix o inexistent (61).

La duració de la maceració pot tenir una influència important en els continguts de MPs en vins negres. L'evolució dels continguts d'IBMP durant la fermentació dels vins de Merlot noir ha revelat aquest efecte: els continguts d'IBMP de les mostres preses després de 3, 5 i 8 dies de maceració incrementaven progressivament: des d'uns 5,5–6,0 ng/L (després de 3 i 5 dies, respectivament) fins a uns 10,5 ng/L (al cap de 8 dies) (34). Això es podria explicar per l'efecte de la fermentació o bé als moviments deguts als gasos i als remuntatges.

També s'ha observat que una maceració final en calent no produeix cap diferència en els continguts d'IBMP respecte d'un blanc, possiblement degut a que el nivell màxim d'IBMP ja s'hauria assolit durant els processos previs de fermentació i maceració (34).

Finalment, s'ha vist que la tècnica de la fermentació a pressió pot ser interessant de cara a l'elaboració de vins negres de qualitat. La fermentació del raïm realitzada en un tanc pressuritzat especial i amb maceració sense remuntatges va resultar en nivells més baixos d'IBMP (uns 12 ng/L) que no pas els obtinguts amb la tècnica tradicional (uns 16 ng/L) (32). Si bé no molt gran en nombre absolut, una diferència d'aquest ordre podria ser crítica, ja que pot representar la diferència entre estar per damunt o per dessota del llindar de percepció de la IBMP en vins negres (13, 25, 33, 62).

2.3.5. Altres factors

A banda de tots els factors esmentats, n'hi ha dos que poden influir en els nivells de MPs als vins. Son l'emmagatzematge i la contaminació microbiològica, que es comenten a continuació.

L'EMMAGATZEMATGE. En solució aquosa àcida, els continguts d'IBMP i d'IPMP decreixien sota la llum fluorescent després d'una exposició durant 120 hores (pèrdua d'aproximadament el 28%), mentre que les mostres deixades a la foscor no presenten cap disminució. Això és degut a que les MPs són sensibles a la foto-degradació (55). Per tant, les condicions de llum, així com el color de les botelles, poden determinar els continguts de MPs en vins al cap d'un llarg període d'emmagatzematge o d'envelliment. En aquest sentit s'ha observat que les concentracions de MPs decreixien més ràpidament en la presència de llum al cap de 12 mesos d'emmagatzematge en botelles de vidre incolor (fins al 60%) que no pas en botelles verdes o de color ambre (fins al 40%). En canvi, quan les botelles eren emmagatzemades en condicions de foscor, les disminucions d'aquests continguts eren molt menors (inferiors al 4%), independentment del color de la botella. També s'ha descrit que l'ETMP és la MP més estable, amb una retenció del 75% al cap de 12 mesos en botelles transparents; la IPMP presenta una retenció del 69% i la IBMP és la més inestable, amb una retenció del 41% en les mateixes condicions (13).

CONTAMINACIÓ MICROBIOLÒGICA. En una botella de vi negre s'han trobat continguts d'IPMP molt més alts que en altres botelles de la mateixa producció. S'ha suggerit que aquesta variació entre botelles hauria de procedir de fonts extrínseques al vi, al raïm i al procés de vinificació (30). Considerant que hi ha microorganismes capaços de sintetitzar la IPMP (1), de vegades fins a concentracions relativament altes (12), no es pot descartar la possibilitat que aquest fet fos degut a la contaminació microbiològica (potser lligada al tap de suro) d'aquella botella (30).

S'ha observat que els nivells d'IBMP en vi procedent de raïm infectat per *Botrytis cinerea* eren més alts que els dels vins procedents de raïm sa (16 respecte a 7-12 ng/L i 19 respecte a 8-14 ng/L). Això s'ha atribuït al fet que el fong podria fer encongir el raïm, la seva pell esdevindria més fràgil i conseqüentment s'incrementaria l'extracció d'IBMP durant la fermentació (27).

Conclusions

Les principals conclusions extretes en aquest capítol són les següents:

1. La 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP) és la metoxipirazina de major interès enològic, s'ha trobat (en totes les mostres de raïms, mostos i vins en què s'han identificat metoxipirazines) a concentracions més altes que les altres i probablement és la que té més impacte sensorial al vi.

2. Els vins de les varietats Sauvignon blanc, Cabernet sauvignon, Merlot noir, Cabernet franc, Chardonnay i Xynomavro poden presentar una nota 'vegetal' característica deguda a la IBMP.

3. Els principals factors que poden afectar els nivells d'IBMP en vins són:

* L'exposició del raïm a la llum del sol: El seu increment, degut a l'efecte de factors edafoclimàtics en el vigor de la planta o bé obtingut amb les tècniques de poda i d'espampolament, pot fer disminuir els nivells d'IBMP.

* L'estadi de maduració del raïm: La concentració d'IBMP disminueix progressivament i ràpidament amb la maduresa del raïm. Aquesta disminució es produeix principalment als estadis inicials de maduració i quan s'arriba a la maduresa tècnica, els nivells d'aquest compost romanen constants.

* La durada de la maceració: Després de la fermentació, els vins negres presenten continguts d'IBMP més alts que els corresponents mostos abans de la fermentació degut a que les metoxipirazines estan localitzades principalment a les parts sòlides del raïm i són extretes durant la fermentació. Les fermentacions de duració més llarga poden resultar en nivells d'IBMP més alts als vins finals.

* La intensitat de la premsada: Els vins de segones tendeixen a tenir un caràcter ‘vegetal’ més accentuat que no pas els vins de primeres, ja que un nivell de premsatge més fort pot extreure més la IBMP de les parts sòlides del raïm.

Finalment, cal assenyalar que resten molts camps de recerca per desenvolupar, ja que el coneixement de la influència de les 3-alquil-2-metoxipirazines en la qualitat del vi, així com els factors que poden determinar els seus continguts i evolució en raïm i vi, es troba encara en una fase molt preliminar de coneixement.

Al final d’aquest capítol es presenta l’article titulat *Factors affecting the presence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes 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 tots els aspectes relacionats amb la viticultura i l’enologia, des del punt de vista de com poden afectar els continguts de les 3-alquil-2-metoxipirazines en raïm, most i vi.

Bibliografia

01. Leete, E.; Bjorklund, J. A.; Reineccius, G. A.; Cheng, T. B. *Biosynthesis of 3-Isopropyl-2-methoxypyrazine and other alkyipyrazines: widely distributed flavour compounds*. Bioformation of flavours, Patterson, R.L.S., Charlwood, B. V., MacLeod, G. and Williams, A. A, Eds.; Royal Society of Chemistry, Cambridge, U. K, **1992**, 75-95.
02. Maga, J. A. Pyrazines in foods: an update. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1982**, *16*, 1-48.
03. Gallois, A. Pyrazines in Food: A review. *Sci. Aliments.* **1984**, *4*, 145-146.
04. Boelens, M.H.; Gemert, L.J. Structure-activity relationships of natural volatile nitrogen compounds. *Perf. Flav.* **1995**, *20*, 63-76.
05. Fors, S.M.; Olofsson, B.K. Alkyipyrazines, volatiles formed in the Maillard reaction. II. Sensory properties of five alkyipyrazines. *Chem. Senses.* **1986**, *11*, 65-77.
06. Maga, J. A. Pyrazines in Flavour. Developments in food Science, 3A. Food Flavours. Part A. Introduction. Chapter IV. Elsevier scientific Publishing company, Amsterdam, **1982**, 283-323.
07. Shibamoto, T. Heterocyclic compounds found in cooked meats. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 237-243.
08. Yaylayan, V. A.; Keyhani, A.; Wnorowski, A. Formation of sugar-specific reactive intermediates from ¹³C-labeled L-serines. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 636-641.
09. Pripis-Nicolau, L.; Revel, G.; Bertrand, A.; Maujean, A. Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3761-3766.
10. Bungert, M.; Jahns, T.; Becker, H. 2-Methoxy-3-(1'-methylpropyl)pyrazine, pea odour, from the marine bacterium *Halomonas venusta*. *Flavour Fragr. J.* **2001**, *16*, 329-333.
11. Cheng, T.B.; Reineccius, G. A.; Bjorklund, J. A.; Leete, E. Biosynthesis of 2-Methoxy-3-isopropylpyrazine in *Pseudomonas perolens*. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1009-1012.
12. Gallois, A.; Kergomard, A.; Adda, J. Study of the Biosynthesis of 3-Isopropyl-2-Methoxypyrazine Produced by *Pseudomonas taetrolens*. *Food Chem.* **1988**, *28*, 299-309.
13. Maga, J. A. Sensory and stability properties of added methoxypyrazines to model and authentic wines. In *Flavours and Off-Flavours*, Proceedings of the 6th International Flavor Conference; Charalambous, G. Elsevier, Amsterdam, **1990**, 61-70.
14. Hashizume, K.; Tozawa, K.; Endo, M.; Aramaki, I. S-Adenosyl-L-methionine-dependent O-Methylation of 2-Hydroxy-3-alkyipyrazine in Wine Grapes: a putative final step of methoxypyrazine biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 795-801.
15. Rizzi, G. P. The biogenesis of food-related pyrazines. *Food Rev. Int.* **1988**, *4*, 375-400.
16. Pyrazine Specialties. Catalog, Pyrazine Specialties Inc., 792 Windsor Street S.W. Atlanta, Georgia 30315, USA, **1994**
17. Masuda, H.; Mihara, S. Olfactive Properties of Alkyipyrazines and 3-Substitued 2-Alkyipyrazines. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 584-587.
18. Buchbauer, G.; Klein, C.T.; Wailzer, B.; Wolschann, P. Threshold-based structure-activity relationships of pyrazines with bell-pepper flavor. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4273-4278.
19. Allen, M. S.; Lacey, M. J. Methoxypyrazine grape flavour: influence of climate, cultivar and viticulture. *Wein-Wissenschaft.* **1993**, *48*, 211-213.
20. 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.
21. Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V. Sauvignon Blanc varietal aroma. *Austr. Grapegr. Winem.* **1988**, *292*, 51-56.
22. 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.
23. Marais, J. Sauvignon blanc cultivar aroma - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1994**, *15*, 41-45.
24. Hashizume, K.; Samuta, T. Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 194-198.
25. 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.
26. Hashizume, K.; Samuta, T. Green odorants of grape cluster stem and their ability to cause a wine stemmy flavor. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1333-1337.

27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. Hashizume, K.; Umeda, N. Methoxypyrazine content of Japanese red wines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 802-805.
32. Hashizume, K.; Kida, S.; Samuta, T. Effect of steam treatment of grape cluster stems on the methoxypyrazine, phenolic, acid, and mineral content in red wines fermented with stems. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4382-4386.
32. Kotseridis, Y.; Anocibar-Beloqui, A.; Bertrand, A. 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine, responsible of vegetative aroma in wines, viticultural and winemaking factors. In 'In vino Analytica Scientia', First Symposium, Bordeaux, **1997**.
33. 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.
34. 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.
35. Kotseridis, Y.; Baumes, R.; Skouroumounis, G. K. Synthesis of labelled [2H4] β -damascenone, [2H2] 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, [2H3] α -ionone, and [2H3] β -ionone, for quantification in grapes, juices and wines. *J. Chromatogr. A*. **1998**, *824*, 71-78.
36. Allen, M. S.; Lacey, M. S.; Brown, W. V.; Harris, R. L. N. Occurrence of methoxypyrazines in grapes of vitis vinifera cv. Cabernet sauvignon and Sauvignon blanc. Actualités Oenologiques 89: Comptes Rendus du 4e Symposium International d'Oenologie, Bordeaux. Institut d'Oenologie Université de Bordeaux II, Dunod, Paris. **1990**, 25-30.
37. Seifert, R. M.; Buttery, R.G.; Guadagni, D.G.; Black, D.R.; Harris, J.G. Synthesis of Some 2-Methoxy-3-Alkylpyrazines with Strong Bell Pepper-Like Odors. *J. Agric. Food Chem.* **1970**, *18*, 246-249.
38. Allen, M. S. What level of methoxypyrazines is desired in red wines? The flavour perspective of the classic red wines of Bordeaux. *Austr. Grapegr. Winem.* **1995**, *381*, 7-9.
39. Murray, K. E.; Shipton, J.; Whitfield, F. B. 2-Methoxypyrazines and the flavour of green peas (*Pisum sativum*). *Chem. Ind.* **1970**, *7*, 897-898.
40. 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.
41. Colagrande, O. Genèse des odeurs et des goûts anormaux des vins. *Rev. Oenol.* **1989**, 17-20.
42. Mihara, S.; Masuda, H. Structure-Odor Relationships for Disubstituted Pyrazines. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 1242-1247.
43. 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.
44. Ferreira, V.; López, R.; Cacho, J. F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1659-1667.
45. 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.
46. Kotseridis, Y.; Razungles, A.; Bertrand, A.; Baumes, R. Differentiation of the Aromas of Merlot and Cabernet Sauvignon Wines Using Sensory and Instrumental Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5383-5388.
47. Schneider, R.; Kotseridis, Y.; Ray, J-L; Augier, C.; Baumes, R. Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. Development and application of a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3243-3248.
48. Tominaga, T.; Peyrot des Grachons, C.; Dubordieu, D. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc: s-Cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5215-5219.
49. Tominaga, T.; Blanchard, L.; Darriet, P.; Dubordieu, D. A powerful aromatic volatile thiol, 2-furanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* Grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1799-1802.
50. Colagrande, O.; Fumi, M. D. The use of cork in closing bottles: a scientific survey. *Ind. Bevande.* **1993**, *22*, 393-409.
51. Arnold, R.A.; Bledsoe, A.M. The effect of various leaf removal treatments on the aroma and flavor of Sauvignon blanc wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 74-76.
52. Allen, M. S. Grape and wine flavour analysis. *Chem. Austr.* **1995**, *62*, 16-17.

53. 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.
54. Allen, M. S. Viticultural effects on methoxypyrazine grape flavour: current research directions. *Austr. Grapegr. Winem.* **1993**, *354*, 10-12.
55. 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.
56. 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.
57. Morrison, J. C.; Noble, A.C. The effects of leaf and cluster shading on the composition of Cabernet sauvignon grapes and on fruit and wine sensory properties. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 193-200.
58. Noble, A.C.; ElliottFisk, D.L.; Allen, M.S. Vegetative flavor and methoxypyrazines in Cabernet Sauvignon. *Fruit Flavors.* **1995**, *596*, 226-234.
59. Robinson, J. (ed). The Oxford companion to wine. Oxford University Press, Oxford / New York, **1994**.
60. Reynier, A. Manual de Viticultura, 5ª edición, Ed. Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona-México, **1995**.
- 61 Allen, M. S. Commercial support for methoxypyrazine flavour research. *Austr. Grapegr. Winem.* **1994**, *366*, 22-23.
62. Takken, H. J.; van der Linde, L. M.; Boelens, M.; van Dort, J. M. Olfactive Properties of a Number of Polysubstituted Pyrazines. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 638-642.

En preparació

FACTORS AFFECTING THE PRESENCE OF 3-ALKYL-2-METHOXYPIRAZINES IN GRAPES AND WINES. A REVIEW.

Cristina Sala^{*a}, Olga Busto^a, Josep Guasch^a and Fernando Zamora^b

^aDepartament de Química Analítica i Química Orgànica.

^bDepartament de Bioquímica i Biotecnologia.

Unitat d'Enologia, CeRTA. Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili.
Avda. Ramón y Cajal 70, E-43005 Tarragona, Spain. E-mail: qaenol@fe.urv.es

Factors affecting the presence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes and wines. A review.

Cristina Sala^a, Olga Busto^a, Josep Guasch^a and Fernando Zamora^b

^a Departament de Química Analítica i Química Orgànica. ^b Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Unitat d'Enologia, CeRTA. Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili. Avda. Ramón y Cajal 70, E-43005 Tarragona, Spain. E-mail: qaenol@fe.urv.es

Abstract

This review discusses the presence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes, musts and wines, their effect on wine flavor and the influence of environmental conditions, viticultural practices and winemaking techniques on their contents. These compounds have been identified in the following varieties of *Vitis vinifera*: Sauvignon blanc, Cabernet sauvignon, Cabernet franc, Merlot noir, Pinot noir, Muscat, Semillon, Chardonnay and Riesling, Zweigeltrebe and Xynomavro. 3-isopropyl-2-methoxypyrazine, 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine and 3-isobutyl-2-methoxypyrazine are the most important, the last one being the more abundant. Reported contents of this compound in grapes and wines are up to 307 and 56.3 ng/L, respectively. Levels of 3-isopropyl-2-methoxypyrazine can be up to 48.7 ng/L in grapes and up to 4.5 ng/L in wines. Finally, the concentration of 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine in grapes and wines has been found to be lower than 11.2 ng/L. Sunlight exposure and grape maturity at harvest are the main factors affecting the contents of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines.

Keywords

3-alkyl-2-methoxypyrazines, aroma, grape, *Vitis vinifera*, wine

Introduction

3-alkyl-2-methoxypyrazines (MPs) (Fig. 1) have been found to play an important role in the aroma of several varieties of *Vitis vinifera*. The study of the aroma compounds of some of them, mainly Sauvignon blanc, Cabernet sauvignon, Cabernet franc and Merlot noir, is of great interest in the field of enology due to their economical importance. The most important pyrazines in wines are 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP), 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine (SBMP), and 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPMP).

Some excellent reviews have been published which have concentrated on the broad field of pyrazines in foods (1-6) and on the aroma of Sauvignon blanc (7). The knowledge of what factors can influence MP contents in grapes, how they evolve throughout the berry development and how they do pass to wines may provide a means for controlling the flavor and quality of the final wines. The present review summarizes and discusses the sensory properties of MPs, their occurrence in grapes, musts and wines; their influence on wine flavor and the viticultural and winemaking factors affecting their concentrations.

Sensory properties

The reported odor descriptions and olfactory thresholds of the main MPs in several media: air, water, and (synthetic, white and red) wine are summarized in Table 1. The difficulties for determining these properties are well known to the analysts dedicated to sensory evaluation. Differences in the results obtained can be due to biases linked to sensory analysis, differences in the methodologies used, in the sensitivity of the panel members, the influence of the medium, the concentration levels and the environmental conditions.

Nevertheless, it is generally agreed that the threshold of IBMP in water is 2 ng/L. The threshold of this compound has been found to be as low as 1-6 ng/L in white and synthetic wines and of 10-16 ng/L in red wines (Table 1). Wines containing a higher amount of this compound tend to have a strong 'vegetative' character (8). A study of MP addition to red wine has indicated a higher odor threshold for IBMP (16 ng/L) than for IPMP (2 ng/L) (3) (Table 1). The threshold of this last pyrazine is of 1-2 ng/L in water and wine (synthetic, white and red). Finally, data on sensory threshold of SBMP is scarce (Table 1), though in water 1-2 ng/L have been reported, so that values are likely to be higher in wines.

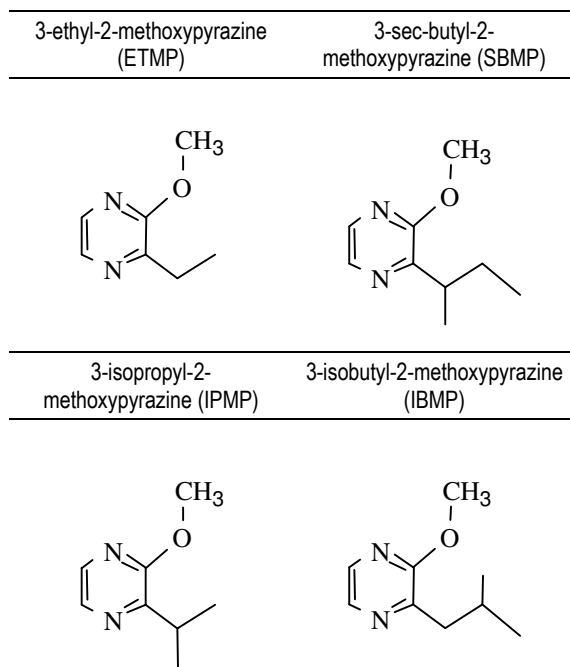
MPs have strongly green, somewhat earthy odor characteristics with roasted and nutty notes (9). IBMP, SBMP, and IPMP are the most important pyrazines regarding their potential influence in wine flavor. Their smell is generally described as 'bell pepper', 'leafy', 'ivy leaves', 'vegetable', 'peas', 'asparagus', 'galbanum', 'ginseng', 'roasted', 'musty' and 'raw potatoes'. 'Green pepper' aromas are considered more typical of IBMP, and 'pea-asparagus' aromas typical of IPMP (10). The olfactory notes of pyrazines are determined by their alkyl chain: the compounds with the smaller chains are described as 'roasted, nutty and sweet', whereas MPs with the longest side chain tend to have green-like odors (11-12) (Table 1).

Influence in wine aroma

MP contents in grapes, musts and wines reported in the literature are summarized on Tables 2 and 3. Data about their region of origin, vintage, climatic conditions and degree of grape maturation is also provided. IBMP is generally more abundant than IPMP and SBMP. This is also the compound

more likely to influence wine flavor because its contents in the final wines are more often above the sensory threshold. For all these reasons, IBMP is the most relevant MP in grapes, musts and wines.

Figure 1: Main 3-alkyl-2-methoxypyrazines found in grapes, musts and wines.



The fact that SBMP occurs in wines at very low levels suggests that it will seldom contribute significantly to the sensory character of wines (13). However, in some Cabernet sauvignon wines it reaches values of 2-6 ng/L, and the highest values registered are in Merlot noir wines, with 4-16 ng/L (Table 3). Considering its sensory threshold in water (1 ng/L), the possibility of the compound having an influence in wine aroma can not be discarded, though further work is needed to know more about its sensory threshold in wines (Table 1).

The presence of 3-ethyl-2-methoxypyrazine (ETMP) was reported in Sauvignon blanc (14) grapes. However, this compound was not found in an extensive research of 22 wines of this variety from Australia, New Zealand and France (15). Consequently, it is unlikely that ETMP, even if present in wines, would occur at a concentration sufficient to contribute to wine aroma, because its odor threshold in water has been reported to be 400-425 ng/L (Table 1). Therefore, authors analyzing MPs in grapes and wines tend not to look for this compound.

Analysis of a particularly MP rich wine (containing an average IBMP level of 35 ng/L) established an upper limit for 3-methyl-2-methoxypyrazine of 0.1 ng/L (16). As its odor threshold has been reported to be 4000-7000 ng/L (Table 1), any contribution of this compound to Sauvignon blanc wine aroma is unlikely to happen.

A too strong 'vegetative', 'green bell pepper' aromas found in wines containing IBMP are generally considered as

detrimental to the quality of red wine (8, 17-21). It can be associated to unripe grapes and poor quality wines (21).

Table 1. Reported odor descriptions and olfactory thresholds (ng/L) of the 3-alkyl-2-methoxypyrazines.

MP	Medium	Odor description	Threshold	Ref.
2-	water	roasted, nutty, sweet	400,000-700,000	(47-48)
3-methyl-2-	water	nutty, roasted, sweet, roasted peanuts, earthy	3,000-7,000	(9, 11, 47-49)
	red/synthetic wine		>64	(3)
3-ethyl-2-	water	sweet, brown, nutty, roasted	10,000	(47)
	water	raw potato, earthy, green bell pepper	400-425	(48-50)
3-propyl-2-	water	green, earthy, ginseng-like, vegetable	120	(11, 47)
	water	bell pepper	6	(48-49)
	white wine	earthy, cooked or canned asparagus, green beans	2	(37)
	air	earthy, roasted	0.0005-0.005	(9, 51)
3-isopropyl-2-	water	galbanum, earthy, musty, potato, green pepper, roasted, pea, mouldy, cellar grassy, earthy leafy	1-2	(3, 9, 32, 48-49)
	olfactometry red wine		2	(40)
	synthetic wine	musty, earthy, leafy	2	(3)
	red wine	green pepper, leafy	8	(3)
	synthetic wine	musty, green pepper	2	(3)
3-butyl-2-	water	green, earthy, ginseng-like, burdock-like, bell pepper	50	(3, 11, 47, 49)
3-sec-butyl-2-	water	green (peas, bell pepper, galbanum), ivy leaves, bell pepper	1-2	(9, 11, 49, 52-53)
	air	earthy	0.002-0.005	(9, 51, 54)
	water	green, bell pepper, musty, earthy	10	(9)
	water	green, bell pepper	2	(3, 48-49, 54)
3-isobutyl-2-	white wine	fresh vegetables, bell pepper, green gooseberries, herbaceous, vegetative	1	(37)
	olfactometry	herbaceous, earthy strongly green, bell pepper	16	(40)
	water		0.5	(55)
	red wine	leafy	10, 15, 16	(19)
	synthetic wine	musty, green pepper	2, 6	(3, 8)
3-pentyl-2-	water	green, earthy, ginseng, burdock	20	(11, 47)
3-hexyl-2-	water	green, earthy, burdock, vegetable	70	(11, 47)
	water	bell pepper	1	(1, 48-49)
3-heptyl-2-	water	green, earthy, burdock, vegetable	26	(47)
3-octyl-2-	water	green, earthy, burdock	60	(47)
3-decyl-2-	water	green, earthy, burdock, waxy	40,000	(47)

However, even when exceeding its sensory threshold, the presence of IBMP might be compatible with high quality Cabernet and Merlot wines (22) due to the flavor complexity of this variety (23).

IBMP is, together with certain sulfur-containing odorants like 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, 3-mercaptohexyl acetate or 3-mercaptohexan-1-ol (24-27), one of the most important varietal aromas of Sauvignon blanc (7, 10, 28). A positive correlation between wine scores and MP levels was found for some Sauvignon blanc wines. However, to achieve a good wine quality, it is important that such varietal aroma is in balance with other sensory features. In fact, the presence of IBMP may provide flavor complexity and varietal character to the resulting Sauvignon blanc wines, being a positive quality factor, as long as it is not too dominant, but in balance and complemented by other herbaceous and fruity aromas (7, 10, 29).

Grape ripening

The 'herbaceous-vegetative' aroma of Cabernet, Merlot noir and Sauvignon blanc grapes is known to decrease as grape maturity increases (14, 21). In agreement with this sensory perception, it has been found that MP levels declined progressively and rapidly with grape maturity in these varieties (15, 23, 30). Finally, once maturity is reached, IBMP levels remain consistent (22). As a consequence of these changes in concentrations throughout the ripening process, a very wide range of MP levels can be found in grapes. One of the major factors influencing IBMP contents in wines is grape maturity, which might vary with climatic conditions year by year: samples made from well-ripened grapes tend to have lower IBMP contents (31). A harvest delay of 15 days can diminish significantly the concentration of IBMP (32).

Although contents of both IPMP and IBMP increase in the early developmental stage, thereafter IPMP decreases before veraison, while IBMP decreases rapidly after veraison (33) (Table 2). Then, the major decrease in IBMP contents happens mainly at the initial stages of grape maturation. Finally, as grapes ripen, a very good correlation between the breakdown of malic acid and IBMP has been observed (8, 15).

Light exposure seems to have two opposite effects on the concentration of MPs in grapes: (a) promoting the biological formation of MPs in immature grapes, and (b) photo-decomposing the MPs in ripening grapes. The actual contents of MPs in grapes would be the result of a balance between these two opposite effects (33-34).

Climate and soil

Variations in MP contents due to differences in climatic conditions, region of origin and vintage are difficult to isolate, because all these factors are connected and actually all of them have to do with macro, meso and microclimatic conditions. However, it is generally acknowledged that wines from colder regions or vintages tend to exhibit a more pronounced 'vegetative-herbaceous' aroma and contain higher amounts of MPs (7-8, 10, 13, 15, 20, 22, 30, 35-36). This might be due to the increased vine vigor and canopy shading generated by better water availability and greater soil fertility (8, 13, 15, 37).

The influence of factors like vine vigor, pruning and leaf removal, all of them determining fruit exposure to sunlight, are

of especial interest because they can be manipulated to control the concentrations of these aromas. Climate and viticultural practices can have an influence on the decrease of IBMP contents throughout grape ripening and the final concentration reached by this compound at harvest (8, 21). MP concentrations decrease more under increased sunlight and temperature conditions (7).

Ripening temperature has a strong influence in IBMP levels in wines (10, 30). Cool ripening conditions can lead to higher MP levels and therefore to enhanced 'vegetative' aromas (7, 13, 15, 19, 31, 38). Ripening temperature seems to have a greater effect on IBMP levels than on sugar accumulation, leading to a lower IBMP concentration in the warmer year than in the cooler year at comparable stages of sugar accumulation. This means that, in relatively warm areas, MP levels might fall below the aroma threshold before the end of grape maturity (13, 15). A high humidity level, particularly in the pre-veraison month, can cause higher IBMP contents (8, 22, 33). Increased canopy shading can increase the 'vegetative' aromas in Cabernet sauvignon (10, 38-39).

Differences in water holding capacity, draining and nutritional richness of the soil can determine vine vigor, which in turn affects the sunlight available to the grape and IBMP contents. Wines with higher 'vegetative' aromas have been associated to the deep, clay-rich soils that are nutrient rich and have a high water holding capacity. On the other hand, fruitier wines, richer in berry aromas are linked to shallow, sandy soils that are nutrient poor and have a lower water holding capacity (20). Finally, Cabernet sauvignon grapes from vineyards grown on sandy-silt soils can contain higher IBMP amounts than grapes from gravel soils (8).

Viticultural Practices

It has been proven by sensory evaluation that leaf removal (prior to veraison) of Sauvignon blanc vines decreased the 'herbaceous' character of the resulting wine (10). MP concentrations can decrease with an increase in sunlight exposure obtained by a reduction in the number of leaf layers (38). Severe leaf removal seems to be most effective at reducing the vegetal character of Sauvignon blanc wine, and earlier treatments would be more effective than later treatments (17).

Different pruning techniques may cause significant differences in IBMP levels (30, 38). This might be explained by the influence the pruning system has upon fruit exposure to sunlight. Minimal pruned vines can produce grapes with eight-fold lower concentrations than fruits from spur-pruned vines. This can be explained by the fact that this pruning system provides a relatively loose and open canopy, with many well-exposed small clusters of small-berried fruit (30).

Winemaking

Skin, pulp and bunchstems contain more MPs than the corresponding grape juices (31, 40-41). Consequently, pressing technique can have a very important influence on MP contents in wines. Press wines are known to present a stronger 'herbaceous' character and higher IBMP amounts (19, 32, 41). The addition of stems to the vinification process can increase the levels of IPMP, SBMP and IBMP in the final wines, particularly in the case of this last compound.

Table 2. Reported contents of IBMP, IPMP and SBMP (averages, ng/L) in grapes.

Variety	Origin	Stage	HY	MTV	IBMP	IPMP	SBMP	Ref.
Sauvignon blanc	Australia				0.5-79			(30)
	Australia			19.8	8 - 16			(30)
	Australia			23.9	< 3			(30)
	Japan	30a	1997		101.2	48.7		(33)
	Australia	e	1987	22.2	35.4	1.1		(15)
	Australia	e	1988	27.0	30.7	1.6		(15)
	Australia	e	1987	19.4	78.5	6.8	0.6	(15)
	Australia	e	1987	20.2	8.6	0.6		(15)
	Australia	e	1987	19.6	12.1	0.6	0.1	(15)
	Australia	l	1987	22.2	1.3	1.0		(15)
	Australia	l	1988	27.0	0.6	0.3		(15)
	Australia	l	1987	19.4	13.4	1.3		(15)
	Australia	l	1987	20.2	11.5	0.5		(15)
	Australia	l	1987	19.6	9.5	0.5	0.5	(15)
Japan	h	1997		0.5	0.2		(33)	
Cabernet sauvignon	Australia			23.9	0.5-189			(30)
	Japan	10a	1997		18.6	6.9		(33)
	Japan	30a	1997		96.2	16.2		(33)
	Japan	50a	1997		143.0	2.7		(33)
	Japan	70a	1997		23.0	0.6		(33)
	Spain	v	1998	23.5	18.4 - 42.5	< 5.4	4.0 - 9.6	(42)
	France	e	1997		100			(8)
	France	e	1996		30-45			(8)
	Spain	e	1998	23.5	10.9 - 20.0	< 8.0	2.4 - 13.0	(42)
	Spain	m	1998	23.5	5.6 - 18.0	< 15.0	3.0 - 18.2	(8)
	France	l	1996		10 - 20			(40)
	Spain	l	1998	23.5	3.7 - 7.0	< 3.0	2.3 - 4.6	(33)
	Japan	h	1995		17.5			(42)
	Japan	h	1997		1.5	< 0.2		(22)
	Spain	h	1998	23.5	< 3.9	< 4.7	< 4.1	(42)
	France	must	1996		4-20			(33)
Spain	must	1998	23.5	4.3-10.0	< 2.8	< 3.4	(8)	
Merlot noir	Japan	30a	1997		227.3	15.4		(42)
	France	e	1997		60			(42)
	Spain	e	1998	23.5	21.7	15.8	11.2	(8)
	Spain	l	1998	23.5	10.4	10.7	6.3	(42)
	France	l	1997		20			(33)
	Spain	h	1998	23.5	5.6	2.7	2.1	(22)
	Japan	h	1997		0.9	< 0.2		(42)
	France	must	1996		5-12.9			(33)
	Spain	must	1998	23.5	19.4	18.1	8.2	(33)
	Pinot noir	Japan	30a	1997		1.4	0.4 ± 0.2	
Japan		h	1997		< 0.2	< 0.2		(33)
Muscat Baley A	Japan	30a	1997		0.3	< 0.2		(33)
	Japan	h	1997		< 0.2	< 0.2		(33)
Semillon	Japan	30a	1997		307.0	40.3		(33)
	Japan	h	1997		2.6	0.3		(33)
Chardonnay	Japan	30a	1997		33.3	2.3		(33)
	Japan	h	1995		5.3			(33)
	Japan	h	1997		0.2	< 0.2		(33)
Riesling	Japan	30a	1997		54.7	6.4		(30)
	Japan	h	1997		0.3	< 0.2		(30)

Table 3. Reported contents of IBMP, IPMP and SBMP (averages, ng/L) in wines.

Variety	Origin	HY	MTV	IBMP	IPMP	SBMP	Ref.
Sauvignon blanc				18	2	< 1	[02]
	Australia		19.4-27.0	6.8	1.3	< 1	[18]
	Australia & New Zealand	1984/85		4.7			[01]
	France			6-38	2-4	0-2	[18]
	New Zealand			25.9	4.4		[18]
	New Zealand	1985		35	< 6	< 0.5	[09]
	Australia			18.0	3.6 - 56.3		[02, 03, 05]
	France			5-30			[19]
	France	1995		11 - 15.4			[16, 19]
	France	1996		8-19			[16]
Cabernet sauvignon	Japan	1975-88		5-28			[11]
	Japan	1989	23.5	17			[11]
	Japan	1990	23.3	4			[11]
	Japan	1991	23.2	10			[11]
	Japan	1992	22.6	9			[11]
	Japan	1993	21.7	35			[11]
	Japan	1994	23.6	3			[11]
	Japan	1995		25.3			[25]
	Japan	1996		6.5	0.2		[12]
	Spain	1998	23.5	3.4 - 15.3	< 1	< 5.8	[20-23]
	Australia			22.7	3.6		[03, 05]
	Australia			23.6	6.2-7.6		[03, 05]
	Australia			21.2	9.1		[03, 05]
	Australia			19.8	11.2		[03, 05]
	Australia			20.0	12.3		[03, 05]
	Australia			22.7	17.1		[03, 05]
Australia			18.0	26.1		[03, 05]	
New Zealand			17.9-18.8	27.6-28.6		[03, 05]	
Merlot noir	France			4-23			[19]
	France			5.1-10.8			[13, 14, 17]
	France	1993		9-16			[13, 14, 17]
	France	1994		6.5-13			[13, 14, 17]
	France	1995		3.7 - 7.5			[16]
	France	1996		3-16			[16]
	France	1996		6-12			[15, 16]
	Japan	1989-1994		11			[11]
	Japan	1996		0.8	0.2-0.3		[12]
	Spain	1998	23.5	25.2-27.3	3.9 - 4.5	9.8 - 10.3	[20-21]
Cabernet franc	France			6-34			[19]
	France			8.5-12.1			[13, 14, 17]
	France	1995		4-5			[16]
	France	1996		2-11			[16]
	Japan	1987-1992		14			[11]
Pinot noir	France	1983		< 0.7		0.12 - 0.26	[03]
Muscat Baley A	Japan	1989-1994		1			[11]
Chardonnay	Japan	1995		11.6			[25]
Zweigeltrebe	Japan	1983-1991		3			[11]
Xynomavro	Greece	1995		15-33			[13, 14, 17]

HY: Harvest Year; MTV: Mean temperature at the month of veraison (°C)

HY: Harvest Year; MTV: Mean temperature at the month of veraison (°C)
 10a, 30a, 50a and 70a: 10, 30, 50 and 70 days after anthesis, respectively; v: veraison; e: grape ripening, early; m: grape ripening, middle; l: grape ripening, late; h: harvest

Grape cluster stems can be present during vinification due to incomplete stemming. Consequently, care must be taken since these vegetative aromas, particularly IBMP can be enhanced by the vinification technique (31, 40).

Changes in MP levels take place through the fermentation process. MP concentrations in freshly fermented red wines of MP containing varieties are higher (in some cases, twofold and threefold) than the corresponding grape juice prior to fermentation (13, 23, 31, 42-43). MPs in Cabernet sauvignon red wines do not only derive from the pulp but also from other parts of the grape berries (31). If the same vinification process is followed, IBMP levels in red wines depend only on the levels of IBMP in their corresponding grapes. They would pass to wine due to maceration and, if the contents in grapes were known, the final levels of IBMP in wines might be predictable (22). Maceration duration has an important influence in the MP contents in red wines (32). IBMP levels in wines obtained by fermentation under pressure have been found to be lower than the ones obtained with the traditional technique (44).

Other factors

MPs are sensitive to photo-degradation (34). Light conditions, as well as the color of bottles may determine MPs levels in wines after a period of storage or aging. MP concentrations decrease more rapidly in the presence of light over 12 months' storage in clear glass bottles (up to 60%) than in green and amber colored bottles (up to 40%). MP contents are stable in bottles stored for 12 months in the darkness, regardless of glass color (3).

IPMP can be produced by some microorganisms (45), sometimes in relatively high concentrations (46). Within a batch of wine bottles, one particular bottle of wine was found to contain a very high amount of IPMP (9.7 ng/L). It has been proposed that bottle-specific microbial contamination (perhaps linked to the cork) might be responsible for such bottle variation in IPMP contents (23).

Wines from grapes infected with *Botrytis cinerea* have been found to contain high IBMP levels and it has been suggested that the fungus would shrink the grapes, their skin would be more fragile and IBMP extraction from the skins during fermentation would be increased (22).

Acknowledgement

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

Literature cited

- (01) Gallois, A. Pyrazines in Food: A review. *Sci. Aliments*. **1984**, 4, 145-146.
(02) Maga, J. A. Pyrazines in foods: an update. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1982**, 16, 1-48.
(03) Maga, J. A. Sensory and stability properties of added methoxypyrazines to model and authentic wines. In *Flavours and Off-Flavours*, Proceedings of the 6th International Flavor Conference; Charalambous, G. Elsevier, Amsterdam, **1990**, 61-70.
(04) Maga, J. A. Pyrazine update. *Food Rev. Int.* **1992**, 8, 479-558.
(05) Shibamoto, T. Heterocyclic compounds found in cooked meats. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, 28, 237-243.
(06) Rizzi, G. P. The biogenesis of food-related pyrazines. *Food Rev. Int.* **1988**, 4, 375-400.
(07) Marais, J. Sauvignon blanc cultivar aroma - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1994**, 15, 41-45.
(08) 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.

(09) Boelens, M.H.; Gemert, L.J. Structure-activity relationships of natural volatile nitrogen compounds. *Perf. Flav.* **1995**, 20, 63-76.

(10) Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V. Sauvignon Blanc varietal aroma. *Austr. Grapegr. Winem.* **1988**, 292, 51-56.

(11) Mihara, S.; Masuda, H. Structure-Odor Relationships for Disubstituted Pyrazines. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, 36, 1242-1247.

(12) Mihara, S.; Masuda, H.; Tateba, H.; Tuda, T. Olfactive properties of 3-substituted 5-alkyl-2-methylpyrazines. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, 39, 1262-1264.

(13) 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.

(14) 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.

(15) 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.

(16) 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.

(17) Arnold, R.A.; Bledsoe, A.M. The effect of various leaf removal treatments on the aroma and flavor of Sauvignon blanc wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 41, 74-76.

(18) Colagrande, O.; Fumi, M. D. The use of cork in closing bottles: a scientific survey. *Ind. Bevande*. **1993**, 22, 393-409.

(19) 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.

(20) Noble, A.C.; ElliottFisk, D.L.; Allen, M.S. Vegetative flavor and methoxypyrazines in Cabernet Sauvignon. *Fruit Flavors*. **1995**, 596, 226-234.

(21) Roujou-de-Boubee, D. The 'plant' aroma characteristic of wines. *Vigne Vin*. **1999**, 33, 145-146.

(22) 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.

(23) 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.

(24) Tominaga, T.; Peyrot des Grachons, C.; Dubordieu, D. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc: s-Cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 5215-5219.

(25) Tominaga, T.; Blanchard, L.; Darriet, P.; Dubordieu, D. A powerful aromatic volatile thiol, 2-furanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* Grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1799-1802.

(26) Tominaga, T.; Guimbertau, G.; Dubordieu, D. Contribution of benzenemethanethiol to smoky aroma of certain *Vitis vinifera* L. wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1373-1376.

(27) Schneider, R.; Kotseridis, Y.; Ray, J.-L.; Augier, C.; Baumes, R. Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. Development and application of a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3243-3248

(28) Hashizume, K.; Tozawa, K.; Endo, M.; Aramaki, I. S-Adenosyl-L-methionine-dependent O-Methylation of 2-Hydroxy-3-alkylpyrazine in Wine Grapes: a putative final step of methoxypyrazine biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, 65, 795-801.

(29) Allen, M. S. What level of methoxypyrazines is desired in red wines? The flavour perspective of the classic red wines of Bordeaux. *Austr. Grapegr. Winem.* **1995**, 381, 7-9.

(30) Allen, M. S.; Lacey, M. J. Methoxypyrazine grape flavour: influence of climate, cultivar and viticulture. *Wein-Wissenschaft*. **1993**, 48, 211-213.

(31) Hashizume, K.; Umeda, N. Methoxypyrazine content of Japanese red wines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, 60, 802-805.

(32) 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.

(33) Hashizume, K.; Samuta, T. Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, 50, 194-198.

(34) 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.

- (35) 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.
- (36) Heymann, H.; Noble, A. C. Descriptive analysis of commercial Cabernet sauvignon wines from California. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, *3*, 41-44.
- (37) 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.
- (38) Allen, M. S. Viticultural effects on methoxypyrazine grape flavour: current research directions. *Austr. Grapegr. Winem.* **1993**, *354*, 10-12.
- (39) Morrison, J. C.; Noble, A.C. The effects of leaf and cluster shading on the composition of Cabernet sauvignon grapes and on fruit and wine sensory properties. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 193-200.
- (40) Hashizume, K.; Samuta, T. Green odorants of grape cluster stem and their ability to cause a wine stemmy flavor. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1333-1337.
- (41) Roujou-de-Boubee, D.; Cumsille, A.M.; Pons, D. Dubordieu, D. Location of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet sauvignon bunches and its extractability during vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 1-5.
- (42) Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. *J. Chromatogr. A* **2000**, *880*, 93-99.
- (43) Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. *J. Chromatogr. A* **2002**, *953*, 1-6.
- (44) Kotseridis, Y.; Anocibar, A.; Bertrand, A. 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine, responsible of vegetative aroma in wines, viticultural and winemaking factors. In: *In vino Analytica Scientia, First Symposium, Bordeaux, 1997*, 12-14 June.
- (45) Leete, E.; Bjorklund, J. A.; Reineccius, G. A.; Cheng, T. B. *Biosynthesis of 3-Isopropyl-2-methoxypyrazine and other alkylpyrazines: widely distributed flavour compounds*. Bioformation of flavours, Patterson, R.L.S., Charlwood, B. V., MacLeod, G. and Williams, A. A, Eds.; Royal Society of Chemistry, Cambridge, U. K, **1992**, 75-95.
- (46) Gallois, A.; Kergomard, A.; Adda, J. Study of the Biosynthesis of 3-Isopropyl-2-Methoxypyrazine Produced by *Pseudomonas taetrolens*. *Food Chem.* **1988**, *28*, 299-309.
- (47) Masuda, H.; Mihara, S. Olfactive Properties of Alkylpyrazines and 3-Substituted 2-Alkylpyrazines. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 584-587.
- (48) Seifert, R. M.; Buttery, R.G.; Guadagni, D.G.; Black, D.R.; Harris, J.G. Synthesis of Some 2-Methoxy-3-Alkylpyrazines with Strong Bell Pepper-Like Odors. *J. Agric. Food Chem.* **1970**, *18*, 246-249.
- (49) Parliament, T.H.; Epstein, M.F. Organoleptic properties of some alkyl-substituted alkoxy- and alkylthiopyrazines. *J. Agric. Food Chem.* **1973**, *21*, 714-716.
- (50) Buttery, R. G.; Seifert, R.M.; Ling, L. C. Characterization of some volatile potato components. *J. Agr. Food Chem.* **1970**, *18*, 538-539.
- (51) Blank, I.; Sen, A.; Grosch, W. Potent odorants of the roasted powder and brew of Arabica Coffee. *Z. Lebensm Unters Forsch.* **1992**, *195*, 239-245.
- (52) Murray, K. E.; Shipton, J.; Whitfield, F. B. 2-Methoxypyrazines and the flavour of green peas (*Pisum sativum*). *Chem. Ind.* **1970**, *7*, 897-898.
- (53) Murray, K. E.; Whitfield, F. B. The occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **1975**, *26*, 973-986.
- (54) Buttery, R. G.; Seifert, R. M.; Guadagni, D. G.; Ling, L. C. Characterization of Some Volatile Constituents of Bell Peppers. *J. Agr. Food Chem.* **1969**, *17*, 1322-1327.
- (55) Takken, H. J.; van der Linde, L. M.; Boelens, M.; van Dort, J. M. Olfactive Properties of a Number of Polysubstituted Pyrazines. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 638-642.
- (56) Hashizume, K.; Kida, S.; Samuta, T. Effect of steam treatment of grape cluster stems on the methoxypyrazine, phenolic, acid, and mineral content in red wines fermented with stems. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4382-4386.
- (57) Kotseridis, Y.; Baumes, R.; Skouroumounis, G. K. Synthesis of labelled [2H4] β -damascenone, [2H2] 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, [2H3] α -ionone, and [2H3] β -ionone, for quantification in grapes, juices and wines. *J. Chromatogr. A* **1998**, *824*, 71-78.

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 ₂	200	2.000	(6)
Èter etílic / hexà (1/1 v/v)	4 + 2 + 2	Vi	50 mL	Corrent de N ₂	(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 ₂	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 N₂ 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 N₂ (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 ₂	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 ₂	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.

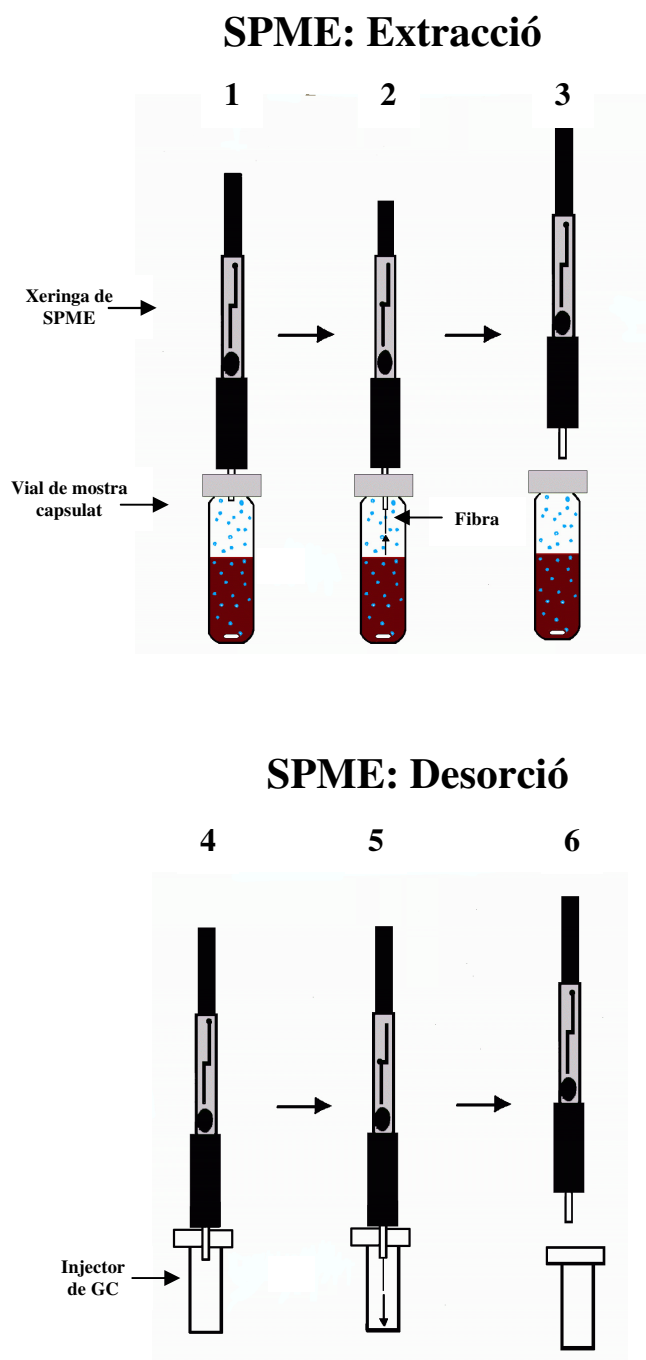


Fig. 1. Procediment de microextracció en fase sòlida. 1. Perforació del sèptum del vial. 2. Exposició de la fibra: extracció i concentració. 3. Replegament de la fibra i retirada de l'agulla. 4. Perforació del sèptum del GC. 5. Exposició de la fibra: desorció tèrmica. 6. Replegament de la fibra i retirada 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- ² H ₂]-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- ² H ₂]-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-(² H ₃)-MP	5-10%	0,1 (MEMP)		(13)
3-isobutil- i 3-isopropil- 2-(² H ₃)-MP				(15)
3-isobutil- i 3-isopropil- 2-(² H ₃)-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-(² H ₃)-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-[²H₃]-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-[²H₃]-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-[1,1-²H₂]-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 [²H₄] β-damascenone, [²H₂] 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, [²H₃] α-ionone, and [²H₃] 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.

Presentat el Juny de 2004

**JOURNAL OF AGRICULTURAL
AND FOOD CHEMISTRY**

DETERMINATION OF 3-ALKYL-2-METHOXPYRAZINES

IN GRAPES, MUSTS AND WINES: A REVIEW

Cristina Sala, Olga Busto and Josep 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

Determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes, musts and wines: a review

Cristina Sala; Olga Busto; and Josep 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. E-mail address: qaenol@fe.urv.es

Abstract

3-alkyl-2-methoxypyrazines are aromatic compounds present among the flavors of a wide range of foods, such as bell peppers, asparagus, peas, and potatoes. Some of these compounds have also been found in Cabernet sauvignon, Sauvignon blanc, Cabernet franc and Merlot noir grapes and wines. Although their contents in these samples are at ng/L level, they can influence wine aroma because of their low sensory thresholds. Identification and quantification of 3-alkyl-2-methoxypyrazines is challenging because it demands very sensitive analytical techniques. Since 3-isobutyl-2-methoxypyrazine was found in grapes of Cabernet sauvignon for the first time, different methods have been reported in the literature. The aim of this paper is to give an overview on them and the results obtained. The application of isolation and concentration techniques such as liquid-liquid-, solid-phase- and solid-phase microextraction is discussed.

Keywords

3-alkyl-2-methoxypyrazines, analysis, aroma, determination, flavor, grape, must, nitrogen compounds, odorant, *Vitis vinifera*, wine

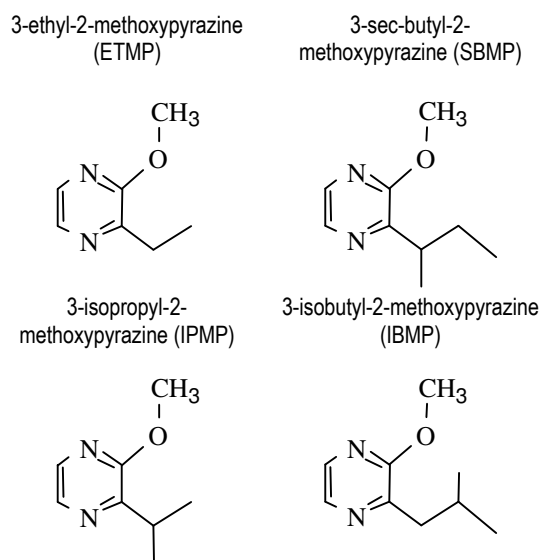
Introduction

Pyrazines (Figure 1) are often found in nature. Most of them have strong smells and contribute to the flavor of fresh and cooked foods (1). Some pyrazines are used in food aromas and in perfumes (2). 3-alkyl-2-methoxypyrazines (MPs) tend to have green and vegetative aromas and they are often found in fresh vegetables, like potatoes, peas, green peppers and asparagus (2). The most important MPs in wines are 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP), 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine (SBMP), and 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPMP) (Figure 1). These compounds, especially IBMP, have been found in the flavor of several wine varieties of great economical importance: Sauvignon blanc, Cabernet sauvignon, Cabernet franc and Merlot noir. These varieties are used in the production of high quality wines all over the world. Consequently, the study of their varietal aromas is of great interest to the field of enology.

Although sensory evaluation is crucial for analyzing wine flavor and quality, instrumental measurements can play an important role in quantifying them and therefore looking at differences that may be too subtle to be noticed by means of sensory analysis. However, such subtle differences might be useful to detect improvements in viticulture or winemaking techniques. Thus, the availability of a reliable methodology to quantify these aromas in musts and wines is of great potential interest to grape growers and winemakers. This review summarizes the different techniques used to determine the 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes, musts and wines, discussing the difficulties faced and the results obtained so far.

MPs, and particularly IBMP, SBMP and IPMP have extraordinarily low sensory thresholds, at the ng/L level in wines (3-5) and they occur at such low levels in grapes and wines.

Figure 1: Main 3-alkyl-2-methoxypyrazines found in grapes, musts and wines.



The complexity of the wine matrix together with the extremely low contents at which MPs occur are a challenge to the analyst. This is because it involves isolating, detecting, identifying and quantifying very scarce aroma compounds within a mass of other substances, which may be present at concentrations several orders of magnitude higher. Therefore, this labor has to be done at the limits of equipment capacity, and it requires very rigorous research methodologies. Indeed, analytical techniques at ultra-trace levels need a high

concentration capacity and a very good clean-up of the sample.

A major problem with analysis of MPs in grapes and wines has been the lack of sensitivity of the available analytical techniques. This challenge is so difficult that, although the first data tentatively indicating the presence of IBMP in Cabernet sauvignon grapes was published in 1975 (6) and several authors were afterwards encouraged to work on this research (7-9), the first report of a reliable method was published more than 10 years later (10). This procedure was subsequently improved by different authors (11-14). More convenient methods have been published (15-17), some of them taking the advantages of the solid-phase microextraction (SPME) technique for the extraction of volatile compounds (18-20). The application of isolation and concentration techniques such as liquid-liquid-, solid-phase- and solid-phase micro- extraction are discussed below, together with the chromatographic conditions and the analytical parameters of the methods.

Isolation and concentration methods

Due to the difficulties of ultra-trace analysis, the reported methods are often based on combinations of clean-up, isolation and concentration techniques. Most of them are based on liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE).

Their main characteristics are summarized in Tables 1 and 2 and discussed below. Finally, the SPME technique is discussed at the end of this section.

LLE. This is the simplest and most generally used technique for analyzing aroma compounds of foodstuffs. The main problem of its application to the determination of MPs in grapes, musts and wines is that it requires big concentration factors and other compounds present in the sample appear as interferences. Thus, it is recommended to use complementary separation techniques to clean the extract, together with very sensitive and specific detector systems.

The solvents used for the determination of MPs are Freon 11, dichloromethane, diethyl ether and the mixture diethyl ether /

hexane (Table 1). These solvents are the most generally used in the analysis of wine aromas since the extraction of ethanol and water is minimal and their low boiling points allow a further concentration step.

Freon 11. The methods based on LLE with Freon 11 are not specific for MPs but general methods for the analysis of aroma components from grapes, musts and wines, which made possible finding MPs among other aroma compounds. A technique based on the LLE of grapes with Freon 11 allowed the detection of ETMP, IBMP and, with less reliability, IPMP in grapes of Sauvignon blanc, for the first time (8, 21). A complex method based on the LLE with Freon 11, extraction and concentration at low-temperature and high vacuum, was the first that reported the determination of IBMP in wines (22). The results obtained indicated that there was an unusually high level (500 ng/L) of IBMP in a Bordeaux wine, actually the highest level ever reported, and there is a general feeling in the related literature that it was an error of determination. It was reported that another method based on the LLE of wine with Freon 11, concentration by rectification column and analysis by GC-MS-GCO allowed the identification of IPMP and IBMP in red wines (23).

Dichloromethane. This solvent was used to extract a very large amount (170 L) of wine with 12 successive extractions. It was the first attempt to isolate and identify IBMP in a Cabernet sauvignon wine with a strong 'herbaceous' aroma (7). In spite of its low sensory threshold and characteristic 'bell pepper' smell, IBMP was not detected, perhaps because the compound was lost in the complex process of extraction and concentration.

Diethyl-ether. An easy and fast procedure for the determination of IBMP in red wines has been developed. The method is based on a simple extraction with diethyl ether followed by concentration by N₂ stream (16). The performance of this procedure is based on the use of the isotopic dilution technique, using a deuterated analogue of IBMP as internal standard..

Table 1. Main parameters of the reviewed liquid-liquid extraction techniques for determining MPs in grapes, musts and wines.

Solvent		Sample		Concentration	Final Volume (µL)	CF*	Ref.
Type	Volume (mL)	Type	Volume				
freon 11	50	grapes	2 x 250 g	rectification column	30-50	5000	(8)
freon 11	250	wine	95 mL	low temperature, high vacuum distillation	25-75	1267-3800	(22)
freon 11	2 x 250	wine	1100 mL	rectification column	1.1-110	10-1000	(23)
diethyl ether	3 x 25	wine	200 mL	vacuum distillation, N ₂ stream	200	2000	(16)
diethyl ether / hexane	4 + 2 + 2	wine	50 mL	N ₂ stream	(4 x) 200	62.5	(15)
diethyl ether / hexane	3 x 5	grapes, wines	wine: 250 mL, berries: 1000 g	N ₂ stream	100	1000	(17)

* CF = initial volume of the sample / final volume of the extract.

Diethyl-ether / hexane. Two similar methods for the analysis of IBMP in red wines based on the LLE with diethyl-ether/hexane (1:1, v/v) followed by concentration under N₂ stream have been reported. The main difference between them is the internal standard: one of them uses the MEMP (15) and the other method uses a deuterated analogue of IBMP (17). The advantages of these methods are the simplicity and rapidity. In these methods dichloromethane, diethyl-ether, dichloromethane/pentane (1:2, v/v) and diethyl-ether/hexane (1:1, v/v) were studied. Although the solvents diethyl-ether and dichloromethane had the best recoveries, the mixture diethyl-ether / hexane was chosen because it presented the lowest affinity for the compounds that created interferences and its level of emulsion was the smallest.

SPE. Polar, non polar and cation exchange extraction techniques have been used for the isolation and concentration by SPE of MPs present in grapes, musts and wines. The phases used with the different types of extraction are, respectively: silica (Si), octadecyl (C18) and strong cation exchange with benzenesulfonic acid (SCX). The main parameters of the reported SPE techniques are summarized on Table 2. SPE demands a preliminary clean-up step to avoid the saturation of the resins. Distillation can be used to remove the less volatile interfering compounds present in the wine medium. Thus, the combination of distillation and SPE has produced some of the most successful methods for the analysis of MPs in grapes, musts and wines.

Si. This phase has been used to identify IBMP in Cabernet sauvignon grapes by means of a complex method (6, 24). The method consists of vacuum distillation of crushed

berries, LLE of the distillate with pentane, SPE with Si, concentration and analysis.

C18. The quantitative analysis of IBMP and IPMP in wines has been approached by means of C18 SPE (9). The method consists on the steam distillation of wine at pH 5, collecting the distillate in an acidic solution and extracting with a C18 cartridge. This method could only be applied to spiked white wines due to the relatively high detection limits of the procedure (at the µg/L level) and the presence of interferences from the volatile phenols, which co-eluted with IBMP (25).

SCX. This phase has been used in different SPE methods taking the advantage of both the volatility and the basicity of MPs (10). These methods are based on the use of a strongly acidic resin which is effective in trapping them from the distillate. All of them have been applied successfully to the determination of MPs in wines. The original method is rather complex and includes the distillation of wine at pH 5-6 and SPE with a SCX resin. After elution with water at pH 10 and extraction with dichloromethane, the final extract is concentrated and analyzed. The high concentration factor allows the determination of MPs below their sensory threshold, using a relatively small (200-300 mL) sample of wine. Despite the low recoveries achieved (10-15%), the method is accurate due to the use of deuterated IBMP as internal standard. This approach allowed the identification and quantification of IPMP, IBMP and SBMP in a Sauvignon blanc wine. The major drawbacks of the procedure are the complicated sample preparation and also the fact that the internal standard used was not commercially available and had to be synthesized.

Table 2. Main parameters of the reviewed SPE techniques for determining MPs in grapes, musts and wines.

Phase	Sample		Pre-treatment	Elution	Concentration	Final Vol. (µL)	CF*	Ref.
	Type	Volume						
Si	grapes	35 Kg	vacuum distillation and LLE (pentane)	ethyl ether/pentane (1:1 v/v)				(6)
C-18	wine	500 mL	adjust to pH 5 and steam distillation with acid trap	methanol	HPLC (reversed phase)	5000	100	(9)
SCX	wine	200 mL	distillation atmospheric pressure	water, pH 10	LLE (dichloromethane) and spontaneous evaporation	10	20000	(10)
SCX	wine	300 mL	dynamic head-space					
SCX	wine	240 mL	distillation atmospheric pressure	water, pH 10	LLE (dichloromethane) and spontaneous evaporation	20	12000	(31)
SCX	grapes, wines	grapes: 1 kg; wines: 300 mL	distillation atmospheric pressure	water, pH 10.5	LLE (dichloromethane) and evaporation under N ₂ stream	5	60000	(12)
SCX	grapes, musts, wines	grapes: 1 kg; musts and wines: 250 mL	steam distillation	solution 10% NaOH	LLE (dichloromethane) and evaporation under N ₂ stream	10	25000	(14)

* CF = initial volume of the sample / final volume of the extract.

Subsequently, several authors have based their works on this method and some of them have reported their improvements. The extraction with a higher amount of SCX resin (12, 14) provided higher percentages of recovery. The use of a non-deuterium-labeled alkyl-pyrazine as internal standard (12) resulted in a more convenient method. Finally, the steam distillation provided higher sensitivity (14).

HS-SPME. This technique has been applied to food analysis (26-27), including the determination of wine aroma compounds (28-30). Its concentration capacity, together with the selectivity of the nitrogen-phosphorous detector has proven to allow the reliable quantification of MPs in musts and wines at the levels they naturally occur in these samples (18-19).

In different studies about the capacity the different SPME fibers have to extract the MPs, the following ones have been tried: polyacrylate (PA), polydimethylsiloxane (PDMS), polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS-DVB), carboxen-polydimethylsiloxane (CAR-PDMS), carbowax-divinylbenzene (CW-DVB), and divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (18, 20). In aqueous solutions, the PDMS-DVB fibers had the best performance (18), whereas in model solutions containing 12% ethanol, the best results were obtained with DVB/CAR/PDMS and CW/DVB fibers (20). Such results prove the influence of ethanol on the extraction efficiency: detection limits are of about 0.1-1 ng/L in a water-based medium, whereas in the presence of ethanol, they are of around 100 ng/L. It is therefore clear that, when applied to wines, care must be taken with ethanol since this compound strongly competes with the MPs for the fiber, resulting in very low recoveries when it is present in the sample (20).

Consequently, when applied to wines, the HS-SPME technique demands a preliminary clean-up step in which ethanol is removed by low temperature distillation of the acidified sample in order to prevent its interference. Wine samples of Cabernet sauvignon and Merlot noir have been successfully determined by means of a procedure based on this principle (19). This method takes the advantage of the fact that MPs are protonated at pH levels below 2.0 and their volatility decreases. Thus, the sample is distilled at low temperature to remove the ethanol, so that the protonated MPs remain in the residue. Finally, the ethanol-free solution is neutralized and the SPME is performed. The SPME technique has also been used to determine the contents of MPs in musts (18). In this case, the distillation step is not required. The main advantages of the methods to determine MPs in musts and wines by means of SPME are simplicity, convenience and rapidity.

Chromatographic conditions

Ultra-trace analysis demands very sensitive methods and consequently the authors dealing with such determination have adjusted their chromatographic conditions to achieve the maximum possible sensitivity and selectivity. Detection systems, columns and injection conditions used in the main GC methods for determining MPs in grapes, musts and wines are summarized on Table 3 and discussed below.

Injection. Splitless mode is generally chosen in the analysis of MPs in grapes, musts and wines. To increase the sensitivity of the chromatographic system, the following techniques have been used: programmed temperature vaporization injector (PTV) (23), retention gap of deactivated column (to accommodate 3-6 μ L injections) together with the cool on-column injection (10), and the solvent effect (10).

Columns. As Table 3 shows, poly(ethylene glycol) columns are the most generally used in the analysis of MPs, followed by poly(5%-diphenyl-95%dimethylsiloxane) columns. The comparison of the retention times obtained from columns with different stationary phases can allow the identification of compounds by GC. This technique has been used in a method for determining MPs in musts and wines by GC-NPD: two different columns, CP-WAX 57 CB and SPB-35, have been used to confirm the identification of the MPs (18-19). The same principle was used when IBMP was identified in Cabernet sauvignon grapes for the first time (6).

Instrumental detectors

Due to its lack of selectivity, FID has not been very successful for the analysis of MPs. This was already noticed in the first report about the occurrence of MPs in grapes: the peak of IBMP obtained with a FID from a concentrate of 35 kg of must of Cabernet sauvignon was too small to be quantified (6). The main use of the FID in the analysis of MPs in grapes, musts and wines is as a complement to GCO (6-8, 23).

Although NPD is very sensitive, its detection limits are not low enough for the analysis of MPs by direct injection of the sample. Consequently, it requires a procedure for concentrating the target compounds before analyzing them by GC. This procedure should provide high recoveries and a high concentration factor. Despite the selectivity of this detector, a good clean-up is also necessary since NPD can fail to detect the MPs if the amounts of other compounds are too high (8). The GC-NPD together with the HS-SPME technique has been successfully applied to the analysis of MPs in musts and wines (18-20). NPD has also been used as a complement of GCO instead of FID since it allows the identification of the peaks (8).

The relatively high detection limits of MSD demand a method that provides a great concentration factor. The first identification of IBMP in Cabernet sauvignon was not successful due to the lack of sensitivity of MSD (6). A similar problem happened to the first identification of IBMP in grapes of Sauvignon blanc: although the concentration factor was high, MP contents in the injected extracts were close to the detection limits of the MSD (8).

The selected ion monitoring (SIM) mode is a must in the application of MSD to the analysis of MPs in grapes, musts and wines, since the total ion chromatogram (TIC) mode results in a lack of sensitivity (7, 15-17, 22). The first reliable determination of MPs was provided by the combination of the MSD in SIM with both electron ionisation (EI) and chemical ionisation (CI) (10).

Table 3. Chromatographic conditions used in the reviewed GC methods for determining MPs in grapes, musts and wines.

Injector	Column	Detector	Clean-up	Analytes	Ref.
splitless	CW 20 M (23m, 0.25mm i.d.)	MSD	LLE Freon 11	flavor compounds	(8)
splitless	DB-WAX (50m, 0.25mm i.d.)	FID, NPD MSD (EI, CI)	LLE Freon 11	flavor compounds	(22)
PTV	DB-WAX (60m, 0.32mm i.d., 0.5µm)	MSD (EI), GCO	LLE Freon 11	flavor compounds	(23)
	CW 20 M, glass capillary, 44m	MSD, FID	LLE dichloromethane	flavor compounds	(7)
	CW 20 M (127m, 0.75mm i.d.)	FID	LLE dichloromethane	flavor compounds	(7)
	CW 20 M, glass (305cm, 4mm i.d.)	FID, GCO	LLE dichloromethane	flavor compounds	(7)
splitless	CW 20 M (50m, 0.25mm i.d., 0.2µm)	MSD (EI)	LLE ether/hexane	IBMP, C-6-alcohols, β-damascenone, α- and β-ionone, free terpenols	(15)
splitless	CW 20 M (50m, 0.25mm i.d., 0.2µm)	MSD (EI)	LLE ether or ether/hexane	IBMP, α- and β-ionone, β-damascenone	(16-17)
cool on-col. retention gab.	BP20 (25m, 0.33mm i.d., 1.0µm)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IBMP	(10)
cool on-col. retention gab.	DB-Wax (30m, 0.32 mm i.d., 0.5 µm)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IPMP, IBMP	(31)
splitless	DB-WAX (60m, 0.32 mm i.d., 0.25µm)	MSD (EI)	SPE SCX	IPMP, SBMP, IBMP	(12)
splitless	CP-WAX 57 CB (50 m, 0.25 mm i.d., 0.2 µm)	NPD	HS-SPME	MP, MEMP, ETMP, IPMP, SBMP, IBMP	(18-19)
splitless	BP 20 (50 m x 0.22 mm i.d.; 0.25 µm)	MSD (CI)	SPE SCX	IBMP	(14)
cool on-col. retention gab.	DB-1 (60 m, 0.32 mm i.d., 1.0 µm)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IPMP, IBMP	(31)
cool on-col. retention gab.	DB-1701 (30 m, 0.32 mm i.d., 1.0 µm)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IPMP, IBMP	(31)
T: 20°C, 6 s, 200°C/min to 190°C	BP-5 (50 m, 0.32 mm i.d., 1.0 µm)	MSD (EI), GCO	LLE Freon 11	flavor compounds	(23)
cool on-col. retention gab.	BP5 (25m, 0.33 mm i.d., 0.5 µm)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IBMP	(10)
cool on-col. retention gab.	BP5 (50m, 0.32mm i.d., 1.0µm)	MSD (EI, CI)	SPE SCX	IPMP, IBMP	(31)
splitless	HP-5MS (30m, 0.25mm i.d., 0.25µm)	NPD	HS-SPME	ETMP, IPMP, SBMP, IBMP	(20)
splitless	SPB-35 (30m, 0.25mm i.d., 0.25µm)	NPD	HS-SPME	MP, MEMP, ETMP, IPMP, SBMP, IBMP	(18-19)
splitless	Reoplex 400 (150m, 0.46mm i.d.)	MSD, FID	LLE Freon 11	flavor compounds	(8)
split 30:1	Reoplex 400 (65m, 0.25mm i.d.)	FID, NPD	LLE Freon 11	flavor compounds	(8)
splitless	SE-54 (30m, 0.25mm i.d.)	FID, NPD MSD (EI, CI)	LLE Freon 11	flavor compounds	(22)
	SE-30 glass capillary, 60 m	MSD	LLE dichloromethane	flavor compounds	(7)

Some modifications of this method used only the CI in SIM (14). EI could be applied instead of CI since the higher recoveries achieved with several improvements of the method allowed doing so (12).

Olfactometry

The technique of gas chromatography-olfactometry (GCO) consists on the replacement of the instrumental detector by a human nose. The outlet of the column is split and one part is lead to an instrumental detector to allow recording the peaks and the other part is conditioned in terms of temperature and humidity to allow the sniff analysis of a trained expert.

The extremely low levels at which the analytical work has to be performed are the major challenge to the analyst when dealing with the determination of MPs in grapes, musts and wines. However, the low sensory thresholds of these compounds have been cleverly used by means of GCO. Indeed, the fact that the human nose is more sensitive than the available detection systems has been used by several authors in order to detect the MPs in the complex extracts of the samples analyzed.

GCO was crucial to the first detection and identification of IBMP in musts of Cabernet Sauvignon. The authors tentatively identified IBMP as the responsible for the green 'pepper-like' smell characteristic of the variety. Although the identification by MSD was not fully reached, they could confirm that the retention time and the smell of the compound were the same as the ones of the standard IBMP in five different chromatographic columns (6). Similarly, the comparison of the smell retention times of some extracts with the standards of MPs confirmed the identification of ETMP, IPMP and IBMP in grapes of Sauvignon blanc, although these compounds could not be quantified neither with NPD nor with MSD (8).

The same way as the detection of the characteristic smells of the analytes by GCO may contribute to confirming their identification, the absence of these characteristic smells at their corresponding retention times can be considered evidence that these compounds are not present in the analyzed extracts. In spite of its low sensory threshold and characteristic 'bell pepper' smell, IBMP was not detected by GCO in a concentrated extract obtained from 170 L of Cabernet sauvignon wine, suggesting that the MPs were not present in the concentrated extract (7).

GCO has also been used to compare the performance of two alternative techniques for the extraction of aroma compounds: LLE and an alternative headspace technique. The later proved to be less efficient because the aroma intensities detected by GCO were hardly detectable or significantly lower (8).

Finally, the analysis by GCO allows extracting information regarding the relative strength of the smell of each compound. This is performed by means of the aroma extract dilution analysis technique, which consists on analyzing by GCO the concentrated extract at several successive dilutions. This information is of great interest because it can link the chemical analysis with the sensory analysis. This technique has been applied to the analysis of the aroma of some young red wines made with Merlot noir, Cabernet sauvignon and Grenache grape varieties and it

was reported that IPMP and IBMP were among the most important odorants of the wines analyzed (23).

Analytical parameters

The determination of MPs in grapes, musts and wines has historically been a challenge to the analysts and a lot of work is still needed in order to achieve fully optimized and validated methods. Internal standards, recoveries, limits of detection, linearity and reproducibility reported on the methods reviewed here are summarized on Table 4 and discussed below.

Internal Standards. The correct choice and use of the internal standard is always crucial, but in the case of ultra-trace analysis it is even more important. The use of acetophenone, chemically different from MPs, might have been responsible for a possible bias on the determination of IBMP in a Bordeaux wine (22). The different types of internal standards used for the determination of MPs in grapes, musts and wines can be classified as follows: alkylpyrazines, 3-alkyl-2-alkoxy-pyrazines and isotopically labeled analogues of MPs.

It has been reported that contents of 500 ng/Kg of TMP were present in Japanese wines (33). However, no further reports on the presence of this compound in wines have been published during the last three decades and TMP has been used as internal standard for quantifying MPs in wines (9). Nevertheless, when considering the use of this compound as internal standard, it should be taken into account that it has been reported that it is not stable under steam distillation conditions (9). 2-methyl-3-*n*-propylpyrazine has been used as an alternative to the isotopically labeled internal standard, although not being chemically identical to the target compounds (12).

Due to the similarity of their chemical structure to the target compounds, 3-methyl-2-methoxypyrazine, 3-ethyl-2-ethoxypyrazine and 3-isopropyl-2-ethoxypyrazine have been used as internal standards (15, 18-20).

The main advantages of the stable isotope dilution method are its simplicity and accuracy. With this technique, the internal standard and the target compound are chemically identical because the analyte itself is the internal standard. Interference from natural isotopic compounds can be prevented by the use of bi- and tri-deuterated analogues. MSD allows to distinguish the added standard from the natural component. Under the appropriated chromatographic conditions, the isotopically labeled IBMP elutes 2-3 seconds before the IBMP (10). The use of 3-isobutyl-2-[²H₃]-methoxypyrazine as internal standard was key to the first reliable method for determining MPs in grape juices and wines (10) and several modifications of this method have used the same internal standard (14, 31-32). Later on, one of the improvements of this method included the simultaneous use of two trideuterated analogues of MPs: 3-isobutyl- and 3-isopropyl-2-[²H₃]-methoxypyrazine (11). Subsequently, an easy method for the synthesis of a bideuterated analogue of IBMP, the 3-[1,1-²H₂]-isobutyl-2-methoxypyrazine, was reported (16). Since the synthesis of this compound is easier, this method simplifies the use of a deuterium labeled internal standard and it has been successfully applied to the analysis of wines (17).

Recovery. Data on recovery tends not to be reported the literature, with the exception of four methods. The authors of the first reliable method for determining MPs in grape juices and wines mentioned that only around 5-10% was recovered (10). Later on, a modification of this method provided a better 86-103% of recovery (12). A method based on the LLE by means of ether-hexane proved to have an excellent performance, with a 90% recovery (17). Finally, the percentages of recovery of a methodology based on the HS-SPME were high for IPMP, SBMP and IBMP (78-109%) in musts and wines (18-19). Care must be taken, though, in the interpretation of the recoveries obtained with the SPME technique because they can not be directly compared with the results obtained from the

LLE, since the SPME technique does not allow the determination of the concentration of the extract.

Limits of detection. The concentration factor provided by the method, the sensitivity and selectivity of the detector and the recoveries play an important role to allow reaching the order of magnitude at which MPs occur in grape and wine samples: around 10 ng/mL. If detection limits are too high, the determination is not possible (9, 20, 22). By means of a very sensitive detector, limits of detection of around 2 ng/L have been obtained with relatively low concentration factors (15-17). Finally, limits of detection below 1 ng/L require concentration factors higher than 10,000 (10-12, 18-19).

Table 4. Analytical parameters of the reviewed GC methods for determining MPs in grapes, musts and wines.

Internal standard		Recovery (%)	DL* (ng/L)	Ref.
Compound	ng/L			
Acetophenone	20 ^(a)		1000	(22)
3-[1,1- ² H ₂]-isobutyl 2-methoxypyrazine	2500 ^(b)		2	(16)
3-methyl-2-methoxypyrazine	2264 ^(b)		2	(15)
3-[1,1- ² H ₂]-isobutyl 2-methoxypyrazine	20	90	2	(17)
Tetramethylpyrazine		53 (IBMP); 14 (IPMP)	1200	(9)
3-isobutyl-2-(² H ₃)-methoxypyrazine	33.2	5-10	0.1 (MEMP)	(10)
3-isobutyl- and 3-isopropyl- 2-(² H ₃)-methoxypyrazine	IBMP: 103.2 IPMP: 75.1		0.15	(11)
3-isobutyl- 2-(² H ₃)- methoxypyrazine	80			(14)
2-methyl-3- <i>n</i> -propyl-pyrazine	100	86 – 103	<0.5 (IBMP); <1.0 (IPMP, SBMP)	(12)
3-isopropyl-2-ethoxypyrazine	10	94-109 (IPMP, SBMP, IBMP); 43-58 (MP, ETMP, MEMP)	0.1 (IPMP, SBMP, IBMP); 0.5 (ETMP); 1 (MEMP, MP)	(18)
3-isopropyl-2-ethoxypyrazine	10	78-105 (ETMP, IPMP, SBMP, IBMP); 31-36 (MP, MEMP)	0.3 (IPMP, SBMP, IBMP); 1 (ETMP), 4 (MEMP, MP)	(19)
3-ethyl- and 3-isopropyl-2-ethoxypyrazine	20000		100	(20)

* DL: Detection limit. (a) added to the concentrate (b) calculated from the data provided in the report.

Acknowledgements

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

References

- Maga, J. A. Pyrazine update. *Food Rev. Int.* **1992**, *8*, 479-558.
- Gallois, A. Pyrazines in Food: A review. *Sci. Aliments.* **1984**, *4*, 145-146.
- Takken, H.J.; Linde, L.M.; Boelens, M.; Dort, J.M. Olfactive properties of a number of polysubstituted pyrazines. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 638-642.
- Seifert, R. M.; Buttery, R.G.; Guadagni, D.G.; Black, D.R.; Harris, J.G. Synthesis of Some 2-Methoxy-3-Alkylpyrazines with Strong Bell Pepper-Like Odors. *J. Agric. Food Chem.* **1970**, *18*, 246-249.

- Seifert, R.M.; Buttery, R.G.; Guadagni, D.G.; Black, D.R.; Harris, J.G. Synthesis and odor properties of some additional compounds related to 2-isobutyl-3-methoxypyrazine. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 135-137.
- Bayonove, C.; Cordonnier, R.; 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.* **1975**, *281* (D), 75-78.
- 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.
- 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.
- 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.
10. 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.
11. Lacey, M. J.; Allen, M. S.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V. Methoxy-pyrazines in Sauvignon blanc Grapes and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 103-108.
12. Hashizume, K.; Umeda, N. Methoxy-pyrazine content of Japanese red wines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 802-805.
13. Hashizume, K.; Kida, S., Samuta, T. Effect of steam treatment of grape cluster stems on the methoxy-pyrazine, phenolic, acid, and mineral content of red wines fermented with stems. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4382-4386.
14. Roujou-de-Boubee, 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.
15. Kotseridis, Y.; Anocibar Beloqui, 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.
16. Kotseridis, Y.; Baumes, R.; Skouroumounis, G. K. Synthesis of labelled [²H₄] β-damascenone, [²H₂] 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, [²H₃] α-ionone, and [²H₃] β-ionone, for quantification in grapes, juices and wines. *J. Chromatogr. A.* **1998**, *824*, 71-78.
17. 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.
18. Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxy-pyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *880*, 93-99.
19. Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxy-pyrazines in wines. *J. Chromatogr. A.* **2002**, *953*, 1-6.
20. Hartmann, P.J.; McNair, H.M.; Zoecklein, B.W. Measurement of 3-alkyl-2-methoxy-pyrazine by headspace solid-phase microextraction in spiked model wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 285-288.
21. 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. Vitic.* **1982**, *3*, 47-51.
22. 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.
23. 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.
24. Bayonove, C.; Cordonnier, R. Recherches sur l'arôme du Muscat. *Ann. Technol. Agric.* **1971**, *20* 347-355.
25. Noble, A.C.; Elliott-Fisk, D.L.; Allen, M.S. Vegetative flavor and methoxy-pyrazines in Cabernet Sauvignon. *Fruit Flavors.* **1995**, *596*, 226-234.
26. Prosen, J.; Zupancic-Kralj, L. Solid-phase microextraction. *T. Anal. Chem.* **1999**, *18*, 272-282.
27. Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *880*, 35-62.
28. 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.
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. 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.
31. Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Boyd, S. Determination of methoxy-pyrazines in red wines by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1734-1738.
32. Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V. Contribution of Methoxy-pyrazines to Sauvignon blanc Wine Aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 109-112.
33. 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.



PART EXPERIMENTAL

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.

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%-difeníl-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.

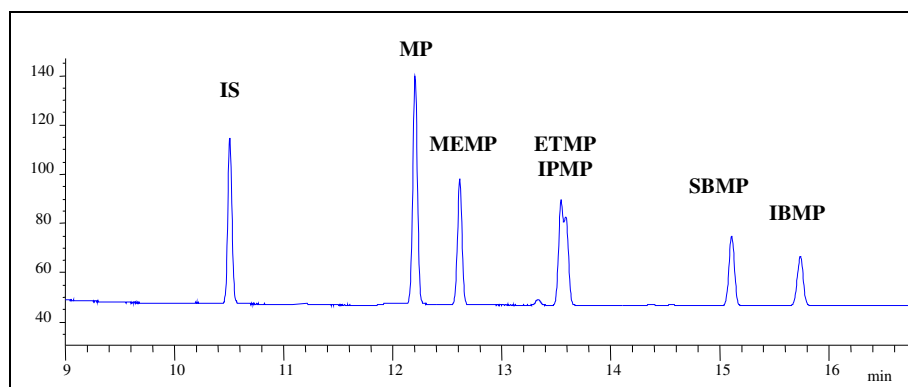


Fig. 1. Separació dels patrons amb la columna HP-INNOWAX. Solució de 50 µg/L de MPs en diclorometà. IS: Pirazina.

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.

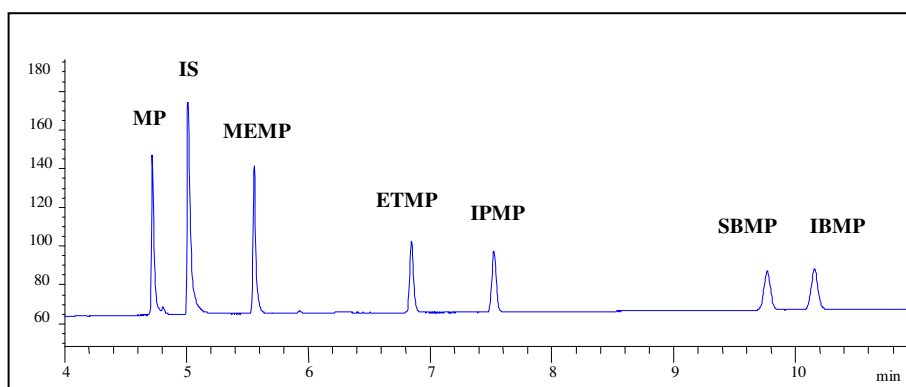


Fig. 2. Separació dels patrons amb la columna SPB-35. Solució de 80 µg/L de MPs en hexà. IS: Etil-pirazina

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).

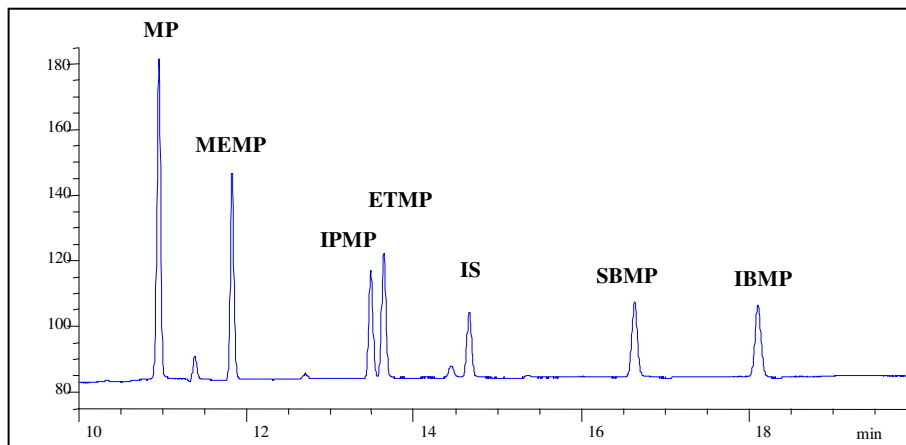


Fig. 3. Separació dels patrons amb la columna CP-WAX-57CB. Solució de 200 µg/L de MPs en etanol. IS: 3-Isopropil-2-etoxipirazina.

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

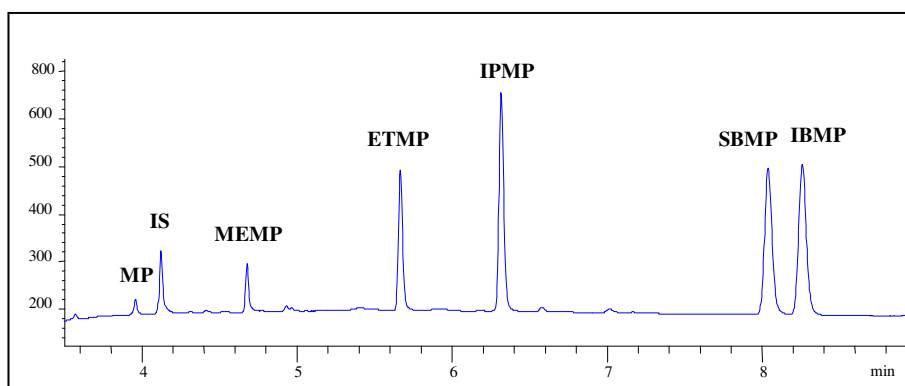


Fig. 4. Resultat obtingut aplicant el Procediment 2 a un vi sintètic addicionat amb 100 ng/L de MPs. IS: etilpirazina.

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.

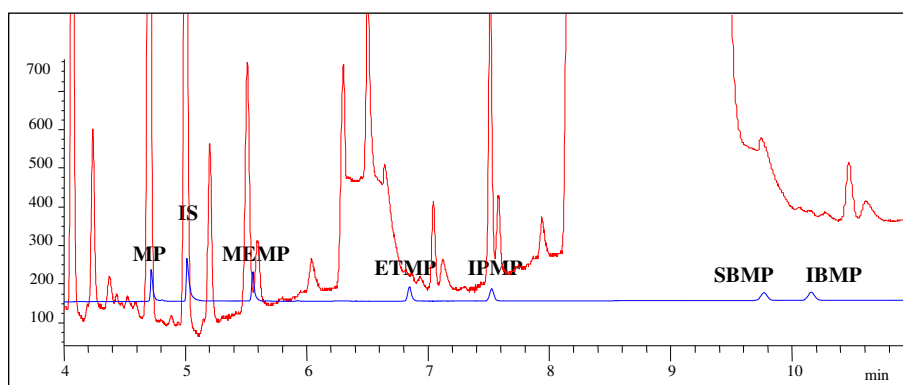


Fig. 5. Resultat obtingut aplicant el Procediment 2 (vermell) a un vi negre addicionat amb 100 ng/L de MPs, comparat amb els patrons (blau) de 80 µg/L de MPs en hexà . IS: Etilpirazina.

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(vinilpirrolidona), 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 retinudes 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.

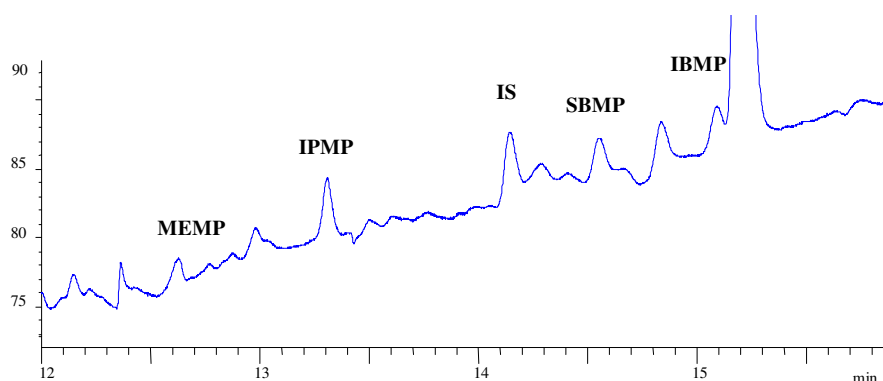


Fig. 6. Resultat obtingut aplicant el Procediment 3 a 1 L de vi negre addicionat amb 10 ng/L de MPs. IS: Tetra-metil-pirazina.

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.

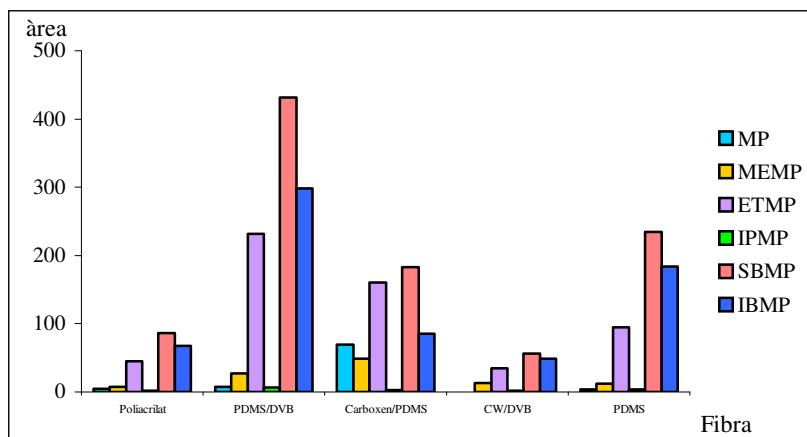


Fig. 7. Àrees dels pics obtinguts amb els diferents tipus de fibra.

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 (%).

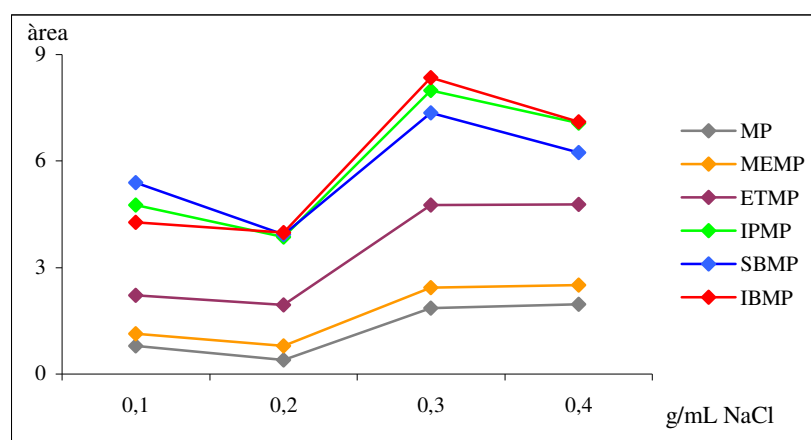


Fig. 8. Increment de l'àrea dels pics amb l'augment de la força iònica.

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.

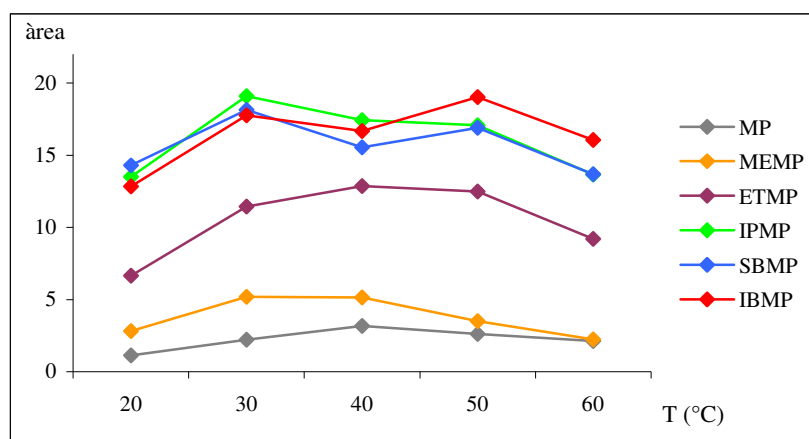


Fig. 9. Variació de les àrees dels pics amb l'increment de la temperatura d'extracció.

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 establitzar-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.

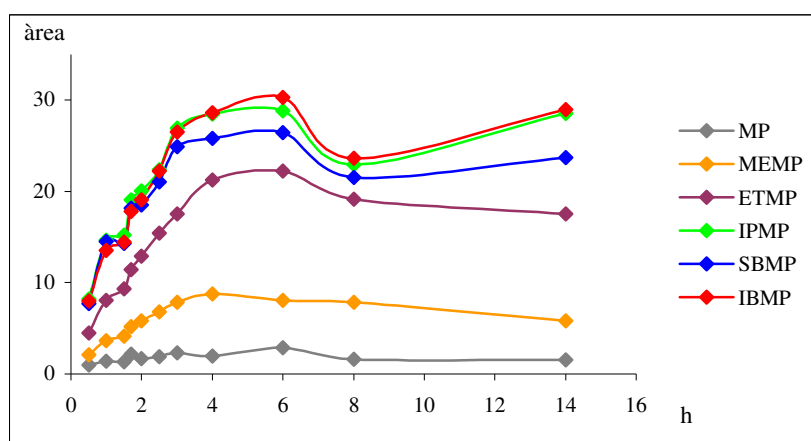


Fig. 10. Variació de les àrees dels pics amb l'increment del temps d'extracció.

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.

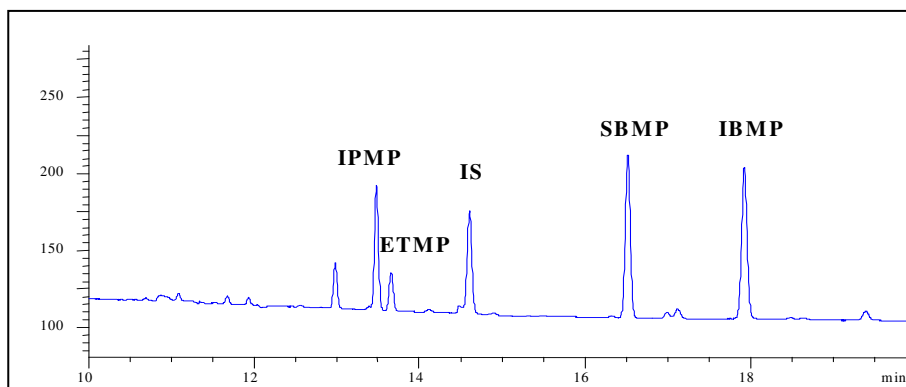


Fig. 11. Resultat obtingut mitjançant el Procediment 6, corresponent a un most de Merlot amb uns 22, 16 i 11 ng/L d'IBMP, SBMP i IPMP, respectivament.

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.

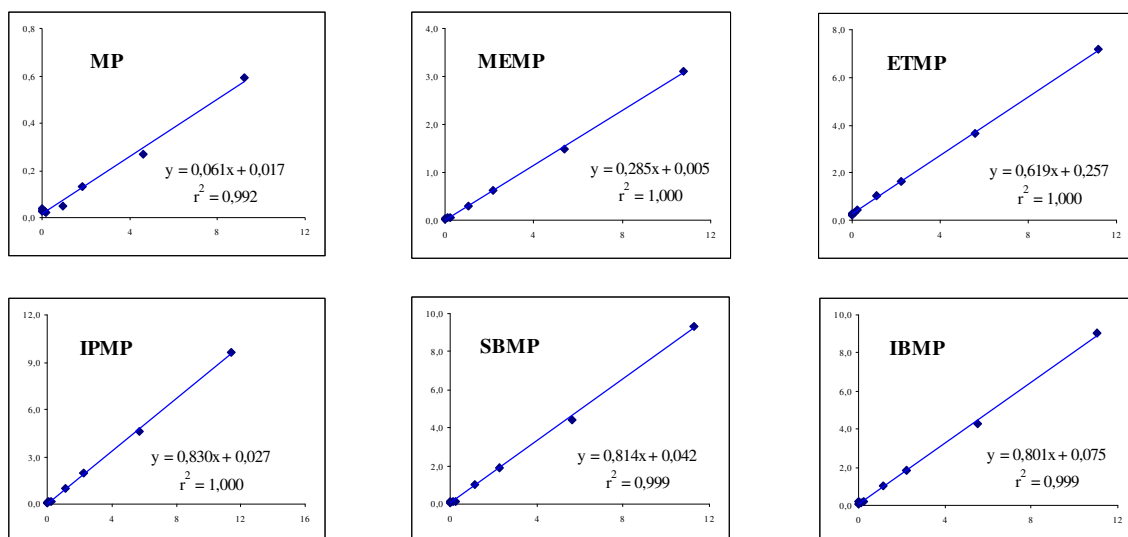


Fig. 12. Rectes de calibratge obtingudes aplicant el Procediment 6 a solucions adicionades amb 0,1-100 ng/L de MPs. IS: Etilpirazina, 10 ng/L. $y = a + b x$; on $x =$ concentració (MP) / concentració (IS); i $y =$ àrea (MP) / àrea (IS).

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.

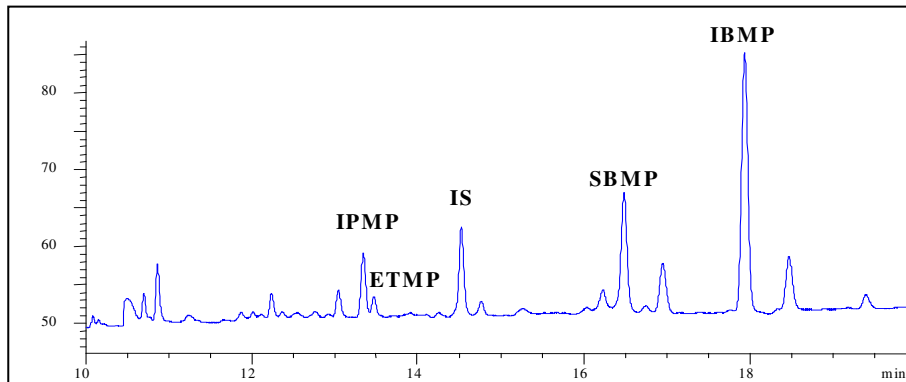


Fig. 13. Resultat obtingut mitjançant el Procediment 7, corresponent a un vi de Merlot amb uns 28, 10 i 4 ng/L d'IBMP, SBMP i IPMP, respectivament.

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.

Bibliografia

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. Vitic.*, **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

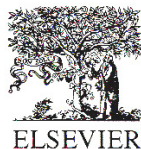
Journal of Chromatography A, 880 (2000) 93-99

**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

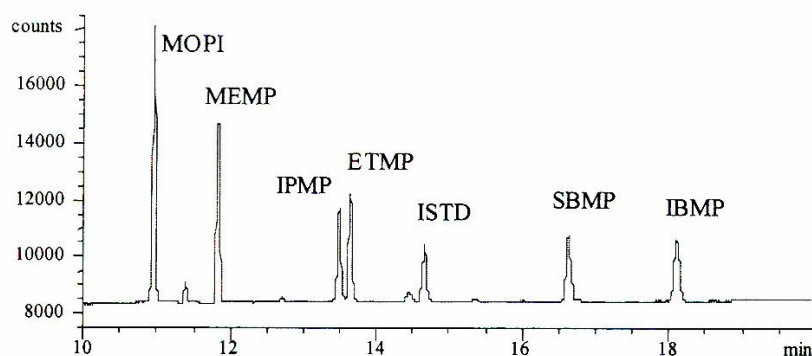


Fig. 1. Standards separated with the 57CB column (direct injection of $1 \mu\text{l}$ of a $200 \mu\text{g l}^{-1}$ solution in ethanol). I.S. is 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPEP).

[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

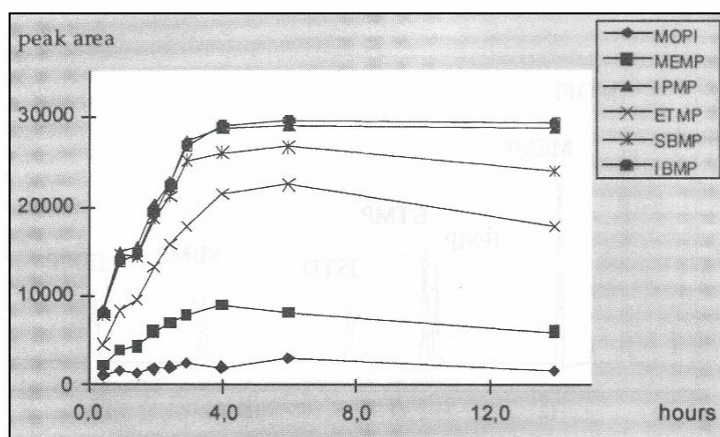


Fig. 2. Influence of time on the extraction of 3-alkyl-2-methoxypyrazines by PDMS–DVB fibres ($n=3$).

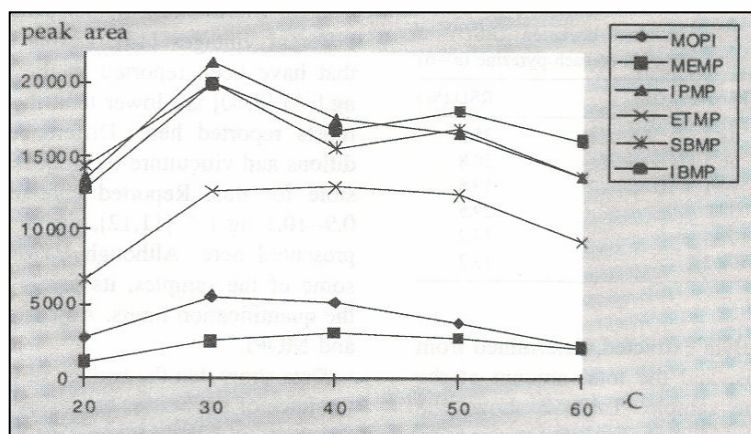


Fig. 3. Influence of temperature on the extraction of 3-alkyl-2-methoxypyrazines by PDMS–DVB fibres ($n=3$).

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

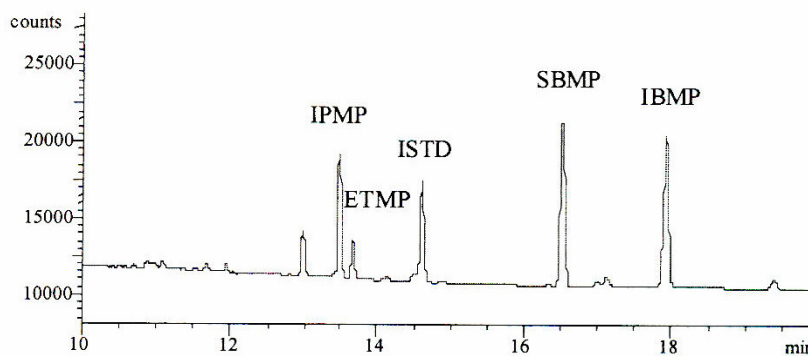


Fig. 4. Chromatogram of a sample of Merlot (must after 1 day of maceration), prepared according to the described method.

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-

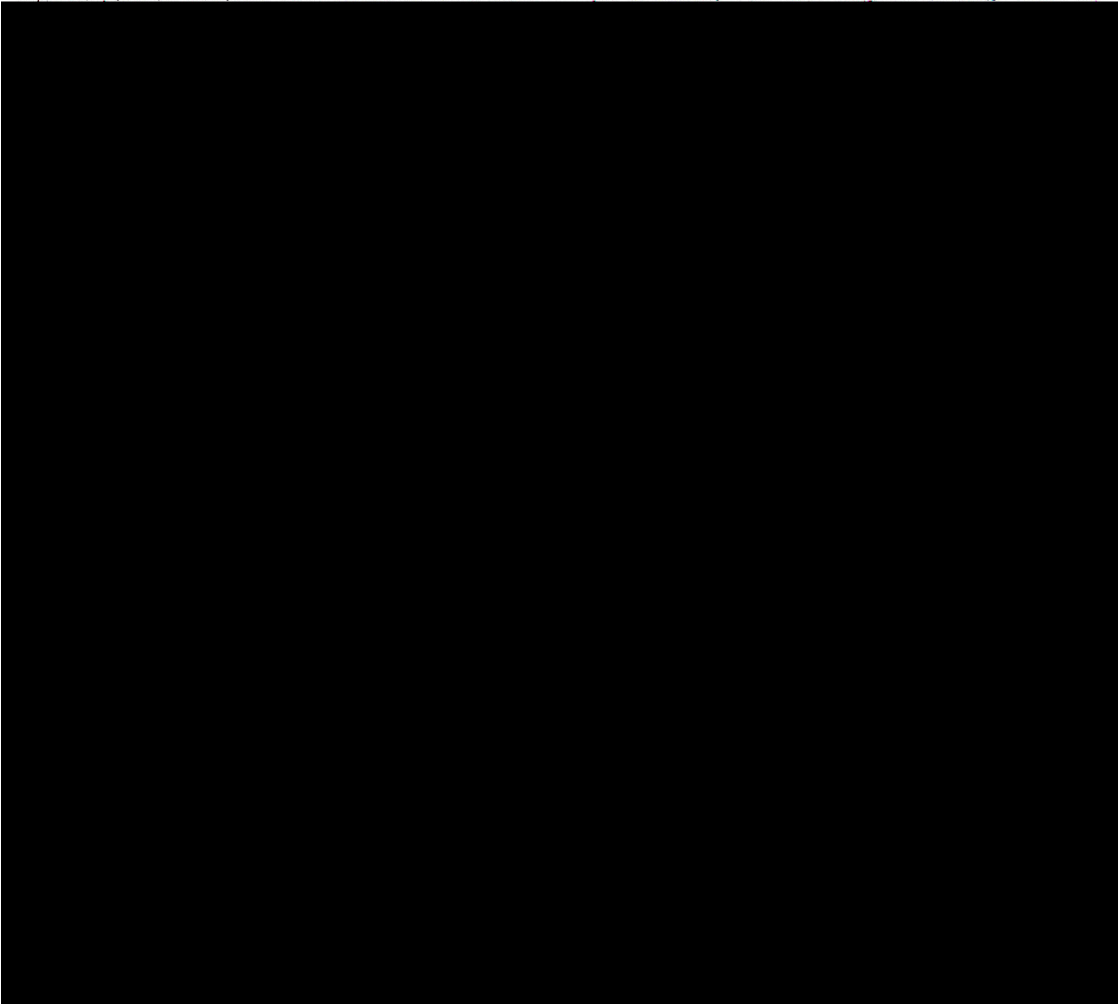


Table 1
Analytical parameters of the HS-SPME method for wines

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

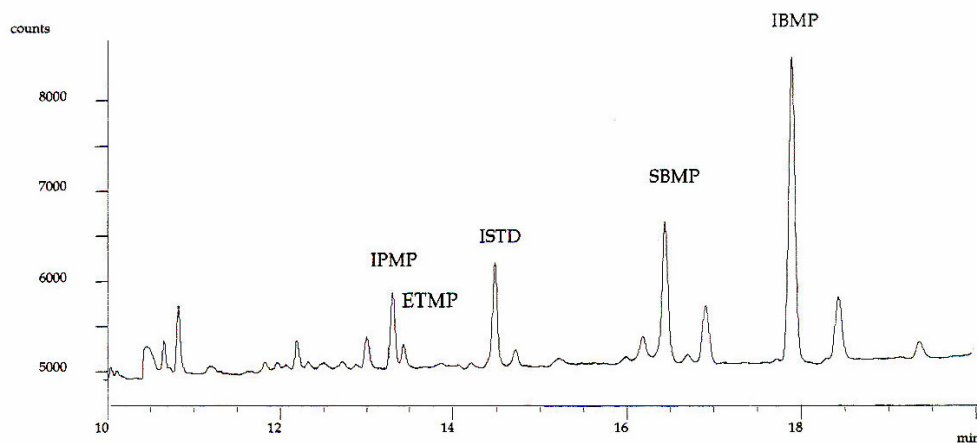


Fig. 1. Chromatogram of a Merlot wine sample analysed using the proposed procedure.

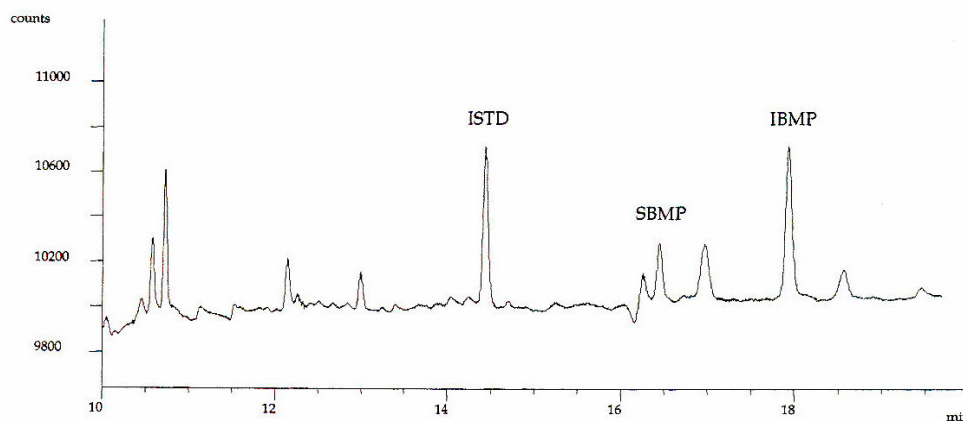


Fig. 2. Chromatogram of a Cabernet sauvignon wine sample analysed using the proposed procedure.

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.

Les aromes primàries són d'importància capdal pel que fa a la qualitat del vi. Tant és així que poden tenir un impacte econòmic important. Com ja s'ha dit, aquest és el cas de les 3-alkil-2-metoxipirazines (MPs), les quals són responsables de la nota 'vegetal' característica de certes varietats, entre les que destaca el Cabernet sauvignon. En particular, la 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP), la 3-*sec*-butil-2-metoxipirazina (SBMP) i la 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP) han estat identificades a l'aroma d'aquesta varietat de raïm. I s'ha vist que, d'entre elles, la més important pel que fa al seu impacte aromàtic és la IBMP (1-9).

Igualment, s'ha esmentat que els llindars de percepció sensorial d'aquests compostos són molt baixos, a nivell de 1-2 ng/L en aigua destil·lada (10-14). I el nas humà pot percebre la nota característica de la IPMP i de la IBMP quan es troben a concentracions de 2 i 10 ng/L, respectivament, en vi negre (11, 15). Així doncs, aquells vins en què els continguts d'aquests compostos superin el seu llindar de percepció sensorial poden presentar la nota 'vegetal' característica que els confereixen.

Si bé s'ha vist que la presència d'aquest caràcter 'vegetal' en quantitats moderades (2-15 ng/L) no és incompatible amb els vins de la màxima qualitat (8, 16), aquesta nota es considera generalment inacceptable en vins negres (9, 15). Donat que el Cabernet sauvignon és una varietat molt extensament plantada i s'utilitza sobretot en l'elaboració de vins de qualitat, els estudis sobre la seva aroma característica, així com de les possibilitats de control i millora de la mateixa, són de gran interès dins el camp de l'enologia.

Aquest capítol recull els estudis sobre l'evolució dels continguts de MPs al Cabernet sauvignon al llarg de la maduració del raïm i del procés de vinificació. També s'exposen els assaigs sobre la influència dels factors poda i conducció, exposició al sol, irrigació i densitat de plantació en els continguts i evolució de les MPs. Es detallen les característiques de les vinyes estudiades, la metodologia de la presa de mostra, els processos de vinificació seguits i els resultats i

conclusions de les anàlisis realitzades. Tota aquesta recerca s'ha dut a terme mitjançant els materials, les condicions cromatogràfiques i els mètodes de determinació de les MPs en mostos i vins desenvolupats, els quals s'han detallat al capítol anterior. L'anàlisi estadística dels resultats s'ha dut a terme mitjançant els tests d'ANOVA de dos factors i Fisher (ambdós, $p=0,05$), amb el programa Statview®.

5.1. Presa de mostra

Totes les feines de presa de mostra i anàlisi dels mostos i vins han estat realitzades l'any 1998 a les instal·lacions de la Facultat d'Enologia de Tarragona, de la Universitat Rovira i Virgili.

Les dades climàtiques corresponents a l'any 1998 es poden veure a la Taula 1. S'observa que hi va haver abundants pluges sobretot al gener i també al febrer; el març gairebé no va ploure i les pluges d'abril i maig van ser moderades. Finalment, després d'un juny i juliol sense pluges, el mes d'agost va ser força plujós.

	T mitjana (°C)		Mitjana de T màx. (°C)		Mitjana de T mín. (°C)		Precipitació (L/m ²)		Irradiació mitjana Diària (MJ/m ²)	
	1998	1997-2002	1998	1997-2002	1998	1997-2002	1998	1997-2002	1998	1997-2002
Gener	9,7	8,8 (1,2)	14,0	13,6 (1,1)	6,2	5,1 (1,4)	86,0	52,6 (60,4)	5,8	6,3 (1,9)
Febrer	9,9	10,1 (1,0)	15,4	15,9 (1,1)	5,6	5,5 (0,9)	34,4	8,4 (13,0)	10,4	11,3 (1,3)
Març	12,0	12,5 (1,2)	18,1	18,2 (1,4)	6,9	7,6 (1,2)	3,4	30,0 (22,2)	14,4	15,3 (0,9)
Abril	12,8	13,5 (0,5)	18,2	19,0 (0,7)	7,4	8,4 (0,6)	47,8	62,4 (20,8)	18,7	18,4 (0,5)
Maig	16,7	17,3 (0,7)	22,6	22,7 (0,7)	11,5	12,2 (0,8)	45,6	52,9 (33,0)	19,7	19,8 (0,5)
Juny	20,6	21,0 (0,6)	26,1	26,3 (1,0)	15,2	15,5 (0,3)	3,6	28,6 (28,0)	21,7	20,9 (1,2)
Juliol	23,6	23,1 (0,4)	29,2	28,6 (0,4)	17,8	17,6 (0,4)	1,4	19,2 (24,0)	22,6	22,6 (0,4)
Agost	23,5	23,7 (0,9)	29,9	29,3 (0,9)	17,6	18,5 (1,1)	54,0	21,9 (20,6)	17,2	18,5 (1,3)
Setembre	20,8	20,5 (0,4)	25,9	26,1 (0,7)	16,7	15,7 (0,6)	19,8	73,6 (30,9)	10,5	13,5 (3,1)

Taula 1. Dades climàtiques corresponents a l'any 1998, comparades amb les mitjanes (i desviació estàndard) del període 1997-2002. Estació meteorològica d'Alcover (Alt Camp), del Servei Meteorològic de Catalunya (SMC).

5.1.1. Maduració i vinificació

Per tal d'obtenir mostres a l'atzar i no repetir la mateixa vinya als diferents mostreigs, s'ha posat una marca cada 5 plantes de cada vinya. La primera mostra s'ha pres només de les plantes marcades; la segona mostra s'ha pres només del següent cep; i de la tercera a la cinquena mostres s'han pres de les plantes tercera a cinquena a partir de la marcada. Els raïms mostrejats també s'han triat a l'atzar dins cada planta, a fi d'assegurar una distribució homogènia entre els fruits més i menys exposats a la llum del sol.

A cada presa de mostra s'han recollit, de cada raïm, tres grans triats a l'atzar, i s'ha mostrejat fins a un total de 100 grans. S'ha tingut especial cura de que les mostres siguin representatives de les diferents posicions relatives al gotim: dalt, baix, centre, interior, exterior. En tots els casos s'han pres tres rèpliques de cada mostra, a fi de poder analitzar-ne la desviació estàndard.

En tots els casos s'ha realitzat la vinificació en negre clàssica. Les mostres de Cabernet sauvignon dels assaigs d'insolació i de conducció s'han vinificat de forma manual en petits recipients, de manera que el volum final de cada microvinificació ha estat d'aproximadament 2,5 L. Finalment, les vinificacions dels assajos d'irrigació i densitat de plantació s'han realitzat en tancs de 200 L de capacitat.

Per tal de poder realitzar un seguiment de l'evolució de les MPs durant la maduració del raïm i la vinificació, s'ha realitzat la presa de mostra en diferents estadis durant aquests processos. El primer mostreig s'ha realitzat al verolat i el darrer a la verema. Al llarg de la maduració del raïm s'han recollit tres estadis de maduració. A totes les mostres de mostos s'ha afegit 1g/L de NaF a fi de conservar-los, i s'han guardat a -20°C fins al moment de l'anàlisi. Pel que fa al procés de vinificació, s'ha pres mostra del most després d'un dia de maceració, al final de la fermentació alcohòlica i al final de la fermentació malolàctica. A les mostres fermentades s'hi ha afegit 25

mg/L de SO₂ com a conservant i s'han guardat en botelles de vidre de color ambre a 4°C fins a ser analitzades.

5.1.2. Vinyes i tractaments

Totes les mostres han estat produïdes a les vinyes i celler experimentals del Mas dels Frares, de la Facultat d'Enologia, a Constantí (Tarragona) en 1998. Tret de les vinyes de l'assaig sobre la densitat de plantació, totes les vinyes són de 2.500 plantes per hectàrea. I cap d'elles no s'ha regat ni protegit de la llum, tret de les vinyes de l'assaig sobre la irrigació i la insolació, respectivament. Finalment, totes elles són emparrades i podades en cordó bilateral (Cordó Royat doble), tret de la vinya podada en vas de l'assaig sobre la poda i conducció. A continuació es detallen les característiques de les diferents vinyes emprades a cadascun dels assaigs realitzats, així com els diferents tractaments aplicats

Insolació. Els estudis sobre poda i conducció i sobre protecció de la llum del sol comparteixen les mateixes mostres control i són inclosos dins l'assaig sobre insolació, ja que ambdós factors condicionen l'exposició del fruit a la llum del sol. Els detalls de les vinyes són presentats a la Taula 2. A l'estudi sobre l'efecte de la poda i conducció, una vinya de Cabernet sauvignon podada en vas s'ha comparat amb una vinya de la mateixa varietat, emparrada i podada en cordó bilateral. I a l'estudi sobre protecció de la llum del sol, alguns raïms de la vinya podada en cordó bilateral s'han protegit de la llum solar a fi de poder comparar-ne els continguts de MPs amb els dels fruits procedents de la mateixa vinya que no han tingut protecció de la llum.

ASSAIG INSOLACIÓ	Emparrat, cordó bilateral		Vas
	Exposat a la llum	Protegit de la llum	
Distribució ceps	12 fileres: 41-42 ceps/filera		5 fileres: 65-83 ceps/filera
Ceps*	502	72	365

Taula 2: Vinyes dels assaigs sobre poda i conducció i sobre insolació. * Total de ceps emprats a l'assaig.

Els raïms protegits de la llum del sol han estat triats a l'atzar i s'ha tingut especial cura a fi d'assegurar una representació equitativa i equilibrada dels fruits més i menys exposats a la llum del sol. L'experiència recollida en assaigs preliminars ha aconsellat que l'embolcall permeti una bona ventilació del raïm a fi d'evitar el sobreescalfament i la sobremaduració.

La protecció de la llum s'ha aconseguit amb una peça de roba de tipus arpillera (o 'de sac'), la qual proporciona una ombra natural i permet l'airejat de la mostra. Aquesta peça s'ha disposat embolcallant el raïm, però amb la part inferior oberta, de tal manera que proporciona ombra però alhora facilita l'airejat i evita l'increment de temperatura degut a la respiració.

El tractament de protecció de la llum s'ha iniciat a l'estadi de verolat del raïm. Així doncs, les mostres corresponents a aquest estadi de maduració són comuns als dos tipus de mostra. A tots els altres estadis de maduració, les mostres de raïm protegit i no protegit de la llum s'han recollit alhora i de la mateixa planta, i en posicions semblants relatives a la llum del sol. Després de cada recollida de mostra, la planta s'ha eliminat de l'experimentació i no se n'ha recollit cap altra mostra.

S'ha realitzat un seguiment de la temperatura del raïm a fi de detectar possibles diferències de temperatura que poguessin esdevenir una font de biaix dels resultats. Per a això s'ha triat, en cada ocasió, 4 raïms a l'atzar. La Taula 3 presenta els resultats obtinguts als controls realitzats en diferents ocasions al llarg de la maduració. No s'han trobat diferències significatives de temperatura entre els raïms protegits i els no protegits de la llum, al llarg de tot el procés de maduració del raïm.

DATA	T. AMBIENT (OMBRA)	Exposat a la llum	Protegit de la llum
11-08	30	30,6 (3,7)	29,3 (6,8)
04-09	29	28,1 (3,0)	28,0 (2,9)
06-09	27	27,4 (2,6)	28,0 (3,3)

Taula 3. Controls de temperatura (°C) realitzats durant la maduració del raïm protegit de la llum. S'indica la temperatura ambient a l'ombra i la temperatura al si dels raïms. Mitjana de n= 4 i desviació estàndard relativa (%). No hi ha diferències significatives (t Student per a mostres aparellades, $\alpha=0,05$).

Irrigació. Les mostres per a aquest estudi procedeixen d'una vinya dividida en una sèrie de sub-parcel·les, seguint diferents tractaments d'irrigació. Els detalls d'aquesta vinya es troben a la Taula 4. Hi ha un total de 16 subparcel·les, cadascuna d'elles de 5 fileres amb 6 plantes per filera: 5 vinyes són Cabernet sauvignon i la sisena, d'una altra varietat, s'utilitza per a evitar les interferències entre tractaments. Així doncs, hi ha 4 grups de 4 subparcel·les, distribuïdes alternativament, segons una estructura de quadrat llatí. Si bé la vinya s'ha tractat amb 4 nivells diferents d'irrigació, per a l'estudi que aquí es presenta s'han emprat només tres subparcel·les no irrigades i tres amb la màxima irrigació. És a dir que s'han estudiat només els tractaments extrems a fi de disposar de mostres amb més probabilitats de presentar diferències entre elles. El tractament d'irrigació ha estat el següent: cada planta irrigada ha rebut un total de 6 L per hora durant 4 hores per setmana, durant sis setmanes al llarg de la maduració del raïm, mitjançant d'un sistema de gota a gota.

ASSAIG IRRIGACIÓ	No irrigat	Irrigat
Distribució ceps	Quadrat llatí 20 fileres: 24 ceps/filera	
Ceps *	20	20

Taula 4: Vinyes de l'estudi sobre la irrigació. * Total de ceps emprats a l'assaig.

Densitat de plantació. Aquest estudi s'ha dut a terme en una vinya de Cabernet sauvignon dividida en subparcel·les de tres densitats diferents: 2.000, 3.000 i 4.000 plantes per hectàrea. La vinya es divideix en 9 subparcel·les, de manera que n'hi ha 3 grups de cada densitat de plantació distribuïts alternativament, segons l'estructura de quadrat llatí. La Taula 5 en presenta les característiques.

ASSAIG DENSITATS	2.000	3.000	4.000
Distribució ceps	Quadrat llatí. 9 fileres: 30 ceps/filera		
Ceps *	90	90	90

Taula 5: Vinyes de l'estudi sobre la densitat de plantació. * Total de ceps emprats a l'assaig.

5.2. Resultats i discussió

Les Taules 6 a 16 presenten els continguts de MPs detectats, així com els resultats de les anàlisis estadístiques realitzades. A tots els tipus de mostres estudiats s'ha trobat IBMP, SBMP i IBMP. La 3-etil-2-metoxipirazina s'ha identificat també a gairebé totes elles, però els seus continguts són inferiors als límits de quantificació gairebé en tots els casos. La concentració de la IBMP és més alta que la de les altres MPs a gairebé totes les mostres estudiades, cosa que està d'acord amb la bibliografia (1, 6, 17-19). I els nivells de SBMP són generalment més alts que els de la IPMP.

Les concentracions d'IBMP trobades en vins, 4,6-15,5 ng/L, també són d'acord amb la literatura, ja que s'ha descrit que els vins negres contenen 3,6-56,3 ng/L d'aquest compost (2, 15, 20). Els continguts de SBMP i d'IPMP als vins finals, propers o inferiors als límits de quantificació, també són d'acord amb la bibliografia: 0,05-1,9 (2) i 0,92-10,1 ng/L (21), respectivament, en vins negres.

Com s'ha comentat a la introducció d'aquest capítol, el llindar de percepció sensorial de la IBMP, la IPMP i la SBMP en aigua és de 1-2 ng/L i s'ha descrit que la IPMP i la IBMP es perceben en vins negres a nivell de 2 i 10 ng/L respectivament. Si bé no hi ha dades disponibles respecte del llindar de percepció sensorial de la SBMP en vins negres, es pot assumir que possiblement són superiors a 2 ng/L, ja que l'efecte de la matriu vinosa probablement incrementa el llindar de percepció sensorial. Considerant totes aquestes dades, els resultats suggereixen que només la IBMP, i en alguns casos possiblement la SBMP, poden tenir una influència en l'aroma dels vins finals. Per tant, es pot dir que la IBMP és la MP més important en termes d'influència sensorial en les mostres de Cabernet sauvignon estudiades.

5.2.1. Evolució durant la maduració i la vinificació

Els continguts d'IBMP segueixen en tots els casos una evolució similar: decreixen durant la maduració, arribant als nivells més baixos a la verema (Fig. 1, 2 i 3). Aquesta disminució coincideix amb les dades trobades a la bibliografia (6, 17). El descens observat s'esdevé principalment al final del primer estadi del procés de maduració, tal com està descrit a la literatura (1, 17). Així doncs, es pot dir que la data de la verema pot condicionar els continguts de MPs als vins finals.

Per tant, la determinació dels nivells de MPs en raïm, junt amb l'aprofundiment en el coneixement de com les MPs passen als vins, pot ser de gran utilitat per tal de determinar les condicions de maduresa idònies, pel que fa als continguts de MPs, per a produir vins de qualitat.

És interessant observar que, durant el procés de maduració del raïm, els continguts de SBMP i IPMP evolucionen d'una forma diferent de la IBMP (Fig. 1, 2 i 3). Si aquesta darrera disminueix al llarg de tota la maduració del fruit, la SBMP i la IPMP tendeixen a augmentar durant la primera part del procés i després disminueixen.

Després d'un dia de maceració amb les parts sòlides del raïm hi ha un increment important dels continguts d'IBMP al most. Aquests nivells encara augmenten durant la fermentació alcohòlica, però al final de la mateixa i amb la separació de les parts sòlides ja no hi ha més increment. Finalment, no s'han observat canvis en els continguts d'IBMP al llarg de la fermentació malolàctica (Fig. 1, 2 i 3). S'han trobat referències bibliogràfiques de l'increment dels continguts d'IBMP durant el procés de vinificació que coincideixen amb els resultats aquí exposats. En efecte, s'ha observat que els vins de Cabernet sauvignon presenten continguts més alts de MPs que no pas els seus corresponents mostos abans de la fermentació (1, 20). S'ha descrit que les pells, llavors i rapes del raïm contenen MPs i que aquestes poden passar parcialment al most durant el procés de maceració i fermentació (5, 6, 22).

S'han considerat dues hipòtesis diferents per explicar aquest augment dels continguts d'IBMP: l'extracció de les MPs per etanol; i la influència d'alguns llevats específics que podrien alliberar les MPs dels seus precursors (23). Els resultats aquí presentats indiquen que l'increment dels nivells d'IBMP s'ha trobat sobretot durant les primeres 24 hores de maceració, és a dir, abans de l'inici de la fermentació alcohòlica. Per tant, és impossible que hi hagi hagut una influència deguda a l'etanol o als llevats.

Tot plegat suggereix que les MPs es trobarien principalment a les parts sòlides, i que la destrucció de les estructures del raïm deguda al procés de premsat resultaria en un contacte més gran amb les pells, cosa que incrementaria els nivells de MPs al suc.

Per altra banda, s'ha vist que la fermentació alcohòlica tindria un efecte menor. Finalment, després del descubart, i durant la fermentació malolàctica, ja no hi ha cap més increment, cosa que contribueix a confirmar la hipòtesi que les MPs procedeixen de les parts sòlides. Aquestes observacions suggereixen que la duració del procés de maceració pot condicionar els continguts de MPs als vins finals, tal com s'ha descrit a la literatura (20).

És interessant observar que no hi ha un increment similar dels nivells de la SBMP i IPMP durant la vinificació, ni tan sols el primer dia de maceració, cosa que suggereix que els continguts d'aquestes MPs a les pells del raïm poden ser més baixos que els de la IBMP. Aquesta observació, junt amb la de llur diferent evolució durant la maduració del raïm, indica que la SBMP i la IPMP segueixen una dinàmica totalment diferent de la IBMP (Fig. 1, 2 i 3).

5.2.2. Insolació

Les evolucions dels continguts de les diferents MPs estudiades a l'assaig sobre l'efecte de la llum del sol es presenten a les Taules 6, 7, 8 i 9 i a la Fig. 1.

Poda. Al llarg de la maduració del raïm, no s'han trobat diferències significatives en l'evolució dels continguts d'IBMP entre les mostres de raïm procedent de vinyes emparrades (exposat a la llum) i podades en vas (Taula 6 i Fig. 1). Ara bé, els continguts mitjans d'IBMP als vins finals procedents de vinyes emparrades són significativament més alts que els dels vins procedents de vinyes en vas (Taula 7).

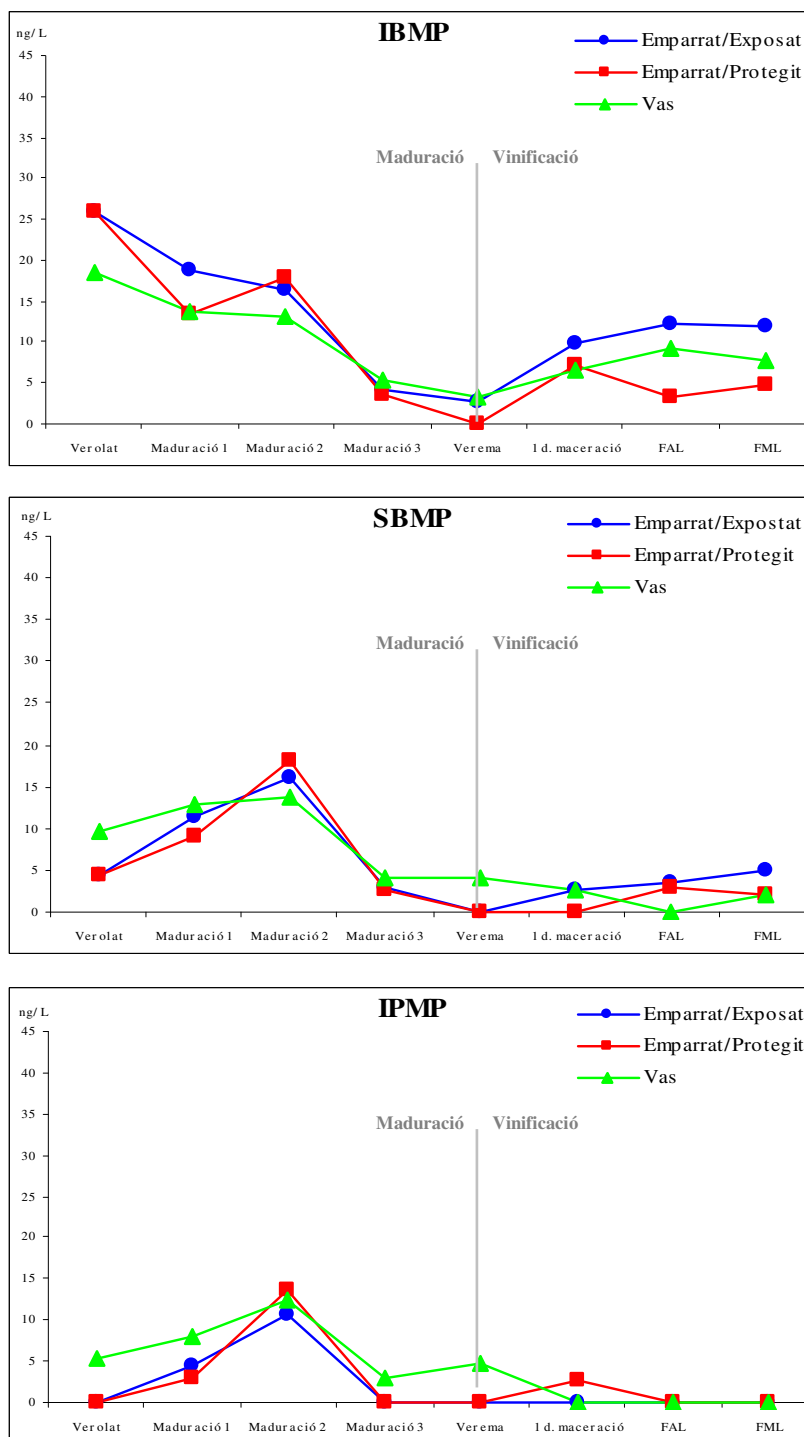


Fig. 1. Continguts de 3-alkil-2-metoxipirazines en mostres procedents de raïms exposats al sol, d'una vinya emparrada i podada en cordó bilateral; de raïms protegits del sol, a la mateixa vinya; i d'una vinya podada en vas. Evolució durant la maduració i la vinificació. FAL: final de la fermentació alcohòlica; FML: final de la fermentació malolàctica.

Durant el procés de vinificació, l'increment relatiu dels nivells d'aquest compost observat en les mostres procedents de vinyes podades en vas i emparrades és similar, de fet paral·lel (Fig. 1). Però els continguts d'IBMP de les mostres procedents de les vinyes emparrades és significativament més alt i els nivells finals d'aquest compost són més alts als vins procedents d'aquestes mostres de raïm.

Aquesta diferència pot ser important ja que el contingut d'IBMP als vins finals procedents de vinyes emparrades, 12,0 ng/L, pot ser superior al llindar de percepció sensorial en vins que s'ha descrit a la bibliografia, 10-16 ng/L (11, 15), però no pas el dels vins procedents de les vinyes en vas, 7,8 ng/L (Taula 7). Aquestes diferències poden estar relacionades amb el fet que les mostres procedents de raïms podats en vas presentaven un nivell de maduració lleugerament més alt a la verema (Taula 6).

INSOLACIÓ	Data	Emparrat, cordó bilateral				Vas	
		Exposat a la llum		Protegit de la llum		Sucres (g/L)	IBMP (ng/L)
		Sucres (g/L)	IBMP (ng/L)	Sucres (g/L)	IBMP (ng/L)		
Verolat	11-08	126	26,0 (7,5) a	126	26,0 (7,5) a	134	18,4 (2,7) a
Maduració 1	21-08	145	18,8 (5,4) a	153	13,4 (3,9) ab	175	13,7 (4,4) ab
Maduració 2	02-09	182	16,3 (4,7) ab	173	18,0 (4,8) b	194	13,0 (2,9) b
Maduració 3	08-09	185	4,1 (1,0) b	185	3,6 (1,4) c	196	5,4 (1,1) c
Verema	15-09	190	2,8 (0,6) b	192	*	201	3,2 (0,8) c
ANOVA DE DOS FACTORS: Maduració $p < 0,0001$; Tractament $p = 0,4867$; Interacció $p = 0,2667$							
Emparrat/Exposat				Vas			
Vas		0,0665		-			
Emparrat/Protegit		0,4646		0,2822			

Taula 6. Evolució dels continguts d'IBMP (ng/L) al llarg de la maduració del raïm. Mitjanes (n=3) i desviacions estàndard (entre parèntesi). *: continguts inferiors als límits de quantificació. Anàlisi estadística: ANOVA de dos factors i test de Fisher (ambdós, $p = 0,05$). La mateixa lletra a la mateixa columna indica l'absència de diferències estadístiques significatives ($p > 0,05$).

Protecció de la llum. L'evolució dels continguts d'IBMP és semblant a les mostres procedents de raïm protegit de la llum i el control (Taula 6 i Fig. 1). Però després de la fermentació alcohòlica, els nivells d'IBMP a les mostres procedents de raïm protegit de la llum del sol, 4,6 ng/L, són significativament més baixos que els de les mostres procedents de raïm exposat a la llum del sol, 12,0 ng/L (Taula 7). I els continguts d'aquest compost als vins finals són clarament inferiors.

Aquestes diferències no poden ser degudes a diferents nivells de maduresa ja que ambdós tipus de mostres presenten un similar estat de maduració al moment de la verema. Per tant, sembla que una menor exposició a la llum del sol produeix uns nivells més baixos d'IBMP als vins finals, fins i tot si la diferència no es nota a l'anàlisi dels mostos durant el procés de maduració.

Aquests resultats són sorprenents, ja que s'esperava que una exposició menor a la llum del sol conduiria a un nivell més alt de producció de MPs i retenció de les mateixes fins a la verema (1, 24, 25). En efecte, s'ha descrit que el raïm menys exposat a la llum del sol presenta continguts de MPs més alts (1) i una aroma diferent, amb unes notes vegetals més potents (26, 27). També s'ha vist que la llum pot fotodegradar la IBMP als teixits del raïm (5). En canvi, els resultats aquí presentats posen de relleu el fet que una menor exposició a la llum del sol obtinguda mitjançant una protecció artificial del raïm resulta en nivells més baixos d'IBMP a les pells del raïm.

Tot plegat suggereix que l'equilibri entre la formació i la degradació de les MPs (5) és complex i que pot estar influït per diferents factors. Així doncs, la formació biològica de la IBMP al raïm requeriria la llum del sol no només als estadis primerencs del desenvolupament del raïm (5) sinó també durant el procés de maduració.

INSOLACIÓ	Emparrat, cordó bilateral		Vas
	Exposat a la llum	Protegit de la llum	
Verema	2,8 (0,6) a	*	3,2 (0,8) a
1 dia maceració	10,0 (2,2) b	7,3 (2,0) a	6,4 (0,8) b
FAL	12,3 (2,8) b	3,4 (0,9) b	9,3 (1,1) c
FML	12,0 (2,1) b	4,6 (1,4) ab	7,8 (1,1) bc
ANOVA DE DOS FACTORS: Vinificació $p < 0,0001$; Tractament $p < 0,0001$; Interacció $p = 0,2777$			
	Emparrat/Exposat		Vas
Vas	0,0133		-
Emparrat/Protegit	< 0,0001		0,0002

Taula 7. Evolució dels continguts d'IBMP (ng/L) al llarg de la vinificació. Mitjanes (n=3) i desviacions estàndard (entre parèntesi). *: continguts inferiors als límits de quantificació. Anàlisi estadística: ANOVA de dos factors i test de Fisher (ambdós, $p = 0,05$). La mateixa lletra a la mateixa columna indica l'absència de diferències estadístiques significatives ($p > 0,05$). FAL: final de la fermentació alcohòlica; FML: final de la fermentació malolàctica.

Donat que els nivells finals d'IBMP dels vins procedents de raïm exposat a la llum poden ser per damunt del llindar de percepció sensorial d'aquest compost, és possible que tinguin una influència en l'aroma del vi, de manera que aparegui el caràcter vegetal. En canvi, els nivells finals d'aquest compost als vins procedents de raïm protegit de la llum del sol són inferiors a aquest llindar i probablement la seva aroma no és perceptible.

Al moment de la verema, els nivells de SBMP i d'IPMP només es troben per damunt del llindar de quantificació en el cas de les mostres procedents de la vinya podada en vas (Taulas 8 i 9). És interessant notar que els continguts d'aquests dos compostos no incrementen significativament durant el procés de vinificació, i són inferiors als límits de quantificació en totes les mostres des de l'inici de la fermentació alcohòlica (Fig. 1, 2 i 3), motiu pel qual no s'exposen les taules dels resultats obtinguts.

INSOLACIÓ		Emparrat, cordó bilateral				Vas	
		Exposat a la llum		Protegit de la llum			
		Data	Sucres (g/L)	SBMP (ng/L)	Sucres (g/L)	SBMP (ng/L)	Sucres (g/L)
Verolat	11-08	126	4,3 (1,8) a	126	4,3 (1,8) a	134	9,6 (4,1) a
Maduració 1	21-08	145	11,4 (4,7) b	153	9,2 (3,6) b	175	13,0 (6,6) a
Maduració 2	02-09	182	16,2 (3,8) b	173	18,2 (4,3) c	194	13,9 (2,9) a
Maduració 3	08-09	185	2,8 (0,8) a	185	2,6 (0,4) a	196	4,0 (0,8) b
Verema	15-09	190	*	192	*	201	4,1 (2,0) b
ANOVA DE DOS FACTORS: Maduració $p < 0,0001$; Tractament $p = 0,5437$; Interacció $p = 0,3381$							
Emparrat/Exposat				Vas			
Vas		0,8848				-	
Emparrat/Protegit		0,3397				0,2736	

Taula 8. Evolució dels continguts de SBMP (ng/L) al llarg de la maduració del raïm. Mitjanes (n=3) i desviacions estàndard (entre parèntesi). *: continguts inferiors als límits de quantificació. Anàlisi estadística: ANOVA de dos factors i test de Fisher (ambdós, $p = 0,05$). La mateixa lletra a la mateixa columna indica l'absència de diferències estadístiques significatives ($p > 0,05$).

INSOLACIÓ		Emparrat, cordó bilateral				Vas	
		Exposat a la llum		Protegit de la llum			
		Data	Sucres (g/L)	IPMP (ng/L)	Sucres (g/L)	IPMP (ng/L)	Sucres (g/L)
Verolat	11-08	126	*	126	*	134	5,4 (2,7) a
Maduració 1	21-08	145	4,5 (0,4) a	153	3,1 (1,0) a	175	8,0 (5,4) ab
Maduració 2	02-09	182	10,7 (3,7) b	173	13,7 (6,8) b	194	12,3 (1,7) b
Maduració 3	08-09	185	*	185	*	196	3,0 (0,5) a
Verema	15-09	190	*	192	*	201	4,7 (3,6) a

Taula 9. Evolució dels continguts d'IPMP (ng/L) al llarg de la maduració del raïm. Mitjanes (n=3) i desviacions estàndard (entre parèntesi). *: continguts inferiors als límits de quantificació. Anàlisi estadística: test de Fisher ($p = 0,05$). La mateixa lletra a la mateixa columna indica l'absència de diferències estadístiques significatives ($p > 0,05$). Els resultats no s'han pogut analitzar mitjançant el test ANOVA de dos factors degut a la manca de dades a nivells superiors als límits de quantificació.

5.2.5. Irrigació

La comparació de les evolucions dels continguts de les principals MPs a les mostres procedents de vinyes irrigades i no irrigades es pot observar a la Fig. 2 i les dades es poden contrastar a les Taules 10 - 13.

Les diferències en la concentració d'IBMP entre les mostres irrigades i no irrigades són petites a l'estadi de verolat (Taula 10 i Fig. 2). Això és lògic si es té en compte que el verolat es va esdevenir pocs dies després de l'inici del tractament d'irrigació i per tant no s'esperava trobar diferències significatives en aquest estadi. Als dos tipus de mostres, els nivells d'IBMP cauen durant la maduració del raïm (Fig. 2), però en el cas de les mostres irrigades, els nivells són significativament més alts (Taula 10). Això pot ser degut al fet que les mostres irrigades maduren a un ritme més lent i per tant el tractament d'irrigació tindria un efecte endarreridor de la caiguda dels nivells d'IBMP. Val a dir, però, que ambdós tipus de raïm van arribar a la verema amb un nivell de sucres similar.

Al moment de la verema, els nivells d'IBMP són baixos en ambdós casos, si bé només a les mostres procedents de les vinyes irrigades eren per damunt del llindar de determinació (Fig. 2). S'observa que després d'un dia de maceració les diferències són encara petites. Però al final de la fermentació alcohòlica i també de la malolàctica, les mostres irrigades presenten uns nivells d'IBMP significativament més alts que les mostres no irrigades (Taula 11).

Considerant el llindar sensorial per aquest compost, aquesta diferència pot significar que és més probable que les mostres irrigades, amb una mitjana de 15,3 ng/L d'IBMP, tinguin una influència en l'aroma del vi que les no irrigades, amb una mitjana de 9,6 ng/L d'aquest compost.

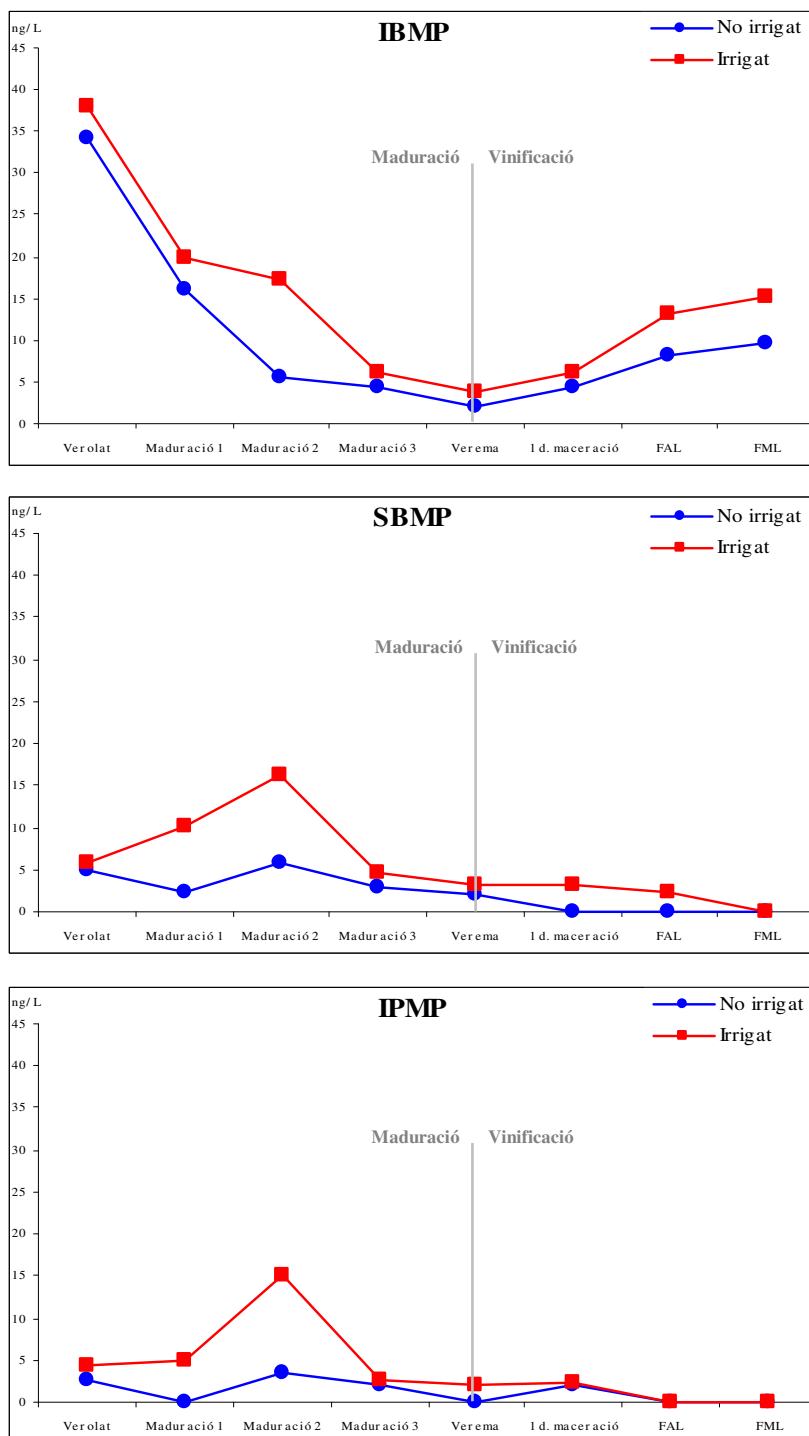


Fig. 2. Continguts de 3-alquil-2-metoxipirazines en mostres procedents de plantes irrigades i no irrigades. Evolució durant la maduració (verolat, maduració 1, 2 i 3 i verema) i la vinificació (1 dia de maceració, final de la fermentació alcohòlica i malolàctica). FAL: final de la fermentació alcohòlica; FML: final de la fermentació malolàctica.

IRRIGACIÓ	Data	No irrigat		Irrigat	
		Sucres (g/L)	IBMP (ng/L)	Sucres (g/L)	IBMP (ng/L)
Verolat	11-08	133	34,2 (3,6) a	131	38,0 (6,4) a
Maduració 1	24-08	160	16,1 (8,8) b	159	20,0 (8,4) b
Maduració 2	03-09	182	5,6 (3,4) c	190	17,3 (7,2) b
Maduració 3	10-09	192	4,4 (0,4) c	199	6,1 (3,3) c
Verema	16-09	207	*	206	3,9 (2,0) c

ANOVA DE DOS FACTORS: Maduració $p < 0,0001$; Tractament $p = 0,0306$; Interacció $p = 0,5538$

Taula 10. Assaig d'irrigació. Evolució dels continguts d'IBMP (ng/L) al llarg de la maduració del raïm. Mitjanes (n=3) i desviacions estàndard (entre parèntesi). *: continguts inferiors als límits de quantificació. Anàlisi estadística: ANOVA de dos factors i test de Fisher (ambdós, $p = 0,05$). La mateixa lletra a la mateixa columna indica l'absència de diferències estadístiques significatives ($p > 0,05$).

IRRIGACIÓ	No irrigat	Irrigat
Verema	*	3,9 (2,0) a
1 dia maceració	4,3 (1,9) a	6,1 (1,3) b
FAL	8,3 (3,3) a	13,1 (3,2) c
FML	9,6 (3,8) a	15,3 (4,1) c

ANOVA DE DOS FACTORS: Vinificació $p < 0,0001$; Tractament $p = 0,0067$; Interacció $p = 0,6477$

Taula 11. Assaig d'irrigació. Evolució dels continguts d'IBMP (ng/L) al llarg de la vinificació. Mitjanes (n=3) i desviacions estàndard (entre parèntesi). *: continguts inferiors als límits de quantificació. Anàlisi estadística: ANOVA de dos factors i test de Fisher (ambdós, $p = 0,05$). La mateixa lletra a la mateixa columna indica l'absència de diferències estadístiques significatives ($p > 0,05$). FAL: final de la fermentació alcohòlica; FML: final de la fermentació malolàctica.

De manera semblant al que passa amb la IBMP, no hi ha diferències importants en els nivells de SBMP a l'estadi de verolat entre les mostres procedents de les vinyes irrigades i les no irrigades (Taula 12 i Fig. 2). No obstant, durant el procés de maduració, la concentració de SBMP és significativament més alta a les mostres irrigades, mentre que a les no irrigades és sempre més baix. Els nivells de SBMP són molt baixos al moment de la verema i no augmenten durant la fermentació, de tal manera que romanen per dessota dels límits de detecció als vins finals (Fig. 2). Per aquest motiu no es presenta la taula d'aquests resultats.

IRRIGACIÓ	Data	No irrigat		Irrigat	
		Sucres (g/L)	SBMP (ng/L)	Sucres (g/L)	SBMP (ng/L)
Verolat	11-08	133	4,9 (1,4) a	131	5,8 (2,4) a
Maduració 1	24-08	160	2,6 (0,5) a	159	10,2 (4,7) ab
Maduració 2	03-09	182	5,8 (2,9) a	190	16,1 (7,5) b
Maduració 3	10-09	192	2,8 (1,3) a	199	4,6 (2,5) a
Verema	16-09	207	*	206	3,3 (1,1) a

ANOVA DE DOS FACTORS: Maduració p **0,0035**; Tractament p = **0,0015**; Interacció p = 0,0908

Taula 12. Assaig d'irrigació. Evolució dels continguts de SBMP (ng/L) al llarg de la maduració del raïm. Mitjanes (n=3) i desviacions estàndard (entre parèntesi). *: continguts inferiors als límits de quantificació. Anàlisi estadística: ANOVA de dos factors i test de Fisher (ambdós, p = 0,05). La mateixa lletra a la mateixa columna indica l'absència de diferències estadístiques significatives (p>0,05).

Finalment, s'observa que els nivells d'IPMP a les mostres irrigades són sempre lleugerament més alts (Fig. 2), sobretot al tercer estadi de maduració (Taula 13). Igual que en el cas de la SBMP, la taula dels continguts d'aquest compost al llarg de la vinificació no es presenta perquè són molt baixos, i no s'ha detectat als vins finals.

IRRIGACIÓ	Data	No irrigat		Irrigat	
		Sucres (g/L)	IPMP (ng/L)	Sucres (g/L)	IPMP (ng/L)
Verolat	11-08	133	2,6 (0,5) a	131	4,3 (0,9) a
Maduració 1	24-08	160	*	159	4,9 (1,5) a
Maduració 2	03-09	182	3,4 (1,2) a	190	15,0 (7,1) b
Maduració 3	10-09	192	*	199	2,7 (0,6) a
Verema	16-09	207	*	206	*

Taula 13. Assaig d'irrigació. Evolució dels continguts d'IPMP (ng/L) al llarg de la maduració del raïm. Mitjanes (n=3) i desviacions estàndard (entre parèntesi). *: continguts inferiors als límits de quantificació. Anàlisi estadística: test de Fisher (ambdós, p = 0,05). La mateixa lletra a la mateixa columna indica l'absència de diferències estadístiques significatives (p>0,05). Els resultats no s'han pogut analitzar mitjançant el test ANOVA de dos factors degut a la manca de dades a nivells superiors als límits de quantificació.

5.2.6. Densitat de plantació

Els resultats d'aquest assaig es presenten a les Taules 14-16 i els gràfics que representen les evolucions de les MPs al llarg de la maduració i vinificació de les mostres es poden veure a la Fig. 3. Al llarg de la maduració del raïm, els nivells d'IBMP a les mostres procedents de les vinyes de 4.000 plantes per hectàrea són significativament més alts que les de les de 3.000 i 2.000 plantes per hectàrea (Taula 14).

En tots els casos s'observa una clara disminució dels nivells d'aquest compost, i al moment de la verema, els nivells de les mostres de 3.000 i 2.000 plantes per hectàrea són per dessota del límit de quantificació, mentre que les de 4.000 plantes per hectàrea s'han pogut quantificar (Fig. 3). Durant el procés de vinificació, els nivells d'IBMP augmenten en tots els casos (Fig. 3). I els vins finals procedents de les mostres 4.000 plantes per hectàrea presenten uns continguts d'IBMP (15,5 ng/L) significativament més alts que les mostres de 3.000 i 2.000 plantes per hectàrea, mentre que aquestes darreres presenten un nivell semblant entre elles: 9,8-9,9 ng/L (Taula 15).

El fet que les mitjanes dels continguts d'IBMP presenten una tendència a ser més alts a les mostres de 4.000 plantes per hectàrea que a les de 3.000 i 2.000 plantes per hectàrea en tots els casos suggereix que la densitat de plantació pot ser un factor que condiciona els continguts de MPs als raïms i als vins. Així doncs, una densitat de plantació més alta pot conduir a un nivell més alt d'IBMP al producte final. Considerant els llimdars de percepció sensorial de les MPs anteriorment esmentats, els vins procedents de les vinyes de 4.000 plantes per hectàrea tenen més probabilitats de presentar la característica nota 'vegetal' aportada per les MPs.

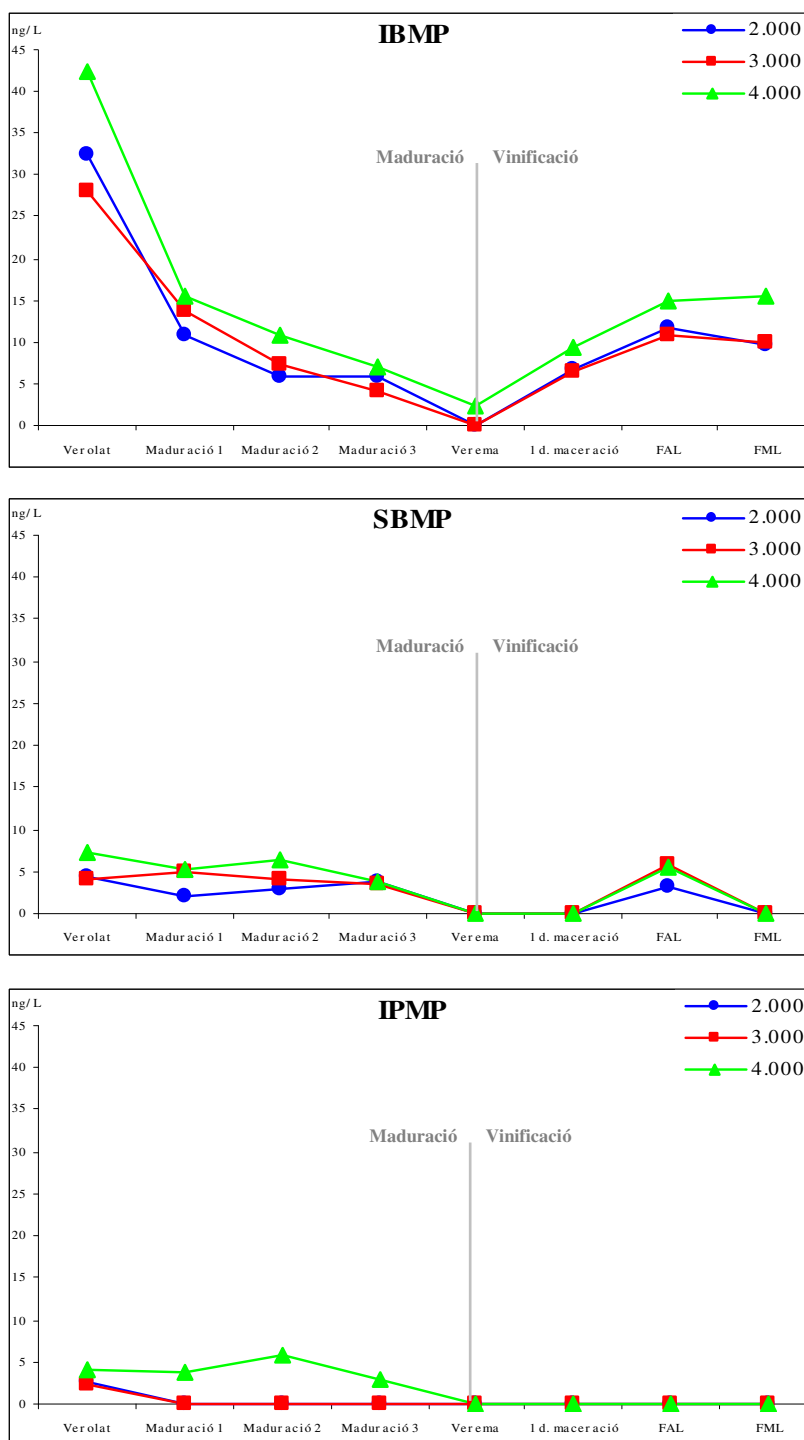


Fig. 3. Continguts de 3-alquil-2-metoxipirazines en mostres procedents de vinyes de 2.000, 3.000 i 4.000 plantes per hectàrea. Evolució durant la maduració (verolat, maduració 1, 2 i 3 i verema) i la vinificació (1 dia de maceració, final de la fermentació alcohòlica i malolàctica). FAL: final de la fermentació alcohòlica; FML: final de la fermentació malolàctica.

DENSITAT	Data	2.000		3.000		4.000	
		Sucres (g/L)	IBMP (ng/L)	Sucres (g/L)	IBMP (ng/L)	Sucres (g/L)	IBMP (ng/L)
Verolat	12-08	128	32,4 (7,4) a	129	28,0 (7,5) a	129	42,5 (8,6) a
Maduració 1	26-08	162	10,9 (3,8) b	158	13,7 (5,8) b	163	15,6 (5,3) b
Maduració 2	05-09	185	5,7 (2,9) c	192	7,4 (6,3) bc	189	10,7 (3,3) b
Maduració 3	10-09	201	5,8 (2,3) c	199	4,0 (2,0) c	199	7,0 (2,9) b
Verema	17-09	216	*	214	*	218	2,6 (0,4) b
ANOVA DE DOS FACTORS: Maduració p < 0,0001; Tractament p = 0,0267; Interacció p = 0,4084							
		2.000			3.000		
3.000		0,8468			-		
4.000		0,0237			0,0153		

Taula 14. Assaig sobre la densitat de plantació. Evolució dels continguts d'IBMP (ng/L) al llarg de la maduració del raïm. Mitjanes (n=3) i desviacions estàndard (entre parèntesi). *: continguts inferiors als límits de quantificació. Anàlisi estadística: ANOVA de dos factors i test de Fisher (ambdós, p = 0,05). La mateixa lletra a la mateixa columna indica l'absència de diferències estadístiques significatives (p>0,05).

DENSITAT	2.000	3.000	4.000		
Verema	*	*	2,6 (0,4) a		
1 dia maceració	6,7 (3,4) a	6,4 (0,9) a	9,5 (3,6) b		
FAL	11,6 (3,9) a	10,8 (3,2) b	14,8 (3,2) bc		
FML	9,8 (3,4) a	9,9 (2,9) b	15,5 (2,4) c		
ANOVA DE DOS FACTORS: Vinificació p = 0,0341; Tractament p = 0,0463; Interacció p = 0,9533					
		2.000		3.000	
3.000		0,9196		-	
4.000		0,0279		0,0347	

Taula 15. Assaig sobre la densitat de plantació. Evolució dels continguts d'IBMP (ng/L) al llarg de la vinificació. Mitjanes (n=3) i desviacions estàndard (entre parèntesi). *: continguts inferiors als límits de quantificació. Anàlisi estadística: ANOVA de dos factors i test de Fisher (ambdós, p = 0,05). La mateixa lletra a la mateixa columna indica l'absència de diferències estadístiques significatives (p>0,05).FAL: final de la fermentació alcohòlica; FML: final de la fermentació malolàctica.

Al llarg de tota la maduració, els nivells de SBMP trobats són baixos, sense cap increment o disminució clara, tret que a la verema són dessorats els límits de quantificació (Taula 16). I, de forma similar a la IBMP, els continguts d'aquesta MP són significativament més alts a les

mostres de 4.000 plantes per hectàrea. Però en aquest cas, els nivells de SBMP romanen dessota els límits de quantificació després de la verema en tots els casos (Fig 3). Per aquest motiu, igual que altres vegades, no s'exposa la taula de resultats corresponent als nivells d'aquest compostos durant la vinificació.

DENSITAT	Data	2.000		3.000		4.000	
		Sucres (g/L)	SBMP (ng/L)	Sucres (g/L)	SBMP (ng/L)	Sucres (g/L)	SBMP (ng/L)
Verolat	12-08	128	4,3 (1,3) a	129	4,0 (2,0) a	129	7,4 (3,1) a
Maduració 1	26-08	162	2,5 (0,3) a	158	4,9 (2,1) a	163	4,6 (2,2) a
Maduració 2	05-09	185	3,0 (0,6) a	192	4,1 (0,9) a	189	6,4 (1,6) a
Maduració 3	10-09	201	3,9 (1,2) a	199	3,5 (2,0) a	199	3,6 (1,4) a
Verema	17-09	216	*	214	*	218	*
ANOVA DE DOS FACTORS: Maduració p = 0,0634; Tractament p = 0,0457 ; Interacció p = 0,3861							
		2.000		3.000			
3.000		0,3346		-			
4.000		0,0142		0,1097			

Taula 16. Assaig sobre la densitat de plantació. Evolució dels continguts de SBMP (ng/L) al llarg de la maduració del raïm. Mitjanes (n=3) i desviacions estàndard (entre parèntesi). *: continguts inferiors als límits de quantificació. Anàlisi estadística: ANOVA de dos factors i test de Fisher (ambdós, p = 0,05). La mateixa lletra a la mateixa columna indica l'absència de diferències estadístiques significatives (p>0,05).

Finalment, els nivells d'IPM trobats durant la maduració del raïm són de 2,8-5,9 ng/L, sense diferències significatives al llarg de tot el procés, en mostres procedents de vinyes de 4.000 plantes per hectàrea. En canvi, en el cas de les vinyes de 2.000 i 3.000 plantes per hectàrea, els nivells d'aquest compost són de 2-3 ng/L al verolat i després cauen, trobant-se per dessota els límits de quantificació en tots els casos. Pel que fa al procés de vinificació, no s'ha pogut quantificar la IPMP en cap de les mostres d'aquest assaig (Fig. 3), degut a que els seus continguts eren inferiors als límits de quantificació. Per tot plegat, no s'exposen les taules dels continguts d'aquest compost durant els processos de maduració i de vinificació.

Conclusions

Mitjançant els dos mètodes d'anàlisi prèviament desenvolupats, s'ha estudiat l'efecte de diferents factors vitivinícoles en els continguts de 3-alkil-2-metoxipirazines en mostos i vins.

Les principals conclusions extretes són les següents:

1. A tots els tipus de mostres estudiats s'hi ha identificat la 3-isobutil-2-metoxipirazina, la 3-*sec*-butil-2-metoxipirazina i la 3-isopropil-2-metoxipirazina. En general, els continguts de la primera són més alts que els de la segona, els quals són més alts que els de la darrera. La 3-etil-2-metoxipirazina s'ha identificat en algunes mostres, però els seus continguts són sota els límits de quantificació.
2. De totes les metoxipirazines trobades a les mostres, la 3-isobutil-2-metoxipirazina és la que més probablement té influència en l'aroma dels vins finals estudiats.
3. Els continguts de 3-isobutil-2-metoxipirazina decreixen durant la maduració del raïm, arribant a les concentracions més baixes a la verema.
4. La concentració de 3-isobutil-2-metoxipirazina en mostos incrementa molt després d'un dia de maceració, probablement degut a l'extracció d'aquest compost de les parts sòlides del raïm. Els continguts d'aquesta pirazina incrementen al llarg de la fermentació alcohòlica, però no pas després del descubats. Durant la fermentació malolàctica no s'han observat canvis significatius als nivells d'aquest compost.
5. Els continguts mitjans de 3-isobutil-2-metoxipirazina als vins procedents de les vinyes emparrades són significativament més alts que els de les vinyes podades en vas. Aquests vins tenen més probabilitat de presentar l'aroma típica de la IBMP que els vins procedents de vinyes en vas.

6. La protecció de la llum del sol pot resultar en un nivell significativament més baix de 3-isobutil-2-metoxipirazina als vins finals.
7. Les vinyes regades poden produir raïms i vins amb un nivell de 3-isobutil-2-metoxipirazina significativament més elevat que les vinyes no regades.
8. Les vinyes amb una densitat de plantació més elevada, de 4.000 plantes per hectàrea, poden donar lloc a vins amb continguts significativament més alts de 3-isobutil-2-metoxipirazina que les vinyes de 3.000 o 2.000 plantes per hectàrea.

Al final d'aquest capítol es presenten les reproduccions de dos articles. El primer, titulat *Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the Vitis vinifera variety Cabernet sauvignon*, acceptat per a publicació al Journal of Agricultural and Food Chemistry, recull els resultats trobats a l'assaig sobre insolació. Igualment, els assaigs sobre la irrigació i la densitat de plantació són presentats a l'article titulat *Contents of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts and wines from Vitis vinifera variety Cabernet sauvignon: influence of irrigation and plantation density*, acceptat per a publicació al Journal of the Science of Food and Agriculture.

Bibliografia

01. Allen, M. S.; Lacey, M. J. Methoxyypyrazine grape flavour: influence of climate, cultivar and viticulture. *Wein-Wissenschaft*. **1993**, *48*, 211-213.
02. Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Boyd, S. Determination of Metoxyypyrazines in Red Wines by Stable Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1734-1738.
03. Allen, M. S. What level of methoxyypyrazines is desired in red wines? The flavour perspective of the classic red wines of Bordeaux. *Austr. Grapegr. Winem.* **1995**, *381*, 7-9.
04. 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.
05. Hashizume, K.; Samuta, T. Grape maturity and light exposure affect berry methoxyypyrazine concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 194-198.
06. Hashizume, K.; Umeda, N. Methoxyypyrazine content of Japanese red wines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 802-805.
07. Hashizume, K.; Kida, S.; Samuta, T. Effect of steam treatment of grape cluster stems on the methoxyypyrazine, phenolic, acid, and mineral content in red wines fermented with stems. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4382-4386.
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. 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.
10. Seifert, R. M.; Buttery, R.G.; Guadagni, D.G.; Black, D.R.; Harris, J.G. Synthesis of Some 2-Methoxy-3-Alkylpyrazines with Strong Bell Pepper-Like Odors. *J. Agric. Food Chem.* **1970**, *18*, 246-249.
11. Maga, J. A. Sensory and stability properties of added methoxyypyrazines to model and authentic wines. In *Flavours and Off-Flavours*, Proceedings of the 6th International Flavor Conference; Charalambous, G. Elsevier, Amsterdam, **1990**, 61-70.
12. Murray, K. E.; Shipton, J.; Whitfield, F. B. 2-Methoxyypyrazines and the flavour of green peas (*Pisum sativum*). *Chem. Ind.* **1970**, *7*, 897-898.
13. Boelens, M.H.; Gemert, L.J. Structure-activity relationships of natural volatile nitrogen compounds. *Perf. Flav.* **1995**, *20*, 63-76.
14. Buttery, R. G.; Seifert, R. M.; Guadagni, D. G.; Ling, L. C. Characterization of Some Volatile Constituents of Bell Peppers. *J. Agr. Food Chem.* **1969**, *17*, 1322-1327.
15. 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.
16. Allen, M. S. Grape and wine flavour analysis. *Chem. Austr.* **1995**, *62*, 16-17.
17. Lacey, M. J.; Allen, M. S.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V. Methoxyypyrazines in Sauvignon blanc Grapes and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 109-112.
18. Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V. Contribution of Methoxyypyrazines to Sauvignon blanc Wine Aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 109-112.
19. 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.
20. 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.
21. Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Boyd, S. Methoxyypyrazines in red wines: occurrence of 2-methoxy-3-(1-methylethyl) pyrazine. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 769-772.
22. Roujou-de-Boubee, D.; Cumsille, A.M.; Pons, D. Dubordieu, D. Location of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet sauvignon bunches and its extractability during vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 1-5.
23. Allen, M. S. Commercial support for methoxyypyrazine flavour research. *Austr. Grapegr. Winem.* **1994**, *366*, 22-23.
24. Marais, J. Sauvignon blanc cultivar aroma - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1994**, *15*, 41-45.

25. Allen, M. S. Viticultural effects on methoxypyrazine grape flavour: current research directions. *Austr. Grapegr. Winem.* **1993**, 354, 10-12.
26. Morrison, J. C.; Noble, A.C. The effects of leaf and cluster shading on the composition of Cabernet sauvignon grapes and on fruit and wine sensory properties. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 41, 193-200.
27. Noble, A.C.; ElliottFisk, D.L.; Allen, M.S. Vegetative flavor and methoxyprazines in Cabernet Sauvignon. *Fruit Flavors.* **1995**, 596, 226-234.

**JOURNAL OF AGRICULTURAL
AND FOOD CHEMISTRY**

**INFLUENCE OF VINE TRAINING AND SUNLIGHT EXPOSURE ON
THE 3-ALKYL-2-METHOXYPIRAZINES CONTENT IN MUSTS AND
WINES FROM *VITIS VINIFERA* VARIETY CABERNET SAUVIGNON**

J. Agric. Food Chem. **2004**, 52, 3492-3497

Cristina Sala^{*a}, Olga Busto^a, Josep Guasch^a and Fernando Zamora^b

^aDepartament de Química Analítica i Química Orgànica.

^bDepartament de Bioquímica i Biotecnologia.

Unitat d'Enologia, CeRTA. Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili.
Avda. Ramón y Cajal 70, E-43005 Tarragona, Spain. E-mail: qaenol@fe.urv.es

**JOURNAL OF THE SCIENCE
OF FOOD AND AGRICULTURE**

Presentat el Febrer de 2004

**CONTENTS OF 3-ALKYL-2-METHOXYPIRAZINES IN MUSTS AND
WINES FROM *VITIS VINIFERA* VARIETY CABERNET SAUVIGNON:
INFLUENCE OF IRRIGATION AND PLANTATION DENSITY**

Cristina Sala^{*a}, Olga Busto^a, Josep Guasch^a and Fernando Zamora^b

^a Departament de Química Analítica i Química Orgànica.

^b Departament de Bioquímica i Biotecnologia.

Unitat d'Enologia, CeRTA. Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili.
Avda. Ramón y Cajal 70, E-43005 Tarragona, Spain. E-mail: qaenol@fe.urv.es

Influence of Vine Training and Sunlight Exposure on the 3-Alkyl-2-methoxypyrazines Content in Musts and Wines from the *Vitis vinifera* Variety Cabernet Sauvignon

CRISTINA SALA,^{*,†} OLGA BUSTO,[†] JOSEP GUASCH,[†] AND FERNANDO ZAMORA[‡]

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

The influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines contents in musts and wines was studied by means of two previously reported methods based on headspace solid-phase micro-extraction. Experimental samples were monitored throughout grape ripening and wine making. 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine, 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine and 3-isopropyl-2-methoxypyrazine were identified. The 3-isobutyl-2-methoxypyrazine content decreased throughout grape ripening in all of the sample types studied. After 1 day of maceration with the skins, there was an increase, but after racking, no further increase was observed. No significant differences between samples were found during grape ripening. Wines from goblet-trained vines, however, contained significantly less 3-isobutyl-2-methoxypyrazine. Clusters protected from sunlight since the beginning of the veraison resulted in wines with a significantly lower content of this compound than the control samples.

KEYWORDS: 3-Alkyl-2-methoxypyrazines; Cabernet sauvignon; gas chromatography; grape; ripening; solid-phase micro-extraction; sunlight; training; *Vitis vinifera*; wine

INTRODUCTION

The different types and amounts of volatile aroma compounds in berries are the major source of flavor distinction in varietal wines. Thus, primary aromas can influence wine quality and have an important economic impact. This is the case of 3-alkyl-2-methoxypyrazines (MP), which are associated with the green, herbaceous or vegetative aromas typical of certain cultivars. 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP), together with 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine (SBMP) and 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPMP), have been identified in Cabernet sauvignon, Merlot noir, and Sauvignon blanc (2–6).

Sensory thresholds of some MPs are very low. IBMP, SBMP, and IPMP can be perceived by the human nose at 1–2 ng/L in distilled water (7–12). IBMP is detected at 10 ng/L in red wines (5) and IPMP at 2 ng/L in red wine (10). Because MP can be present in grapes and wines at higher levels, they can have an important sensorial impact on wine quality.

Among the most important aroma compounds of the Sauvignon blanc variety, some sulfur-containing compounds have been found (13–14). Nevertheless, MP, and in particular IBMP, are considered to be mainly characteristic of this variety. Their contribution to the quality of Sauvignon blanc wines can be positive as long as it is not too dominant and it is balanced and

complemented by other aromas (15–16). However, the “vegetative” character it provides is generally considered unacceptable in red wines (5, 17), though its presence in moderate amounts (2–15 ng/L) is not incompatible with the high quality of Bordeaux wines (16, 18).

It has been found that a balance between biological formation and photodegradation may determine the MP content in grapes throughout the ripening process. MP might form largely in the earlier stages of grape development, and photodegradation might be more important in the ripened fruits (19). This hypothesis would explain how some viticulture factors, like the effect of the weather conditions on ripening, the exposure of the fruit to sunlight, and the degree of grape ripening can affect the MP content in grapes and wines.

It is generally accepted that wines from warm areas tend to have lower “vegetative-herbaceous” aromas and a lower IBMP content than wines from cool areas (5–6, 15, 20–22). Cool ripening conditions can lead to higher MP levels and thus enhance these aromas in Sauvignon blanc grapes (6, 20). Likewise, a greater humidity in the pre-veraison month can result in higher IBMP contents (17). This is in accordance with the theory that unripe grapes determine the IBMP content of final wines (19).

Producers know that the exposure of grapes to light has a strong influence on the character of wines (22). They are interested in factors such as vine vigor, leaf removal, and

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: qsaenol@urv.es.

† Departament de Química Analítica i Química Orgànica.

‡ Departament de Bioquímica i Biotecnologia.

pruning, all of which determine the exposure of the fruit to sunlight, because they can be manipulated to manage wine flavor and quality from the beginning of grape growth. Indeed, increased vine vigor and the resulting canopy shade can significantly change the aromas in Cabernet sauvignon and Sauvignon blanc wines (20, 22–23) by increasing their vegetative character. Severe leaf removal seems to be effective at reducing these notes in Sauvignon blanc wine, and earlier treatments are more effective than later treatments (22, 24). Light exposure has been found to have an effect on IBMP levels, which were three times higher in heavily shaded clusters than in the well exposed fruits of Cabernet sauvignon (20). Finally, minimally pruned vines gave fruits with IBMP concentrations that were eight times lower than those in fruits from spur-pruned vines. The authors explained that minimal pruning provided greater exposure to sunlight (20).

Grape growers are familiar with the fact that Cabernet and Merlot noir grapes have a vegetative taste when they are not ripe (25). Also, it has been reported that, in Cabernet sauvignon and Sauvignon blanc, the riper the grapes are, the lower the IBMP levels (4, 26) and the herbaceous-vegetative character (3, 6, 20). Thus, a very wide range of MP levels can be found in grapes (27), and consequently in the final wines obtained.

Assessing how viticultural factors affect the contents of MP requires accurate analytical methods because some differences may be too small to be noticed by sensory analysis. Because the contents of these compounds in grape juices and wines are so low (ng/L), their determination is methodologically difficult. We have developed and reported two methods based on HS-SPME with GC-NPD for quantifying MP in musts and wines. They have high recoveries and detection limits at 0.1–0.3 ng/L for IBMP, SBMP, and IPMP (26, 28). The results presented here were obtained by means of these procedures.

The purpose of this work was to study the influence that training and sunlight exposure can have on the MP content of Cabernet sauvignon musts and wines. MP concentrations were monitored throughout grape ripening and winemaking.

MATERIALS AND METHODS

All samples were produced and collected at the experimental vineyard and wine cellar of the Faculty of Enology of the Rovira i Virgili University in Constantí (Tarragona) in 1998. The weather in the region (average June, July, and August, respectively) was as follows: temperature, 20.6, 23.6, and 23.5 °C; maximum temperature, 26.1, 29.2, and 29.9 °C; minimum temperature, 15.2, 17.8, and 17.6 °C; daily solar irradiation, 21.7, 22.6, and 17.2 MJ/m²; rainfall, 1.0, 3.5, and 35.0 L/m².

Two plots of Cabernet sauvignon vines were used in this study. Both plots were planted 7 years before in the same parcel, on the same type of ground, with the same orientation and at the same elevation. The first plot is goblet-trained and has a total of 365 plants, distributed in 5 rows. The second plot is trellised, bilateral cordon trained, and has 502 plants distributed in 12 rows. Both plots have a density of plantation of 2500 plants per hectare. None of them was irrigated.

To study the effect of vine training on MP concentrations, samples from (sunlight-exposed) clusters of trellised-trained vines were compared with samples from (sunlight-exposed) clusters of goblet-trained vines.

Sunshine Protection. Samples for studying the influence of sunshine exposure on MP content were collected from the plot of trellised-trained vines. One cluster on every two vines was protected from the sunlight from the beginning of the veraison by means of pieces of sackcloth. These clusters were randomly selected, and special care was taken to make sure that the more and less sunlight-exposed clusters were correctly represented. The pieces of sackcloth were wrapped round the cluster, but the bottom was left open to facilitate gas movement and to

prevent the temperature from increasing due to grape respiration. The temperature of the fruits was monitored, and no important differences between wrapped and nonwrapped fruits were found during the ripening process. Samples of sunlight-protected clusters (from trellised-trained vines) were compared with sunlight-exposed clusters from the same vines. Both series of samples were common at veraison. For the other sampling stages during fruit ripening, both types of samples were collected from clusters belonging to the same plant.

Sampling. To obtain random samples and not use the same vine twice at the different sampling times, a mark was put every five vines of each vineyard. The first sample was collected only from marked vines. The second sample was collected from the vine immediately next to the marked vine. The third to fifth samples were collected from the plants on the third to fifth places after the marked vine. The clusters sampled were also randomly selected within the vine, to ensure a homogeneous distribution between clusters that had been exposed more or less to sunlight. Three berries from each cluster were collected, up to a total of 100. They were collected at random: one from the top, one from the bottom, and one from the middle of the cluster. Special care was taken to obtain a good distribution between berries from inside and outside the cluster. Three replicates of each kind of sample were collected in all cases.

During the grape ripening period, grapes were collected at the following times: veraison, every 5–12 days (ripening stages 1, 2, and 3), and on the harvest day. Samples were manually pressed in the laboratory, NaF (1 g/L) was added as preservative, and they were stored in dark bottles at –20 °C. At the harvest day, grapes from goblet-trained vines presented a potential alcoholic content of 11.8% and a pH of 3.73, while trellised trained grapes presented a slightly lower potential alcoholic content 11.2–11.3% and a similar pH of 3.70–3.71. A total of nine different micro-vinifications were monitored: three replicates of each type of sample. Classical red winemaking was used for all the samples. The final volumes of each micro-vinification were about 2.5 L. The sampling times during winemaking were the following: after 1 day of maceration, at the end of alcoholic fermentation, and after the malolactic fermentation. Fermented samples were preserved with SO₂ (25 mg/L) and stored in dark bottles at 4 °C.

Sample Preparation. MP contents were determined in accordance with the previously published HS-SPME procedures (26, 28). Every determination was made in duplicate. In the case of musts, 3 g of NaCl and 1 mL of a 100 ng/L solution of 3-isopropyl-2-ethoxypyrazine (internal standard) was placed in a 20 mL vial for SPME together with an aliquot of 10 mL of must and a little magnetic stirrer. It was thickly capped, put in an isothermal bath at 30 °C and continuously stirred. The SPME fiber was then introduced into the headspace. After 4 h, it was analyzed by GC. In the case of wines, 10 mL of the sample was spiked with the internal standard, acidified with HCl, and distilled at low pressure and room temperature. After the volume had been reduced to 50%, the resulting solution was neutralized with NaOH and transferred to the 20 mL SPME vial containing the NaCl and the magnetic stirrer. Finally, the SPME extraction was performed as for the musts.

Chromatographic Conditions. Chromatographic analysis was performed with a Hewlett-Packard 5890 II gas chromatograph equipped with a nitrogen-phosphorus detector. Injection (splitless, 1 min) was performed with an inlet of 0.75-mm ID and at 250 °C. The analytical column was a CP-WAX 57 CB (50-m × 0.25-mm ID, 0.2- μ m FT). The carrier gas was high purity helium flowing at 0.8 mL/min. The oven temperature was 30 °C (1 min), 25 °C/min to 100 °C (20 min). 3-Isopropyl-2-ethoxy-pyrazine (Pyrazine Specialties, Atlanta, Georgia), more than 97% pure, was used as internal standard (IS). The SPME device and the poly(dimethylsiloxane)/divinylbenzene, 65 μ m, fibers used in this study were purchased from Supelco (Bellefonte, PA). Each fiber was conditioned before use, as well as cleaned afterward by insertion into a GC injector at 260 °C for a minimum of 5 min. They were used immediately to prevent contamination.

Statistics. All the data are expressed as the arithmetic average \pm standard deviation from three replicates. Two-factor ANOVA and Fisher test were carried out using Statview (software for Macintosh).

Table 1. Evolution of 3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazine (IBMP) Contents (ng/L) throughout Grape Ripening

	IBMP: Grape Ripening ^a		
	sunlight/trellised	sunlight/goblet	protected/trellised
veraison	26.0 (7.5) ^b	18.4 (2.7) ^b	26.0 (7.5) ^b
ripening 1	18.8 (5.4) ^b	13.7 (4.4) ^{bc}	13.4 (3.9) ^{bc}
ripening 2	16.3 (4.7) ^{bc}	13.0 (2.9) ^c	18.0 (4.8) ^c
ripening 3	4.1 (1.0) ^c	5.4 (1.1) ^d	3.6 (1.4) ^d
harvest	2.8 (0.6) ^c	3.2 (0.8) ^d	bl ^a

Two-Factor Anova:		
Ripening $p < 0.0001$; Treatment $p = 0.4867$		
	sunlight/trellised	sunlight/goblet
sunlight/goblet	0.0665	
protected/trellised	0.4646	0.2822

^a Average values and standard deviations (in brackets). ^{b-d} Statistical analysis: Two-factor ANOVA and Fisher test (both, $p = 0.05$). Same letter in the same column indicates the absence of statistically significant differences ($p > 0.05$). ^a bl, below quantification limits.

Table 2. Evolution of 3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazine (IBMP) Contents (ng/L) throughout Winemaking

	IBMP: Winemaking ^a		
	sunlight/trellised	sunlight/goblet	protected/trellised
harvest	2.8 (0.6) ^b	3.2 (0.8) ^b	bl ^a
1 day macer.	10.0 (2.2) ^c	6.4 (0.8) ^c	7.3 (2.0) ^b
end alc. ferm.	12.3 (2.8) ^c	9.3 (1.1) ^d	3.4 (0.9) ^c
end mal. ferm	12.0 (2.1) ^c	7.8 (1.1) ^{cd}	4.6 (1.4) ^{bc}

Two-Factor Anova:		
Winemaking $p < 0.0001$; Treatment $p < 0.0001$		
	sunlight/trellised	sunlight/goblet
sunlight/goblet	0.0133	
protected/trellised	< 0.0001	0.0002

^a Average values and standard deviations (in brackets). ^{b-d} Statistical analysis: Two-factor ANOVA and Fisher test (both, $p = 0.05$). Equal letter in the same column indicate the absence of statistically significant differences ($p > 0.05$). ^a bl, below quantification limits.

RESULTS AND DISCUSSION

Tables 1–4 show the MP content of experimental musts and wines, and Figure 1 shows several typical chromatograms. IBMP, SBMP, and IPMP were identified in the three series of samples. The content of SBMP and IPMP was very low throughout winemaking in all cases and often below quantification limits. Similarly, 3-ethyl-2-methoxy-pyrazine was identified in some grape samples, but the content was generally too low to be quantified.

IBMP was the most abundant methoxy-pyrazine in almost all the samples studied, which agrees with the literature (4, 6, 7, 20, 29). SBMP levels were generally higher than IPMP levels. It should be pointed out that data on SBMP concentrations in musts and wines is scarce in the literature. According to the sensory thresholds stated in the Introduction, only IBMP might have an influence on the flavor of the final wines obtained from the sunlight exposed grapes of the trellised-trained vines. The content of SBMP in final wines was higher than its detection threshold in water, but we do not have data about the threshold of SBMP in red wines.

Grape Ripening. IBMP levels are reported to vary considerably in Cabernet sauvignon and Sauvignon blanc musts (0.5–

Table 3. Evolution of 3-sec-Butyl-2-methoxy-pyrazine (SBMP) Contents (ng/L) throughout Grape Ripening

	SBMP: Grape Ripening ^a		
	sunlight/trellised	sunlight/goblet	protected/trellised
veraison	4.3 (1.8) ^b	9.6 (4.1) ^b	4.3 (1.8) ^b
ripening 1	11.4 (4.7) ^c	13.0 (6.6) ^b	9.2 (3.6) ^c
ripening 2	16.2 (3.8) ^c	13.9 (2.9) ^b	18.2 (4.3) ^d
ripening 3	2.8 (0.8) ^b	4.0 (0.8) ^c	2.6 (0.4) ^a
harvest	bl ^a	4.1 (2.0) ^c	bl ^a

Two-Factor Anova:		
Ripening $p < 0.0001$; Treatment $p = 0.5437$		
	sunlight/trellised	sunlight/goblet
sunlight/goblet	0.8848	
protected/trellised	0.3397	0.2736

^a Average values and standard deviations (in brackets). ^{b-d} Statistical analysis: Two-factor ANOVA and Fisher test (both, $p = 0.05$). Same letter in the same column indicate the absence of statistically significant differences ($p > 0.05$). ^a bl, below quantification limits.

Table 4. Evolution of 3-Isopropyl-2-methoxy-pyrazine (IPMP) Contents (ng/L) throughout Grape Ripening

	IPMP: Grape Ripening ^a		
	sunlight/trellised	sunlight/goblet	protected/trellised
veraison	bl ^d	5.4 (2.7) ^b	bl ^d
ripening 1	4.5 (0.4) ^b	8.0 (5.4) ^{bc}	3.1 (1.0) ^b
ripening 2	10.7 (3.7) ^c	12.3 (1.7) ^c	13.7 (6.8) ^c
ripening 3	bl ^d	3.0 (0.5) ^b	bl ^d
harvest	bl ^d	4.7 (3.6) ^b	bl ^d

^a Average values and standard deviations (in brackets). ^{b-d} Statistical analysis: Fisher test ($p = 0.05$). Equal letter in the same column indicate the absence of statistically significant differences ($p > 0.05$). Results could not be analyzed by means of two-factor ANOVA test due to the lack of data above quantification limits. ^d bl, below quantification limits.

189 ng/L) (20). The results presented here support this (Table 1), although an IBMP content no higher than 26 ng/L was found in the monitored samples. The content of this compound changed significantly during grape ripening, and its evolution was similar in all cases: it decreased dramatically after the veraison and then gradually throughout the process so that the levels were lowest on harvest day. Our results match those in the literature, which reported that the IBMP content in Cabernet sauvignon, Merlot noir, and Sauvignon blanc varieties decreased with increasing grape maturity, and mainly during the first stage of the ripening process (6, 17, 20, 26).

Interestingly, the SBMP and IPMP content evolve differently during grape ripening (Tables 3 and 4). They tend to increase during the first part of the process and then decrease. Consequently, although at veraison and grape ripening stage 1, the IBMP content is higher than both SBMP and IPMP, at ripening stage 2, the concentration of all these MP is similar, (between 11 and 16 ng/L). After reaching this maximum level, the concentrations of both SBMP and IPMP drop, so the average levels of the three MPs are below 5 ng/L at harvest.

Winemaking. The IBMP concentration increases significantly in all musts on the first day of maceration (Table 2). However, no further significant increase was observed after racking. These results suggest that IBMP seems to be released from the solid parts of the grapes (30). Finally, malolactic fermentation proved not to change the IBMP content.

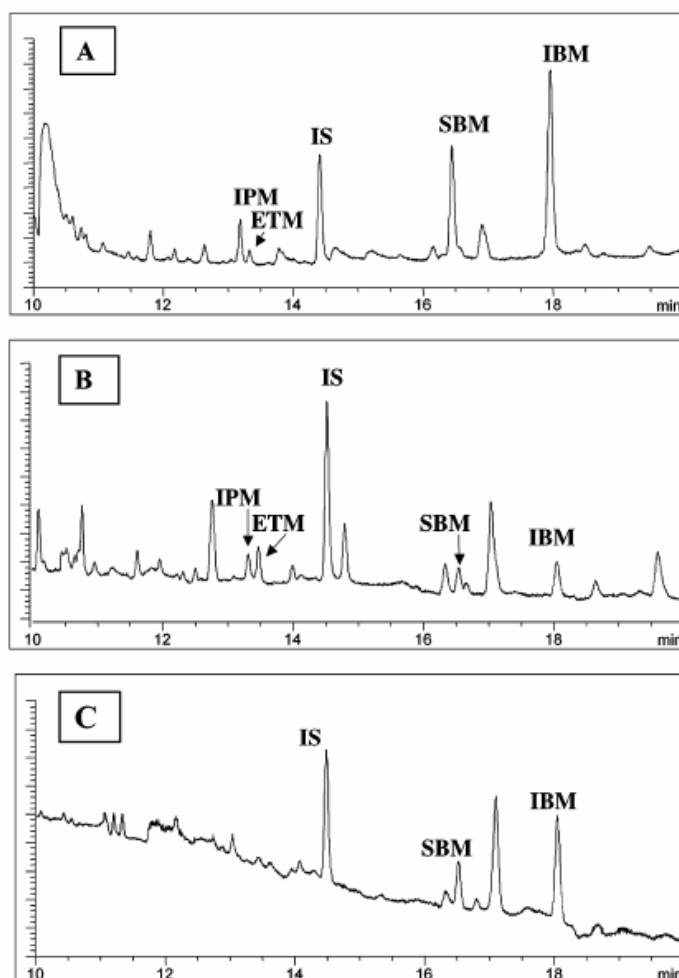


Figure 1. Chromatograms of samples from sunlight-exposed grapes of trellised-trained vines. Grape juices at an earlier (A) and at a later (B) grape ripening stage, and the final wine obtained from them (C). Internal standard (IS): 10 ng/L.

The increase in IBMP during the winemaking process has also been reported in the literature: Cabernet sauvignon wines showed a higher MP content than did the juice before fermentation (21, 27). It has been reported that the skins, seeds, and stems of grapes contain MP and that they can partly pass into the juice during fermentation/maceration (4, 19, 26, 30). The extraction by ethanol during fermentation and/or the release from precursors by specific yeast strains (15, 21) have been considered responsible for this compound passing from the solid parts to the juice. However, the results presented here show that the IBMP levels mainly increased during the first 24 h of maceration, before the alcoholic fermentation actually started. These results indicate that ethanol or specific yeasts are unlikely to have a major influence. The destruction of the berry structure due to destemming and crushing means that there is a considerable contact between skin/seeds/stems and juice, which increases the levels of these compounds in musts, because MP occur mainly in the solid parts of the fruit. So, if extraction by ethanol has an influence, it would be lower and slower.

Surprisingly, neither the SBMP nor the IPMP content increases significantly during the winemaking process (data not

shown), even on the first day of maceration. This suggests that the contents of these MP in the skins of the fruits might be lower than the IBMP content. This, together with the fact that they evolve differently during grape ripening, indicates that the dynamics of both SBMP and IPMP are totally different from that of IBMP.

The MP content in final wines agrees with the literature. The IBMP contents of 4.6–12.0 ng/L do not differ from the reported 3.6–56.3 ng/L (20, 27). Finally, the SBMP and IPMP content, which is close to or below quantification limits, agree with the levels mentioned in the literature: 2.0–4.9 ng/L and 0.92–10.1 ng/L, respectively (2).

Vine Training. The results do not show statistically significant differences in IBMP contents between samples from goblet and trellised trained vines during grape ripening (Table 1). The evolution of all MP is similar throughout this process in both types of vines.

Nevertheless, the training factor produces significant differences in the IBMP content of final wines (Table 2). The relative increases in samples from both goblet and trellised-trained vines during the winemaking process was similar, in fact almost

parallel. However, in the winemaking stages, the IBMP content of samples from the trellised-trained vines was significantly higher. Eventually, the average content in final wines was higher in these samples. This difference can be critical because the amount of IBMP in final wines from trellised trained vines is actually higher than its reported odor threshold in red wines (5), whereas in samples from goblet-trained vines it is not. These differences may be related to the fact that grapes from goblet-trained vines presented a slightly higher maturation level at harvest.

Finally, musts from goblet trained vines contain enough SBMP to be determined, but in musts from trellised-trained vines, the amount of SBMP is below determination limits (Table 3).

Sunshine Exposure. During ripening, IBMP levels in grapes exposed to sunshine were not significantly different from the ones that had been covered with pieces of sackcloth (Table 1). Interestingly, however, the increase in IBMP content during maceration was significantly lower in the samples from the sunlight-protected clusters (Table 2). And the amount of IBMP in the final wines was clearly lower. Such differences cannot be due to different maturity levels, inasmuch as both samples, sunlight exposed, and sunlight protected grapes, presented similar pH and potential alcoholic content at harvest. Therefore, the results reveal that less sunshine exposure resulted in wines with a lower IBMP content.

These results are surprising because sunlight protection was expected to lead to higher levels of MPs. Indeed, according to the literature, fruit that is exposed less to the sun has higher MP levels (20) and a different aroma, with a stronger vegetative accent (23, 31). It has also been proven that light can photodegrade of IBMP in grape tissues (19). Our findings point to the hypothesis that the lower sunshine exposure obtained by means of the artificial protection of the berries would result in lower levels of IBMP in the skins. These results suggest that the balance between MP formation and degradation (19) is complex and can be influenced by several factors. Thus, the biological formation of MPs in grapes would require sunlight not only in the earlier stages of grape development (19) but also during grape ripening. In terms of wine flavor, the reported differences in IBMP content might be critical. In wines from sunlight-protected clusters, these levels are below the sensory threshold for this compound in red wines (5), so the final product is likely not to have the vegetative character, whereas wines from the sunlight-exposed clusters might have this character. Finally, no significant differences in the SBMP levels (Table 3) were found between the samples from the sunlight exposed and sunlight protected clusters during grape ripening.

LITERATURE CITED

- Bayonove, C.; Cordonnier, R.; 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. Sci. Paris*. 1975, 281 (D), 75–78.
- 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.
- 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.
- Hashizume, K.; Umeda, N. Methoxypyrazine content of Japanese red wines. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 1996, 60, 802–805.
- Kotseridis, Y.; Anocibar Beloqui, 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.
- 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, 103–108.
- 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.
- Buttery, R. G.; Seifert, R. M.; Lundin, R. E.; Guadagni, D. G.; Ling, L. C. Characterisation of an important aroma component of bell peppers. *Chem. Ind.* 1969, 04, 490–491.
- Buttery, R. G.; Seifert, R. M.; Guadagni, D. G.; Ling, L. C. Characterization of Some Volatile Constituents of Bell Peppers. *J. Agric. Food Chem.* 1969, 17, 1322–1327.
- Maga, J. A. Sensory and stability properties of added methoxypyrazines to model and authentic wines. In *Flavours and Off-Flavours*, Proceedings of the 6th International Flavor Conference; Charalambous, G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1990, 61–70.
- Murray, K. E.; Shipton, J.; Whitfield, F. B. 2-Methoxypyrazines and the flavour of green peas (*Pisum sativum*). *Chem. Ind.* 1970, 07, 897–898.
- Seifert, R. M.; Buttery, R. G.; Guadagni, D. G.; Black, D. R.; Harris, J. G. Synthesis of Some 2-Methoxy-3-alkylpyrazines with Strong Bell Pepper-Like Odors. *J. Agric. Food Chem.* 1970, 18, 246–249.
- Tominaga, T.; Guibertau, G.; Dubordieu, D. Contribution of benzenemethanethiol to smoky aroma of certain *Vitis vinifera* L. wines. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1373–1376.
- Schneider, R.; Kotseridis, Y.; Ray, J.-L.; Augier, C.; Baumes, R. Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. Development and application of a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3243–3248.
- Marais, J. Sauvignon blanc cultivar aroma—a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 1994, 15, 41–45.
- Allen, M. S. Grape and wine flavour analysis. *Chem. Austr.* 1995, 62, 16–17.
- Roujou-de-Boubee, 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.
- Kotseridis, Y.; Baumes, R. L.; Bertrand, A.; Skouroumornis, 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.
- Hashizume, K.; Samuta, T. Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazines concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* 1999, 50, 194–198.
- Allen, M. S.; Lacey, M. J. Methoxypyrazine grape flavour: influence of climate, cultivar, and viticulture. *Wein-Wiss.* 1993, 48, 211–213.
- Allen, M. S. Commercial support for methoxypyrazine flavour research. *Aust. Grapegr. Winem.* 1994, 366, 22–23.
- Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V. Sauvignon Blanc varietal aroma. *Aust. Grapegr. Winem.* 1988, 292, 51–56.
- Morrison, J. C.; Noble, A. C. The effects of leaf and cluster shading on the composition of Cabernet sauvignon grapes and on fruit and wine sensory properties. *Am. J. Enol. Vitic.* 1990, 41, 193–200.
- Arnold, R. A.; Bledsoe, A. M. The effect of various leaf removal treatments on the aroma and flavor of Sauvignon blanc wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 1990, 41, 74–76.
- Roujou-de-Boubee, D. The “plant” aroma characteristic of wines. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 1999, 33, 145–146.

Vine Training and Sunlight Exposure in *Vitis vinifera*

- (26) Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M. P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres. *J. Chromatogr. A*. **2000**, *880*, 93–99.
- (27) 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.
- (28) Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M. P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. *J. Chromatogr. A*. **2002**, *105*, 262–267.
- (29) 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.
- (30) Roujou-de-Boubee, D.; Cumsille, A. M.; Pons, D. Dubordieu, D. Location of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet sauvignon bunches and its extractability during vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 1–5.
- (31) Noble, A. C.; ElliottFisk, D. L.; Allen, M. S. Vegetative flavor and methoxypyrazines in Cabernet Sauvignon. *Fruit Flavors*. **1995**, *506*, 226–234.

Received for review January 14, 2004. Revised manuscript received March 19, 2004. Accepted March 23, 2004. Financial support provided by the CICYT (Project ALI 97-0765).

JF049927Z

Contents of 3-alkyl-2-methoxy-pyrazines in musts and wines from *Vitis vinifera* variety Cabernet sauvignon: influence of irrigation and plantation density.

Cristina Sala^{*a}, Olga Busto^a, Josep Guasch^a and Fernando Zamora^b

^a Departament de Química Analítica i Química Orgànica. ^b Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Unitat d'Enologia, CeRTA. Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili. Avda. Ramón y Cajal 70, E-43005 Tarragona, Spain. E-mail: qaenol@fe.urv.es

Abstract

The influence of irrigation and plantation density in the contents of methoxy-pyrazines in musts and wines has been studied. Samples were monitored throughout grape ripening and winemaking. 3-isobutyl-2-methoxy-pyrazine, 3-sec-butyl-2-methoxy-pyrazine and 3-isopropyl-2-methoxy-pyrazine were identified and quantified.

Keywords

3-alkyl-2-methoxy-pyrazines, Cabernet sauvignon, , Grape, Irrigation, Plantation density, Wine.

Introduction

Trace amounts of 3-alkyl-2-methoxy-pyrazines (MPs) can be found in a wide range of The results indicate that irrigation increased significantly the contents of 3-isobutyl-2-methoxy-pyrazine. It also has been noticed that the average levels of this compound were higher in the samples from the vines with the highest plantation density.vegetables, like peas and bell peppers (1-2). These substances are important flavor compounds due to their extremely low sensory detection thresholds. 3-isobutyl-2-methoxy-pyrazine (IBMP) is perceptible at 0.5-2 ngL⁻¹ in water, synthetic wine and white wine; and at 10-16 ng L⁻¹ in red wine. 3-sec-butyl-2-methoxy-pyrazine (SBMP) can be detected by the human nose at 1 ng L⁻¹ in water. And the sensory detection threshold of 3-isopropyl-2-methoxy-pyrazine (IPMP) in water is 2 ng L⁻¹ (3-9). These three compounds have been associated with the green, herbaceous or vegetative aromas that are characteristic of Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sauvignon blanc and Merlot (6, 10-17). They can occur in berries and wines of these varieties at levels higher than their sensory detection thresholds and have an important impact on wine quality.

The 'vegetative' aromas found in red wines containing IBMP are generally considered as unfavourable to wine quality (6, 18). However, the presence of this compound at relatively high levels can be compatible with the high quality of red wines (19-20), as long as it is not too dominant and it is complemented with other aromas (6, 21).

Different grape cultivars have proven to contain diverse amounts of MPs, suggesting that these compounds can contribute to their varietal distinction. IBMP levels of Merlot samples were lower than Cabernet sauvignon wines of the same vintage (20). And important differences in MP contents in grapes between the varieties Cabernet sauvignon, Merlot, Semillon, Sauvignon blanc and Riesling have been reported (22). MPs are part of the characteristic aromas of the variety

Sauvignon blanc, together with other aromas, among which the sulfur-containing 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one and 3-mercapto-hexan-1-ol are also important contributors (23-24). Several reports on how viticultural factors may influence the MP contents in grapes and wines have been published (10, 17, 20-22). But information about how plantation density and irrigation can affect the amounts of these compounds in grapes and wines is rather scarce.

Climatic conditions over grape ripening, particularly at the unripe grape stage, may determine IBMP contents in final wines (22). A higher humidity in the pre-veraison month may result in higher IBMP contents in the grapes at harvest: a sunnier and less humid year led to lower IBMP amounts, whereas levels of this compound were clearly higher in the following year, which was marked by frequent rainfalls. The authors explained that the reconstitution of soil water reserves favoured the growth of the vine until harvest, which in turn increased the production and retention of IBMP (18).

It has been reported that there is an association between the 'vegetative' notes of wines and the deep, clay-rich soils that are nutrient rich and have a high water holding capacity. On the other hand, fruitier wines, richer in berry aromas were linked to shallow, sandy soils that are nutrient poor and have a lower water holding capacity. The authors attributed this difference to the fact that the first type of soils produce more vigorous canopies, which limit the sunlight exposure of the berry, whereas vines grown in the latter type of soils produce a wide open canopy, the fruits of which are better exposed to sunlight (25).

Cabernet sauvignon grapes from vineyards with different plantation densities and in soils with different compositions showed different evolution of IBMP contents throughout the grape ripening process (18). Unfortunately, the effect of soil could not be separated from the effect of plantation density, so that further research is needed to understand to what extent each factor contributes to the differences in MP contents.

Grape growers and winemakers are interested on knowing how viticultural factors may influence MP contents in grapes and how these compounds pass to final wines, in order for them to manage and obtain the maximum wine quality. With the aim of enlarging the data available on this field, the present article focuses on the study of how irrigation and plantation density may affect the contents and evolution of MPs in grapes and wines. Analysis were performed by means of two fast, cheap and convenient methods based on HS-SPME and GC-NPD we developed previously (26-27).

Experimental

All samples were produced and collected at the experimental fields and cellar of the *Facultat d'Enologia de Tarragona (Universitat Rovira i Virgili)* at Constantí (Tarragona) in 1998. The weather in the region (average June, July and August, respectively) was as follows: temperature: 20.6, 23.6 and 23.5°C; maximum temperature: 26.1, 29.2 and 29.9°C; minimum temperature: 15.2, 17.8 and 17.6°C; daily solar irradiation: 21.7, 22.6 and 17.2 MJ(m²)⁻¹; rainfall: 1.0, 3.5 and 35.0 L(m²)⁻¹.

Vines

This study was carried out with Cabernet sauvignon variety. Concretely, the used clone was the number 15 of Rauscedo that was planted on rootstock 110 Richter. All vines involved in this study are trained in a bilateral cordon (Cordon de Royat double) and trellised in a spalier system with three levels (60, 110 and 150 cm). After pruning the vines had 16 buds per plant.

Samples for the study of irrigation were collected from a vineyard that has a total of 480 plants and a plantation density of 2,500 plants per hectare (40,000 buds per hectare). The plot is divided in 16 sub-plots, each one containing 5 rows of 6 plants per row: 5 vines are Cabernet sauvignon, and the sixth one, of another variety, is used to prevent possible interferences between treatments. There are 4 groups of 4 subplots, alternatively distributed according to the Latin Square structure. They received 4 different irrigation treatments, though only the two extremes, non irrigated and irrigated, were used in this study. Irrigation was achieved by means of a trickle system. Irrigated vines received 6 L per hour for a total of 4 hours per week, during 6 weeks all through grape ripening.

Samples for the study of plantation density were collected from an experimental plot that has a total of 270 plants. It was not irrigated. The plot is divided in 9 sub-plots and there are 3 groups of 3 subplots, alternated according to the Latin Square structure, with the following plantation densities: 2,000, 3,000 and 4,000 plants per hectare (32,000, 48,000 and 64,000 buds per hectare).

Sampling

In order to obtain random samples and not to repeat the same vine in the different sampling times, a mark was put every 5 vines of each vineyard. The first sample was collected only from the marked vines. The second sample was collected from the vine immediately next to the marked vine. The third to fifth samples were collected from the plants on the third to fifth places after the marked vine.

Grapes for sampling were also randomly selected within the vine, so that a homogeneous distribution between more and less exposed to sunshine was ensured.

3 berries of each grape were collected up to a total of about 100. They were randomly sampled, taking one from the top, one from the bottom, and one from the middle of the cluster. Special care was taken in order to obtain a good distribution between berries from inside and outside the grape. Three replicates of each kind of sample were collected in all cases.

First sample was taken at veraison and the last one at harvest. Three intermediate samples were collected throughout grape ripening. After removing the bunchstems, grapes were manually pressed at the laboratory and 1g L⁻¹ of NaF was added to the grape juice to preserve it. Samples were kept in dark bottles at -20°C until analysis. Classical red winemaking was followed in all types of samples. Musts were fermented in pilot-scale tanks. Sampling times over winemaking were the following: musts after one day of maceration, end of alcoholic fermentation and final wines at the end of malolactic fermentation. Three replicates of each sample were taken and analysed in all cases, each sample belonging to a different fermentation tank. Fermented samples were preserved with SO₂ and kept in dark bottles at 4°C until analysis.

Analytical Procedures

Analysis of samples was performed according to the previously published HS-SPME procedures (26-27). Every determination was made by duplicate. Chromatographic analysis was performed with a Hewlett Packard 5890 II gas chromatograph equipped with a Nitrogen-Phosphorous Detector (NPD). Injection (splitless, 1 min) was performed with an inlet of 0.75 mm ID and at 250°C. The analytical column was a CP-WAX 57 CB (50 m x 0.25 mm id, 0.2 µm film thickness). Carrier gas was high purity helium flowing at 0.8 mLmin⁻¹. Oven temperature was 30°C (1 min), 25°Cmin⁻¹ to 100°C (20 min). 3-isopropyl-2-ethoxy-pyrazine was used as internal standard, and was provided by Pyrazine Specialties (Atlanta, Georgia), its purity was above 97%. SPME device and Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (65 µm) fibres used in this study were purchased from Supelco (Bellefonte, USA). Each fibre was conditioned before use as well as cleaned after use by inserting them into a GC injector at 260°C a minimum of 5 min. They were immediately used to prevent contamination. Results were statistically analysed by means of two-factor ANOVA and Fisher test (p=0.05 for both).

Statistics

All the data are expressed as the arithmetic average ± standard deviation from three replicates. Two-factor ANOVA and Fisher test were carried out using Statview (28).

Results

MP contents in experimental musts and wines are shown in Tables 1 to 7. Figures 1 and 2 show several typical chromatograms obtained with the grape juices and wines analysed. IBMP, SBMP and IPMP were identified. 3-ethyl-2-methoxy-pyrazine was found in some samples, but its contents were usually below quantification limits. Generally, IBMP was the most abundant MP and concentrations of SBMP were higher than IPMP contents. IBMP levels decrease significantly throughout grape ripening in all monitored plots, so that the lowest concentrations are reached at harvest. The process of

alcoholic fermentation/maceration with the solid parts of the berries raised the IBMP contents in all samples analysed, particularly within the first day of maceration (Tables 2 and 6).

At veraison, samples from irrigated and non irrigated vines did not show important differences on IBMP contents (Table 1). This is logical because veraison took place only few days after starting the irrigation treatment and therefore no differences were expected at this stage. Afterwards, in both kinds of grapes, levels of this compound dropped throughout grape ripening. However, the decrease in grapes from irrigated plants happened later. At harvest, IBMP contents were low in both cases, though only in the samples from irrigated vines they were high enough to be determined.

Finally, wines from irrigated vines contained significantly higher levels of IBMP (Table 2). Similarly, SBMP contents in grapes from irrigated vines were significantly higher (Table 3). And, though statistical analysis could not be performed for IPMP, the contents of this compound also tend to be higher in grapes from the irrigated plants (Table 4). The contents of SBMP and IPMP throughout winemaking are not presented because they were close or below quantification limits all through this process and none of these compounds were detected in final wines.

Table 1. IBMP contents (ng L⁻¹) throughout grape ripening. Irrigation effect.

		NON IRRIGATED		IRRIGATED	
	Date	Sugar (g/L)	IBMP (ng/L)	Sugar (g/L)	IBMP (ng/L)
VERAISON	08-11	133	34.2 (3.6) a	131	38.0 (6.4) A
RIPENING 1	08-24	160	16.1 (8.8) b	159	20.0 (8.4) B
RIPENING 2	09-03	182	5.6 (3.4) c	190	17.3 (7.2) B
RIPENING 3	09-10	192	4.4 (0.4) c	199	6.1 (3.3) C
HARVEST	09-16	207	*	206	3.9 (2.0) C

TWO-FACTOR ANOVA: Ripening p < 0.0001; Treatment p = 0.0306; Interaction p = 0.5538

*: below quantification limits. Values followed by a different letter are significantly different at the p < 0.05 level.

Table 2. IBMP contents (ng L⁻¹) throughout winemaking. Irrigation effect.

	NON IRRIGATED	IRRIGATED
HARVEST	*	3.9 (2.0) A
1 DAY MACER.	4.3 (1.9) a	6.1 (1.3) B
END ALC. FERM.	8.3 (3.3) a	13.1 (3.2) C
END MAL. FERM	9.6 (3.8) a	15.3 (4.1) C

TWO-FACTOR ANOVA: Winemaking p < 0.0001; Treatment p = 0.0067; Interaction p = 0.6477

*: below quantification limits. Values followed by a different letter are significantly different at the p < 0.05 level.

Table 3. SBMP contents (ng L⁻¹) throughout grape ripening. Irrigation effect.

		NON IRRIGATED		IRRIGATED	
	Date	Sugar (g/L)	SBMP (ng/L)	Sugar (g/L)	SBMP (ng/L)
VERAISON	08-11	133	4.9 (1.4) a	131	5.8 (2.4) A
RIPENING 1	08-24	160	2.6 (0.5) a	159	10.2 (4.7) AB
RIPENING 2	09-03	182	5.8 (2.9) a	190	16.1 (7.5) B
RIPENING 3	09-10	192	2.8 (1.3) a	199	4.6 (2.5) A
HARVEST	09-16	207	*	206	3.3 (1.1) A

TWO-FACTOR ANOVA: Ripening p 0.0035; Treatment p = 0.0015; Interaction p = 0.0908

*: below quantification limits. Values followed by a different letter are significantly different at the p < 0.05 level.

Table 4. IPMP contents (ng L⁻¹) throughout grape ripening. Irrigation effect.

		NON IRRIGATED		IRRIGATED	
	Date	Sugar (g/L)	IPMP (ng/L)	Sugar (g/L)	IPMP (ng/L)
VERAISON	08-11	133	2.6 (0.5) a	131	4.3 (0.9) A
RIPENING 1	08-24	160	*	159	4.9 (1.5) A
RIPENING 2	09-03	182	3.4 (1.2) a	190	15.0 (7.1) B
RIPENING 3	09-10	192	*	199	2.7 (0.6) A
HARVEST	09-16	207	*	206	*

TWO-FACTOR ANOVA: Ripening p 0.0035; Treatment p = 0.0015; Interaction p = 0.0908

*: below quantification limits. Values followed by a different letter are significantly different at the p < 0.05 level. Results could not be analysed by means of two-factor ANOVA test due to the lack of data above quantification limits.

Over grape ripening, contents of IBMP and SBMP were significantly higher in samples from vines with the highest plantation density (Tables 5 and 7). Levels of SBMP were low over grape ripening and did not show any clear increase or decrease, except that at the harvest they were below quantification levels in all cases (Table 7). IBMP contents raised during winemaking (Table 6), but not the levels of SBMP or IPMP, which remained close or below quantification limits until the end of the process. Final wines made with grapes from the highest plantation density vines contained significantly higher contents of IBMP (Table 6). IPMP levels were between 2.8 and 5.9 (with no significant differences over the process) in samples from vines with a plantation density of 4,000 plants per hectare throughout winemaking. However, they were below quantification limits in samples from both 3,000 and 2,000 plants per hectare vines.

Table 5. IBMP contents (ng L⁻¹) throughout grape ripening. Effect of Plantation density (plants per hectare).

Date	2,000		3,000		4,000	
	Sugar (g/L)	IBMP (ng/L)	Sugar (g/L)	IBMP (ng/L)	Sugar (g/L)	IBMP (ng/L)
VERAISON 08-12	128	32.4 (7.4) a	129	28.0 (7.5) A	129	42.5 (8.6) α
RIPENING 1 08-26	162	10.9 (3.8) b	158	13.7 (5.8) B	163	15.6 (5.3) β
RIPENING 2 09-05	185	5.7 (2.9) c	192	7.4 (6.3) BC	189	10.7 (3.3) β
RIPENING 3 09-10	201	5.8 (2.3) c	199	4.0 (2.0) C	199	7.0 (2.9) β
HARVEST 09-17	216	*	214	*	218	2.6 (0.4) γ

TWO-FACTOR ANOVA: Ripening p < 0.0001; Treatment p = 0.0267; Interaction p = 0.4084

	2,000	3,000
3,000	0.8468	-
4,000	0.0237	0.0153

*: below quantification limits. Values followed by a different letter are significantly different at the p < 0.05 level.

Table 6. IBMP contents (ng L⁻¹) throughout winemaking. Effect of Plantation density (plants per hectare).

	2,000	3,000	4,000
HARVEST	*	*	2.6 (0.4) α
1 DAY MACER.	6.7 (3.4) a	6.4 (0.9) A	9.5 (3.6) β
END ALC. FERM.	11.6 (3.9) a	10.8 (3.2) B	14.8 (3.2) βγ
END MAL. FERM	9.8 (3.4) a	9.9 (2.9) B	15.5 (2.4) γ

TWO-FACTOR ANOVA: Winemaking p = 0.0341; Treatment p = 0.0463; Interaction p = 0.953

	2,000	3,000
3,000	0.9196	-
4,000	0.0279	0.0347

*: below quantification limits. Values followed by a different letter are significantly different at the p < 0.05 level.

Discussion and conclusions

Concentrations of IBMP in final wines (4.6-15.5 ng L⁻¹) (Tables 2 and 6) match the literature: it has been reported that red wines contain 3.6-56.3 ng L⁻¹ of this compound (6, 11, 20). The fact that IBMP contents are generally higher than the levels of both SBMP and IBMP can also be found in the literature (3, 11, 15-17). SBMP and IPMP contents in final wines, close or below quantification limits, also agree with the reported studies: 0.05-1.9 (11) and 0.92-10.1 ng L⁻¹ (12), respectively, in red wines.

Table 7. SBMP contents (ng L⁻¹) throughout grape ripening. Effect of Plantation density (plants per hectare).

Date	2,000		3,000		4,000	
	Sugar (g/L)	SBMP (ng/L)	Sugar (g/L)	SBMP (ng/L)	Sugar (g/L)	SBMP (ng/L)
VERAISON 08-12	128	4.3 (1.3) a	129	4.0 (2.0) A	129	7.4 (3.1) α
RIPENING 1 08-26	162	2.5 (0.3) a	158	4.9 (2.1) A	163	4.6 (2.2) α
RIPENING 2 09-05	185	3.0 (0.6) a	192	4.1 (0.9) A	189	6.4 (1.6) α
RIPENING 3 09-10	201	3.9 (1.2) a	199	3.5 (2.0) A	199	3.6 (1.4) α
HARVEST 09-17	216	*	214	*	218	*

TWO-FACTOR ANOVA: Ripening p = 0.0634; Treatment p = 0.0457; Interaction p = 0.3861

	2,000	3,000
3,000	0.3346	-
4,000	0.0142	0.1097

*: below quantification limits. Values followed by a different letter are significantly different at the p < 0.05 level.

Taking into account the sensory thresholds mentioned in the introduction, results reveal that IBMP is the MP more likely to have an influence in the flavour of the final wines. Our findings agree with previous studies (12, 20, 22). Therefore, in terms of sensory impact, this compound can be considered the most important methoxypyrazine in the studied Cabernet sauvignon samples.

The decrease of IBMP contents over grape ripening (Tables 1 and 5) agree with the literature (16, 17, 20-21). Results also show that such decrease happens mainly at the first stage of the ripening process, as reported (10, 17, 26-27). This means that MP contents in final wines can be determined by the harvest date. Therefore, the analytical quantification of MPs in grapes, together with a further knowledge on how MPs pass to wines, may be useful to determine the suitable grape maturity conditions for producing high quality wines.

References to the observed raise in IBMP contents throughout winemaking (Tables 2 and 6) can also be found on the literature (29). However, not observe major changes in MP concentrations were observed after racking. As discussed in a previous work (27), all these results point to the hypothesis that MPs pass to the juice during the winemaking process because they are partly located at the skins, seeds and stems of the fruits (16, 20, 22, 30). The raise in MP contents happens mainly the first day after destemming and crushing the grapes, before starting the alcoholic fermentation. Therefore, it is probable that the highest contact between skin/seeds/stems and juice after crushing the grapes is what accelerates the pass of MPs from the solid parts to the musts. On account to this, it is possible that the duration of maceration may influence the levels of MPs in the final wines (20).

The observed delay in the drop of IBMP levels of the grapes belonging to the irrigated plants (Table 1) can be due to the fact that these fruits ripen at a slightly slower rhythm, though they reach the harvest with the same sugar level. Plantation density seems to be a factor that can condition IBMP levels in grapes and wines (Tables 5 and 6), since it has been observed that averages show a tendency to be significantly higher in samples from vines with the highest plantation density in all cases. Finally, considering the sensory detection threshold of IBMP (6), samples from irrigated vines and also from vines with a higher plantation density are more likely to have the characteristic 'vegetative' flavour.

Acknowledgement

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

Literature cited

1. Maga JA, Pyrazine update. *Food Rev Int* 8: 479-558 (1992).
2. Murray KE and Whitfield FB, The Occurrence of 3-Alkyl-2-Methoxy-pyrazines in Raw Vegetables. *J Sci Food Agric* 26: 973-986 (1975).
3. Allen MS, Lacey MJ, Harris RLN and Brown WV, Contribution of Methoxy-pyrazines to Sauvignon blanc Wine Aroma. *Am J Enol Vitic* 42: 109-112 (1991).
4. Buttery RG, Seifert RM, Lundin R E, Guadagni DG and Ling LC, Characterisation of an important aroma component of bell peppers. *Chem Ind* 04: 490-491 (1969).
5. Buttery RG, Seifert RM, Guadagni DG and Ling LC, Characterization of Some Volatile Constituents of Bell Peppers. *J Agric Food Chem* 17: 1322-1327 (1969).
6. Kotseridis Y, Anocibar Beloqui A, Bertrand A and Doazan JP, An Analytical Method for Studying the Volatile Compounds of Merlot noir Clone Wines. *Am J Enol Vitic* 49: 44-48 (1998).
7. Maga JA, Sensory and stability properties of added methoxy-pyrazines to model and authentic wines. In *Flavours and Off-Flavours*, Proceedings of the 6th International Flavor Conference, Charalambous, G Elsevier, Amsterdam, pp 61-70 (1990).
8. Murray KE, Shipton J and Whitfield FB, 2-Methoxy-pyrazines and the flavour of green peas (*Pisum sativum*). *Chem Ind* 07: 897-898 (1970).
9. Seifert RM, Buttery RG, Guadagni DG, Black DR and Harris JG, Synthesis of Some 2-Methoxy-3-Alkyl-pyrazines with Strong Bell Pepper-Like Odors. *J Agric Food Chem* 18: 246-249 (1970).
10. Allen MS and Lacey MJ, Methoxy-pyrazine grape flavour: influence of climate, cultivar and viticulture. *Wein-Wissenschaft* 48: 211-213 (1993).
11. Allen MS, Lacey MJ and Boyd S, Determination of Methoxy-pyrazines in Red Wines by Stable Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 42: 1734-1738 (1994).
12. Allen MS, Lacey MJ, and Boyd S, Methoxy-pyrazines in red wines: occurrence of 2-methoxy-3-(1-methylethyl) pyrazine. *J Agric Food Chem* 43: 769-772 (1995).
13. Augustyn OPH, Rapp A and Wyk J, Some Volatile Aroma Components of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc. *S Afr J Enol Vitic* 3: 53-60 (1982).
14. Bayonove C, Cordonnier R and 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* 281 (D): 75-78 (1975).
15. Harris RLN, Lacey MJ, Brown WV and Allen MS, Determination of 2-methoxy-3-alkyl-pyrazines in wine by gas chromatography / mass spectrometry. *Vitis* 26: 201-207 (1987).
16. Hashizume K and Umeda N, Methoxy-pyrazine content of Japanese red wines. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 802-805 (1996).
17. Lacey MJ, Allen MS, Harris RLN and Brown WV, Methoxy-pyrazines in Sauvignon blanc Grapes and Wines. *Am J Enol Vitic* 42: 103-108 (1991).
18. Roujou-de-Boubee D, Leeuwen C Van and 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* 48: 4830-4834 (2000).
19. Allen MS, What level of methoxy-pyrazines is desired in red wines? The flavour perspective of the classic red wines of Bordeaux. *Austr Grapegr Winem* 381: 7-9 (1995).
20. Kotseridis Y, Anocibar-Beloqui A, Bayonove C, Baumes RL and Bertrand A, Effects of selected viticultural and enological factors on levels of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in wines. *J Int Sci Vigne Vin* 33: 19-23 (1999).
21. Marais J, Sauvignon blanc cultivar aroma - a review. *S Afr J Enol Vitic* 15: 41-45 (1994).
22. Hashizume K and Samuta T, Grape maturity and light exposure affect berry methoxy-pyrazines concentration. *Am J Enol Vitic* 50: 194-198 (1999).
23. Schneider R, Kotseridis Y, Ray J-L, Augier C and Baumes R, Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels Development and application of a stable isotope dilution assay. *J Agric Food Chem* 51: 3243-3248 (2003).
24. Tominaga T, Guimbertau G and Dubordieu D, Contribution of benzenemethanethiol to smoky aroma of certain *Vitis vinifera* L wines. *J Agric Food Chem* 51: 1373-1376 (2003).
25. Noble AC, Elliott-Fisk DL and Allen MS, Vegetative flavor and methoxy-pyrazines in Cabernet Sauvignon. *Fruit Flavors* 596: 226-234 (1995).
26. Sala C, Mestres M, Martí MP, Busto O and Guasch J, Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxy-pyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. *J Chromatogr A* 880: 93-99 (2000).
27. Sala C, Mestres M, Martí MP, Busto O and Guasch J, Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxy-pyrazines in wines. *J Chromatogr A* 953: 1-6 (2002).
28. Haycock K, Roth J, Gagnon J, Finzer WF and Soper C, Statview 4.0, ABACUS Concepts, Inc., Berkeley, California (1992).
29. Allen MS, Commercial support for methoxy-pyrazine flavour research. *Austr Grapegr Winem* 366: 22-23 (1994).
30. Roujou de Boubee D, Cumsille AM, Pons M and Dubordieu D, Location of 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet sauvignon grape bunches and its extractability during vinification. *Am J Enol Vitic* 53:1-5 (2002).

Com s'ha comentat, el principal repte per a l'estudi de les 3-alkil-2-metoxipirazines (MPs) en mostos i vins és el nivell extremadament baix en què s'hi poden trobar, de l'ordre de ng/L. El seu estudi en aquest rang és de gran interès degut a que els seus llindars de percepció sensorial són del mateix ordre i també pel fet que el seu impacte en l'aroma del producte final en pot condicionar la qualitat. La determinació d'aquests compostos en mostos i vins és metodològicament difícil, ja que es troben en aquestes quantitats tan baixes dins una matriu molt complexa. Els treballs desenvolupats i presentats en aquesta memòria volen ser una petita contribució a aquest camp de recerca, ja que, amb aquests, s'ha avançat en la línia d'obtenció de mètodes de quantificació de les MPs en mostos i vins i també s'ha progressat en el coneixement de com diferents factors vitícoles i enològics poden determinar-ne els continguts finals al vi. La possibilitat de conèixer amb precisió els continguts de MPs en raïm, most i vi, i poder fer-ne un seguiment durant el procés de maduració del raïm i d'elaboració del vi és d'un gran interès per als productors. En efecte, aquesta informació els podria ajudar a optimitzar la qualitat del vi des de l'inici de la producció del raïm i durant tot el procés d'elaboració del vi. A continuació es presenten les principals conclusions derivades del treball que s'ha exposat.

DETERMINACIÓ ANALÍTICA

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.

TRACTAMENT DE LA MOSTRA

Límits de detecció

2. En condicions òptimes, els límits de detecció del detector de nitrògen-fòsfor (NPD) per injecció directa d'una solució de MPs són de 0,1-0,2 ng/mL.

3. Donat que 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 amb detecció per NPD requereix un mètode amb factor de concentració de 10.000 o superior.

Extracció líquid líquid

4. La determinació de nivells de l'ordre de 10 ng/L de MPs en vins negres es pot aconseguir mitjançant 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. Ara bé, al cromatograma hi pot aparèixer una interferència molt propera al pic de la 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP).

Destil·lació

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.

MICRO-EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA DE L'ESPAI DE CAP

Sensibilitat i selectivitat

6. La tècnica de la microextracció en fase sòlida de l'espai de cap resulta especialment idònia per a l'anàlisi de les MPs en most i vi per GC-NPD, ja que proporciona una sensibilitat 10.000 vegades més gran que la injecció directa, així com una excel·lent neteja d'interferències.

Patró intern

7. 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 MPs en mostos i vins.

Mètode per a mostos

8. 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.

9. 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.

Mètode per a vins

10. 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.

11. 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.

CONTINGUTS EN MOSTOS I VINS

12. A tots els tipus de mostres estudiats s'hi ha identificat la IBMP, la 3-*sec*-butil-2-metoxipirazina (SBMP) i la 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP). En general, els continguts de la primera són més alts que els de la segona, els quals són més alts que els de la darrera. La 3-etil-2-metoxipirazina s'ha identificat en algunes mostres, però els seus continguts són sota els límits de quantificació.

13. La IBMP és la metoxipirazina de major interès enològic ja que s'ha trobat en totes les mostres de raïms, mostos i vins en què s'han identificat metoxipirazines a concentracions més altes que les altres i probablement és la que té més impacte sensorial al vi.

14. Els continguts d'IBMP quantificats en raïm oscil·len entre 2,6 i 42,5, mentre que els nivells d'aquest compost en vi final són d'entre 4,6 i 15,5. Mentre que la variabilitat trobada entre mostres de raïm és deguda als diferents estadis de maduració del raïm, la del vi és deguda als diferents tractaments realitzats.

15. Els continguts de SBMP i d'IPMP quantificats en raïm oscil·len, respectivament, entre 2,8 i 18,2; i entre 2,6 i 15,0. Igual que en el cas de la IBMP, aquesta variabilitat és deguda a l'estadi de maduració del raïm.

FACTORS QUE PODEN AFECTAR ELS CONTINGUTS

Estadi de maduració del raïm

16. La concentració d'IBMP disminueix progressivament i ràpidament amb la maduresa del raïm. Aquesta disminució es produeix principalment als estadis inicials de maduració i arriba a les concentracions més baixes a la verema.

Exposició del raïm a la llum del sol

17. Els continguts mitjans d'IBMP trobats als vins procedents de les vinyes emparrades són significativament més alts que els de les vinyes podades en vas. Aquests vins tenen més probabilitat de presentar l'aroma típica de la IBMP que els vins procedents de vinyes en vas.

18. La protecció 'artificial' de la llum del sol (aconseguida embolcallant el raïm amb una peça d'arpillera) pot resultar en un nivell significativament més baix d'IBMP als vins finals.

Irrigació

19. Les vinyes regades poden produir raïms i vins amb un nivell d'IBMP significativament més elevat que les vinyes no regades.

Densitat de plantació

20. Les vinyes amb una densitat de plantació més elevada, de 4.000 plantes per hectàrea, poden donar lloc a vins amb continguts significativament més alts d'IBMP que les vinyes de 3.000 o 2.000 plantes per hectàrea.

Maceració i fermentació

21. La concentració d'IBMP en mostos incrementa molt després d'un dia de maceració, probablement degut a l'extracció d'aquest compost de les parts sòlides del raïm.

22. Els continguts d'aquesta pirazina incrementen al llarg de la fermentació alcohòlica, però no pas després del descubart.

23. Durant la fermentació malolàctica no s'han observat canvis significatius als nivells d'aquest compost.

PERSPECTIVES DE FUTUR

Cal assenyalar que resten molts camps de recerca per desenvolupar, ja que el coneixement de la influència de les MPs en la qualitat del vi, així com els factors que poden determinar els seus continguts i evolució en raïm i vi, es troba encara en una fase molt preliminar de coneixement. Des de la perspectiva del present treball, els principals camps de coneixement que es poden assenyalar com a possibles futures línies de recerca són els següents:

- Aplicació del procediment de SPME a la determinació dels nivells de metoxipirazines en pell i rapa del raïm.
- Determinació dels llindars de percepció sensorial i les descripcions olfactives de les metoxipirazines estudiades en diferents tipus de vins, emprant mètodes comparables i donant detalls precisos respecte del pannell i els procediments emprats.
- Continguts i influència en l'aroma de les MPs en diferents varietats de *Vitis vinifera*.
- Estudi de la rotació de les metoxipirazines al raïm deguda a la seva dinàmica de síntesi i destrucció.
- Aprofundiment en l'anàlisi de la influència de les pràctiques vitícoles en els nivells de MPs: nutrició, disponibilitat d'aigua, vigor de la vinya, ombra de la canòpia, exposició a la llum del sol, maduració del raïm, anyada, regió i sòl.
- Estudi de com els diferents procediments d'elaboració del vi poden condicionar els nivells de metoxipirazines al producte final: moment de la verema, intensitat de premsada, freqüència de remuntats per dia i durada de la maceració.



Per quina sendera pujarem al cim?
Quina deessa serà propícia al cant?
Vivim tan lluny de la claredat lunar
malgrat que la mar la proclama i la venera.
¿Serà la nostra impietat cercar la bellesa
en el vi, en el foc o en la conversa?

Àngel Terron
Professor de química i poeta.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Bioquímica i Biotecnologia

TESI DOCTORAL



**3-ALQUIL-2-METOXIPIRAZINES EN
MOSTOS I VINS: DETERMINACIÓ
ANALÍTICA I ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA
D'ALGUNS FACTORS VITIVINÍCOLES**

Cristina Sala Camps



*Fruit de la vinya
i del treball de l'home...*



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Departament de Bioquímica i Biotecnologia

TESI DOCTORAL

**3-ALQUIL-2-METOXIPRAZINES EN MOSTOS I VINS:
DETERMINACIÓ ANALÍTICA I ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA
D'ALGUNS FACTORS VITIVINÍCOLES**

Cristina Sala Camps



Les 3-alquil-2-metoxipirazines (MPs) es troben en moltes plantes, entre les quals hi ha *Vitis vinifera*. Les més importants pel que fa a la seva presència i potencial influència en l'aroma del vi són la 3-isobutil-, la 3-sec-butil- i la 3-isopropil-metoxipirazina. Aquests compostos es troben entre les aromes varietals del Cabernet sauvignon, però també del Merlot noir, el Sauvignon blanc i el Cabernet franc, entre d'altres. El caràcter 'vegetal' que aporten als vins es considera generalment un factor de baixa qualitat, sobretot en vins negres, ja que s'associa a la manca de maduresa del raïm al moment de la verema. El seguiment dels continguts d'aquests compostos en raïm, most i vi durant la maduració del raïm i l'elaboració del vi és d'un gran interès per als productors, ja que els podria permetre ajustar la poda, l'exposició del raïm al sol, el nivell de premsat, el temps de maceració i fins i tot el cupatge dels vins per tal d'obtenir un producte final de la màxima qualitat.

Cal no subestimar el repte de determinar les MPs en mostos i vins, ja que aquests compostos es troben en matrius molt complexes a nivells d'ultra-traça (ng/L). Malgrat aquests continguts tan baixos, aquests compostos poden influir en l'aroma i la qualitat del vi perquè els seus llindars de percepció sensorial són al mateix nivell i conseqüentment la seva anàlisi resulta d'interès enològic. Per tant, la identificació i quantificació de MPs en mostos i vins requereix tècniques molt sensibles i selectives i alhora una gran capacitat de concentració.

L'objectiu fonamental del treball que aquí es presenta ha estat el desenvolupament d'un mètode basat en la cromatografia de gasos amb detector de nitrògen-fòsfor per tal de poder quantificar les MPs d'interès enològic en mostos i en vins. Una vegada establert aquest mètode, s'ha fet un seguiment dels nivells d'aquests compostos durant la maduració del raïm i l'elaboració del vi. Finalment, s'ha estudiat la possible influència de certes condicions de creixement i maduració del raïm en els continguts de MPs en raïms i vins: exposició a la llum solar, irrigació, poda i conducció de la vinya, i densitat de plantació.

PUBLICACIONS

Autors: Sala, C.; Fort, F.; Busto, O.; Zamora, F.; Arola, Ll.; Guasch, J.
Títol: Fate of Some Common Pesticides During Vinification Process
Revista: 001723 - Journal of Agricultural and Food Chemistry
Volum: 44 **Número:** 11 **Pàgines, inicial:** 3668 **final:** 3671 **Any:** 1996

Autors: Sala, C.; Busto, O.; Arola, Ll.; Guasch, J.
Títol: Analysis of methoxypyrazines in wines by GC
Llibre: In Vino Analytica Scientia
Volum: --- **Número:** --- **Pàgines, inicial:** 329 **final:** 332 **Any:** 1997

Autors: Sala, C.; Busto, O.; Guasch Torres, J.
Títol: Quick capillary gas chromatographic method for determining usual pesticides in musts and wines
Revista: 102904 - Chromatographia
Volum: 44 **Número:** --- **Pàgines, inicial:** 320 **final:** 324 **Any:** 1997

Autors: Mestres, M.; Sala, C.; Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J.
Títol: Headspace solid-phase microextraction of sulphides and disulphides using Carboxen-polidimethylsiloxane fibers in the analysis of wine aroma
Revista: 105262 - Journal of Chromatography A
Volum: 835 **Número:** --- **Pàgines, inicial:** 137 **final:** 144 **Any:** 1999

Autors: Fort, F.; Sala, C.; Busto, O.; Arola, L.; Bordons, A.; Guasch, J.; Zamora, F.
Títol: Presenza di pesticide in vinificazione ed inibizione della fermentazione alcolica
Revista: 003379 - Vignevini
Volum: --- **Número:** 7/8 **Pàgines, inicial:** 42 **final:** 44 **Any:** 1999

Autors: Sala, C.; Busto, O.; Arola, Ll.; Guasch, J.
Títol: Determinación de metoxipirazinas en vinos por GC. Estudio de la extracción previa
Llibre: GIE. Jornadas científicas'97. Carmelo García Barroso (ed). Encuentros UCA.
Volum: 1 **Número:** --- **Pàgines, inicial:** 339 **final:** 345 **Any:** 1999

Autors: Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J.
Títol: Headspace Solid-phase Microextraction Method for Determining 3-alkyl-2- methoxypyrazines in Musts by means of Polydimethyl-siloxane/divinylbenzene Fibres
Revista: 105262 - Journal of Chromatography A
Volum: 880 **Número:** --- **Pàgines, inicial:** 93 **final:** 99 **Any:** 2000

Autors: Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J.
Títol: Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxy- pyrazines in wines
Revista: 105262 - Journal of Chromatography A
Volum: --- **Número:** 105 **Pàgines, inicial:** 262 **final:** 267 **Any:** 2002

Autors: Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J.; Zamora, F.
Títol: Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the Vitis vinifera variety Cabernet sauvignon
Revista: 001723 - Journal of Agricultural and Food Chemistry
Volum: --- **Número:** 52 **Pàgines, inicial:** 3492 **final:** 3497 **Any:** 2004
