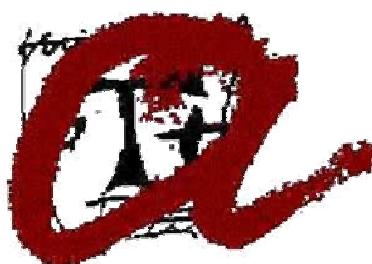


UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química Analítica i Química Orgànica



Tesi Doctoral

**ESTUDI DE L'APLICACIÓ DEL NAS ELECTRÒNIC I DE LA
CROMATOGRÀFIA DE GASOS-OLFACTIMETRIA A
L'ANÀLISI DE L'AROMA DE VINS I AIGUARDENTS**

M. PILAR MARTÍ BORRÀS

Tarragona, 2005



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química Analítica i Química Orgànica

**ESTUDI DE L'APLICACIÓ DEL NAS ELECTRÒNIC I DE LA
CROMATOGRÀFIA DE GASOS-OLFACTIMETRIA A
L'ANÀLISI DE L'AROMA DE VINS I AIGUARDENTS**

Memòria presentada per

M. PILAR MARTÍ BORRÀS

per assolir el grau de Doctora per la

Universitat Rovira i Virgili

Tarragona, maig de 2005



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA
I QUÍMICA ORGÀNICA

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: "ESTUDI DE L'APLICACIÓ DEL NAS ELECTRÒNIC I DE LA CROMATOGRÀFIA DE GASOS-OLFACTIMETRIA A L'ANÀLISI DE L'AROMA DE VINS I AIGUARDENTS", ha estat realitzat per Na MARIA PILAR MARTÍ BORRÀS, 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 per ella realitzades.

Tarragona, 9 de maig de 2005

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.

En gairebé totes les fites que ens proposem al llarg de la nostra vida és tant important, o més, el camí que hem de recórrer per arribar fins a elles, com el fet d'assolir-les. Quan vaig emprendre la meua tesi doctoral ho vaig fer amb molta il·lusió i entusiasme, els quals he anat mantenint durant tots aquests anys. No obstant això, el recorregut no ha estat fàcil. Hi ha hagut també moments difícils i, fins i tot, moments de desesperació, que sense el suport incondicional de la meua família m'haguessin costat molt de superar. És per això que, en primer lloc, vull agrair-los a tots ells, sobretot als meus pares, al meu germà, a l'Àgata i, de manera molt especial, al Jordi, el seu recolzament i la seva confiança, ja que sempre han cregut més en mi que no pas jo mateixa.

Una bona part de tot allò que he après al llarg d'aquest temps ho deo als meus directors de tesi, el Dr. Josep Guasch i la Dra. Olga Busto. A ells els agraeixo de tot cor la confiança que han dipositat en mi així com el tracte tan cordial que sempre m'han ofert i que ha fet, en nombroses ocasions, que el camí fos més planer.

Però hi ha hagut més gent que m'ha brindat el seu ajut i la seva amistat durant el recorregut.

Un d'ells és el Dr. Ricard Boqué el qual no ha escatimat esforços en guiar-me pel món de la quimiometria. A ell li agraeixo tot el temps i el treball que ha dedicat a aquesta tesi.

La Cristina Sala i la Montse Mestres, amb les qui he passat molts bons moments "sniffant" (cal llegir el capítol III d'aquesta memòria per entendre el sentit de la paraula). A totes dues els agraeixo tot el que m'han ensenyat i, especialment a la Montse, el seu ajut en una part important del treball realitzat en aquesta tesi.

Els companys actuals del laboratori, el Marc, la Sandra i la Susanna, i els altres que han anat passant durant tot aquest temps, com la Montse Miracle, la Dolores, l'Èlia i la Núria, dels quals no me'n puc oblidar per les petjades que han deixat en el meu camí.

Els companys del Grup de Quimiometria i Qualimetria, sobretot el Jaume, el Jordi, el Joan, el Javi, el Santi, la Mari i l'Àlicia. També els del Departament de Bioquímica, especialment els doctorands i, entre ells, el Josep Valls.

No em puc oblidar tampoc de totes les persones de la Facultat d'Enologia, que van fer que l'antic convent de les Clarisses fos quelcom més que un edifici on s'hi anava a treballar.

Bona part del treball realitzat no s'hagués pogut dur a terme sense la col·laboració d'alguns cellers i de diferents Consells Reguladors de Denominacions d'Origen que, de manera desinteressada, ens van subministrar un gran nombre de vins per als estudis amb el nas electrònic. És per això que vull agrair la col·laboració del Sr. Josep Ribes del Consell Regulador de la D.O. Penedès; del Sr. Jaume Guasch del Consell Regulador de la D.O. Catalunya; del Sr. Salustia Álvarez del Consell Regulador de la D.O.Q. Priorat; dels responsables i tècnics del Consell Regulador de la D.O. Ribera del Duero, particularment del Sr. Alfonso J. Sánchez i del Sr. Agustín Alonso; dels cellers Dehesa de los Canónigos, Emilio Moro, Real Sitio de Ventosilla i Marqués de Velilla aollits a la D.O. Ribera del Duero; i dels cellers C.V.N.E. i Granja de Nuestra Señora de Remelluri (particularment a la seva endòloga la Sra. Ana Barrón) aollits a la D.O.Q. Rioja.

A tots ells, GRÀCIES!

Als meus pares

ÍNDEX

Objectius	1
Capítol I	7
I.1 Presentació	9
I.2 Bibliografia	16
Capítol II. L'aroma del vi i dels aiguardents	17
II.1 L'aroma	19
II.1.1 Relació estructura-olor	21
II.1.2 Llindar sensorial	22
II.1.3 Dimensió de les olors	24
II.1.4 Compostos amb caràcter impacte	25
II.1.5 Classificació de les olors	26
II.2 L'aroma del vi	29
II.2.1 Classificació segons l'origen dels compostos	30
II.2.2 Classificació segons la funció dels compostos	32
II.2.3 Composició de l'aroma del vi	34
II.2.4 Defectes aromàtics	47
II.3 L'aroma dels aiguardents	51
II.3.1 L'aroma del rom	53
II.4 Anàlisi de l'aroma	57
II.4.1 L'anàlisi sensorial	58
II.4.2 L'anàlisi instrumental	59
II.4.2.1 Tècniques de pretractament	59
II.4.2.2 La cromatografia de gasos	65
II.4.2.3 La GCO	66
II.4.2.4 El nas electrònic	67
II.5 Bibliografia	69

Capítol III. Anàlisi de l'aroma mitjançant la cromatografia de gasos	75
III.1 Anàlisi dels èsters de l'aroma mitjançant SPME-GC-FID	79
III.1.1 La microextracció en fase sòlida	80
III.1.2 Aplicació de l'SPME a l'anàlisi dels èsters de l'aroma del vi	90
III.1.2.1 Materials i mètodes	90
III.1.2.2 Optimització de les variables d'extracció	94
III.1.2.3 Determinació dels paràmetres de qualitat analítica del mètode	101
III.1.3 Aplicació de l'SPME a l'anàlisi dels èsters de l'aroma del rom	107
* <i>Headspace solid-phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma</i>	113
III.2 Anàlisi de l'aroma del vi mitjançant la GCO	123
III.2.1 La GCO	123
III.2.1.1 Les tècniques olfactimètriques	125
III.2.1.2 Discussió sobre l'aplicació de la GCO	137
III.2.1.3 La GCO en l'anàlisi de l'aroma del vi	139
III.2.2 Caracterització de l'aroma de diferents vins monovarietals mitjançant la GCO	149
III.2.2.1 Materials i mètodes	149
III.2.2.2 Resultats i discussió	153
III.2.3 Desenvolupament d'una nova modalitat de l'AEDA mitjançant SPME-GCO i aplicació a la caracterització d'un vi negre de Garnatxa	161
III.2.3.1 Desenvolupament del mètode d'extracció	162
III.2.3.2 Determinació de la potència aromàtica dels compostos olorosos	164
III.2.3.3 Determinació dels valors d'aroma (OAVs)	167
* <i>Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Olfactometry Analysis of Serially Diluted Wine Samples. A New Approach to Characterize Wine Aroma</i>	175
III.3 Bibliografia	183

Capítol IV. Anàlisi de l'aroma mitjançant el nas electrònic	197
IV.1 El nas electrònic	203
IV.1.1 L'instrument	205
IV.1.1.1 Sistema de mostreig	206
IV.1.1.2 Sistema de detecció	206
IV.1.1.3 Sistema de tractament de dades	215
IV.1.2 Aplicació a l'anàlisi de begudes alcohòliques	232
<i>*Electronic noses in the quality control of alcoholic beverages</i>	239
IV.2 Estudi del potencial del nas electrònic en el control de qualitat del vi	251
IV.2.1 Materials i mètodes	252
IV.2.2 Optimització de variables	256
IV.2.3 Aplicació a la diferenciació de vins segons diversos paràmetres enològics	259
IV.2.3.1 Diferenciació de vins segons l'origen	260
IV.2.3.2 Diferenciació de vins segons la varietat del raïm	264
IV.2.3.3 Diferenciació de vins i brandis segons el temps d'envelliment	273
IV.2.4 Aplicació al control de la vinificació i la maduració del raïm	282
IV.2.4.1 Control del procés de vinificació	283
IV.2.4.2 Control de la maduració dels raïms	287
<i>*Application of a headspace-mass spectrometry (HS-MS) system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing</i>	295
IV.3 Aplicació del nas electrònic a la determinació del 2,4,6-tricloroanisole (TCA) en el vi	305
IV.3.1 Determinació de TCA mitjançant HS-MS	308
<i>*Fast screening method for determining 2,4,6-trichloroanisole in wines using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) system and multivariate calibration</i>	321
IV.3.2 Determinació de TCA mitjançant HS-SPME-MS	329

IV.4 Aplicació del nas electrònic a l'anàlisi d'aiguardents de canya de sucre	339
IV.4.1 Determinació del temps d'envelliment dels aiguardents en bótes de fusta de roure	340
<i>*Determination of aging time of spirits in oak barrels using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) electronic nose system and multivariate calibration</i>	347
IV.4.2 Predicció de les intensitats aromàtiques avaluades per un panel de tastadors en l'anàlisi dels aiguardents	359
<i>*Modeling human sensory panels with an electronic nose. Application to sensory analysis of sugar cane spirits</i>	371
IV.5 Bibliografia	387
Conclusions	395

OBJECTIUS

L'aroma és un factor de qualitat de la majoria dels aliments, ja que en depèn, en gran mesura, que el consumidor accepti o rebutgi el producte. En el vi, i en les begudes alcohòliques en general, esdevé, però, un dels factors més importants, ja que aquests productes no es consumeixen pel seu valor nutritiu, sinó pel plaer que en proporciona la degustació.

L'anàlisi de l'aroma del vi és una tasca complicada a causa de la gran complexitat de la seva composició. Les tècniques cromatogràfiques amb detectors químics, ja siguin universals o específics, permeten conèixer quins compostos componen la fracció volàtil del vi i en quines concentracions s'hi troben. Aquesta informació, no obstant això, no és suficient quan l'objectiu és determinar quins compostos, d'entre tots els volàtils, contribueixen realment a l'aroma. El perfil aromàtic d'un vi no queda reflectit amb el perfil cromatogràfic de la seva fracció volàtil, ja que en aquest últim hi poden aparèixer, per exemple, pics que corresponen a compostos que no fan olor o, el cas contrari, regions cromatogràfiques en què no s'hi detecta cap pic, però en les quals, hi elueixen compostos amb gran intensitat aromàtica. És per aquest motiu que, per poder determinar el perfil aromàtic d'un vi, cal recórrer a la cromatografia de gasos amb detecció olfactimètrica (GCO), una eina imprescindible en la caracterització de l'aroma dels aliments que utilitza el nas humà com a detector cromatogràfic.

La injecció directa del vi al cromatògraf de gasos tan sols permet determinar els compostos volàtils majoritaris. A més, aquesta és poc recomanable perquè, dins de l'injector, es pot produir la piròlisi de compostos no volàtils de la matriu, la qual pot generar artefactes susceptibles d'interferir en la determinació. Per tant, abans de l'anàlisi cromatogràfica, cal aïllar els compostos volàtils de la matriu i concentrar-los. Aquest primer pas de pretractament de la mostra és l'etapa més crítica de tot el procés analític, que requereix encara un gran esforç dels investigadors de l'aroma per millorar-lo. Són diverses les tècniques que s'han

utilitzat per obtenir aquest extracte aromàtic del vi. La microextracció en fase sòlida (SPME) és una tècnica relativament nova, que ofereix avantatges importants respecte d'altres més clàssiques com l'extracció líquid-líquid, una de les més utilitzades.

Quan l'anàlisi de l'aroma va dirigit al control de qualitat del producte, sovint les tècniques cromatogràfiques presenten limitacions importants pel que fa a la interpretació de les percepcions que es reben durant la degustació. Els instruments coneguts com a "nassos electrònics" es van desenvolupar amb la finalitat d'imitar el nas humà en el control de qualitat que, des de temps immemorials, s'ha dut a terme mitjançant l'anàlisi sensorial. En l'anàlisi de les begudes alcohòliques, però, aquests instruments han estat poc utilitzats. Això és degut als problemes de saturació que causa l'elevat contingut d'etanol als sensors de gasos que conformen la majoria d'aquests instruments. La recent aparició al mercat d'un nou tipus de nas electrònic basat en l'espectrometria de masses, que és una tècnica prou consolidada com a detector cromatogràfic i molt utilitzada per identificar els compostos volàtils del vi, obre un nou camp d'aplicació d'aquests instruments al control de qualitat de les begudes alcohòliques ja que, a priori, l'etanol no suposa una limitació per a l'ús de l'instrument.

En el plantejament d'aquesta tesi doctoral es va establir com a objectiu l'estudi i la caracterització de l'aroma del vi. Amb aquest objectiu tan general, i a partir de les premisses citades, es va plantejar treballar amb la cromatografia de gasos amb detecció olfactimètrica i amb el nas electrònic, dues tècniques que analitzen aspectes diferents de l'aroma, però que totes dues proporcionen informació valuosa. A la vegada, però, també es va plantejar treballar en la millora del pretractament de la mostra amb l'aplicació de la microextracció en fase sòlida, una tècnica que ja havia donat molt bons resultats en altres treballs realitzats en el grup d'investigació en el qual s'ha desenvolupat aquesta tesi.

Els objectius concrets que es pretenien assolir amb l'aplicació d'aquestes tècniques a l'anàlisi de l'aroma del vi van ser els següents:

Cromatografia de gasos-olfactimetria

1. Posar a punt la cromatografia de gasos amb detecció olfactimètrica per a l'anàlisi de vins al laboratori de recerca on s'ha dut a terme aquesta tesi, ja que aquesta tècnica no hi havia estat mai utilitzada.
2. Comprovar l'efectivitat de la tècnica de la microextracció en fase sòlida per obtenir extractes representatius de l'aroma del vi aptes per caracteritzar-la mitjançant la cromatografia de gasos amb detecció olfactimètrica.

Nas electrònic

3. Estudiar l'aplicació del nas electrònic basat en l'espectrometria de masses a diferents aspectes relacionats amb la determinació de la qualitat aromàtica del vi, com poden ser el control de qualitat a partir de diferents paràmetres enològics (varietat, origen, edat...), el seguiment i control del procés de vinificació, el seguiment del procés de maduració dels raïms i la determinació de compostos amb un impacte sensorial important, com els defectes aromàtics no desitjats.

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral, el grup de Química Analítica Enològica i dels Aliments va dur a terme un projecte en col·laboració amb l'*Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia* (IIIA) de Cuba, dins del qual es van realitzar algunes aplicacions de les tècniques estudiades a l'anàlisi de roms i aiguardents de canya de sucre. És per això que, tot i que en els objectius plantejats a l'inici la mostra per estudiar era el vi, durant el desenvolupament de la tesi es van dur a terme estudis amb aquestes altres begudes alcohòliques.

CAPÍTOL I

I.1 PRESENTACIÓ

El nostre coneixement del món exterior depèn, en gran mesura, dels nostres cinc sentits. Tot i que els humans, actualment, confiem principalment en la vista i l'oïda per a la nostra supervivència, el nostre llegat sensorial primari és el gust i l'olfacte. Aquests dos sentits són els més primitius dels sistemes sensorials, amb una història evolutiva de 500 milions d'anys [1]. Sens dubte, doncs, el gust i l'olfacte estan relacionats amb els requeriments bàsics de l'organisme: l'alimentació, per a preservar-lo, i la reproducció, per preservar l'espècie. Actualment, però, aquests dos sentits estan més relacionats amb el plaer que no pas amb la supervivència.

Segons els antropòlegs, l'olfacte deixa de ser vital per a l'home en el moment en què aquest es converteix en Homo erectus i s'allunya del terra. A partir d'aleshores la percepció del món passa a ser fonamentalment visual [2]. El fet de no saber parlar d'olors n'és la lògica conseqüència, ja que la percepció d'aquestes ha deixat de ser vital per a la nostra supervivència i, per tant, no hem tingut la necessitat de crear-ne un vocabulari. Així doncs, quan parlem d'una olor hem d'anomenar els objectes que fan aquella olor (olor de rosa, olor de maduixa, etc.) o referir-nos a sensacions que no són olfactivas (olors dolces, fresques, etc.), mentre que per referir-nos a la sensació del color el procés mental d'abstracció ens permet tenir una paraula específica per a cadascun. Malgrat tot, en l'estadi evolutiu en què ens trobem, l'olfacte no ha perdut cap dels trets fonamentals que l'han convertit en el sentit més fi, de la mateixa manera que les sensacions olfactivas continuen sent les més suggeridores.

Els consumidors formem un mercat cada vegada més exigent des d'un punt de vista organolèptic i som més coneixedors d'aspectes com la nutrició, la salut o el medi ambient. No obstant això, totes aquestes característiques no tenen perquè anar juntes en un mateix aliment. Aliments valuosos des del punt de vista nutritiu poden tenir qualitats sensorials pobres, o a l'inrevés, aliments poc recomanables

per a la salut poden ser un autèntic plaer per als sentits. Avui en dia, la indústria alimentària té molt en compte les característiques sensorials dels seus productes, ja que aquestes juguen un paper molt important en l'actitud del consumidor. En el cas del vi aquestes característiques sensorials adquireixen una rellevància especial. El vi es consumeix, fonamentalment, per al gaudiment dels sentits, per la qual cosa totes les operacions que es duen a terme, des del cultiu de la vinya fins a l'obtenció del producte final al celler, incideixen en l'aspecte sensorial.

El vi forma part d'un patrimoni molt antic, amb un origen que es confon amb els mateixos orígens de la nostra civilització. Són arrels que no es poden separar de la nostra història, pertanyem a la civilització de la vinya. De ben segur, l'home prehistòric ja sabia elaborar el vi, ja que els paleontòlegs han trobat fòssils que semblen restes de brisa o de raïm premsat. Els escrits humans més antics, inclosos les taules d'argila cuneïformes de Babilònia o els papirs de l'antic Egipte, fan nombroses referències al fruit fermentat del cep. Grecs i romans difonien al mateix temps la filosofia i el cultiu de la vinya i el plaer de les arts amb el plaer del vi [3].

El vi ha evolucionat al mateix temps que la nostra civilització, tant en qüestió de gustos com de tècnica. La qualitat del vi que l'home ha anat produint al llarg de la història segurament seria qualificada de mediocre pels exigents paladars d'avui en dia. Cal tenir en compte que els romans i els grecs afegien al vi productes com la resina, la brea o algunes espècies per conservar-lo, així com també per millorar-ne el gust, ja que, en general, eren vins enrancits o avinagrats. Fins al segle XIX, gairebé tots els vins que es consumien eren sempre de l'any, a causa de les dificultats per conservar-los. Tan sols en algunes anyades, i en circumstàncies excepcionals, es produïen algunes bótes de bon vi que, si era embotellat en bones condicions, es podia conservar durant algun temps [3, 4]. Amb Pasteur es pot dir que nasqué l'enologia moderna, la qual combina la biologia i la química aplicades a l'estudi del vi. El vi d'avui no es fa als laboratoris, però hi és estudiat i analitzat, i s'hi examinen les mesures necessàries per prevenir-ne les malalties i els accidents,

així com també per millorar-ne la qualitat. Una bona part d'aquesta qualitat ve determinada per la seva aroma, una de les principals responsables del plaer que proporciona la degustació del vi als nostres sentits.

L'anàlisi de l'aroma del vi no és un problema senzill de resoldre si es consideren els centenars de compostos volàtils que poden intervenir en la seva configuració aromàtica i els baixos nivells de concentració en què es troben molts d'ells. Existeixen, però, diverses tècniques analítiques que, malgrat les seves limitacions, proporcionen informació valuosa i complementària sobre diferents aspectes de l'aroma.

Per una banda, hi ha les tècniques que ens aporten informació sobre la composició de l'aroma, és a dir, quins són els compostos químics que l'integren i en quines concentracions es troben. Les tècniques cromatogràfiques, principalment la cromatografia de gasos, són les que s'utilitzen amb aquesta finalitat. Els importants avenços que hi ha hagut en el desenvolupament de columnes cromatogràfiques, capaces de separar mescles complexes de compostos volàtils, així com també de sistemes de detecció, ja siguin universals (cal destacar el d'espectrometria de masses) o específics, amb una gran selectivitat i sensibilitat, han permès identificar la gran majoria dels compostos volàtils del vi. Actualment, doncs, la problemàtica de l'anàlisi no radica en el sistema cromatogràfic en si, sinó en el pas previ d'obtenció de l'extracte aromàtic. El pretractament de la mostra continua sent encara avui en dia un handicap per als investigadors de l'aroma. Tot i les millores que s'han anat efectuant en els mètodes clàssics d'extracció i de concentració dels compostos volàtils i les noves tècniques de pretractament que s'han desenvolupat, no existeix encara un mètode idoni per a l'obtenció d'un extracte aromàtic del vi.

Una tècnica cromatogràfica en l'estudi de l'aroma que cal destacar és la cromatografia de gasos amb detecció olfactimètrica (GCO). Aquesta tècnica, que utilitza el nas humà com a detector cromatogràfic, permet identificar, d'entre tots els compostos volàtils de la mostra, aquells que presenten olor i que, per tant, són

susceptibles de participar en l'aroma. A més, s'han desenvolupat metodologies que permeten quantificar la importància aromàtica dels diferents compostos olorosos, és a dir, permeten conèixer la contribució de l'olor de cada compost individual a l'aroma global del vi. La GCO és, doncs, una eina imprescindible en l'estudi de l'aroma ja que permet centrar-nos en els compostos olorosos, que són els que realment interessen a l'hora de caracteritzar l'aroma.

A part de les tècniques cromatogràfiques, n' existeixen unes altres enfocades no a l'anàlisi de la composició química de l'aroma, sinó a una anàlisi global d'aquesta. Una d'aquestes tècniques és l'anàlisi sensorial mitjançant un panel de tastadors, la qual ha estat utilitzada des de temps immemorials per avaluar la qualitat dels vins. Mitjançant l'anàlisi sensorial, els tastadors experts en poden arribar a conèixer la zona on s'ha elaborat, l'edat aproximada, les varietats de raïm emprades, els possibles defectes aromàtics que en devaluen la qualitat, etc. Però aquest procés de degustació, d'apreciació de les qualitats organolèptiques i de descripció del vi, té un component afectiu i subjectiu elevat a causa de les emocions i dels records que els estímuls olfactivs desperten en els tastadors. A més, el temps que requereix aquesta tècnica és llarg si es té en compte que els tastadors poden realitzar poques anàlisis al dia, a causa de la fatiga que causa la degustació, la qual es tradueix en una pèrdua de sensibilitat sensorial. Tota aquesta problemàtica inherent a l'anàlisi sensorial ha generat el desenvolupament d'instruments que permetin dur a terme el control de qualitat, de manera similar a com ho fa un panel de tastadors, però amb objectivitat i rapidesa. Aquests instruments, coneguts com a *nassos electrònics*, no aporten informació de la composició química de l'aroma, sinó que en fan una anàlisi global, que permet la comparació dels perfils aromàtics de diferents mostres i, a partir d'aquí, construir models de classificació capaços de predir propietats d'interès en mostres futures (origen, edat, varietats...).

En el grup de Química Analítica Enològica i dels Aliments, on s'ha desenvolupat aquesta tesi doctoral, s'ha treballat en diverses línies de recerca dedicades a

l'anàlisi de l'aroma del vi i centrades en l'establiment de mètodes d'anàlisi de diferents famílies de compostos importants des del punt de vista de la seva contribució a l'aroma d'alguns vins. En el plantejament d'aquesta tesi, es va pensar en un treball d'investigació que versés, no en l'estudi d'uns compostos en concret, sinó en l'estudi i la caracterització de tota l'aroma mitjançant l'aplicació de dues tècniques molt importants en aquest àmbit: la GCO i el nas electrònic.

La memòria d'aquesta tesi doctoral consta de tres parts ben diferenciades, cadascuna de les quals constitueix un capítol. En el capítol II es presenta una visió general de la composició química de l'aroma del vi, així com també de les diferents tècniques que s'han emprat per analitzar-la. També es fa referència a l'aroma dels aiguardents perquè, tot i que la tesi està centrada principalment en l'aroma del vi, en el marc d'un projecte realitzat en col·laboració amb *l'Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia (IIIA)* de Cuba, també s'han dut a terme algunes aplicacions de les tècniques estudiades a l'anàlisi de roms i d'aiguardents de canya de sucre (producte a partir del qual s'obtenen els roms).

Els capítols III i IV, que versen sobre la GCO i el nas electrònic respectivament, constitueixen el cos de la memòria d'aquesta tesi, ja que és on es detalla tot el treball experimental dut a terme i es discuteixen els resultats obtinguts. Aquests dos capítols estan estructurats de manera que permeten incloure els articles científics derivats de l'experimentació realitzada. Tot i que no s'inclouen en aquesta memòria, part del treball realitzat amb el nas electrònic ha donat lloc també a diversos articles de caràcter divulgatiu que han estat publicats en revistes d'àmbit nacional [5-8].

Al capítol III es presenten els estudis realitzats amb tècniques cromatogràfiques. Aquest capítol es divideix en dues parts ben diferenciades. En la primera es presenta el mètode desenvolupat per determinar una família de compostos molt importants en l'aroma del vi, com són els èsters, utilitzant la microextracció en fase sòlida (SPME) per a l'extracció i la concentració d'aquesta família de compostos. En

un segon treball es va adaptar el mètode desenvolupat per a l'anàlisi dels èsters en el vi a l'anàlisi dels èsters del rom. A causa del gran ús que s'ha fet de l'SPME en aquesta tesi, en aquesta primera part del capítol III s'inclou un apartat en què es descriu el funcionament d'aquesta tècnica de pretractament de la mostra i les diferents variables que s'han de tenir en compte per obtenir una eficiència òptima en l'extracció dels compostos d'interès.

La segona part del capítol III està dedicada als treballs realitzats amb la GCO. En primer lloc, s'explica de forma detallada aquesta tècnica i totes les metodologies que s'han desenvolupat, basades en aquesta, per estimar la importància sensorial dels compostos olorosos. També s'inclou un recull bibliogràfic de les aplicacions d'aquesta tècnica a l'estudi de l'aroma del vi. Pel que fa a l'experimentació duta a terme amb la GCO, en primer lloc es presenten els estudis realitzats per tal de posar a punt la tècnica al laboratori de recerca en el qual s'ha desenvolupat aquesta tesi, ja que era la primera vegada que s'utilitzava. En segon lloc, es presenta el mètode desenvolupat per caracteritzar l'aroma del vi mitjançant la GCO, en el qual s'utilitza l'SPME per obtenir l'extracte aromàtic.

El capítol IV està dedicat al nas electrònic. S'hi presenten els resultats obtinguts en tota una sèrie d'estudis, l'objectiu dels quals era avaluar el potencial d'un nas electrònic basat en l'espectrometria de masses en l'anàlisi de begudes alcohòliques. Tot i que la majoria de les aplicacions s'han dut a terme amb vins, se n'han realitzat algunes amb aiguardents de canya de sucre i brandies. Aquest darrer capítol està dividit en quatre grans apartats. En el primer, que és teòric, s'explica el funcionament de la tècnica i es descriuen els diferents tipus d'instruments desenvolupats. En aquest apartat també s'inclou un recull bibliogràfic de les principals aplicacions del nas electrònic a l'anàlisi de begudes alcohòliques.

Els altres tres apartats corresponen a l'experimentació duta a terme. En el segon s'hi troben recollits tota una sèrie d'estudis en els quals s'ha avaluat el potencial d'aquesta tècnica en el control de la qualitat del vi. Amb aquest objectiu s'han dut a

terme diferenciacions de vins segons diversos paràmetres enològics, com són l'origen, la varietat o el temps d'envelliment. Aquest últim paràmetre s'ha estudiat també en Brandies de Jerez. Per altra banda, s'ha fet un seguiment de la maduració del raïm i del procés d'elaboració del vi per tal d'avaluar la capacitat d'aquesta tècnica en el control d'aquests dos processos.

En el tercer apartat es presenten els mètodes desenvolupats amb el nas electrònic i en els quals s'ha utilitzat el calibratge multivariant per a l'anàlisi quantitativa del 2,4,6-tricloroanisole, un compost que es troba en alguns vins a causa de contaminacions externes i que és el principal responsable del defecte aromàtic conegut com a "gust de suro". Els dos mètodes que s'hi detallen es diferencien en la tècnica utilitzada per extraure i concentrar el compost d'interès. Mentre que en el primer s'utilitza la tècnica de l'espai de cap estàtic, en el segon s'utilitza l'SPME.

En l'últim apartat del capítol IV s'hi troben les aplicacions dutes a terme amb el nas electrònic en el control de qualitat d'aiguardents de canya de sucre. En primer lloc es presenta un mètode desenvolupat per determinar el temps d'envelliment dels aiguardents en bótes de fusta de roure. En un segon treball s'estudia la correlació entre les dades obtingudes en l'anàlisi dels aiguardents amb el nas electrònic i les intensitats de diferents descriptors aromàtics, avaluades per un panel de tastadors, en una anàlisi sensorial de les mostres.

Finalment, a les últimes pàgines es recullen les principals conclusions a les quals s'ha arribat a partir dels resultats obtinguts durant l'experimentació. En aquestes conclusions, es plantegen noves qüestions que podrien donar origen a futurs treballs de recerca en aquest camp tan complex, i a la vegada fascinant, de l'anàlisi de l'aroma del vi.

I.2 BIBLIOGRAFIA

- [1]. C. Fisher, T. R. Scott (eds). *Flavores de los Alimentos. Biología y Química*. Acribia S.A., Zaragoza (1997)
- [2]. A. Vidal. *Olors i perfums*. *Diónyssos*, 2 (2002) 45-49
- [3]. M.A. Torres (ed). *La vinya i els vins*. Blume, Barcelona (1982)
- [4]. E. Peynaud, J. Blouin (eds). *El gusto del vino*. Mundi-Prensa, Madrid (1999)
- [5]. M.P. Martí, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. *Aplicación de la nariz electrónica en el control de calidad de vinos*. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 9 (2000) 129-133
- [6]. O. Busto, M.P. Martí, J. Guasch. *La nariz electrónica en el control de calidad de vinos. Nuevas aplicaciones*. *Tecnología del vino*, 5 (2002) 31-36
- [7]. M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch. *El nas electrònic: una eina d'anàlisi per a l'aroma del vi*. *Diónyssos*, 2 (2002) 56-61
- [8]. M.P. Martí, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. *El nas electrònic: una altra manera d'olorar els vins*. *Revista de la Societat Catalana de Química*, 4 (2003) 34-43

CAPÍTOL II

L'aroma del vi i dels aiguardents

II.1 L'AROMA

La flavor, des d'un punt de vista biològic, és la sensació produïda per un aliment quan aquest és ingerit. Aquesta propietat sensorial, juntament amb l'aspecte i la textura, és decisiva en l'elecció i acceptació d'un determinat aliment per part del consumidor. Encara que la flavor es percep principalment pels receptors de l'aroma i del gust que es troben al nas i a la boca respectivament, quan ingerim un aliment existeixen altres sensacions de calor, picor o ardor que són rebudes pels receptors generals del dolor, tàctils i de temperatura, situats a la boca, al nas i als ulls. Així doncs, la flavor és deguda a les sensacions gustatives, olfactives i també trigeminals; aquestes últimes corresponen a la part del tacte referent a la sensació de dolor [1].

El gust està compost de quatre sensacions: salat, àcid, dolç i amarg. Tanmateix, alguns científics japonesos n'inclouen una quinta denominada *umami* ("gustós") que es pot atribuir al gust del glutamat. Les sensacions trigeminals són les que ens proporcionen els descriptors d'astringència, picor i fred. Tant les sensacions gustatives com les trigeminals tenen lloc pel contacte amb l'aliment dins a la boca, ja que la majoria de les substàncies que produeixen aquestes flavors són polars i solubles en la saliva.

En el cas de les sensacions olfactives, la interacció física entre el compost químic i el receptor corresponent té lloc a les vies nasals. Per tant, només les molècules que siguin suficientment volàtils per arribar als receptors olfactoris seran susceptibles de desencadenar les sensacions olfactives. Les molècules poden arribar a aquests receptors que es troben dins de les cavitats nasals per dues vies: entrant pels orificis nasals (via ortonasal) o bé a través de la boca quan ingerim l'aliment (via retronasal). Les sensacions olfactives, a diferència de les gustatives, són infinitament variades ja que el sentit de l'olfacte és capaç de distingir entre un gran nombre de compostos químics i, a més, en molt baixes concentracions.

L'olor és deguda a la interacció que té lloc dins de la cavitat nasal entre les molècules volàtils de la substància olorosa i les neurones olfactives primàries de l'epiteli olfatori (figura II.1).

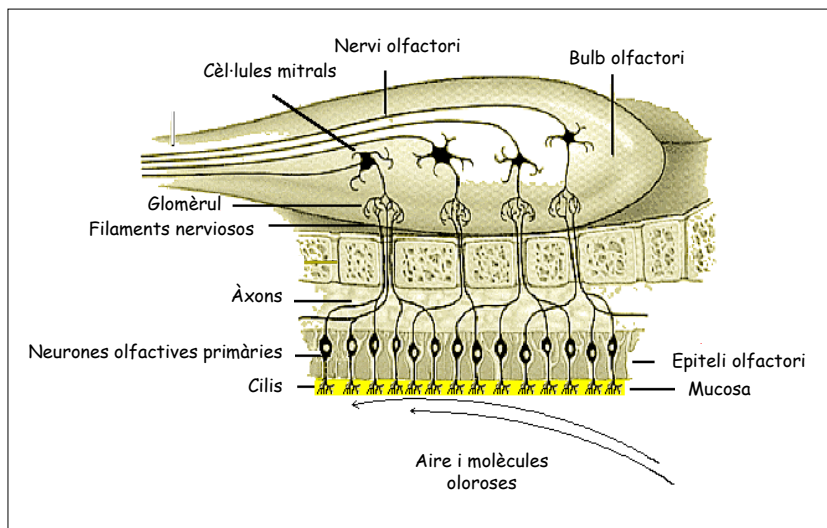


Figura II.1. Esquema del sistema olfatiu [2].

Tot i que aquestes cèl·lules nervioses pateixen moltes agressions pel fet que estan en contacte directe amb el medi extern, aquest fet no afecta l'olfacte, ja que, a diferència de les neurones del cervell, les neurones olfactives primàries es renoven constantment, aproximadament cada dos mesos. Aquestes cèl·lules tenen un cilí introduït dins la mucosa olfactiva, que és precisament on té lloc la interacció inicial entre el compost volàtil i el sistema nerviós, i a l'altre extrem, un axó projectat cap al bulb olfatori. Els punts de contacte entre les neurones sensorials primàries i les cèl·lules del bulb olfatori formen una sèrie d'estructures anomenades glomèruls que és el lloc on convergeix la informació procedent de totes les cèl·lules que perceben, al mateix temps, un compost volàtil. Així doncs, l'organització del sistema olfatiu es basa fonamentalment en un principi de convergència: l'activitat de totes les cèl·lules que porten la mateixa informació olfactiva convergeix en un

mateix punt, el glomèrul, i d'allí és enviada a altres parts del sistema nerviós central on és susceptible d'un processament més elaborat que té a veure amb els efectes emocionals i psicològics que ens produeixen algunes olors [2-4].

II.1.1 Relació estructura-olor

Com ja s'ha comentat, la percepció sensorial d'un compost volàtil requereix la seva interacció amb un receptor situat a les neurones olfactives primàries. Però, per tal que es produeixi aquesta interacció, el compost ha de tenir un grup funcional actiu anomenat grup osmòfor, a més a més d'unes determinades propietats moleculars pel que fa a la solubilitat amb l'aigua, la polaritat, la pressió de vapor i tenir una estereoquímica adequada. Aquestes característiques són necessàries perquè la molècula arribi a les fosses nasals, travessi la mucosa olfactiva que recobreix l'epiteli olfactori i es produeixi la interacció amb un receptor. Molts compostos olorosos són hidròfobs, la qual cosa fa pensar que la mucosa constitueix una barrera difícil de traspasar. La descoberta a finals del segle XX [5] de proteïnes OBP (*Odorant Binding Proteins*) en la mucosa olfactiva capaces de lligar molècules i transferir-les a les cèl·lules receptores, va suposar una autèntica revolució pel que fa a la comprensió de com funciona el sistema olfactiu i, a la vegada, va oferir una explicació a la possibilitat que les molècules poc solubles en la mucosa poguessin arribar fins als receptors [2, 4, 6]. S'han identificat més de 1000 proteïnes receptores, la qual cosa suposa la família més gran de proteïnes coneguda en els éssers vius i, a la vegada, la família més gran de gens (un 3% del genoma). Aquest descobriment ha fet mereixedors els seus autors, Linda Buck i Richard Axel, del premi Nobel en medicina de l'any 2004.

Utilitzant compostos alifàtics amb diferents longituds de cadena s'ha demostrat que hi ha una molt bona discriminació en la unió lligand-receptor, fins al punt que un sol receptor pot distingir entre compostos químics que tan sols es diferencien en un àtom de carboni en la llargada de la cadena alifàtica o entre compostos que

tenen la mateixa cadena carbonada i que es diferencien en el grup funcional. L'estructura de la molècula és tan important que fins i tot dues molècules enantiomèriques poden presentar olors diferents [3]. Aquest és el cas, per exemple, de l'àcid 2-metilbutíric, en el qual un dels enantiòmers presenta una olor agradable, que es descriu com afruitada i dolça, mentre que l'altre presenta una olor més aviat desagradable de formatge i suor [2].

II.1.2 Llindar sensorial

A més a més de les característiques estructurals que ha de tenir un compost perquè faci olor, caldrà que es produeixi la interacció d'un nombre suficient de molècules amb les neurones olfatives primàries perquè aquestes enviïn un senyal al cervell. Però aquest nombre necessari de molècules no és el mateix per a tots els compostos, ja que l'estimulació dels receptors olfactoris depèn del tipus de compost. Això fa que dos compostos amb la mateixa concentració puguin tenir intensitats aromàtiques diferents, per la qual cosa la importància d'un compost en l'aroma d'una substància no es pot conèixer determinant-ne simplement la concentració.

El llindar de percepció sensorial d'un determinat compost es defineix com el nivell de concentració més baix en el qual pot ser detectat. El nivell de concentració en què, a més a més de detectar-lo, se'n pot identificar l'olor es defineix com el llindar de reconeixement sensorial. Els dos valors depenen molt de la matriu on estigui el compost, ja que aquesta pot afectar en gran mesura la manera com la molècula olorosa arriba al nas. Per exemple, en matrius aquoses, com més apolar sigui una molècula volàtil, menys solubilitat i més pressió de vapor tindrà i, en conseqüència, es podrà inhalar més fàcilment. Un altre problema que es pot presentar en la detecció d'una determinada olor és la interacció del compost olorós amb altres compostos presents a la matriu. Si aquests potencien la capacitat de detectar l'olor s'anomenen sinergistes, mentre que si interfereixen en la detecció

s'anomenen antagonistes [1, 4]. En el vi, per exemple, s'han observat efectes sinèrgics entre l'acetat de propil i el propionat d'etil. Les olors que es perceben d'aquests dos compostos són més intenses quan estan junts en la mateixa solució que quan només n'hi ha un dels dos. Per altra banda, un cas d'antagonisme és el de l'acetat d'etil que, a partir d'un cert nivell de concentració, produeix efectes de supressió de les olors de l'acetat de propil i l'acetat de butil [7].

Un paràmetre relacionat amb els llindars sensorials és el valor d'aroma (OAV, *Odor Activity Value*), el qual es defineix com el quocient entre la concentració del compost i el seu llindar de percepció sensorial [8]. El valor d'aroma proporciona una estimació de la importància d'un compost individual en l'aroma total de la substància. Quan la concentració del compost sigui superior al seu llindar de percepció sensorial, és a dir, quan el valor d'aroma sigui superior a la unitat, el compost participarà en l'aroma d'aquella substància. No obstant això, els valors d'aroma s'han de considerar aproximacions en la quantificació de les intensitats aromàtiques, ja que en el seu càlcul no es consideren efectes sinèrgics o antagònics. Per altra banda, en el càlcul del valor d'aroma s'assumeix que hi ha una relació lineal entre la concentració d'un compost i la intensitat que se'n percep. Aquesta suposició, però, es contradiu amb una de les lleis fonamentals de la psicofísica (ciència que estudia les relacions entre estímuls i respostes) formulada per Stevens, la qual estableix que la variació de la intensitat amb la concentració d'un compost és exponencial. Això no obstant, encara que el valor d'aroma sigui un índex aproximat, ens indica d'una manera ràpida la importància sensorial d'un compost, i és la manera més senzilla d'avaluar i de transformar les dades de l'anàlisi quantitativa en informació sensorial [9].

II.1.3 Dimensió de les olors

Les tres dimensions principals de les olors són la intensitat, la qualitat i la tonalitat hedonista [10]. La intensitat, com ja s'ha comentat en l'apartat anterior, està relacionada amb la concentració i el llindar de percepció sensorial, mentre que la qualitat està relacionada amb el llindar de reconeixement. Quan la concentració superi aquest llindar, l'olor serà percebuda amb una certa qualitat que li conferirà la seva identitat. La qualitat de l'olor d'alguns compostos, però, varia amb la concentració i, per tant, es pot dir que aquests compostos tenen diversos llindars de reconeixement. Per exemple, l'(E)-2-nonenal, just per sobre del seu llindar de percepció (0.1 µg/L), fa olor de fusta; per damunt d'una concentració de 8 µg/L presenta una olor de grassa que es converteix en desagradable a 30 µg/L. I quan la concentració d'aquest compost sobrepassa d'1 mg/L, presenta una intensa olor de cogombre [1].

La tonalitat hedonista fa referència a la sensació que ens produeix l'olor, per exemple, si ens agrada o ens desagrada. Moltes vegades, però, la sensació que pot produir una olor va molt més lluny d'una simple sensació agradable o desagradable. L'olfacte és un sentit que alerta i també un sentit que produeix plaer. Ens informa sobre l'aire que respirem i sobre els aliments i begudes que consumim. Reaccionem davant d'olors repulsives que fins i tot ens poden arribar a produir nàusees com a mitjà de defensa davant de productes que poden ser perillosos per al nostre organisme. Per altra banda ens pot evocar a fets passats d'un gran contingut emocional. Amb tan sols una olor a vegades és possible revifar un record que creiem oblidat. Aquesta longevitat de la memòria olfactiva és una de les característiques que la distingeix d'altres sistemes sensorials com la vista o l'oïda. La memorització d'una olor va acompanyada del context en el qual és percebuda i això explica el fet que quan es rememora una olor es recupera també tot el context emocional en el qual s'havia percebut [11-14].

II.1.4 Compostos amb caràcter impacte

En alguns casos, l'aroma d'una substància és deguda a un compost, o a un petit nombre de compostos, els quals són anomenats "compostos clau" (*key substances*) o "compostos amb caràcter impacte" [1]. A la taula II.1 es mostren alguns exemples d'aquests compostos en una selecció d'aliments juntament amb el descriptor de l'olor del compost químic. Bàsicament, com es pot observar, l'olor del compost amb caràcter impacte és el que proporciona la identitat sensorial a l'aliment en qüestió.

Aliment	Compost	Descriptor
Ametlla	Benzaldehid	Ametlla amarga
Vainilla	Vainil·lina	Vainilla
Clau	Eugenol	Especiada, clau
Cogombre	2-(E)-6-(Z)-nonadienal	Cogombre
Col	Sulfur de dimetil	Col
Pera	2-(E)-4-(Z)-decaionat d'etil	Pera
Bolets	1-octen-3-ona	Xampinyó
Pebrot verd	2-isobutil-3-metoxipirazina	Pebrot verd

Taula II.1. Compostos amb caràcter impacte d'alguns aliments [1, 15].

En altres substàncies, però, l'aroma que percebem no es deu a uns pocs compostos sinó que és el resultat de la combinació de molts, on cadascun d'ells aporta la seva olor específica. En aquests casos ja no és adequat parlar de compostos impacte. A mode d'exemple, en la taula II.2 es mostren els compostos que més contribueixen a l'aroma del cafè verd. Alguns dels compostos tenen olors molt diferents (floral,

formatge, cogombre, etc.) però la conjunció de totes elles fa que quan olorem un gra de cafè verd en percebem l'olor característica.

Compost	Descriptor
3-isopropil-2-metoxipirazina	Pèsol
Metional	Patates bullides
(Z)-2-nonenal	Arbreda
3-isobutil-2-metoxipirazina	Pebrot
(E)-2-nonenal	Arbreda
Linalool	Floral
(Z,Z)-2,6-nonadienal	Cogombre
2-feniletanal	Rosa
Àcid 3-metilbutíric	Formatge
(E,E)-2,4-decanedial	Fregit
β -damascenona	Melmelada, floral

Taula II.2. Compostos de l'aroma del cafè verd [10].

II.1.5 Classificació de les olors

Sovint, quan percebem una olor no sabem explicar-la perquè no existeix un llenguatge que estigui ben codificat verbalment. Conceptes com camforàcia, mentolada, floral, afruitada, etc. defineixen olors considerades bàsiques. El problema, però, és que n'existeixen molt poques d'aquest tipus i cal recórrer a qualitats d'altres àmbits com són olor verda, fresca, dolça, càlida, etc. i molts més atributs que es fonamenten en les sensacions generades per comparació i que tenen una dosi de subjectivitat elevada.

La classificació, que és coneguda com “la roda de les aromes” per la seva representació gràfica (figura II.2), està organitzada en termes primaris, secundaris i terciaris. Els termes primaris són descriptors generals: olors afruitades, vegetals, de fruits secs, encaramel·lades, de fusta, de terra, químiques, picants, oxidades, microbiològiques, florals i especiades. Aquestes dotze categories estan a la vegada dividides en subcategories que corresponen als termes secundaris. A manera d'exemple, la categoria d'olors afruitades es desglossa en olors cítriques, de baies, de fruites d'arbre, de fruites tropicals, de fruites assecades i altres. Per a una major concreció hi ha un tercer nivell que correspon als termes terciaris. Així doncs, les olors secundàries del grup “fruites d'arbre” que es poden trobar en el vi són de cirera, d'albercoc, de préssec i de poma.

II.2 L'AROMA DEL VI

El vi és una substància complexa que requereix gairebé de tots els nostres sentits per poder apreciar-la. L'aparença visual inclou el color, la claredat, la transparència o la presència de llàgrimes a les parets de la copa. El tacte ens permet notar la sensació de temperatura quan ens introduïm el vi a la boca o també la sensació d'astringència (impressió de sequedat, rugositat i aspresa) deguda als tanins. El gust i l'olfacte, però, són els sentits que proporcionen més satisfacció en degustar el vi. Els compostos causants del gust dolç són els sucres, l'alcohol i el glicerol, mentre que els nombrosos àcids orgànics que hi ha al vi, entre els quals l'àcid tartàric és el majoritari, són els causants del gust àcid. La presència de sals minerals són les responsables del gust salat, tot i que aquest queda molt emmascarat pels altres gustos. Un lleuger gust amarg acompanyat d'una lleugera astringència és del tot necessari en els bons vins negres, no obstant això, si el gust amarg és intens llavors aquest es considera un defecte. Tot i la importància de les sensacions gustatives, ja que de l'equilibri dels quatre gustos elementals (dolç, salat, àcid i amarg) en depèn l'harmonia de la constitució del vi, les sensacions olfactives són la part més important de la flavor del vi ja que aquestes són infinitament més variades. L'olor del vi no és deguda a uns pocs compostos amb caràcter impacte, sinó que és el resultat de la combinació de les olors específiques que aporten una gran varietat de compostos.

L'aroma del vi està formada per centenars de compostos orgànics de diferent naturalesa química i de diferents característiques organolèptiques. Hi ha nombrosos factors i també una gran diversitat de mecanismes que incideixen directament en la formació de tots aquests compostos que conformen l'aroma del vi, com són: el metabolisme dels raïms, que depèn de la varietat, el sòl i els tractaments que s'hagin dut a terme a la vinya; els fenòmens bioquímics (oxidacions i hidròlisis) que tenen lloc abans de la fermentació i que es

desencadenen durant l'extracció del suc del raïm i la maceració; els metabolismes dels microorganismes responsables de la fermentació alcohòlica i malolàctica; reaccions químiques o enzimàtiques que tenen lloc després de la fermentació i durant la criaça del vi, ja sigui en bóta o en ampolla. La complexitat de l'aroma del vi i la dificultat del seu estudi són degudes, en gran part, a tota aquesta diversitat de factors que intervenen en la formació i que, d'alguna manera, queden reflectits en les diferents anyades.

II.2.1 Classificació segons l'origen dels compostos

Depenent de l'etapa del procés de vinificació en què es formen els compostos volàtils que constitueixen l'aroma del vi, aquesta es pot classificar en aroma primària, secundària o terciària [11, 18-21].

Aroma primària

L'aroma primària o varietal està constituïda pels compostos que es troben principalment a les pells del raïm i, en menor proporció, a la polpa. La seva composició depèn de la varietat del raïm, del sòl, del clima, dels tractaments fitosanitaris que s'hagin fet a la vinya i del procés d'elaboració del most. Alguns dels compostos passen inalterats al vi i li confereixen olors intenses i definides, mentre que altres es troben en el raïm en forma de precursors aromàtics. Aquests últims no són volàtils i, per tant, no poden contribuir a l'aroma del raïm, però durant la fermentació o l'envelliment del vi es poden produir reaccions de tipus químic o enzimàtic que transformin els precursors en compostos volàtils susceptibles de participar en l'aroma del vi. Per exemple, alguns alcohols monoterpènics es troben en el raïm en forma de glicòsids, és a dir, lligats a molècules de sucre. Durant la fermentació, però, es produeixen reaccions enzimàtiques en les quals es trenca l'enllaç entre el sucre i l'alcohol monoterpènic, i

aquest últim pot revelar la seva olor específica. Un altre cas és el dels norisoprenoides, com la β -damascenona o la β -ionona, que es formen en el procés d'elaboració del vi a partir de la degradació oxidativa dels carotenoides que s'han extret del raïm.

En els vins elaborats amb raïms de les varietats anomenades neutres (Garnatxa, Carinyena, Macabeu, etc.) la contribució dels compostos de l'aroma varietal a l'aroma del vi és molt petita, ja que aquests es troben en concentracions inferiors al seu llindar de percepció sensorial. Però en els vins elaborats amb raïms de les varietats anomenades aromàtiques, l'aroma primària és la que els dona el toc distintiu. Un exemple són els vins de Moscatell, Gewüztraminer o Riesling, en els quals els compostos terpènics són els responsables de l'aroma característica. O també el cas de les metoxipirazines en els vins de Cabernet sauvignon, que els confereixen les olors herbàcies i de pebrot verd característiques d'aquests vins.

Aroma secundària

L'aroma secundària o fermentativa està constituïda en gran part pels compostos que es formen durant la fermentació alcohòlica per l'acció dels llevats i que són els responsables del típic aroma dels vins neutres. D'alguna manera es pot dir que les olors que aporten aquests compostos, que majoritàriament són alcohols, èsters etílics, acetats i àcids grassos, constitueixen la base de l'aroma del vi. Altres fermentacions secundàries que es produeixen durant la vinificació també contribueixen a l'enriquiment de l'aroma. Una de les més importants és la fermentació malolàctica produïda per les bacteries làctiques. Aquesta fermentació, que té lloc principalment en els vins negres, constitueix una desacidificació biològica del vi i converteix l'àcid màlic en àcid làctic. A més a més de suavitzar, la fermentació malolàctica refina l'aroma dels vins joves i és per això que es considera la primera fase de maduració aromàtica dels vins destinats a envellir.

Aroma terciària

La formació de l'aroma terciària o postfermentativa s'inicia després de la fermentació, quan el vi es sotmet a un procés d'envelliment. Les reaccions químiques que es produeixen durant aquest procés converteixen l'aroma del vi en l'anomenat bouquet. Quan l'envelliment es fa en bótes de fusta es parla de bouquet d'oxidació, ja que aquestes són permeables a l'aire, mentre que si es fa en ampolles el tap de suro tapa hermèticament i no deixa que hi entri l'aire i, per tant, es parla de bouquet de reducció.

L'evolució de l'aroma després de la fermentació depèn de les condicions de vinificació, dels llevats, de les tècniques que s'hagin utilitzat en l'elaboració i de les condicions de conservació durant l'envelliment. En aquesta evolució es poden formar compostos nous, per exemple, aquells que s'extreuen de la fusta quan es duu a terme l'envelliment en bóta, com poden ser la vainil·lina o el siringoaldehid, que procedeixen dels productes de degradació de la lignina. Per altra banda, pot augmentar o disminuir la concentració de compostos que ja eren presents al vi. Els acetats, per exemple, són gradualment hidrolitzats durant el procés d'envelliment. Aquest fet és el causant de la pèrdua de l'aroma afruitat que caracteritza els vins joves, ja que els acetats hi tenen una contribució important. Altres compostos, com l'acetaldehid, el lactat d'etil o els èsters dietílics dels àcids succínic, màlic i tartàric, n'augmenten la concentració durant aquest procés. Aquests nombrosos canvis que poden tenir lloc en el vi durant l'envelliment poden afectar dràsticament l'aroma i, en conseqüència, la qualitat del vi.

II.2.2 Classificació segons la funció dels compostos

Una altra classificació possible dels compostos que constitueixen l'aroma del vi és segons la funció que hi desenvolupin. Les categories en què es poden incloure són les següents [22]:

Base de l'aroma

Aquesta categoria està formada per tots aquells compostos que són presents en tots els vins a uns nivells de concentració apreciables i que constitueixen el tronc de la percepció aromaticogustativa. Aquests compostos, que majoritàriament són produïts durant la fermentació alcohòlica, són els alcohols de fusel (isobutílic, isoamílic i fenilètilic) i els seus acetats, els àcids grassos (acètic, butíric, hexanoic, octanoic, isobutíric i isovalèric) i els seus èsters etílics, el metionol, l'acetaldehid, el diacetil i la β -damascenona.

Aroma subtil

Els compostos inclosos en aquesta categoria també es troben en tots els vins, però, a diferència dels anteriors, tan sols en algunes ocasions la seva concentració supera el llindar de percepció sensorial i genera unes notes aromàtiques característiques. Els fenols volàtils (guaiacol, vinilguaiacol, eugenol, etc.) en són un clar exemple, així com també els terpens en les varietats neutres.

Aroma impacte

Aquesta última categoria està formada pels compostos que només es troben en alguns vins determinats i en els quals el seu impacte sensorial és tan intens que fan que aquells vins es diferenciïn de la resta. Alguns exemples són el linalool, juntament amb altres terpens, que són els responsables de les característiques notes afruitades dels vins de Moscatell; la 4-mercapto-4-metilpentanona, que aporta una olor de ginesta als vins de Schereube i Sauvignon blanc; o les metoxipirazines en els vins de Cabernet sauvignon, que els confereixen les notes de pebrot verd, típiques d'aquests vins.

II.2.3 Composició de l'aroma del vi

A partir dels exemples mostrats en les diferents classificacions, ja s'ha pogut deduir que els compostos que conformen l'aroma del vi pertanyen a famílies químiques molt variades. Nombrosos investigadors han dedicat els seus esforços a identificar els compostos que es troben a la fracció volàtil del vi, així com també a conèixer-ne l'origen, tal com ho mostra la gran quantitat de publicacions que es troben en la bibliografia en forma de revisions [7, 19-21, 23-32].

En aquest apartat es presenta una descripció breu dels compostos més importants que constitueixen l'aroma del vi classificats segons la família química a la qual pertanyen. Mitjançant taules, s'indica l'olor que fan aquests compostos, la concentració en què es troben habitualment en el vi, així com també els seus límits de percepció sensorial, en vi o en una solució hidroalcohòlica. En alguns casos, el límit de percepció sensorial s'indica amb un interval perquè els valors trobats per diferents investigadors varien substancialment. La informació que es presenta a les taules no és un recull exhaustiu de totes les dades que apareixen a la bibliografia, sinó que tan sols pretén mostrar, de manera orientativa, l'impacte d'aquests compostos en l'aroma del vi.

Èsters

Els èsters són compostos majoritaris de l'aroma del vi produïts principalment en els processos fermentatius, en què tenen lloc esterificacions de naturalesa enzimàtica i, en menor proporció, en els processos d'envelliment, en què tenen lloc esterificacions de naturalesa química. Si tenim en compte que l'etanol és l'alcohol majoritari, els èsters etílics són el grup més abundant. L'altre grup important són els acetats, tot i que també s'hi poden trobar en petites quantitats èsters que són el resultat de la combinació d'àcids grassos, hidroxiàcids i cetoàcids amb alcohols de cadena llarga o poliols.

Compost	Descriptor	LPS (mg/L)	Concentració (mg/L)	
			Vi blanc	Vi negre
Acetat d'etil	Picant, pinya	160	30-160	10-250
Acetat de 2-feniletíl	Floral, mel	1.8	0-4	0.01-2
Acetat d'hexil	Poma, pera	0.7-2.4	0-1	0-0.8
Acetat d'isoamil	Plàtan	0.2	0.03-12	0-10
Butirat d'etil	Afruitada	0.02*	0.01-4	0.01-4
Decanoat d'etil	Afruitada	0.5	0-3	0-2
Hexanoat d'etil	Poma verda	0.08	0.02-2	0.02-2
2-metilbutirat d'etil	Afruitada	0.001-0.018*	0-0.05	0-1
3-metilbutirat d'etil	Afruitada	0.003*	0.01-0.06	0.01-0.11
Octanoat d'etil	Afruitada	0.6	0.05-5	0.05-3
Propanoat d'etil	Maduixa	1.8	0-2	0-10

Taula II.3. Exemples d'èsters que es troben en l'aroma del vi. Llindars de percepció sensorial (LPS) en el vi o en una solució hidroalcohòlica (*).

En la taula II.3 es presenten els èsters més importants que es troben a la fracció volàtil del vi. Tal com es pot observar, la contribució dels acetats i dels èsters etílics de cadena curta a l'aroma del vi és important, ja que, en molts casos, la concentració en què es troben és superior al seu llindar de percepció sensorial. Aquests compostos són els responsables de l'agradable olor afruitada dels vins joves de les varietats neutres.

Alcohols

Els alcohols són també compostos majoritaris de l'aroma del vi que, de la mateixa manera que els èsters, es formen principalment en el procés de fermentació. L'etanol, després de l'aigua, és el constituent quantitativament més important del vi. A part de la seva olor distintiva i dels seus efectes fisiològics en el sistema nerviós central, determina la viscositat (el cos), equilibra les sensacions gustatives i actua com un fixador de les olors. El metanol, tot i que es troba en quantitats relativament importants (entre 20 i 300 mg/L), no té incidències organolèptiques. Per altra banda, els alcohols de cadena més llarga, alguns dels quals es mostren a la taula II.4, sí que tenen una incidència important en l'aroma del vi, tot i que no són considerats factors de qualitat a causa de les olors desagradables que presenten alguns d'ells. Per sota dels 300 mg/L aquests compostos contribueixen positivament a la complexitat aromàtica del vi, mentre que, en concentracions superiors als 400 mg/L, poden convertir-se en un factor negatiu, és a dir, en un defecte de l'aroma.

Tot i que, com ja s'ha dit, els alcohols són majoritàriament produïts per l'acció dels llevats durant la fermentació alcohòlica, alguns d'ells ja són presents als raïms. Aquest és el cas dels hexanols i hexenols, que es troben dins dels teixits vegetals i són els responsables de les olors herbàcies característiques dels vins elaborats amb raïms poc madurs. Alguns alcohols també es poden formar per alteracions microbianes, ja sigui per l'acció de llevats o bacteris. Un exemple és la presència d'1-octen-3-ol en els vins elaborats amb raïms infectats pel fong *Botrytis cinerea*, als quals confereix la seva olor de bolet.

Compost	Descriptor	LPS (mg/L)	Concentració (mg/L)	
			Vi blanc	Vi negre
Butanol	Medicinal, dolça	150	1-5	1-2
2-feniletanol	Roses	25-200	20-180	20-130
Hexanol	Herbàcia	1.1-5.2	1-3	1.5-5
(E)-3-hexenol	Herbàcia	-	0-0.1	0-0.1
(Z)-3-hexenol	Herbàcia	0.4*	0.05-0.3	0.05-0.3
2-metil-1-butanol	Solvent, química	300-330	20-80	50-150
3-metil-1-butanol	Química, rànica	14.5	70-320	120-500
2-metil-1-propanol	Desagradable	75-500	30-170	45-140
Propanol	Química	306-750	10-50	10-50

Taula II.4. Exemples d'alcohols que es troben en l'aroma del vi. Llímits de percepció sensorial (LPS) en el vi o en una solució hidroalcohòlica (*).

Àcids

De tots els àcids orgànics presents en el vi, molt pocs són suficientment volàtils per poder contribuir a l'aroma, i els que podrien fer-ho generalment es troben en concentracions inferiors als seus límits de percepció sensorial (taula II.5). El constituent principal de l'acidesa volàtil del vi és l'àcid acètic. Aquest compost és produït pels llevats al començament de la fermentació alcohòlica i també pot augmentar lleugerament la seva concentració durant la fermentació malolàctica a causa de la descomposició de l'àcid cítric. Però, quan l'àcid acètic es troba en concentracions elevades (> 1 g/L), indica que hi ha hagut una intervenció dels bacteris acètics i, a aquests nivells de concentració, l'olor es considera un defecte important del vi que, juntament amb l'acetat d'etil, són els responsables del conegut "picat acètic".

Compost	Descriptor	LPS (mg/L)	Concentració (mg/L)	
			Vi blanc	Vi negre
Àcid acètic	Vinagre	200*	50-600	50-800
Àcid butanoic	Formatge, rànica	0.2-4*	1.5-4	0.5-5
Àcid decanoic	Greixosa, sabó	6	1-6	1-5
Àcid hexanoic	Rànica, afruitada	8	0.02-5.7	0.7-2.6
Àcid 3-metilbutanoic	Formatge, fecal	0.03-0.7*	0.5-5	0.5-5
Àcid 2-metilpropanoic	Mantega rànica	2.3-20*	0.1-6	1-6
Àcid octanoic	Greixosa, floral	10	1-10	1-10
Àcid propanoic	Rànica	8.1*	0.1-2	0.1-10

Taula II.5. Exemples d'àcids que es troben en l'aroma del vi. Llindars de percepció sensorial (LPS) en el vi o en una solució hidroalcohòlica (*).

Terpens

Els compostos terpènics, com ja s'ha comentat anteriorment, són els responsables de l'aroma floral característica dels vins de Moscatell i també d'altres vins elaborats amb varietats aromàtiques com són la Gewürztraminer, la Scheurebe i la Riesling. Encara que també es poden trobar compostos terpènics en els vins de les varietats neutres, la concentració d'aquests és generalment inferior al seu llindar de percepció sensorial i, per tant, no influeixen en l'aroma.

Una gran quantitat d'aquests compostos es troben als raïms, concretament a la pell. Mentre que alguns estan de forma lliure, altres estan en forma de precursors aromàtics i poden ser alliberats durant el procés de vinificació. En el procés de cria hi pot haver canvis en la concentració d'aquests compostos i, fins i tot, alguns es poden transformar en altres terpens. Per exemple, s'ha observat que la

concentració de linalool, geraniol i citronelol disminueix durant la criaça mentre que la d'òxid de linalool, òxid de nerol, HO-trienol, α -terpineol, hidroxilinalool i hidroxicitronelol augmenta. El fong *Botrytis cinerea* també pot modificar la composició monoterpènica, degradant els principals monoterpens i transformant-los en constituents menys olorosos.

Tot i que en el vi s'han identificat més de seixanta monoterpens, els més importants aromàticament són els alcohols monoterpènics que es mostren a la taula II.6.

Compost	Descriptor	LPS ($\mu\text{g/L}$)	Concentració ($\mu\text{g/L}$)	
			Vi blanc	Vi negre
Citronelol	Floral, dolça	0.03	0-30	0-5
Geraniol	Floral, afruitada	30*	0-500	0-10
Linalool	Floral, llimona	6	1-1000	0-10
Nerol	Floral, herbàcia	-	0-400	0-5
α -terpineol	Floral, medicinal	80	0-80	0-5

Taula II.6. Exemples d'alcohols monoterpènics que es troben en l'aroma del vi. Llindars de percepció sensorial (LPS) en el vi o en una solució hidroalcohòlica (*).

Lactones

En el vi s'hi poden trobar diverses lactones, però en la majoria dels casos la seva contribució a l'aroma no és important, ja que es troben en concentracions inferiors al seu llindar de percepció sensorial.

L'origen d'aquests compostos pot ser molt divers. Existeixen les lactones d'origen fermentatiu, entre les quals la més coneguda és la γ -butirolactona, que, tot i trobar-

se en concentracions importants, generalment no influeix en l'aroma del vi. Altres poden aparèixer durant l'envelliment en bótes de roure, com és el cas dels dos isòmers de la 3-metil- γ -octalactona, coneguda amb el nom de *whisky lactona* o *oak lactona*. Tot i que les quantitats que es troben dels dos isòmers són semblants, els seus llindars de percepció sensorial són molt diferents, fins al punt que la contribució a l'aroma de l'isòmer *cis* és negligible en la majoria dels casos.

La 4,5-dimetil-3-hidroxi-2(5H)-furanona, coneguda com a sotolon, es troba en concentracions superiors al seu llindar de percepció sensorial en vins elaborats amb raïms infectats per *Botrytis cinerea* i, juntament amb el 9-hidroxinonanoat d'etil, és el compost responsable de l'olor característica d'aquests vins. Per altra banda, aquest compost s'ha identificat també en els finos de Xerès, i s'ha vist que la seva olor, que es descriu com a dolça, especiada, curri i nous, contribueix de manera important a l'aroma d'aquests vins. Una altra lactona que es troba en quantitats relativament importants en els finos és la solerona (5-oxo-4-hexanolida), tot i que existeix controvèrsia sobre la seva participació en l'aroma d'aquests vins.

Compost	Descriptor	LPS ($\mu\text{g/L}$)	Concentració ($\mu\text{g/L}$)	
			Vi blanc	Vi negre
γ -butirolactona	Goma, caramel	-	24-800	0-5300
γ -decalactona	Préssec	400	-	-
(Z)-3-metil- γ -octalactona	Coco	790*	12-146	-
(E)-3-metil- γ -octalactona	Coco	100*	15-27	50-140
γ -nonalactona	Coco	30-460	0-50	0-43

Taula II.7. Exemples de lactones que es troben en l'aroma del vi. Llindars de percepció sensorial (LPS) en el vi o en una solució hidroalcohòlica (*).

La taula II.7 mostra algunes de les lactones que es troben de manera més freqüent en l'aroma del vi.

Compostos carbonílics

Malgrat que en el most s'hi troben compostos carbonílics en concentracions elevades que s'originen en el procés de premsat dels raïms, aquests ja no són detectats en el vi perquè són eliminats pels llevats al començament de la fermentació. Aquest és el cas de l'hexanal, els hexenals i l'(E,E)-2,4-decadienal, que són compostos amb una olor herbàcia característica. No obstant això, la concentració d'aquests compostos pot augmentar durant la cria a causa de l'oxidació catalitzada dels corresponents alcohols.

L'acetaldehid és el compost carbonílic majoritari del vi i la seva concentració es considera un indicador de l'estat d'oxidació d'un vi. Aquest compost ja forma part de la composició del raïm, però, a més a més, també és un producte intermedi de la fermentació i, per tant, el tipus de llevat, la temperatura de fermentació, el pH i l'oxigenació del medi influiran en la seva concentració final. Durant l'envelliment, a causa de l'oxidació de l'etanol i d'alguns o-hidroxifenols, augmenta la concentració d'acetaldehid i, per tant, la possibilitat que contribueixi, amb la seva olor rànica i de fruita verda, a l'aroma del vi.

Altres compostos carbonílics que es troben en el vi són la 3-hidroxi-3-butanona (acetoïna), la 2,3-butadiona (diacetil) i la 2,3-pentadiona. Aquestes cetones són produïdes durant la fermentació alcohòlica pels llevats, tot i que la concentració d'acetoïna i de diacetil pot augmentar considerablement durant la fermentació malolàctica. El diacetil, quan es troba en concentracions entre 1 i 4 mg/L, aporta complexitat al vi, però per damunt de 5 mg/L la seva olor intensa de mantega es considera un defecte.

La β -damascenona i la β -ionona són dues cetones norisoprenoides que provenen de la degradació dels carotenoides del raïm. Aquests compostos, que presenten olors afruitades i florals molt agradables, poden tenir un impacte sensorial important en alguns vins.

La taula II.8 mostra els compostos carbonílics més importants que es troben en la fracció volàtil del vi.

Compost	Descriptor	LPS (mg/L)	Concentració (mg/L)	
			Vi blanc	Vi negre
Acetaldehid	Rància, herba, fruita verda	100	5-100	5-100
Acetoïna	Iogurt, suor	150	1-10	3-20
β -damascenona	Afruitada, dolça	$45 \cdot 10^{-6}$	0-0.170	0-0.170
Diacetil	Mantega	3	0.5-3	2-5
β -ionona	Floral, violeta	$90 \cdot 10^{-6}$	0-0.030	0-0.001
2,3-pentadiona	Mantega	1	2.5	3.9

Taula II.8. Exemples de compostos carbonílics que es troben en l'aroma del vi. Llistats de percepció sensorial (LPS) en el vi o en una solució hidroalcohòlica (*).

Compostos fenòlics volàtils

Excepte l'acetovainillona, els compostos fenòlics volàtils que es troben en el vi no provenen del raïm sinó que es formen durant els processos de vinificació i d'envelliment. El 4-etilfenol, el 4-vinilfenol, el 4-etilguaiaicol i el 4-vinilguaiaicol són els compostos d'aquesta família que més contribució tenen a l'aroma del vi. El 4-vinilfenol i el 4-vinilguaiaicol, provenen de la descarboxilació enzimàtica dels àcids p-cumàric i ferúlic respectivament, que té lloc durant el procés de fermentació

alcohòlica. Els vins blancs contenen quantitats variables d'aquests dos compostos amb olors especiades, però poques vegades es troben en els vins negres pel fet que alguns compostos fenòlics del raïm inhibeixen l'enzim responsable de la formació dels vinilfenols.

Els etilfenols són una desviació aromàtica freqüent dels vins negres que, a nivells de mg/L, confereixen al vi una forta olor desagradable. Durant molt temps, s'havia atribuït l'origen d'aquests compostos al metabolisme de les bacteries làctiques. Però, la quantitat d'etilfenols que poden produir aquestes bacteries és molt petita si es compara amb la que produeixen llevats de *Brettanomyces*, veritables responsables d'aquest defecte. Aquests llevats són capaços de produir els etilfenols a partir dels àcids p-cumàric i ferúlic provinents del raïm.

Compost	Descriptor	LPS (µg/L)	Concentració (µg/L)	
			Vi blanc	Vi negre
Acetovainillona	Vainilla	-	200	-
4-etilfenol	Pell, estable	140*	12-42	200-1800
4-etilguaiacol	Fumat, fenòlica, especiada	33*	1-22	40-400
Eugenol	Clau (espècie)	11*	12-84	-
Guaiacol	Fumat	3-10*	4-29	5
Vainil lina	Vainilla	200	17-45	-
4-vinilfenol	Especiada, clavell	180*	18-81	8-45
4-vinilguaiacol	Especiada, curri	1100*	19-750	1-10

Taula II.9. Exemples de fenols volàtils que es troben en l'aroma del vi. Lindars de percepció sensorial (LPS) en el vi o en una solució hidroalcohòlica (*).

Un altre origen de compostos fenòlics volàtils és la degradació química de la lignina en els vins emmagatzemats en bótes de fusta. Els més importants són la vainil·lina, la propiovainillona, el guaiacol, el 4-metilguaiacol, l'eugenol i l'isoeugenol que confereixen al vi olors predominantment especiades i de fumet.

En la taula II.9 es presenten alguns dels fenols volàtils que es poden trobar a la fracció volàtil del vi.

Compostos amb sofre

Els compostos sofrats que s'han trobat en el vi es poden classificar segons la seva estructura en cinc famílies diferents: tiols, sulfurs, polisulfurs, tioèsters i compostos heterocíclics. La majoria d'aquests compostos tenen una influència negativa en l'aroma del vi degut a les olors desagradables que presenten, amb l'excepció d'alguns que participen positivament en l'aroma varietal, com és el cas de la 4-metil-4-mercaptopentanona en els vins de Sauvignon blanc. La formació dels compostos sofrats està relacionada amb el metabolisme d'alguns aminoàcids, en la degradació de pesticides que contenen sofre i amb les reaccions de reducció catalitzades per la llum. Aquestes últimes són les responsables de les olors de tancat o de reduït que presenten alguns vins embotellats. Els responsables d'aquestes notes desagradables són, principalment, compostos volàtils que contenen sofre reduït, és a dir, grups tiol. La majoria de vegades, però, aquestes olors s'eliminen quan s'obre l'ampolla i es deixa airejar, la qual cosa és una pràctica usual i necessària en vins envellits.

El sulfur d'hidrogen és el compost sofrat més característic que es troba en el vi. Aquest compost, que confereix al vi una olor desagradable d'ous podrits, pot aparèixer en quantitats importants durant la fermentació si els raïms contenen sofre elemental en estat lliure. Aquest i altres compostos sofrats d'olors intenses es presenten a la taula II.10.

Compost	Descriptor	LPS ($\mu\text{g/L}$)	Concentració ($\mu\text{g/L}$)	
			Vi blanc	Vi negre
Benzotiazol	Cautxú, goma	50-350	0-7	0-15
Disulfur de carboni	Cautxú	30	0-10	0-10
Disulfur de dimetil	Ceba	29	0.1-1	0.3-1.6
4-metiltio-1-butanol	Alls	100-1000	0-10	5-20
3-metiltio-1-propanol	Patates bullides	1000-4000	200-3500	800-4000
2-metil-tetrahidrotiofè	Cautxú	-	3-50	0-30
Sulfur de dimetil	Espàrrecs, cereals	25-60	0-474	8-15
Sulfur d'hidrogen	Ous podrits	0.001-150	0-10	-

Taula II.10. Exemples de compostos sofrats que es troben en l'aroma del vi. L·lindars de percepció sensorial (LPS) en el vi o en una solució hidroalcohòlica (*).

Compostos amb nitrogen

Dels compostos nitrogenats que s'han identificat en la fracció volàtil del vi, els més importants pel que fa a la seva contribució a l'aroma són, sens dubte, les pirazines. Aquesta família de compostos, i més concretament les alquil-metoxipirazines, són les responsables de les olors herbàcies i de pebrot verd característiques dels vins de Cabernet sauvignon. Tot i trobar-se a nivells molt baixos de concentració (ng/L), la seva contribució a l'aroma és important a causa dels baixos l·lindars de percepció sensorial que presenten. La taula II.11 mostra les 3-alquil-metoxipirazines més importants que s'han identificat en l'aroma del vi.

Compost	Descriptor	LPS (ng/L)	Concentració (ng/L)	
			Vi blanc	Vi negre
3-sec-butil-2-metoxipirazina	Pebrot verd, pèsols	1-2	0-2	0.5
3-isobutil-2-metoxipirazina	Pebrot verd, pèsols	1-16	0-38	0.8-56.3
3-isopropil-2-metoxipirazina	Nou rostida	2	1.3-6	0.3

Taula II.11. Exemples de compostos nitrogenats que es troben en l'aroma del vi. Llindars de percepció sensorial (LPS) en el vi o en una solució hidroalcohòlica (*).

Altres

En els vins envellits s'hi han identificat alguns hidrocarburs, com benzè, toluè, estirè, etc. Però els que han despertat més interès en els investigadors a causa de la seva olor són l'1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalè (TDN) i el vitispirà. El TDN aporta al vi una nota aromàtica de querosè, característica dels vins envellits, però que a concentracions elevades es pot convertir en un defecte molt desagradable. Un altre cas similar és el del vitispirà que contribueix a les olors camforàcies dels vins que no han envellit de manera correcta o de vins molt vells.

Un altre compost interessant pel que fa a la seva participació en l'aroma d'alguns vins és la 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona, coneguda com a furaneol. Aquesta furanona es va identificar, ja fa temps, com un dels compostos responsables de les olors dolces i de maduixa que presenten els vins d'algunes varietats de *Vitis Labrusca*. Però, fins fa relativament poc temps, no s'ha detectat la presència d'aquest compost en vins de *Vitis vinifera* demostrant, fins i tot, la seva contribució a l'aroma d'alguns d'ells.

II.2.4 Defectes aromàtics

Un problema important per als enòlegs és la presència en el vi d'olors desagradables. Són els anomenats defectes o *off-flavors*. El progrés de l'enologia ha permès millorar considerablement la qualitat dels vins de manera que alguns defectes molt freqüents en el passat pràcticament han desaparegut però, a la vegada, les degustacions han anat sent més i més exigents. Els defectes importants poden ser percebuts i identificats sensorialment però n'hi ha d'altres que, tot i no poder apreciar-se clarament les seves característiques, emmascaren la finesa de les olors afruitades aportant al vi una major complexitat. A la taula II.12 es mostren alguns exemples d'aquests defectes aromàtics.

Descriptor	Compost responsable
Oxidat	Acetaldehid
Ceba, alls	Mercaptans
Ous podrits	Sulfur d'hidrogen
Vinagre	Àcid acètic i acetat d'etil
Xampinyó	1-octen-3-ol
Gerani	2-etoxi-3,5-hexadiè
Gust de ratolí	2-acetiltetrahidropiridina
Gust de suro	2,4,6-tricloroanisole

Taula II.12. Exemples de defectes aromàtics en els vins.

L'origen d'aquests compostos és molt divers ja que la seva formació pot ser deguda a reaccions químiques, a processos microbiològics o també a contaminacions externes. Un aspecte important a destacar és que, de vegades, la

presència d'alguns d'aquests compostos no es considera un defecte sinó que constitueix una tipicitat. Per exemple, no és acceptable una presència notable d'acetaldehid lliure en un vi on la frescor ha de dominar. No obstant això, en els vins rancis, el caràcter oxidatiu que aporta aquest compost és part de la seva tipicitat. L'acetaldehid pot provenir de l'oxidació directa de l'etanol en presència de catalitzadors (Fe^{3+} , Cu^{2+}) o de l'acció dels llevats micodèrmics.

Les reaccions de reducció porten a un defecte aromàtic conegut com a "gust de llum". Aquest defecte, que afecta sobretot als vins blancs, s'anomena així perquè és a causa de la fotodegradació oxidativa d'alguns aminoàcids que contenen sofre i que evolucionen cap a compostos sofrats responsables d'aquesta olor. En general, aquests compostos es consideren *off-flavors* a causa de les olors desagradables que presenten (all, ceba, goma, corral, etc.).

L'àcid acètic, constituent essencial de l'acidesa volàtil, és un dels defectes més importants del vi per damunt d'una certa concentració. Valors d'acidesa volàtil superiors a 1 g/L (expressat en àcid acètic) indiquen una intervenció dels bacteris acètics. En les alteracions produïdes per aquests microorganismes, a més a més d'àcid acètic també es forma acetat d'etil que és el responsable del caràcter organolèptic del "picat del vi" que es caracteritza per una olor sufocant molt desagradable i per una impressió de duresa i de cremor al final de la degustació (acescència).

Altres defectes aromàtics que es poden trobar ocasionalment en els vins són l'olor de gerani o el "gust de ratolí". El primer és a causa de la presència de 2-etoxi-3,5-hexadiè, que és un compost produït per l'activitat bacteriana en vins que contenen àcid sòrbic com a conservant. Pel que fa al "gust de ratolí", en els vins que presenten aquest defecte es percep una olor molt desagradable al final de la degustació que recorda als ratolins, és per això que alguns autors el denominen d'aquesta manera. No es coneix amb certesa el seu origen, però sembla que els

bacteris làctics són els implicats en l'aparició d'aquest defecte que es troba en alguns vins mal conservats, en particular als insuficientment sulfitats.

En el vi també s'hi poden trobar defectes aromàtics deguts a contaminacions externes. Un dels més habituals, i que més preocupa a la indústria vinícola, és el que es coneix com a "gust de suro". Aquest defecte s'anomena d'aquesta manera perquè, tradicionalment, s'ha associat amb la utilització de taps de suro, tot i que, en molts casos, aquests no són els responsables directes de la contaminació. S'han identificat diversos compostos responsables de l'olor de humitat, florit, terra i fusta mullada que es percep en els vins que presenten aquest defecte però, sens dubte, un dels principals contribuïdors és el 2,4,6-tricloroanisole.

II.3 L'AROMA DELS AIGUARDENTS

L'aroma dels aiguardents, de la mateixa manera que l'aroma del vi, no és deguda a les olors que aporten uns quants compostos amb caràcter impacte sinó que és el resultat de les olors que aporten nombrosos compostos [24, 26, 33, 34]. La fracció volàtil de la major part de les begudes alcohòliques està composta gairebé dels mateixos constituents. No obstant això, les matèries primeres i la tecnologia que s'utilitzi per a elaborar-les subministren els ingredients necessaris que donen als diferents productes el seu caràcter particular.

El cos de l'aroma dels aiguardents està format pels compostos produïts pels llevats durant la fermentació -que són majoritàriament alcohols, àcids grassos, èsters etílics i acetats- i que es troben a concentracions elevades. No obstant això, a l'aroma també hi contribueixen molts altres compostos que, tot i ser minoritaris, també tenen la seva importància sensorial i en alguns casos són els que donen el toc distintiu a les diferents begudes alcohòliques. L'origen d'aquests compostos pot ser divers: compostos que provenen de la matèria primera i del seu processat i que passen inalterats a l'aiguardent, compostos que s'extreuen de la fusta durant l'envelliment en bótes o compostos que es formen mitjançant reaccions químiques entre alguns constituents de l'aiguardent durant l'envelliment.

Tot i que, com ja s'ha dit, durant la fermentació s'originen els compostos que conformen el cos de l'aroma, la destil·lació és una etapa clau en la composició de l'aroma de la beguda alcohòlica final. En aquesta etapa, a més de l'alteració que es produeix en la composició volàtil a causa de la variació en les proporcions relatives dels compostos formats durant la fermentació, tenen lloc reaccions químiques degudes a les condicions de temperatura en què es duu a terme la destil·lació. Factors com són el tipus de dipòsit, el grau de rectificació i la selecció de les fraccions que formaran part de la beguda alcohòlica determinen també d'una manera important la composició de l'aiguardent final. Normalment, els compostos

més volàtils (els caps) no s'inclouen a la beguda alcohòlica ja que el seu impacte sensorial es considera negatiu. L'acetaldehid, el diòxid de sofre i l'acetat d'etil són alguns dels compostos "no-desitjats" que es troben en els caps de la destil·lació. Alguns dels èsters etílics més volàtils i també alguns aldehids són eliminats amb aquesta separació. No obstant això, el contingut d'aquests últims es recupera durant l'envelliment en bóta. Per altra banda les fraccions menys volàtils (les cues) tampoc s'acostumen a incloure en la beguda alcohòlica final. En aquesta fracció s'hi troben, principalment, àcids grassos que presenten olors de sabó, com són els àcids hexanoic, octanoic i decanoic.

Tot i els grans canvis que es produeixen en la composició volàtil dels aiguardents durant la fermentació i la destil·lació, quan han finalitzat aquestes dues etapes, l'aroma resultant és tan sols una aproximació del que serà l'aroma del producte final. En l'envelliment en bóta, els compostos volàtils reaccionen lentament cap al seu equilibri donant com a resultat canvis graduals en l'aroma que, sens dubte, porten a la seva millora i per tant a la millora de la qualitat del producte final.

Aiguardent	Matèria primera
Brandy, conyac	Raïm
Ginebra	Cereals
Rom	Canya de sucre
Tequila	Atzavara
Vodka	Patata o cereals
Whisky	Cereals

Taula II.13. Exemples de begudes alcohòliques destil·lades i la matèria primera a partir de la qual s'obtenen.

Com ja s'ha comentat, un dels factors que caracteritza els diferents tipus d'aiguardents és la matèria primera a partir de la qual s'obtenen. La taula II.13 mostra algunes de les begudes alcohòliques destil·lades que més es consumeixen arreu del món i la matèria primera a partir de la qual s'obtenen.

En el marc d'un programa de col·laboració científica amb Llatinoamèrica, en aquesta tesi s'ha estudiat l'aplicació d'algunes tècniques analítiques a l'anàlisi de l'aroma de roms. És per això que ens centrarem amb l'aroma d'aquesta beguda alcohòlica que s'obté a partir de la canya de sucre.

II.3.1 L'aroma del rom

El rom, clàssicament associat als països del Carib, fou la primera beguda alcohòlica destil·lada que es va elaborar en aquesta zona amb l'arribada dels europeus. A partir de llavors, el seu reconeixement va anar augmentant fins al punt que actualment s'exporta i es consumeix a tot el món. Aquesta beguda alcohòlica s'obté a partir dels sucres de la canya de sucre i depenent del tractament que es faci a la matèria primera s'obtenen roms de diferent qualitat.

L'aroma del rom, com la de la resta dels destil·lats, està composta per un gran nombre de compostos volàtils de diferent naturalesa química, que es troben en concentracions molt variades i que contribueixen de manera diferent a l'aroma global de la beguda. Aquests compostos volàtils són, principalment, compostos carbonílics, alcohols, èsters i àcids grassos que es formen durant el procés de fermentació dels sucres. Tot i que aquesta etapa és la més important pel que fa a la producció de compostos volàtils, la destil·lació i l'envelliment que es duu a terme posteriorment, són dues etapes crítiques en la composició aromàtica que s'obtindrà finalment.

En els treballs que es troben a la bibliografia, en forma de revisions, sobre la composició aromàtica del rom, hi queda reflectida la complexitat de l'aroma

d'aquesta beguda alcohòlica [23, 33-37]. A continuació es presenta una breu descripció de les principals famílies de compostos químics que constitueixen la fracció volàtil del rom.

Com ja s'ha dit, la fermentació és l'etapa on hi ha més producció de compostos volàtils. En aquesta es produeixen relativament grans quantitats d'alcohols alifàtics de baixa pes molecular i molt olorosos com són el propanol, el 2-metil-1-propanol, el butanol i els alcohols isoamílics, així com també alcohols aromàtics entre els quals destaca el 2-feniletanol. Aquesta família de compostos té una gran influència en l'aroma del rom. Fins i tot, el contingut total d'alcohols permet classificar els roms en pesats o lleugers. Per exemple els roms pesats de Jamaica tenen un contingut total d'alcohols entre 900 i 3400 mg/L mentre que els lleugers en tenen menys de 60 mg/L.

Els èsters són l'altra família de compostos que s'originen en la fermentació i que contribueixen significativament a l'aroma dels roms aportant les seves olors afruitades. Es considera que un rom amb un alt contingut d'èsters, especialment èsters etílics, és un rom de bona qualitat.

Altres compostos volàtils originats en el procés de fermentació són els aldehids, entre els quals el majoritari és l'acetaldehid. No obstant, a causa de la gran reactivitat d'aquests compostos, el seu contingut es redueix de manera considerable durant la destil·lació ja que reaccionen amb els alcohols per formar acetals, la qual cosa redueix, en el destil·lat final, l'olor picant i desagradable que presenten alguns d'ells. Les cetones són altres compostos carbonílics que també es formen durant la fermentació. A més a més de cetones alifàtiques com són l'acetona, la butanona, les pentanones i les hexanones, també s'hi troba l'acetoïna, el diacetil i la 2,3-pentadiona.

Els àcids grassos volàtils són una altra família de compostos que contribueixen a l'aroma i al gust del rom, entre els quals l'àcid acètic és el que es troba en major concentració.

L'origen de compostos fenòlics en l'aroma dels roms és degut principalment al contacte del destil·lat alcohòlic amb la fusta en l'envelliment del producte. L'eugenol és un dels principals fenols que s'hi troben i la seva concentració augmenta amb l'envelliment en bótes de roure. Aquest compost, juntament amb la vainil·lina, el siringoaldehyd, l'o-cresol, el p-cresol, el guaiacol, el 4-etilfenol i el 4-etilguaiacol generalment contribueixen a l'aroma dels roms ja que les seves concentracions són superiors als seus llindars de percepció sensorial.

Altres compostos que s'han identificat en l'aroma dels roms són alguns alcohols monoterpènics com el linalool, el citronelol, el geraniol o l' α -terpineol. També algunes lactones com la γ -nonalactona, la γ -decalactona, la γ -dodecalactona, la δ -octalactona, la δ -decalactona i la δ -dodecalactona, tot i que a nivells traça. A més s'hi han trobat compostos sofrats (tiols, sulfurs i disulfurs) i compostos nitrogenats com, per exemple, algunes pirazines.

II.4 ANÀLISI DE L'AROMA

Sens dubte, la cromatografia de gasos és la tècnica més adequada per a l'estudi de la composició de l'aroma del vi i de les begudes alcohòliques en general. A finals dels anys 50, just després de l'aparició d'aquesta tècnica, Bayer i els seus col·laboradors van ser els primers en aplicar-la al camp de les aromes del vi, identificant alcohols superiors i èsters. Abans però, a mitjans dels anys 40, Hennig i Villforth ja havien identificat alguns compostos volàtils del vi utilitzant mètodes clàssics d'anàlisi. L'evolució de la cromatografia de gasos amb el desenvolupament de detectors específics i, sobretot, el seu acoblament amb l'espectrometria de masses ha permès la separació i identificació de centenars de compostos volàtils presents al vi [19, 38-40].

Tot i que amb les tècniques cromatogràfiques es pot obtenir un coneixement a fons de la composició de l'aroma, aquesta informació no és suficient quan es vol conèixer la percepció global que experimenta un individu quan olora un vi. És per això que l'anàlisi sensorial, que és la tècnica utilitzada des de temps immemorials per avaluar la qualitat dels aliments, continua sent una eina imprescindible en l'anàlisi de l'aroma. A més, cal tenir en compte que, per alguns compostos, l'olfacte humà és més sensible que qualsevol dels detectors cromatogràfics que existeixen actualment. No obstant, la utilització de panels de tastadors comporta alguns inconvenients importants a les empreses. En primer lloc, cal disposar d'un conjunt de persones entrenades que només poden realitzar un nombre molt reduït d'anàlisis al dia, ja que l'exposició a determinats aromes durant temps prolongats redueix la sensibilitat olfactiva. A més, la subjectivitat, la variabilitat entre individus, els canvis de sensibilitat deguts a la fatiga, els refredats, etc. són altres inconvenients que presenta l'anàlisi sensorial. Tota aquesta problemàtica ha causat que en les últimes dècades hi hagi hagut un esforç considerable en desenvolupar un instrument capaç de dur a terme el mateix treball que els tastadors però d'una

manera ràpida i objectiva. Aquesta recerca ha generat el desenvolupament d'una sèrie d'instruments coneguts com a "nassos electrònics".

En aquest apartat es fa una breu descripció de totes aquestes tècniques que s'utilitzen per a l'anàlisi de l'aroma, fent especial èmfasi en la seva utilització en l'anàlisi de l'aroma del vi.

II.4.1 L'anàlisi sensorial

El desenvolupament d'instruments que proporcionen gran quantitat d'informació analítica ha tendit a subestimar el paper de l'anàlisi sensorial en la definició de la qualitat de l'aroma. En nombroses indústries alimentàries, però, es continuen utilitzant panells de tastadors per a dur a terme el control de qualitat dels seus productes ja que la informació global de l'aroma que aquests aporten no es pot obtenir amb les tècniques cromatogràfiques. El cas del vi és un exemple molt clar ja que és un aliment que no es consumeix per les seves propietats nutritives, sinó per les sensacions agradables que produeix la seva degustació. Per tant, l'anàlisi sensorial és indispensable per tal d'apreciar la seva qualitat, ja que aquesta depèn sobretot de la satisfacció sensorial que el vi proporciona. Per altra banda, cal assenyalar que l'aplicació de tècniques instrumentals com la cromatografia de gasos amb detecció olfactimètrica o el nas electrònic, en molts casos, requereixen l'anàlisi sensorial per a la seva calibració i interpretació.

Existeixen diferents tipus de tests per a dur a terme l'anàlisi sensorial, però els més utilitzats són els tests d'opinió i els tests descriptius. Els primers són els més simples i no requereixen que els tastadors siguin especialistes entrenats, potser per això són els més utilitzats. Els tests d'opinió bàsicament determinen si entre dues mostres existeixen diferències sensorials. La determinació dels llindars de percepció sensorial generalment es duu a terme amb aquests tipus de tests. Per altra banda, els tests descriptius els realitzen tastadors entrenats que valoren la

contribució d'uns descriptors que han estat definits prèviament. Aquests tests, a més de diferenciar entre mostres, es poden utilitzar per definir el tipus de producte i la seva acceptabilitat pel que fa referència a la qualitat de l'aroma [11].

II.4.2 L'anàlisi instrumental

Com s'ha mostrat en els apartats anteriors, l'aroma del vi i dels destil·lats està constituït per compostos que es troben a uns nivells de concentració molt baixos (entre mg/L i ng/L). Per tant, abans d'utilitzar qualsevol tècnica, en la majoria dels casos, caldrà separar els compostos volàtils de la matriu i també concentrar-los. L'etapa de preparació de la mostra és la més crítica de tot el procés analític perquè els compostos volàtils de les begudes alcohòliques presenten un rang molt ampli de polaritat, volatilitat i concentració. També cal tenir en compte que alguns compostos presenten problemes d'instabilitat i poden ser oxidats per l'aire o degradats a determinades temperatures o determinats pHs. Per tant, resulta difícil escollir un mètode adequat per a l'anàlisi de tots els compostos volàtils de manera simultània.

II.4.2.1 Tècniques de pretractament

Han estat moltes les tècniques que s'han utilitzat en la preparació de la mostra per a l'anàlisi de l'aroma. Tal i com es descriu a continuació totes elles presenten una sèrie d'avantatges i inconvenients que l'analista haurà de tenir en compte a l'hora d'escollir la més adequada per al tipus de compostos que li interessi analitzar.

Destil·lació

Els mètodes de destil·lació es basen en el fet que, excepte l'aigua, l'etanol i els compostos volàtils, totes les substàncies que componen el vi tenen punts

d'ebullició elevats i, per tant, és possible aïllar els compostos volàtils en una solució hidroalcohòlica per destil·lació. El principal avantatge d'aquesta tècnica és que separa els compostos volàtils dels no volàtils d'una manera senzilla, ja que no es requereix d'instrumentació sofisticada, és ràpida i s'obté una bona reproductibilitat.

La destil·lació directa del vi no és aconsellable ja que a temperatures elevades es podrien produir canvis significatius en la composició de l'aroma. Una opció és dur a terme la destil·lació amb arrossegament de vapor, amb la qual no es produeixen descomposicions de la mostra. Una altra alternativa és la destil·lació a pressió reduïda de manera que no es sobrepassin els 35°C, ja que per sota d'aquesta temperatura la formació d'artefactes per degradació tèrmica és mínima [41].

En aquests processos de destil·lació, però, no es produeix una concentració important dels compostos volàtils i, per tant, abans d'injectar-los al cromatògraf de gasos, cal dur a terme un procés de concentració dels mateixos. En aquest sentit, la tècnica de destil·lació-extracció simultània (SDE) presenta clars avantatges front les altres tècniques de destil·lació esmentades, ja que utilitzant un volum petit de solvent orgànic, es duu a terme l'extracció i concentració dels analits en una sola operació [42, 43].

Extracció líquid-líquid

L'extracció líquid-líquid (LLE) ha estat la tècnica més utilitzada fins al moment per a dur a terme la separació de la gran majoria de compostos volàtils presents en el vi. En funció de la polaritat del dissolvent es poden extreure de forma selectiva substàncies de diferents polaritats. A més, l'ús de solvents orgànics de baix punt d'ebullició permet concentrar fàcilment l'extracte. Els solvents més emprats, pel fet que extreuen poc l'aigua i l'etanol, són el diclorometà, l'éter etílic, els freons i el pentà, així com també mesclures binàries dels mateixos. La majoria dels mètodes

descrits en la bibliografia es basen en l'extracció en continu durant un període de temps que oscil·la al voltant de les 8-12 hores i la posterior concentració de l'extracte volàtil per eliminació de la major part del solvent [39, 41, 44-46].

Els mètodes desenvolupats amb l'extracció líquid-líquid, però, requereixen de diverses etapes per a l'obtenció de l'extracte, la qual cosa implica temps llargs d'anàlisi i una gran manipulació de la mostra. Aquest fet provoca que es pugui contaminar l'extracte amb facilitat i que, a més, es puguin produir pèrdues importants dels analits d'interès. La fase de concentració és la més crítica pel que fa a aquestes possibles pèrdues. Una manera adequada de concentrar grans volums de solvent és utilitzant columnes de fraccionament Kuderna-Danish o Vigreux.

Per intentar solucionar alguns d'aquests problemes, s'ha desenvolupat un mètode de microextracció líquid-líquid amb 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetà (freon 113) que permet l'anàlisi d'un nombre considerable de compostos volàtils del vi amb un temps reduït de tractament de mostra [47]. El mètode es basa en dur a terme una extracció en un sol pas utilitzant un volum de mostra petit (10 mL) i una relació mostra/solvent elevada (100/1), de manera que l'extracte que s'obté no necessita ser concentrat i pot ser injectat directament al cromatògraf de gasos. En alguns treballs, abans de la microextracció es duu a terme una desmixturització que consisteix en saturar la mostra de sal per tal de que es separi la fracció aquosa de l'etanòlica. Aquesta darrera fracció conté la majoria dels compostos volàtils i és la que s'extreu amb un petit volum de solvent orgànic [48].

Extracció en fase sòlida

La introducció de les tècniques d'extracció en fase sòlida (SPE) en el camp de l'enologia va suposar un gran avanç pel fet que aquestes tècniques permeten aïllar els compostos aromàtics del vi de forma ràpida i amb un consum de mostra i solvent molt inferior al que implica l'extracció líquid-líquid. Les Amberlite XAD-2

van ser les primeres reïnes que es van utilitzar per a l'extracció de compostos volàtils del vi, concretament per a l'aïllament de compostos terpènics i alcohols aromàtics [49]. Aquest tipus de reïnes hidrofòbiques, juntament amb les d'octadecilsilà (C18), són les més utilitzades en l'anàlisi d'aromes. Els solvents que s'utilitzen per a eluir els compostos retenguts en la fase sòlida són majoritàriament diclorometà, pentà i éter etílic [50-53]. Cal tenir en compte que els rendiments que s'obtenen en l'extracció depenen tant del tipus d'adsorbents com del solvent emprat en l'elució [54]. Per altra banda, amb aquesta tècnica es pot aconseguir un fraccionament dels analits si, per dur a terme l'elució, s'escullen dissolvents amb la polaritat adequada [48].

Tècniques d'espai de cap

Les tècniques d'espai de cap (o *headspace*) es basen en l'anàlisi dels compostos que es troben a la fase gasosa en equilibri amb la fase líquida. És per això que aquestes tècniques són les que ens donen una idea més aproximada de la composició de la fracció volàtil que arriba a les nostres fosses nasals quan olorem un producte. Segons el sistema de mostreig es divideixen en dues categories: estàtiques i dinàmiques. En ambdós casos, l'avantatge que presenten aquestes tècniques front les descrites en els apartats anteriors, és que no precisen de l'ús de solvents orgànics i que, a més, la manipulació de la mostra és mínima, la qual cosa fa que es puguin automatitzar fàcilment.

La tècnica d'espai de cap estàtic consisteix en deixar equilibrar els analits de la mostra, continguda dins d'un vial tancat, entre la fase líquida o sòlida, i la gasosa. Una vegada establert l'equilibri, s'injecta directament l'espai de cap (1-2 mL) al cromatògraf de gasos. És una tècnica molt senzilla en la que no hi ha manipulació de la mostra. Però en no haver-hi cap tipus de concentració dels analits, presenta l'inconvenient de tenir una sensibilitat baixa i, per tant, la seva aplicació es veu restringida als compostos volàtils majoritaris (>1 mg/L) [45, 55, 56].

La tècnica d'espai de cap dinàmic, que també se l'anomena purga i trampa (P&T), consisteix en fer passar els analits de la matriu de la mostra a l'espai de cap d'una manera contínua. Per tal de que no s'estableixi l'equilibri dels analits entre les dues fases, la fracció volàtil que hi ha just al damunt de la mostra és arrossegada contínuament per un gas inert cap a una trampa, que pot ser criogènica o amb un adsorbent, on els analits hi són retinguts. Posteriorment, aquests són transferits a l'injector del cromatògraf de gasos mitjançant, generalment, una desorció tèrmica, encara que també es pot utilitzar algun dissolvent orgànic. Amb aquesta tècnica s'obté més recuperació dels analits d'interès que amb la tècnica de l'espai de cap estàtic, podent-se arribar a límits d'aplicació de l'ordre de ng/L.

La utilització d'una trampa amb un material adsorbent pot comportar alguns problemes. Un d'ells és el denominat "efecte memòria" pel fet que alguns compostos no són desorbits totalment, ja que queden fortament retinguts a la trampa i, amb el fet agreujant, que aquests van apareixent en els cromatogrames d'anàlisi posteriors. Un altre problema és l'aparició d'artefactes en l'anàlisi cromatogràfica a causa de la poca estabilitat tèrmica d'algunes trampes a la temperatura que es duu a terme la desorció. Tot i que les trampes criogèniques no comporten aquest tipus de problemes, presenten l'inconvenient de ser poc selectives i, per exemple, en mostres aquoses, l'aigua també quedarà retinguda i serà introduïda en el sistema cromatogràfic en l'etapa de desorció. En l'anàlisi dels compostos volàtils del vi el sistema més utilitzat és una trampa de Tenax (òxid de 2,6-difenil-p-fenilè), ja que aquest adsorbent té molt poca afinitat per l'aigua i l'etanol [57-59].

La microextracció en fase sòlida

La microextracció en fase sòlida (SPME) és una tècnica apareguda a començaments dels anys 90 que permet l'extracció i la concentració de compostos orgànics volàtils en una sola etapa. L'extracció dels analits es realitza sobre una fase lligada a una

fibra de sílice fosa, i es pot dur a terme tant en l'espai de cap de la mostra com directament dins del líquid. Després de l'extracció, els analits són desorbitats tèrmicament dins de l'injector del cromatògraf de gasos. Un dels principals avantatges d'aquesta tècnica és que, al igual que les tècniques d'espai de cap, no precisa de l'ús de solvents orgànics. A més a més, és una tècnica molt selectiva ja que, depenent del tipus de fase lligada, la fibra tindrà més afinitat per un tipus de compost que per un altre. Aquest fet pot representar un gran avantatge quan el que es vol és analitzar una família concreta de compostos. En el cas de l'anàlisi de begudes alcohòliques cal tenir en compte la interferència produïda per la presència d'etanol en quantitats considerables. L'increment en el contingut d'etanol implica una disminució de la sensibilitat, sobretot quan l'anàlisi es fa sumergint la fibra dins la mostra. Tot i això, són força les aplicacions que en el cas del vi han proporcionat bons resultats [60]. L'SPME ha estat una de les tècniques utilitzades en aquesta tesi i més endavant, en el capítol III, es descriu d'una manera més detallada el seu funcionament i les aplicacions que s'hi han dut a terme en l'anàlisi dels compostos volàtils del vi i altres begudes alcohòliques.

Stir bar sorptive extraction

La *stir bar sorptive extraction* (SBSE) és una tècnica desenvolupada recentment amb un fonament molt semblant al de l'SPME. En aquest cas s'utilitza un imant de petites dimensions que està recobert per una fina capa de polidimetilsiloxà. L'imat s'introdueix a la mostra líquida i a la vegada que agita la mostra té lloc l'absorció dels analits en la fase estacionària. Quan l'extracció acaba s'introdueix l'imat en un tub de vidre i, mitjançant una desorció tèrmica, s'alliberen els analits retinguts, que passen directament a la columna cromatogràfica. L'avantatge d'aquesta tècnica front l'SPME és que el factor de concentració és més important ja que les dimensions de l'imat són més grans que les de la fibra. Tot i el recent desenvolupament de la tècnica, les aplicacions realitzades en el camp dels

compostos volàtils del vi mostren el seu potencial en l'obtenció de mètodes ràpids, senzills i amb una bona sensibilitat [61-63].

II.4.2.2 La cromatografia de gasos

Entrant ja a la tècnica de la cromatografia de gasos, cal destacar que el desenvolupament de les columnes capil·lars va suposar un gran avanç en la recerca de l'aroma dels aliments a causa de la seva gran capacitat de separar mescles complexes de compostos volàtils. En l'anàlisi dels compostos volàtils del vi s'utilitzen columnes capil·lars amb fases estacionàries polars, apolars o intermèdies depenent dels compostos d'interès.

En quant als sistemes de detecció, el més àmpliament utilitzat és el detector de ionització de flama (FID), ja que dona resposta a gairebé tots els compostos orgànics. A més, aquest detector presenta una bona sensibilitat, la seva resposta és lineal en un rang ampli de concentracions, és estable, senzill d'utilitzar i requereix poc manteniment.

Un altre sistema de detecció molt utilitzat és l'espectrometria de masses (MS). La utilització d'aquesta tècnica com a detector cromatogràfic ha permès avançar molt en la recerca de l'aroma del vi ja que permet confirmar la identitat dels diferents analits. En el cas de components a nivells traça, és de gran utilitat la detecció en mode SIM (*Selective Ion Monitoring*) que consisteix en seleccionar, prèviament, les masses dels ions més abundants de l'espectre del compost d'interès, amb la qual cosa augmenta de manera important la sensibilitat de l'instrument [40].

En l'anàlisi d'alguns compostos concrets, o famílies de compostos, s'utilitzen detectors específics. Per exemple, en l'anàlisi de compostos sofrats dos detectors molt utilitzats són el fotomètric de flama (FPD) i el de quimioluminiscència (SCD) ja que són específics de compostos que contenen àtoms de sofre i, a més, presenten una elevada sensibilitat [30]. En l'anàlisi de compostos nitrogenats com les

pirazines, s'ha utilitzat el detector de nitrogen-fósfor (NPD) que també té una elevada sensibilitat però presenta l'inconvenient de tenir estabilitat i reproductibilitat baixes [64]. El detector de captura electrònica (ECD) és molt sensible als compostos amb grups halogenats i s'ha utilitzat en l'anàlisi de tricloroanisols [65].

Amb tots els sistemes de detecció descrits s'aconsegueix obtenir un coneixement a fons de la composició de la fracció volàtil del vi. Aquesta informació, no obstant, queda incompleta quan es volen relacionar aquests resultats amb les característiques sensorials del vi. No tots els compostos volàtils d'una substància presenten olor i, dels que en presenten, moltes vegades no tots contribueixen a l'aroma pel fet que la concentració a la que es troben és inferior al seu llimar de percepció sensorial. Amb la finalitat de poder identificar, d'entre tots els compostos volàtils, quins són potencials contribuïdors a l'aroma, es va desenvolupar la tècnica de la cromatografia de gasos amb detecció olfactimètrica (GCO).

II.4.2.3 La GCO

La GCO és una eina analítica imprescindible en la caracterització de les aromes dels aliments. La tècnica es basa en utilitzar el nas humà com a detector cromatogràfic (olorant els compostos que elueixen de la columna cromatogràfica) en paral·lel amb un altre detector convencional que normalment és un FID o un MS. D'aquesta manera, al creuar la informació que proporciona el detector convencional amb la informació olfactimètrica, es pot conèixer quins són els compostos que fan olor i, a més, quin tipus d'olor aporta cadascun.

Dins d'aquesta tècnica existeixen metodologies que permeten obtenir informació quantitativa de les característiques aromàtiques de cada compost, és a dir, permeten conèixer la contribució de cada compost volàtil a l'aroma [31, 66-70]. El

Charm Analysis (*Combined Hedonic Aroma Response Measurements*) i l'AEDA (*Aroma Extract Dilution Analysis*) són dues tècniques de dilució que permeten obtenir una llista jerarquitzada dels compostos segons la seva contribució a l'aroma. Altres tècniques com l'Osme o el *finger-span* mesuren les intensitats de les olors. Per últim, les tècniques de freqüència de detecció, com el NIF (*Nasal Impact Frequency*), proporcionen mesures quantitatives de les olors basant-se en el nombre d'analistes que l'han detectat. En el capítol III es descriuen totes aquestes metodologies, així com també una discussió més àmplia de la GCO i de la seva aplicació al camp de l'enologia.

Tot i els avenços que hi ha hagut en el desenvolupament d'aquestes tècniques, avui en dia encara és difícil contrastar la informació que s'obté de les tècniques olfactimètriques amb els resultats que s'obtenen en una anàlisi sensorial. Amb l'objectiu d'emular el treball d'un panel de tastadors, s'han desenvolupat els nassos electrònics.

II.4.2.4 El nas electrònic

El nas electrònic és un instrument que, d'una manera similar a l'anàlisi sensorial, realitza una anàlisi global de l'aroma aportant informació bàsicament qualitativa: diferències i similituds entre mostres, presència de defectes aromàtics, etc. A diferència de les tècniques cromatogràfiques, el nas electrònic no proporciona informació de la composició química de l'aroma.

L'instrument consta de tres parts ben diferenciades que són el sistema de mostreig, el sistema de detecció i el sistema de tractament de dades. Generalment, el mostreig es duu a terme utilitzant tècniques d'espai de cap com les que s'han descrit anteriorment. Pel que fa al sistema de detecció, es pot dir que és la part principal de l'instrument i que permet fer una divisió entre els diferents tipus de nassos electrònics desenvolupats: els que utilitzen els sensors de gasos i els que

utilitzen l'espectrometria de masses [71-75]. El senyal que s'obté amb els dos tipus d'instruments és com una empremta digital de l'aroma de la substància analitzada. La última part, però no menys important, d'un nas electrònic és el sistema de tractament de dades. La gran quantitat d'informació que s'obté amb el sistema de detecció es tracta amb eines quimiomètriques com les tècniques de reconeixement de models, tècniques de calibració multivariant o xarxes neuronals, per tal d'extreure informació útil de les dades, com pot ser la similitud entre mostres, la seva classificació segons alguna propietat d'interès, etc.

Pel que fa a l'aplicació d'aquesta tècnica a l'anàlisi de vins, i de begudes alcohòliques en general, cal destacar que la utilització dels instruments basats en sensors de gasos és molt difícil, fins i tot en alguns casos impossible, a causa dels problemes que el gran contingut d'etanol de la mostra causa en els sensors [75]. En el capítol IV d'aquesta tesi s'inclou un recull bibliogràfic de les aplicacions d'aquesta tècnica a l'anàlisi de begudes alcohòliques, a la vegada que es descriu més àmpliament el seu funcionament.

II.5 BIBLIOGRAFIA

- [1]. C. Fisher, T. R. Scott (eds). *Flavores de los Alimentos. Biología y Química*. Acribia S.A., Zaragoza (1997)
- [2]. J.C. Leffingwell. *Olfaction - a review* [en línia]. Leffingwell & Associates (2002). <<http://www.leffingwell.com/olfaction.htm>> [Consulta 12/09/2002]
- [3]. J.F. Jackson. *Molecular biology of taste and aroma receptors: implications for taste and aroma of plant products*. En: J.F. Jackson, H.F. Linskens (eds). *Analysis of Taste and Aroma*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (2002) 1-6
- [4]. G. Ohloff (ed). *Scent and Fragrances*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1994)
- [5]. L. Buck, R. Axel. *A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition*. *Cell*, 65 (1991) 175-187
- [6]. T. Jacob. *Olfaction: A tutorial on the sense of smell* [en línia]. T. Jacob (2000). <<http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/jacob/teaching/sensory/olfact1.html>> [Consulta 13/02/2003]
- [7]. P.X. Etiévant. *Wine*. En: H. Maarse (ed). *Volatile compounds in food and beverages*. Marcel Dekker Inc., New York (1991)
- [8]. B.S. Mistry, T. Reineccius, L.K. Olson. *Gas Chromatography-Olfactometry for the determination of key odorants in foods*. En: R. Marsili (ed). *Techniques for analyzing food aroma*. Marcel Dekker Inc., New York (1997) 265-292
- [9]. J. Cacho. *Los compuestos aromáticos y su significación sensorial*. Jornada tècnica: els compostos aromàtics del vi. Vilafranca del Penedès (1999)
- [10]. A. Holley. *Le système olfactif* [en línia]. Université Claude Bernard Lyon 1 (2001). <<http://olfac.univ-lyon1.fr/sysolf.htm>> [Consulta 10/09/2001]
- [11]. E. Peynaud, J. Blouin (eds). *El gusto del vino*. Mundi-Prensa, Madrid (1999)
- [12]. J. Candau. *La tenacidad de los recuerdos olfativos*. *Mundo Científico*, 227 (2001) 50-54
- [13]. R. Gervais. *Olores y memoria olfativa*. *Mundo Científico*, 227 (2001) 55-57
- [14]. A. Masó. *El olfato: un sentido con mucha memoria*. *Mundo Científico*, 227 (2001) 74-77
- [15]. R. J. McGorrin. *Character impact compounds: flavors and off-flavors in foods*. En: R. Marsili (ed). *Flavor, fragrance and odor analysis*. Marcel Dekker Inc., New York Basel (2002) 375-413
- [16]. A.C. Noble, R.A. Arnold, J. Buechsenstein, E.J. Leach, J.O. Schimdt, P.M. Stern. *Modification of a standardized system of wine aroma terminology*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38 (1987) 143-146

- [17]. A.C. Noble, R.A. Arnold, B. M. Masuda, S.D. Pecore, J.O. Schimdt, P.M. Stern. *Progress towards a standardized system of wine aroma terminology*. Am. J. Enol. Vitic., 35 (1984) 107-109
- [18]. J. Ortega. *El aroma de los vinos de Jerez*. Alimentaria, noviembre (1985) 35-40
- [19]. A. Rapp, H. Mandery. *Wine aroma*. Experientia, 42 (1986) 873-884
- [20]. J. Marais. *Wine aroma composition*. Food Review, 17 (1991) 18-21
- [21]. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdiou (eds). Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine. Stabilization and Treatments. John Wiley & Sons LTD, Chichester (2000)
- [22]. V. Ferreira. *Los aromas del vino*. Curs: Temas actuales de interés enológico. Tarragona (2001)
- [23]. P. Schreier. *Flavor composition of wines: a review*. C.R.C. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 12 (1979) 59-111
- [24]. L. Nykänen, H. Suomalinen (eds). *Aroma of beer, wine and distilled beverages*. D. Reidel Publishing Company, Berlin (1983)
- [25]. G. Montedoro, M. Bertuccioli. *The flavour of wines, vermouth and fortified wines*. En: I.D. Morton, A.J. Macleod (eds). Food Flavours Part B. The flavour of beverages. Elsevier, Amsterdam (1986)
- [26]. L. Nykänen. *Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages*. Am. J. Enol. Vitic., 37 (1986) 84-95
- [27]. H. Maarse, C.A. Visscher (eds). *Volatile compounds in food: alcoholic beverages*. TNO-CIVO Food Analysis Institute, Zeist (1989)
- [28]. A.L. Waterhouse, S.E. Ebeler (eds). *Chemistry of wine flavor*. American Chemical Society, Washington (1998)
- [29]. A. Bertrand, P. Guedes de Pinho, A. Anocibar Beloqui. *Les constituants organiques majoritaires du vin, les constituants volatils: teneurs trouvees, exemples d'analyses*. Office International de la Vigne et du Vin, FV 971 (1994)
- [30]. M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. *Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma (review)*. J. Chromatogr. A, 881 (2000) 569-581
- [31]. V. Ferreira, R. López, M. Aznar. *Olfactometry and aroma extract dilution analysis of wines*. En: J.F. Jackson, H.F. Linskens (eds). Analysis of taste and aroma. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2002) 89-117
- [32]. A. Rapp. *Volatile flavour of wine: correlation between instrument analysis and sensory perception*. Nahrung, 42 (1998) 351-363
- [33]. R. T. Heide. *The flavour of distilled beverages*. En: I.D. Morton, A.J. Macleod (eds). Food Flavours. Part B: The flavour of beverages. Elsevier, Amsterdam (1986) 239-336
- [34]. V.C. Cole, A.C. Noble. *Flavor chemistry and assessment*. En: A.G.H. Lea, J.R. Piggott (eds). Fermented beverage production. Blackie academic & professional, Glasgow (1995) 361-387

- [35]. L. Nykänen, I. Nykänen. *Rum flavour*. En: J. Piggott (ed). *Flavour of distilled beverages: origin and development*. Ellis Horwood Limited, Chichester (1983) 49-63
- [36]. L. Nykänen, I. Nykänen. *Distilled beverages*. En: H. Maarse (ed). *Volatile compounds in foods and beverages*. Marcel Dekker Inc., New York (1991) 547-580
- [37]. J.A. Pino. *Los componentes volátiles del aroma del ron*. *Alimentaria*, 269 (1996) 79-85
- [38]. M. González, G. Reglero, M. Herraiz, M.D. Cabezudo. *El análisis íntegro de los vinos. I. Componentes volátiles mayoritarios*. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, marzo-abril (1985) 131-135
- [39]. M. González, G. Reglero, M. Herraiz, M.D. Cabezudo. *El análisis íntegro de los vinos. II. Componentes volátiles minoritarios*. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, septiembre-octubre (1985) 87-92
- [40]. J.A. Maga. *Analysis of aroma volatiles*. En: M.H. Gordon (ed). *Principles and applications of gas chromatography in food analysis*. Ellis Horwood Limited, Chichester (1990) 86-110
- [41]. P.X. Etiévant. *Mise au point sur les techniques d'extraction et de séparation des constituants volatils du vin*. *Connais. Vigne Vin*, 21 (1987) 247-265
- [42]. G.P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz, J. Tabera. *A comparison of different extraction methods for the volatile components of grape juice*. *J. Chromatogr. Sci.*, 29 (1991) 11-15
- [43]. G.P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz. *Rapid extraction of wine aroma compounds using a new simultaneous distillation-solvent extraction device*. *Food Chem.*, 56 (1996) 439-444
- [44]. G. Vernin. *Les composants volatils des arômes de vin et de jus de raisin*. *Parfums, cosmétiques, arômes*, 68 (1986) 83-93
- [45]. M.P. Romero, A. Casp, J.M. Carrasco. *Determinación de componentes volátiles en vinos*. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 26 (1986) 338-348
- [46]. L. Moio, E. Chambellant, I. Lesschaeve, S. Issanchou, P. Schlich, P.X. Etiévant. *Production of representative wine extracts for chemical and olfactory analysis*. *Ital. J. Food Sci.*, 3 (1995) 265-278
- [47]. V. Ferreira, A. Rapp, J.F. Cacho, H. Hastrich, I. Yavas. *Fast and quantitative determination of wine flavor compounds using microextraction with Freon 113*. *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993) 1413-1420
- [48]. V. Ferreira, M. Sharman, J.F. Cacho, J. Dennis. *New and efficient microextraction/solid-phase extraction method for the gas chromatographic analysis of wine volatiles*. *J. Chromatogr. A*, 731 (1996) 247-259
- [49]. Y.Z. Gunata, C.L. Bayonove, R.L. Baumes. R.E. Cordonnier. *The aroma of grapes: extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components*. *J. Chromatogr. A*, 331 (1985) 83-90
- [50]. N. Abbott, P. Etiévant, S. Issanchou, D. Langlois. *Critical evaluation of two commonly used techniques for the treatment of data from extract dilution sniffing analysis*. *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993) 1698-1703

- [51]. C.E. Edwards, R.B. Beelman. *Extraction and analysis of volatile compounds in white wines using Amberlite XAD-2 resin and capillary gas chromatography*. J. Agric. Food Chem., 38 (1990) 216-220
- [52]. S. Gianotti, R. Di Stefano. *Metodo per la determinazione dei composti volatili di fermentazione*. Enotecnico (1991) 61-64
- [53]. J. Marais, C.J. Van Wyk, A. Rapp. *Effect of storage time, temperature and region on the levels of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene and other volatiles, and on quality of Weisser Riesling wines*. S. Afr. J. Enol. Vitic., 13 (1992) 33-44
- [54]. V. Ferreira, L. Ortega, A. Escudero, J.F. Cacho. *A comparative study of the ability of different solvents and adsorbents to extract aroma compounds from alcoholic beverages*. J. Chrom. Science, 38 (2000) 469-476
- [55]. M. Shimoda, Y. Shibamoto, A.C. Noble. *Evaluation of headspace volatiles of Cabernet sauvignon wines sampled by an on-column method*. J. Agric. Food Chem., 41 (1993) 1664-1668
- [56]. M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. *Chromatographic analysis of volatile sulphur compounds in wines using the static headspace techniques with flame photometric detection*. J. Chromatogr. A, 773 (1997) 261-269
- [57]. M.R. Salinas, G.L. Alonso, F.J. Esteban-Infantes. *Adsorption-thermal desorption-gas chromatography applied to the determination of wine aromas*. J. Agric. Food Chem., 41 (1993) 1664-1668
- [58]. L. Rosillo, M.R. Salinas, J. Garijo, G.L. Alonso. *Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis. Application to the differentiation of some Vitis vinifera varieties*. J. Chromatogr. A, 847 (1999) 155-159
- [59]. Y. Le Fur, V. Mercurio, L. Moio, J. Blanquet, J.M. Meunier. *A new approach to examine the relationships between sensory and gas chromatography-olfactometry data using generalized procrustes analysis applied to six French Chardonnay wines*. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 443-452
- [60]. M. Mestres, M.P. Martí, M. Miracle, C. Sala, O. Busto, J. Guasch. *Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis de aromas en vinos*. Técnicas de Laboratorio, 251 (2000) 289-295
- [61]. Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz. *Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis*. Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 948-955
- [62]. J. Díez, C. Domínguez, D.A. Guillén, R. Veas, C.G. Barroso. *Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines*. J. Chromatogr. A, 1025 (2004) 263-267
- [63]. M.R. Salinas, A. Zalacain, F. Pardo, G.L. Alonso. *Stir bar sorptive extraction applied to volatile constituents evolution during vitis vinifera ripening*. J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 4821-4827
- [64]. C. Sala, M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch. *Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres*. J. Chromatogr. A, 880 (2000) 93-99

- [65]. M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. *Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection*. *J. Chromatogr. A*, 977 (2002) 1-8
- [66]. W. Grosch. *Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs)*. *Flavour Fragrance J.*, 9 (1994) 147-158
- [67]. B.S. Mistry, T. Reineccius, L.K. Olson. *Gas chromatography-olfactometry for the determination of key odorants in foods*. En: R. Marsili (ed). *Techniques for analyzing food aroma*. Marcel Dekker Inc., New York (1997) 265-292
- [68]. J.V. Leland, P. Schieberle, A. Buettner, T.E. Acree (eds). *Gas chromatography-olfactometry. The state of the art*. American Chemical Society, Washington (2001)
- [69]. I. Blank. *Gas chromatography-olfactometry in food aroma analysis*. En: R. Marsili (ed). *Flavor, fragrance and odor analysis*. Marcel Dekker Inc., New York (2002) 297-332
- [70]. A. Chaintreau. *Quantitative use of gas chromatography-olfactometry: the GC-SNIF method*. En: R. Marsili (ed). *Flavor, fragrance and odor analysis*. Marcel Dekker Inc., New York (2002) 333-348
- [71]. J.W. Gardner, P.N. Bartlett. *A brief history of electronic noses*. *Sens. Actuators B*, 18-19 (1994) 211-220
- [72]. D.J. Strike, M.G.H. Meijerink, M. Koudelka-Hep. *Electronic noses – a mini review*. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364 (1999) 499-505
- [73]. C. García, M.E. Fernández, J.L. Pérez, B. Moreno. *Electronic olfactometry. A new tool in analytical chemistry*. *Quim. Anal.*, 20 (2001) 3-11
- [74]. C. Pérès, F. Begnaud, L. Eveleigh, J.L. Berdagué. *Fast characterization of foodsutff by headspace mass spectrometry (HS-MS)*. *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 858-866
- [75]. M.P. Martí, R. Boqué, O. Busto, J. Guasch. *Electronic noses in the quality control of alcoholic beverages*. *Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 57-66

CAPÍTOL III

Anàlisi de l'aroma mitjançant la cromatografia de gasos

La cromatografia de gasos és sens dubte la tècnica més adequada per a la determinació dels diferents compostos volàtils que constitueixen l'aroma del vi. La utilització d'aquesta tècnica, però, comporta un pas previ com és la separació i concentració dels compostos volàtils d'interès. Aquesta primera etapa de pretractament de la mostra és la més crítica de tot el procés analític perquè pot generar problemes importants com són la pèrdua d'analits, contaminació de la mostra, discriminació de compostos, etc., a més a més de suposar una despesa de temps considerable en molts casos. En general, de tota la sèrie de processos que un mètode analític implica, com són la presa i preparació de la mostra, la separació dels analits a estudiar, la detecció i l'anàlisi de les dades obtingudes, la major part del temps s'utilitza en la preparació de la mostra ja que aquesta requereix d'etapes més o menys laborioses d'extracció, concentració, fraccionament i/o aïllament dels analits. És per tot això que la major part de la recerca que es duu a terme actualment en el desenvolupament de mètodes cromatogràfics per a la determinació de compostos volàtils, està enfocada a la millora del pretractament de la mostra i no a la separació cromatogràfica en si, ja que la cromatografia de gasos és, avui en dia, una tècnica molt consolidada.

La microextracció en fase sòlida (SPME) és una tècnica de pretractament relativament nova en la que, amb una mínima manipulació de la mostra, es duu a terme la separació dels analits de la matriu i la seva concentració de manera simultània, la qual cosa suposa un estalvi de temps important. En la primera part d'aquest capítol es presenta el mètode que es va posar a punt per a la determinació d'èsters de l'aroma del vi utilitzant l'SPME com a tècnica de pretractament. En el marc d'un projecte de cooperació científica amb el *Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia* (IIIA) de Cuba, el mètode desenvolupat per a l'anàlisi de vins es va adaptar després a la determinació d'èsters volàtils en els roms.

Quan l'objectiu de l'estudi no és la determinació d'uns compostos en concret sinó que el que es pretén és caracteritzar l'aroma d'una substància, amb els detectors cromatogràfics convencionals no n'hi ha prou i cal recórrer a la cromatografia de gasos amb detecció olfactimètrica (GCO) en la que s'utilitza el nas humà com a detector cromatogràfic. En la segona part d'aquest capítol es presenten, en primer lloc, els estudis preliminars que es van dur a terme en la present tesi doctoral per tal de posar a punt la GCO al nostre laboratori, ja que era la primera vegada que aquesta s'utilitzava. En aquests estudis preliminars es van analitzar tota una sèrie de vins monovarietals mitjançant la GCO i es van determinar les intensitats aromàtiques dels compostos olorosos utilitzant la tècnica de dilució AEDA (*Aroma Extract Dilution Analysis*).

La part més novedosa ha estat el desenvolupament d'un mètode que utilitza l'SPME com a tècnica de pretractament i que permet l'avaluació de la intensitat aromàtica dels diferents compostos mitjançant una nova modalitat de l'esmentada tècnica de dilució AEDA.

III.1 ANÀLISI DELS ÈSTERS DE L'AROMA MITJANÇANT SPME-GC-FID

Els èsters són compostos volàtils majoritaris de l'aroma del vi, i de les begudes alcohòliques en general, que es formen principalment en els processos fermentatius. Les olors afruitades que aporten aquesta família de compostos constitueixen una part important de la base de l'aroma de les begudes alcohòliques.

L'anàlisi de la majoria de compostos d'aquesta família es podria dur a terme mitjançant la injecció directa de la mostra a l'injector del cromatògraf de gasos ja que, molts d'ells, es troben en uns nivells de concentració (mg/L) superiors al límit de detecció de la tècnica. No obstant això, la injecció directa és poc recomanable perquè, dins de l'injector del cromatògraf, es poden produir reaccions de piròlisi dels compostos no volàtils de la matriu que poden generar artefactes susceptibles de interferir en la determinació.

Tal i com s'ha comentat en el capítol anterior, són diverses les tècniques de pretractament que s'han utilitzat per a l'aïllament i la concentració dels compostos volàtils que conformen l'aroma del vi. Molts dels mètodes desenvolupats, sobretot els que utilitzen les tècniques de pretractament més clàssiques, són llargs, tediosos i acostumen a utilitzar grans volums de dissolvents orgànics, amb els inconvenients que això suposa [1-7]. L'SPME és una tècnica que permet l'extracció i concentració dels compostos volàtils en un sol pas i d'una manera senzilla, ràpida i sense utilitzar dissolvents orgànics.

III.1.1 La microextracció en fase sòlida

L'SPME, desenvolupada per Pawliszyn i els seus col·laboradors a començaments dels anys 90 [8-10], és una tècnica de preparació de mostra que consisteix en la utilització d'una fibra de sílice fosa de molt petites dimensions recoberta amb una fase estacionària polimèrica que, en exposar-la a la mostra, permet extreure els analits d'interès i, a la vegada, concentrar-los. El fet de produir-se l'extracció i concentració en un sol pas és un avantatge important d'aquesta tècnica per l'estalvi de temps que això suposa. A més, la seva aplicació és molt senzilla ja que tan sols requereix d'un dispositiu especial que consisteix en una mena de xeringa modificada o *holder*.

A la figura III.1 es mostra el procediment a seguir per tal de dur a terme aquest tipus d'extracció. Primerament, s'introdueix la mostra en un vial el qual es tanca hermèticament amb un *septum*. Després, atravesant el *septum* amb l'agulla i prement l'èmbol del *holder*, es desmbeina la fibra de l'interior de l'agulla i s'exposa a la mostra fins que s'estableix l'equilibri dels analits entre la mostra i la fase estacionària de la fibra. En funció de les característiques de la fase estacionària utilitzada, tindrà lloc un procés d'adsorció i/o absorció de l'analit sobre la fibra.

Tal i com es pot observar a la figura III.1, existeixen dues modalitats diferents per dur a terme l'extracció dels analits. En la primera, la fibra s'exposa a l'espai de cap de la mostra (HS-SPME), mentre que en la segona la fibra es submergeix directament dins la mostra (DI-SPME). Pel que fa a la microextracció directa, aquesta es sol utilitzar en mostres netes i amb analits no massa volàtils. Per a l'anàlisi de compostos que es troben en matrius complexes és més adequat utilitzar la modalitat de l'espai de cap ja que d'aquesta manera el temps de vida de la fibra és molt més llarg. Un cop finalitzat el procés d'extracció es puja l'èmbol del *holder* per retornar la fibra a l'interior de l'agulla que la protegeix.

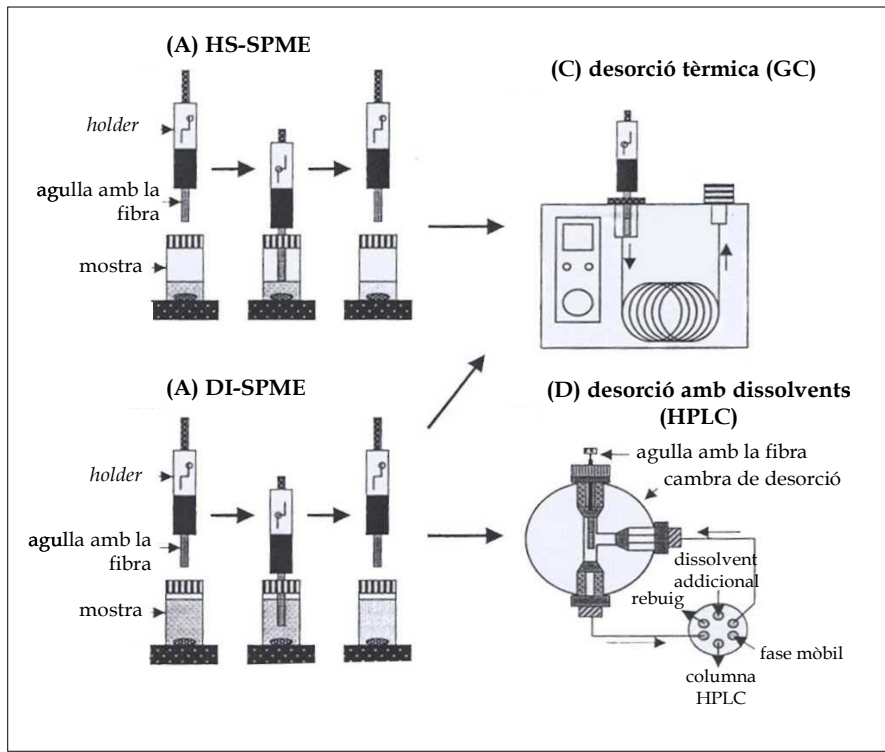


Figura III.1. Procediment de l'SPME [11].

El següent pas és la desorció dels analits de la fibra que es duu a terme de manera diferent depenent de si la separació és mitjançant cromatografia de gasos o cromatografia líquida. En el cas de la cromatografia de gasos s'insereix l'agulla a l'injector del cromatògraf on s'exposa la fibra a una temperatura elevada (200-300°C) la qual provoca la desorció instantània dels analits que entraran a la columna cromatogràfica per ser analitzats. Si es treballa amb cromatografia líquida, la desorció dels analits es duu a terme en una interfase prèvia a l'HPLC que consisteix en una vàlvula de sis vies i una cambra de desorció especial. En aquest cas la desorció no és tèrmica sinó que s'utilitza un dissolvent que s'escull tenint en compte els analits a estudiar i el tipus de fase estacionària.

En el procés d'extracció existeixen diversos paràmetres que poden influir en la quantitat d'analit extret i que, per tant, en el desenvolupament de mètodes analítics caldrà optimitzar-los per a que els paràmetres de qualitat (repetitivitat, reproductibilitat, límits de detecció, etc.) que s'obtinguin en aplicar la tècnica siguin els adequats. Els paràmetres més importants es descriuen a continuació.

Tipus de fibres

La quantitat d'analit extreta depèn en gran mesura del tipus de fase estacionària que recobreix la fibra de sílice. Tal com mostra la figura III.2, en el mercat hi ha disponibles diversos tipus de fases estacionàries. Depenent de la manera de com aquestes estan immobilitzades sobre la fibra de sílice fosa podem trobar fases lligades, fases no lligades, fases parcialment entrecruades i fases fortament entrecruades. Les fases no lligades són estables amb alguns dissolvents orgànics miscibles amb l'aigua però quan s'utilitzen dissolvents apolars es pot produir un inflament de la fibra. Per altra banda, les fases lligades són estables amb tots els dissolvents orgànics exceptuant-ne alguns d'apolars. Les fases entrecruades, tant les que ho estan parcialment com les que ho estan fortament, són estables amb la majoria de dissolvents miscibles amb l'aigua i també amb alguns apolars [11].

L'afinitat de la fibra per un tipus d'analit depèn del principi "*like dissolves like*" que es podria traduir com "igual dissol a igual". Per exemple, les fibres apolars de pòlidimetilsiloxà (PDMS) són molt efectives en l'extracció de compostos volàtils apolars. No obstant això, si s'optimitzen adequadament les altres variables d'extracció també es poden obtenir bones eficàcies en l'extracció de compostos amb certa polaritat. De la mateixa manera, les fibres polars de poliàcrilat (PA) són més adequades per a l'extracció de compostos més polars, com per exemple alcohols i fenols. En les fibres que contenen mesclades de diferents fases estacionàries, com les que contenen divinilbenzè (DVB) o carbó porós activat (Carboxen, CAR), s'incrementa la seva capacitat d'extracció a causa de la potenciació mútua de

l'efecte d'adsorció i distribució de la fase estacionària. Les fibres de PDMS-DVB, CAR-DVB i Carbowax (CW)-DVB s'utilitzen per a l'extracció de compostos volàtils amb un baix pes molecular i compostos polars. Pel que fa a les fibres de CAR-PDMS, presenten una eficàcia en l'extracció millor que les de PDMS de 100 μm i d'altres similars, però la seva repetitivitat és baixa i, a més, necessiten temps llargs per assolir l'equilibri.

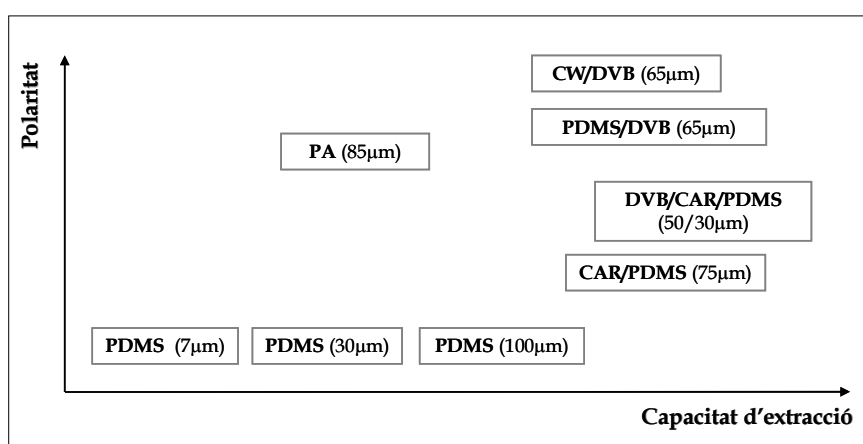


Figura III.2. Propietats de les diferents fases estacionàries utilitzades en l'SPME. PDMS: polidimetilsiloxà; PA: poliacrilat; DVB: divinilbenzè; CW: carbowax; CAR: carboxen.

El gruix de la fase estacionària és un altre paràmetre a tenir en compte. S'ha comprovat que els compostos més volàtils requereixen recobriments gruixuts, mentre que les fases més fines són més efectives per als compostos semivolàtils. Per altra banda, les fibres recobertes amb fases estacionàries més gruixudes necessiten temps d'extracció més llargs per arribar a l'equilibri però, a la vegada, proporcionen una major sensibilitat perquè extreuen més quantitat d'analit [12].

Variables d'extracció

Tot i que, com ja s'ha dit, el tipus de fase estacionària que recobreixi la fibra afectarà a l'eficàcia de l'extracció, hi ha també altres paràmetres que afecten i que, per tant, cal tenir en compte. En aquest apartat s'inclouen les altres variables de caràcter més experimental com són el temps d'extracció, l'agitació, l'addició de sals (força iònica), el pH, la temperatura i el volum de mostra.

El temps d'extracció ve determinat principalment pel coeficient de partició de l'analit entre la fase estacionària i la matriu de la mostra, en el cas de l'extracció directa (DI-SPME). Quan l'extracció és duu a terme a l'espai de cap (HS-SPME) cal introduir un nou equilibri ja que, a part del que s'estableix entre la fibra i l'espai de cap, existeix l'equilibri entre la fase líquida i la gasosa. Tot i que la sensibilitat de la tècnica és màxima al punt d'equilibri, no és del tot necessari treballar en condicions d'equilibri per a obtenir una bona precisió dels resultats de l'anàlisi, ja que existeix una relació lineal entre la quantitat d'analit extreta per la fibra i la concentració inicial de l'analit en la matriu [11]. No obstant això, quan es treballa en condicions de no-equilibri cal controlar minuciosament totes les variables que influeixen en l'extracció, principalment el temps.

Pel que fa a l'agitació de la mostra, aquesta accelera la transferència dels analits de la matriu de la mostra a la fibra. La més àmpliament utilitzada és l'agitació magnètica. Tot i que el temps d'extracció necessari per assolir l'equilibri disminueix progressivament amb l'augment de l'agitació, si l'agitació és massa ràpida pot arribar a ser incontrolable i es poden produir variacions en l'equilibri, la qual cosa es pot traduir en una precisió molt baixa.

L'eficàcia de l'extracció també es pot augmentar addicionant sals solubles a la mostra, és a dir, variant la força iònica. Les sals més utilitzades són el clorur sòdic i el sulfat amònic [11]. En principi, la saturació de la mostra amb sal augmenta l'eficàcia de l'extracció de compostos apolars. No obstant això, quan s'utilitza la

modalitat DI-SPME s'ha d'anar molt en compte amb l'addició de sal ja que en alguns casos pot danyar la fibra.

El pH és un altre paràmetre que pot afectar a l'extracció dels analits. En general, la mostra s'acidifica per a l'extracció d'analits àcids i s'alcalinitza per a l'extracció d'analits bàsics. Cal tenir cura, però, quan es treballa submergint la fibra dins a la mostra ja que medis massa àcids la poden malmetre.

La temperatura d'extracció és un dels altres paràmetres importants a controlar que afecta tant a la sensibilitat com a la cinètica de l'extracció. En el cas de l'extracció a l'espai de cap, l'augment de la temperatura provoca que més compostos de la matriu passin a l'espai de cap de la mostra però, per altra banda, fa que disminueixin els coeficients de partició dels analits entre la fibra i la fase gasosa ja que el procés d'extracció en la fibra és exotèrmic [13]. Zhang i Pawliszyn [14] van idear un dispositiu per a refredar la fibra al mateix temps que es calenta la mostra i d'aquesta manera augmentar l'eficàcia de l'extracció en aplicacions on cal escalfar molt la mostra per tal de que els analits passin a l'espai de cap.

Una altra variable a considerar és el volum de mostra. En el cas de l'extracció directa, si la constant de distribució de l'analit entre la fibra i la matriu és molt gran, la sensibilitat es veu afectada pel volum de mostra ja que la quantitat d'analit que s'extreu augmenta amb aquest. Però si el volum de mostra és suficientment gran, la quantitat d'analit extreta és independent d'aquesta variable. Pel que fa a l'aplicació de la tècnica a l'espai de cap, per augmentar la sensibilitat cal minimitzar el volum de la fase gasosa ja que, així, els compostos volàtils s'acumulen a l'espai de cap [12].

Variables de desorció

En cromatografia de gasos, l'eficàcia de la desorció tèrmica que es duu a terme directament dins l'injector del cromatògraf, dependrà de la volatilitat de l'analit,

del gruix de la fase estacionària de la fibra, de la temperatura i del temps d'exposició de la fibra dins de l'injector [15]. La temperatura de desorció es troba normalment entre 150 i 250°C i, generalment, l'òptima és el punt d'ebullició de l'analit menys volàtil. Pel que fa al temps que cal tenir exposada la fibra dins de l'injector, aquest depèn de la temperatura però, en la majoria dels casos, la desorció és instantània i, per tant, amb pocs segons es desorbeixen tots els analits. Tot i això, moltes vegades es deixa la fibra exposada a l'injector durant uns minuts per tal d'assegurar que quedi neta i que no es produirà cap efecte memòria en les anàlisis posteriors. Un paràmetre que té a veure amb la resolució cromatogràfica és el tipus de *liner* de l'injector. S'ha comprovat que el seu diàmetre influeix en l'amplada dels pics cromatogràfics, sobretot els dels compostos que elueixen primer [16]. El *liner* que s'acostuma a utilitzar quan es treballa amb SPME és de 0.75 mm de diàmetre, amb el qual s'obtenen pics més estrets i, per tant, millor resolució.

Quan la determinació dels compostos es duu a terme mitjançant cromatografia líquida, hi ha dues possibilitats en la desorció mitjançant un dissolvent: la desorció dinàmica i la desorció estàtica [11]. En la primera, els analits es desorbeixen fent passar contínuament una fase mòbil. En el cas de que els analits estiguin fortament retinguts a la fibra, es pot dur a terme una desorció estàtica exposant la fibra en la fase mòbil o, fins i tot, en un altre dissolvent amb una major força elutròpica, durant un temps determinat. En cada cas, però, caldrà optimitzar la desorció per tal de que la quantitat de dissolvent utilitzada sigui la mínima.

Aplicació de l'SPME a l'anàlisi de l'aroma de begudes alcohòliques

Des del desenvolupament de l'SPME a principis de la dècada dels noranta, són nombroses les aplicacions que s'han dut a terme d'aquesta tècnica al camp de l'anàlisi dels aliments [11]. El fet de que es pugui aplicar de manera senzilla a mostres líquides, sòlides o gasoses, ja que no requereix d'instrumentació sofisticada, i l'estalvi de temps que suposa que l'extracció i concentració es dugui a

terme en un sol pas, la fan una tècnica atractiva per al pretractament de mostres amb matrius complexes com acostumen a ser les dels aliments.

Pel que fa al cas concret de les begudes alcohòliques, aquesta tècnica també ha estat àmpliament utilitzada i amb resultats força exitosos. La taula III.1 mostra un recull bibliogràfic de les principals aplicacions que s'hi han dut a terme en l'anàlisi de compostos de l'aroma de begudes alcohòliques.

Com es pot observar, les aplicacions són molt variades pel que fa al tipus de compostos que s'han analitzat. L'SPME s'ha utilitzat en la determinació de compostos específics de l'aroma del vi que a concentracions elevades poden tenir un impacte sensorial negatiu com és el diacetil [16], alguns fenols volàtils [17-19] o la família dels compostos sofrats [20-26]. Aquests últims també s'han determinat en cervesa [27, 28]. També s'han desenvolupat diverses aplicacions a la determinació de cloroanisols [29-32], principalment el 2,4,6-tricloroanisole (TCA), que es troben en el vi a causa de contaminacions externes i que són els causants del defecte aromàtic "gust de suro". També s'han desenvolupat metodologies per a determinar els clorofenols, que són els precursors dels cloroanisols [33, 34].

Altres treballs han estat dirigits a l'anàlisi de famílies de compostos de gran importància en l'aroma de les begudes alcohòliques, com són els èsters i els alcohols [35-40]. En el cas concret del vi, altres famílies de compostos que s'han analitzat utilitzant l'SPME per a la seva extracció i concentració, són les implicades en l'aroma varietal d'alguns vins com són les pirazines [41-45], els terpens [46, 47] i els norisoprenoides [48]. En el cas de la cervesa s'ha desenvolupat un mètode per a la determinació específica del linalool [49].

Compost o família de compostos	Tipus de beguda	Ref.
Aldehids	Cervesa	[50]
	Vodka	[51]
Cetones	Brandy	[75]
	Vi	[16]
Cloroanisols	Vi	[29-32]
Clorofenols	Vi	[33, 34]
Èsters	Rom	[36]
	Tequila	[40]
	Vi	[37-39]
Èsters i alcohols	Cervesa	[35]
Fenols volàtils	Vi	[17-19]
Fracció volàtil	Brandy	[71, 72]
	Cava	[69, 70]
	Vi	[52-68]
	Vodka	[73]
	Whisky	[74]
Pirazines	Vi	[41-45]
Sofrats	Cervesa	[27, 28]
	Vi	[20-26]
Terpens	Cervesa	[49]
	Vi	[46, 47]
Terpens i norisoprenoids	Vi	[48]

Taula III.1. Aplicacions de l'SPME a l'anàlisi de compostos volàtils de begudes alcohòliques.

Per a la determinació d'aldehids s'han desenvolupat unes aplicacions interessants en cervesa i vodka, en les que s'ha dut a terme una extracció selectiva d'aquests compostos utilitzant un agent derivatitzant en la mateixa fibra per tal d'extreure selectivament aquesta família de compostos [50, 51].

Altres treballs de caire diferent són els que han utilitzat l'SPME per a estudiar el perfil de la fracció volàtil de la beguda en qüestió [52-74]. En la majoria d'aquests treballs l'objectiu no era la determinació d'uns compostos específics sinó extreure el màxim possible de compostos volàtils.

III.1.2 Aplicació de l'SPME a l'anàlisi dels èsters de l'aroma del vi

Tal i com s'ha comentat reiteradament, l'SPME presenta avantatges importants front altres tècniques d'anàlisi més clàssiques que són les que s'han utilitzat majoritàriament per a l'aïllament dels compostos volàtils del vi. La seva simplicitat i rapidesa són un reclam important a l'hora d'escollir-la per a l'obtenció d'extractes aromàtics.

En el moment en que es va plantejar aquest estudi, en la bibliografia es van trobar algunes aplicacions d'aquesta tècnica en el camp de les begudes alcohòliques que presentaven resultats força bons. S'havien dut a terme alguns estudis de caracterització de la fracció volàtil del vi [46, 47, 52-54] i del vodka [73], així com també l'anàlisi de compostos més específics com el 2,4,6-tricloroanisole [29] en el vi o alguns èsters i alcohols en cervesa [35]. En el nostre grup de recerca ja es tenia experiència en la utilització de l'SPME, la qual estava donant excel·lents resultats en l'anàlisi de compostos sofrats del vi [20]. El fet d'haver-hi relativament poques aplicacions d'aquesta tècnica a l'anàlisi de compostos de l'aroma del vi i els bons resultats que havia proporcionat fins al moment, ens van fer decidir a estudiar l'aplicació d'aquesta tècnica a la determinació d'una família de compostos molt important en l'aroma del vi com són els èsters.

A continuació es descriu tot el treball experimental dut a terme per al desenvolupament d'un mètode per a la determinació dels èsters mitjançant SPME-GC-FID, així com també es fa una discussió dels resultats obtinguts.

III.1.2.1 Materials i mètodes

Els compostos determinats en aquest treball van ser una bona part dels èsters etílics i acetats que es troben en l'aroma de gairebé tots els vins. Aquests es mostren a la taula III.2 juntament amb el compost que es va escollir com a patró

intern (PI) i tota una sèrie d'alcohols que es van afegir a les solucions de treball. En tots els casos la puresa d'aquests compostos va ser superior al 98%.

Compostos		
Acetat d'etil	Acetat de 2-feniletíl	Acetat d'hexil
Acetat d'isoamil	Acetat d'isobutil	1-butanol
Butirat d'etil	Decanoat d'etil	2-feniletanol
Hexanoat d'etil	1-hexanol	Lactat d'etil
3-metil-1-butanol	2-metil-1-propanol	Octanoat d'etil
Octanoat de metil (PI)	1-propanol	

Taula III.2. Relació de compostos utilitzats en l'estudi.

Solucions patró

De cadascun dels compostos es van preparar solucions patró individuals de 1000 mg/L en etanol de puresa HPLC. Les solucions de treball es van preparar addicionant diferents quantitats de cadascuna de les solucions individuals o, en alguns casos, addicionant alíquotes del patró pur, a un vi sintètic. Aquest era una solució hidroalcohòlica que pretenia assimilar-se a la matriu d'un vi. Un litre d'aquesta solució es va obtenir dissolvent 3.5 g d'àcid tartàric, que és l'àcid majoritari del vi, amb la quantitat adequada d'aigua desionitzada i addicionant 120 mL d'etanol. D'aquesta manera s'aconseguia una solució amb un contingut d'etanol al 12% vol, que és un valor mitjà entre el 9 i el 15% vol que poden tenir els vins comercials. Després la solució es va ajustar, amb NaOH 1 M, a un pH de 3.5 que és aproximadament el valor de pH que tenen els vins.

Per a la construcció de les rectes de calibratge es van preparar en etanol tres solucions mare independents que contenien tots els èsters a estudiar, per tal de

detectar possibles errors sistemàtics en la preparació de les solucions de calibratge. Així doncs, aquestes últimes es van preparar addicionant diferents quantitats de la solució mare corresponent al vi sintètic, al qual se li havia addicionat el patró intern, en el cas que aquest fos necessari. Es va considerar oportú afegir també a les solucions de calibratge alguns alcohols que es troben sempre presents a l'aroma del vi i que, al ser compostos majoritaris igual que els èsters, podrien influir en la determinació.

Fibres

El *holder* d'SPME i les diferents fibres que es van utilitzar en l'estudi van ser subministrades per Supelco. Abans de la seva utilització, les fibres es van condicionar exposant-les a l'injector del cromatògraf de gasos a una certa temperatura i durant un cert temps, depenent del tipus de fase estacionària.

Fase estacionària	Temperatura	Temps
Polidimetilsiloxà (PDMS) 100 µm	250°C	1 h
Poliacrilat (PA) 85 µm	300°C	2 h
Carbowax-divinilbenzè (CW-DVB) 65 µm	250°C	30 min
Carboxen-polidimetilsiloxà (CAR-PDMS) 75 µm	270°C	30 min
Divinilbenzè-carboxen-polidimetilsiloxà (DVB-CAR-PDMS) 50/30 µm	270°C	1h
Polidimetilsiloxà-divinilbenzè (PDMS-DVB) 65 µm	260°C	30 min

Taula III.3. Diferents tipus de fibres d'SPME assajades en l'estudi i condicions de temps i temperatura utilitzades per al seu condicionament.

A la taula III.3 es mostren les diferents fibres estudiades i els paràmetres de temps i temperatura que es van utilitzar per al seu condicionament. Aquests paràmetres, en tots els casos, eren els que recomanava el fabricant de les fibres.

Procediment d'extracció

En el procediment d'extracció optimitzat (apartat III.1.2.2) s'introduïen 6 g de clorur sòdic i 25 mL de mostra addicionats amb 0.1 mg/L del patró intern en un vial de 50 mL de capacitat. Una vegada tancat hermèticament amb un *septum* de silicona, es deixava el vial durant 15 minuts dins un bany termostatitzat a 25°C i amb agitació magnètica constant (500 rpm) amb l'objectiu d'equilibrar els compostos volàtils entre el líquid i l'espai de cap de la mostra. Passat aquest temps, s'exposava la fibra de PDMS a l'espai de cap de la mostra durant 15 minuts per tal de que s'establís l'equilibri dels compostos d'interès entre la mostra i la fase estacionària. Una vegada acabada l'extracció, es retirava la fibra del vial i s'introduïa a l'injector del cromatògraf de gasos on s'exposava durant 1 minut a 250°C per a que es produís la desorció dels analits.

Anàlisi cromatogràfica

Les anàlisis es van dur a terme en un cromatògraf de gasos Hewlett-Packard 6890 equipat amb un detector FID. La injecció es va fer en mode *splitless* i utilitzant un *liner* de 0.75 mm. Els analits es van separar amb una columna CP-Wax 57 CB (50 m x 0.25 mm x 0.2 µm) de Chrompack i aplicant la següent programació de temperatura: 30°C (1 min), 5°C/min fins a 100°C, 3°C/min fins a 210°C (30 min). El gas portador va ser heli amb un flux de 1 mL/min. La temperatura del detector va ser de 250°C i la flama es va obtenir amb 40 mL/min d'hidrogen, 450 mL/min d'aire i 45 mL/min d'heli, actuant aquest últim com a gas auxiliar.

III.1.2.2 Optimització de les variables d'extracció

Per a l'estudi de les diferents variables que influeixen en l'extracció es va utilitzar el vi sintètic addicionat amb els èsters i també alguns alcohols, especificats a la taula III.2, a la concentració a la que es troben normalment en el vi. La concentració de cada compost es va escollir en base a les dades trobades a la bibliografia [76].

De les dues modalitats d'extracció que existeixen amb SPME (HS-SPME i DI-SPME) es va decidir treballar amb l'espai de cap ja que la concentració en què es troben normalment aquests compostos al vi i la seva volatilitat garanteixen, en principi, una presència notable dels mateixos a l'espai de cap i, per tant, una bona sensibilitat de la tècnica. A més, en el cas de mostres complexes com és el vi, cal evitar, sempre que es pugui, submergir la fibra a la mostra ja que això suposa una reducció considerable del seu temps de vida.

Tipus de fibra

El primer paràmetre que es va considerar va ser el tipus de fase estacionària. En aquesta primera part de l'estudi es van assajar sis tipus diferents de fibres per tal de trobar la fase estacionària que millors resultats donava en l'extracció dels èsters. Les fibres que es van estudiar són les que es mostren a la taula III.3. Les anàlisis es van fer per triplicat i amb dues fibres de cada tipus per tal de poder detectar derives en el temps de la capacitat d'extracció de les mateixes.

Les condicions en què es van dur a terme les extraccions amb els diferents tipus de fibres es van fixar prèviament a partir de les que havien utilitzat altres autors en treballs de la bibliografia [52, 53] i també a partir de l'experiència pròpia del grup de recerca. Així doncs, en el procediment d'extracció fixat, s'introduïen 25 mL de mostra i 6 g de NaCl en un vial de 50 mL que es deixava equilibrar en un bany termostatitzat a 25°C durant 15 minuts. Un cop passat aquest temps, s'exposava la fibra a l'espai de cap de la mostra durant 30 minuts. La desorció dels analits es

duia a terme exposant la fibra a l'injector del cromatògraf de gasos a 250°C durant 1 minut.

La figura III.3 mostra les àrees obtingudes per a cada compost amb els diferents tipus de fibres. Tal i com es pot observar, la fase estacionària de PDMS era la que presentava una major eficàcia en l'extracció de la majoria dels èsters, seguida per la de PA. L'excepció va ser l'acetat d'etil, el qual s'extreia millor amb la fibra de CAR-PDMS. Aquest fet es podria explicar per la major volatilitat d'aquest compost ja que aquesta fibra, a causa de l'adsorbent de carbó porós que constitueix la fase estacionària, presenta una elevada sensibilitat per als compostos de baix pes molecular [21]. Pel que fa a la repetitivitat obtinguda amb les diferents fibres, les de PDMS juntament amb les de PA eren també les que presentaven els millors valors, entre el 6 i el 8%, els quals contrastaven amb els valors del 26% que presentaven les fibres de DVB-CAR-PDMS.

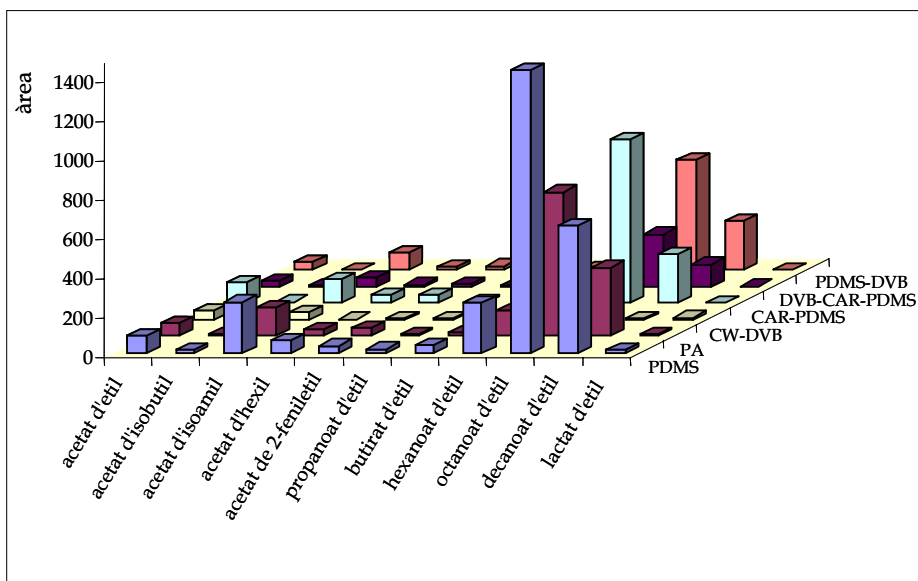


Figura III.3. Resposta dels èsters amb els diferents tipus de fibres.

Els alcohols que es van afegir a la solució sintètica no presentaven el mateix comportament que els èsters amb els diferents tipus de fase estacionària. Aquest fet es pot observar en el gràfic de la figura III.4. En aquest cas, la fibra, més polar, de PA, era la que presentava una millor eficàcia en l'extracció d'aquests compostos. Aquest fet era del tot esperable per l'afinitat que presenten les fibres de PA per als compostos polars com els alcohols.

En base a tots aquests resultats, es va escollir la fibra de PDMS ja que, a més a més de presentar la millor eficàcia en l'extracció dels èsters, tenia una menor afinitat per a l'extracció de compostos polars com els alcohols, que podrien influir en la determinació ja que, igual que els èsters, són compostos volàtils majoritaris de l'aroma del vi.

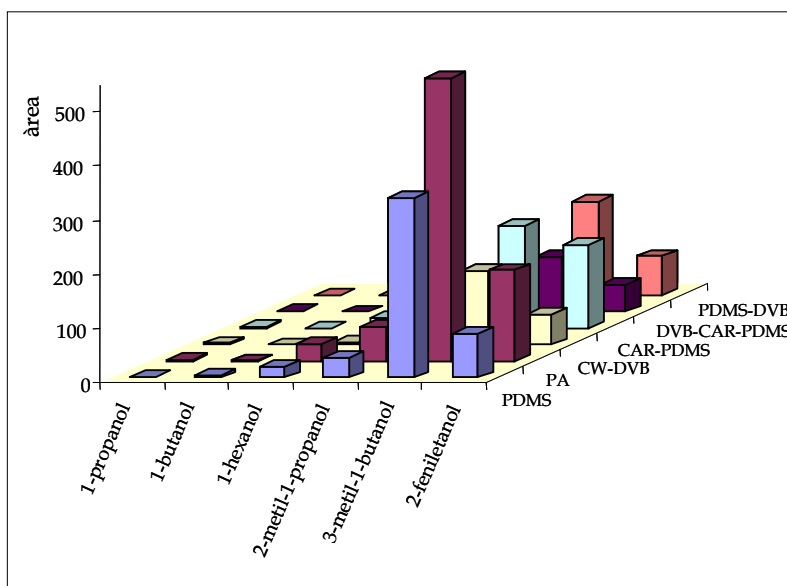


Figura III.4. Resposta dels alcohols amb els diferents tipus de fibres.

Temps d'extracció

Una vegada escollida la fase estacionària es van anar optimitzant tots els altres paràmetres que influeixen en l'extracció. El primer va ser el temps d'exposició de la fibra a l'espai de cap de la mostra. Per tal de veure com influïa aquest paràmetre en la resposta cromatogràfica dels diferents analits, es va extreure la mostra sintètica a diferents temps, entre 15 minuts i 4 hores. En cada punt experimental l'anàlisi de la mostra es va fer per triplicat i utilitzant dues fibres de PDMS de manera alterna. Els altres paràmetres de l'extracció van ser els mateixos que s'havien fixat en l'estudi de les fibres.

La figura III.5 mostra gràficament la variació de les àrees cromatogràfiques dels èsters amb el temps. Per a la majoria dels compostos, l'augment de les àrees amb el temps no era significatiu i semblava que amb 15 minuts l'eficàcia de l'extracció ja era l'òptima. No passava el mateix, però, amb els èsters menys volàtils com són l'octanoat d'etil, el decanoat d'etil i l'acetat de 2-feniletil, els quals necessitaven més temps per assolir l'equilibri. Per aquests compostos, el senyal que s'obtenia amb 1 hora d'extracció era més gran que el que s'obtenia amb 15 minuts. Tot i això, es va escollir com a temps òptim d'extracció 15 minuts ja que es va creure oportú prioritzar la rapidesa del mètode. A més, però, cal tenir en compte que els compostos menys volàtils eren a la vegada els més majoritaris i, per tant, encara que aquests no assolissin l'equilibri, la quantitat que se n'extreia era suficient per obtenir un mètode amb una bona sensibilitat. La única precaució que calia tenir era controlar de manera rigorosa els paràmetres de l'extracció, sobretot el temps, per tal de que la repetitivitat de les anàlisis d'aquests compostos fos l'adequada.

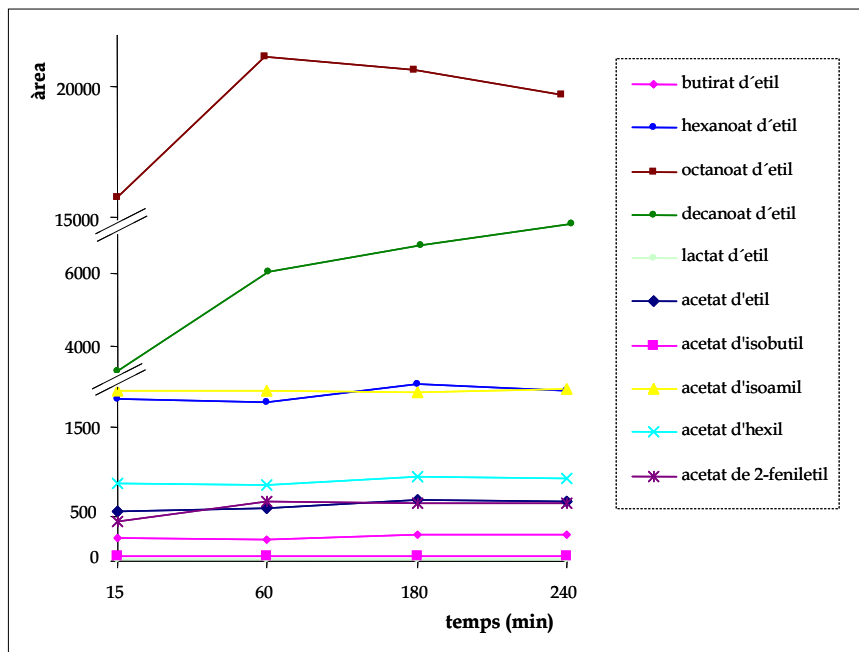


Figura III.5. Resposta dels èsters amb diferents temps d'extracció.

Força iònica

Com s'ha comentat en l'apartat III.1.1.1, l'addició de sals solubles a la mostra pot augmentar l'eficàcia de l'extracció d'alguns compostos. Així doncs, una vegada optimitzat el temps d'extracció, es va estudiar l'efecte de la força iònica en la resposta dels èsters. Amb aquest objectiu es va analitzar la mostra sintètica addicionada amb NaCl a 4 nivells diferents: sense addició, 2 M, 4 M i 6 M. En la última addició s'assolia la saturació de la mostra. Les condicions d'extracció van ser les fixades prèviament, excepte el temps d'exposició de la fibra a l'espai de cap que va ser el que s'havia escollit com a òptim (15 minuts). Les extraccions es van fer per triplicat i utilitzant dues fibres de PDMS.

A la figura III.6, on es mostren les àrees dels èsters obtingudes a cada nivell de concentració de sal estudiat, es pot observar que gairebé tots els compostos assoleixen l'equilibri quan la concentració de NaCl a la mostra és 4M. En base a aquests resultats, es va escollir 4 M com la concentració òptima de NaCl que calia afegir a la mostra.

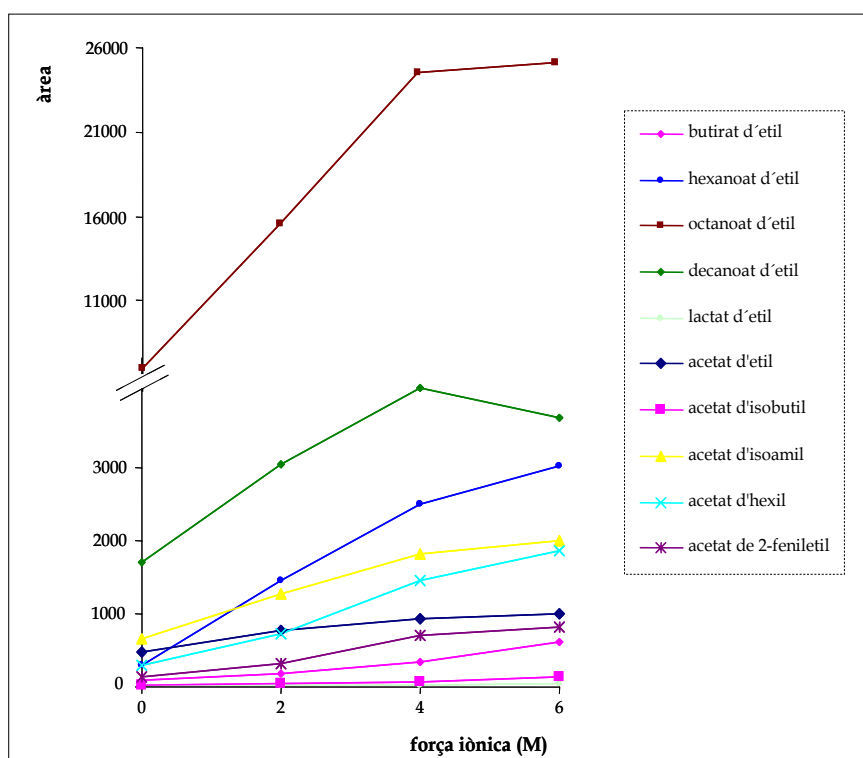


Figura III.6. Resposta dels èsters amb diferents concentracions de NaCl.

Temperatura d'extracció

El següent paràmetre que es va tenir en compte va ser la temperatura. Per veure com aquesta afectava a l'extracció dels èsters, es van analitzar mostres sintètiques a 10, 25 i 40°C. No es va treballar a temperatures més elevades perquè si es calentava molt la mostra es podria veure alterada la composició aromàtica de la mateixa. Les

extraccions es van fer durant 15 minuts i amb una concentració 4 M de NaCl a la mostra. Com en els altres casos, cada punt experimental es va assajar per triplicat i amb dues fibres de PDMS diferents.

En el gràfic que es mostra a la figura III.7 es pot observar que, clarament, la temperatura òptima d'extracció per aquesta família de compostos era de 25°C. El fet que, per a molts compostos, a 40°C s'obtingués l'eficàcia d'extracció més baixa, demostrava que en l'anàlisi d'aquests compostos el pas crític no era l'equilibri de la fase líquida amb la gasosa, ja que eren suficientment volàtils, sinó que era l'equilibri dels compostos entre la fase gasosa i la fase estacionària. Pel fet que aquest segon procés és exotèrmic, les temperatures elevades no afavorien l'extracció dels compostos amb la fibra.

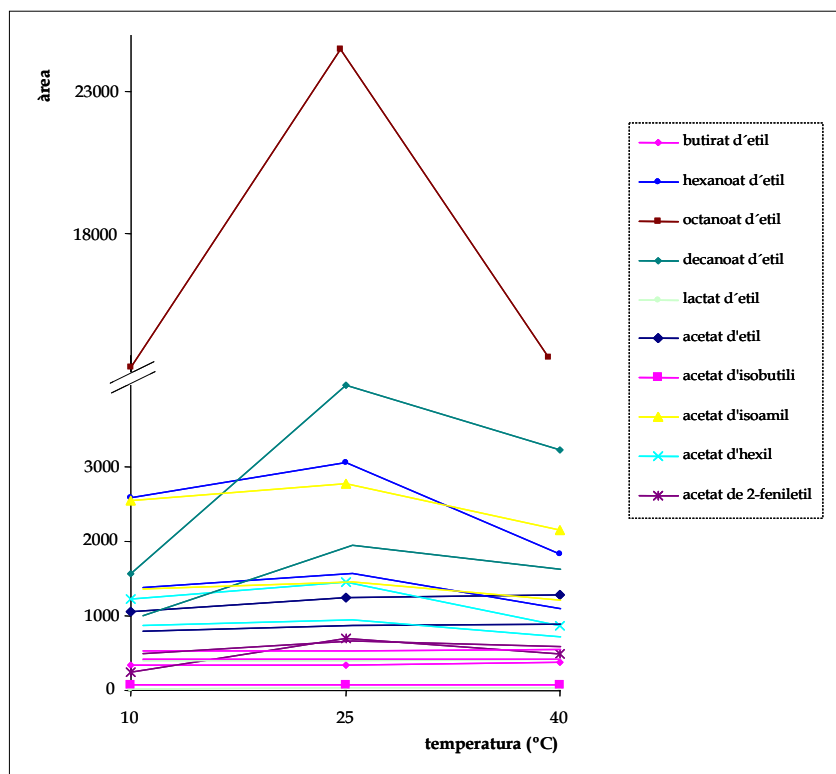


Figura III.7. Resposta dels èsters a diferents temperatures d'extracció.

III.1.2.3 Determinació dels paràmetres de qualitat analítica del mètode

Un cop optimitzades totes les variables d'extracció es van construir les rectes de calibratge. Com que la repetitivitat que s'obtenia amb les fibres de PDMS era prou bona, es va optar per treballar amb la tècnica del patró extern per tal d'evitar els problemes que comporta treballar amb un patró intern cromatogràfic amb SPME. En aquest tipus d'extracció, per raons òbvies, no és possible afegir el patró intern a l'extracte i, per tant, cal extreure'l amb la resta d'analits, amb la qual cosa hi poden haver competències entre aquests i el patró intern en la seva absorció a la fibra.

Les solucions de calibratge es van preparar addicionant diferents quantitats dels analits a determinar a un vi sintètic que, de la mateixa manera que en l'optimització, contenia els alcohols majoritaris de l'aroma del vi a la concentració en que aquests s'hi troben normalment. Els rangs de concentracions en que es van construir les rectes de calibratge (taula III.4) es van escollir en funció de les dades de concentració dels èsters en el vi trobades a la bibliografia [76]. Les anàlisis de cada solució de calibratge es van fer per triplicat i amb dues fibres de PDMS diferents.

La taula III.4 mostra els paràmetres que es van obtenir de les diferents rectes de calibratge. Els intervals de confiança, tant del pendent com de l'ordenada a l'origen, es van calcular multiplicant la desviació estàndard d'aquests paràmetres pel valor estadístic de la *t* de Student, el qual es va obtenir per a un nivell de significància del 95% ($\alpha = 0.05$) i per a $(n-2)$ graus de llibertat, on n són els punts de la recta. També s'indica a la taula el límit de detecció (LD) del mètode per a cadascun dels analits. Aquest paràmetre es va calcular utilitzant el programa informàtic ULC (*Univariate Linear Calibration*) [77], el qual determina el límit de detecció a partir dels paràmetres de la recta de calibratge. En aquest càlcul es té en compte la desviació estàndard de la recta, el nombre de mostres de calibratge, la seva distribució, la sensibilitat del mètode (el pendent de la recta) i les probabilitats de cometre errors del tipus α i β .

Compost	Interval (mg/L)	Ordenada a l'origen	pendent	r	LD (mg/L)
Acetat d'etil	10-200	-2.1 ± 17.9	4.3 ± 0.1	0.999	7.91
Acetat de 2-feniletíl	0.05-1.5	-3.6 ± 18.0	162.0 ± 11.0	0.998	0.21
Acetat d'hexil	0.02-0.7	-18.6 ± 25.4	1380.6 ± 43.4	0.999	0.04
Acetat d'isoamil	0.1-3.5	61.0 ± 71.3	301.3 ± 12.0	0.999	0.45
Acetat d'isobutil	0.05-1.5	0.4 ± 2.7	67.4 ± 4.3	0.998	0.08
Butirat d'etil	0.05-1.5	12.2 ± 15.6	107.3 ± 5.2	0.999	0.28
Decanoat d'etil	0.05-1.5	509.5 ± 339.4	9109.3 ± 434.7	0.999	1.23
Hexanoat d'etil	0.05-1.5	-32.8 ± 46.4	1466.9 ± 44.7	0.999	0.06
Lactat d'etil	10-200	1.4 ± 2.2	0.1 ± 0.01	0.996	29.04
Octanoat d'etil	0.1-3.5	1682.6 ± 571.0	7172.0 ± 644.7	0.996	0.69

Taula III.4. Paràmetres de les rectes de calibratge obtingudes amb la tècnica del patró extern (àrees front concentracions) i límits de detecció (LD) del mètode.

Els coeficients de correlació (r) que es van obtenir mostraven que, en el rang de concentracions en el que es va treballar, hi havia una bona linealitat entre les àrees cromatogràfiques i les concentracions. No obstant això, els límits de detecció del mètode per alguns compostos eren superiors a la concentració del primer punt de la recta. Com ja s'ha comentat, aquests es van calcular a partir dels paràmetres de les rectes. Si els límits de detecció dels diferents analits s'haguessin calculat experimentalment a partir del senyal del soroll de fons, probablement s'haurien obtingut valors molt inferiors ja que, en tots els casos, el senyal cromatogràfic que s'observava en les mostres de concentració més petita era bastant més gran que el soroll de fons. Davant d'aquests resultats, es va pensar que utilitzant un patró intern la repetitivitat de la injecció cromatogràfica probablement milloraria i que, per tant, la variabilitat de la recta podria disminuir, amb la qual cosa s'obtindrien també uns límits de detecció més baixos. Així doncs, es van tornar a construir les

rectes de calibratge però, aquesta vegada, utilitzant un patró intern per tal de minimitzar-ne la variabilitat.

En la construcció de les rectes de calibratge amb la tècnica del patró intern es va escollir un compost de la mateixa família que els analits d'interès com a patró intern perquè en el procés d'extracció el seu comportament és similar al dels altres èsters. Es va escollir l'octanoat de metil que és un compost que no es troba en el vi de forma natural i que, a més, es va comprovar que eluïa a un temps de retenció on no interferia en la determinació de cap dels analits d'interès.

Compost	Interval (mg/L)	Ordenada a l'origen	pendent	r	LD (mg/L)
Acetat d'etil	10-200	-0.04 ± 0.12	$1 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-3}$	0.994	0.001
Acetat de 2-feniletíl	0.05-1.5	-0.01 ± 0.03	0.03 ± 0.002	0.995	0.11
Acetat d'hexil	0.02-0.7	0.02 ± 0.04	0.27 ± 0.02	0.998	0.02
Acetat d'isoamil	0.1-3.5	0.16 ± 0.09	0.07 ± 0.005	0.996	0.19
Acetat d'isobutil	0.05-1.5	0.009 ± 0.02	0.02 ± 0.002	0.989	0.12
Butirat d'etil	0.05-1.5	0.12 ± 0.02	0.02 ± 0.002	0.994	0.12
Decanoat d'etil	0.05-1.5	0.2 ± 1.3	1.8 ± 0.2	0.993	0.09
Hexanoat d'etil	0.05-1.5	0.03 ± 0.13	0.30 ± 0.02	0.996	0.06
Lactat d'etil	10-200	-0.006 ± 0.01	$1 \cdot 10^{-4} \pm 0.1 \cdot 10^{-4}$	0.990	20.3
Octanoat d'etil	0.1-3.5	-0.6 ± 2.9	1.6 ± 0.1	0.994	0.24

Taula III.5. Paràmetres de les rectes de calibratge obtingudes amb la tècnica del patró intern (relació d'àrees front relació de concentracions) i límits de detecció (LD) del mètode.

A la taula III.5 es mostren els paràmetres de les rectes de calibratge que es van obtenir amb la tècnica del patró intern. En aquest cas, els coeficients de correlació van ser també adequats. Pel que fa als límits de detecció (LD) del mètode, calculats

també a partir dels paràmetres de les rectes, aquests van ser millors que els obtinguts amb la tècnica del patró extern per a la majoria dels compostos.

Per tal de comprovar si la matriu influïa en el procés d'extracció, es va aplicar el mètode de les addicions estàndard addicionant diferents quantitats dels analits d'interès a un vi blanc, un vi negre i un vi rosat. Ja que l'experiència del nostre grup de recerca en l'anàlisi de compostos volàtils del vi amb SPME demostrava que calia ajustar les mostres al mateix grau alcohòlic a causa de la influència que pot tenir l'etanol en l'eficàcia de l'extracció, es va ajustar el contingut en etanol dels vins a un 12% que és el valor que s'havia fixat al vi sintètic amb el que s'havien construït les rectes de calibratge.

El gràfic de la figura III.8 mostra, a mode d'exemple, la recta de calibratge de l'acetat d'isoamil i les rectes d'addicions estàndards obtingudes amb diferents addicions d'aquest compost als tres vins assajats. Gràficament, s'observa que les rectes són paral·leles entre elles, la qual cosa indica que per aquest compost no hi ha efecte matriu. Per a cada analit, es van comparar estadísticament els pendents de les rectes d'addicions estàndard amb els pendents de les rectes de calibratge construïdes amb la tècnica del patró intern. A un nivell de confiança del 95%, en cap cas es van observar diferències significatives entre el pendent de la recta de calibratge i el pendent de la recta d'addicions estàndard. Per tant, es va concloure que en la determinació dels èsters amb el mètode desenvolupat no existia efecte matriu.

La repetitivitat del mètode es va avaluar a partir de la determinació, per triplicat, de la concentració dels diferents compostos en un vi blanc. Els valors de repetitivitat, estimada com la desviació estàndard relativa, oscil·laven entre el 0.3 i el 6.9%.

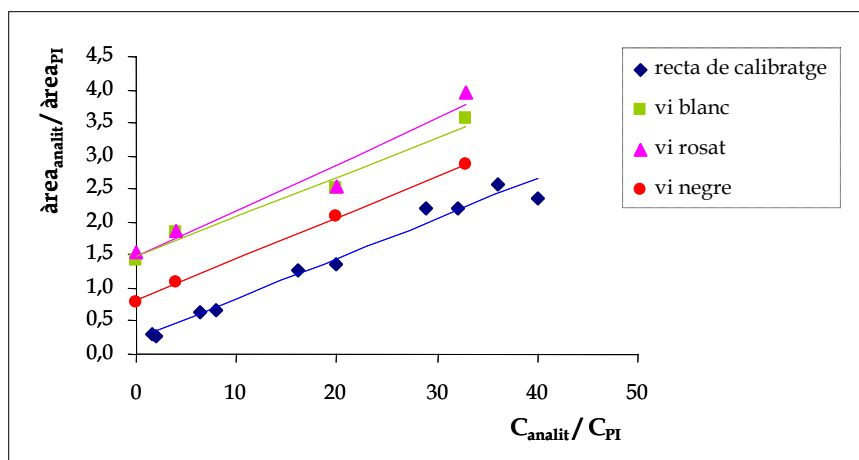


Figura III.8. Recta de calibratge de l'acetat d'isoamil obtinguda amb la tècnica del patró intern i rectes obtingudes en les addicions estàndard d'aquest compost a un vi blanc, un vi negre i un vi rosat.

Les addicions que es van fer en vins reals per a detectar si hi havia efecte matriu es van utilitzar també per a calcular les recuperacions del mètode. Tot i que quan es parla de recuperació d'una extracció, generalment, aquest paràmetre fa referència a la quantitat d'analít extret de la mostra respecte a la concentració inicial, cal remarcar que les recuperacions, quan es treballa amb SPME, cal calcular-les a partir de la relació percentual entre la quantitat d'analít afegida i la trobada mitjançant les rectes de calibratge. Les recuperacions es van calcular a tres nivells de concentració diferents (baix, mitjà i alt) segons els rangs de concentració especificats a la taula III.5. El valor de recuperació es va determinar com el quocient entre la concentració d'analít en la mostra, calculada a partir de la recta de calibratge, i la concentració real d'analít que correspon a la que ja contenia de forma natural el vi més la que s'hi va addicionar. A la taula III.6, on es mostren els valors de recuperació obtinguts per a cada analít i en cada tipus de vi juntament amb les corresponents desviacions estàndard relatives, es pot observar que els valors de recuperació oscil·laven entre un 80 i un 110%.

Compost	Vi blanc	Vi negre	Vi rosat
Acetat d'etil	88.1 (18.0)	98.5 (13.8)	96.4 (21.5)
Acetat de 2-feniletíl	105.1 (8.1)	93.6 (7.8)	99.4 (15.0)
Acetat d'hexil	94.8 (7.5)	101.9 (10.2)	99.1 (10.8)
Acetat d'isoamil	80.9 (11.4)	90.3 (15.7)	101.2 (19.0)
Acetat d'isobutil	111.9 (10.0)	106.5 (13.2)	109.4 (10.8)
Butirat d'etil	106.6 (19.0)	87.7 (15.9)	108.7 (16.5)
Decanoat d'etil	107.2 (19.5)	100.5 (18.6)	109.6 (21.1)
Hexanoat d'etil	82.2 (14.2)	97.8 (12.2)	97.3 (19.0)
Lactat d'etil	84.1 (8.3)	95.5 (12.3)	89.0 (5.1)
Octanoat d'etil	104.0 (5.3)	107.5 (6.6)	105.2 (9.1)

Taula III.6. Percentatges de recuperació del mètode i desviacions estàndard relatives (entre parèntesis).

En base a tots aquests resultats obtinguts es pot concloure que el mètode desenvolupat per a la determinació d'èsters presentava uns paràmetres de qualitat analítica adequats. La característica més important a destacar, a part de la seva senzillesa, és la rapidesa ja que el temps de pretractament de la mostra, que normalment és el temps limitant en aquest tipus de mètodes, és de tan sols 30 minuts (15 minuts de preequilibri i 15 minuts d'extracció).

III.1.3 Aplicació de l'SPME a l'anàlisi dels èsters de l'aroma del rom

La família dels èsters, i més concretament els èsters etílics, són compostos amb un impacte sensorial molt important en les begudes destil·lades com és el rom. Tot i que són compostos majoritaris de l'aroma d'aquest tipus de begudes, la concentració a la que es troben normalment no és suficient per a determinar-los mitjançant una injecció directa al cromatògraf de gasos i, per tant, cal utilitzar una tècnica de pretractament per tal d'extreure'ls i concentrar-los.

L'SPME ja havia donat bons resultats en la determinació dels èsters de l'aroma del vi. A més, alguns treballs de la bibliografia duts a terme amb brandies [71] i vodkes [73], apuntaven uns bons resultats d'aquesta tècnica d'extracció en la determinació de compostos volàtils en els destil·lats. Així doncs, en el marc d'un programa de col·laboració científica del nostre grup de recerca amb el *Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia* (IIIA) de Cuba, es va voler adaptar el mètode desenvolupat per a la determinació d'èsters de l'aroma del vi a la determinació dels principals èsters etílics de l'aroma del rom. Tota l'experimentació realitzada i les dades obtingudes en aquesta, es troben recollides en un article publicat al *Journal of Chromatography A*, 922 (2001) 267-275, el qual s'adjunta al final d'aquest apartat.

La primera part de l'estudi va consistir en trobar les condicions òptimes d'extracció, és a dir, les que proporcionaven una millor eficàcia en l'extracció dels èsters etílics dels roms. Per a dur a terme l'estudi, es van fixar unes condicions d'extracció que es van anar variant així que s'anaven trobant els valors òptims dels diferents paràmetres que influeixen en l'extracció. Així doncs, en aquestes condicions fixades prèviament, 25 mL de mostra i 6 g de NaCl s'introduïen en un vial de 50 mL de capacitat. Un cop tancat hermèticament el vial, s'agitava la mostra mitjançant agitació magnètica dins un bany termostatitzat a 25°C. L'extracció es duia a terme exposant la fibra a l'espai de cap de la mostra durant 30 minuts. Basant-nos amb els resultats obtinguts en l'estudi dels diferents tipus de fases

estacionàries dut a terme en el desenvolupament del mètode per a l'anàlisi d'èsters en vins, vam escollir la fibra de PDMS ja que era la que donava millors resultats en l'extracció d'aquesta família de compostos.

A causa de l'elevat contingut en etanol de les mostres (al voltant del 40% v/v), el primer paràmetre que es va creure oportú estudiar va ser l'efecte de la concentració d'aquest alcohol en l'eficàcia d'extracció dels èsters. Amb aquest objectiu es va analitzar un rom comercial amb un contingut en etanol del 40% v/v i tres dilucions del mateix al 20, 12 i 5% v/v d'etanol. En el gràfic de la figura III.9 es representa la suma de les àrees dels èsters etílics obtingudes als diferents nivells de concentració d'etanol assajats. Tal i com es pot observar, al disminuir el contingut en etanol de la mostra, augmentaven les àrees cromatogràfiques dels èsters. Aquest comportament, però, s'observava fins a un contingut en etanol del 12%, ja que les àrees obtingudes en la mostra que contenia un 5% d'etanol eren semblants a les de la mostra amb un 12% d'etanol. En funció d'aquests resultats, en les següents anàlisis es va fixar el contingut en etanol de la mostra al 12%.

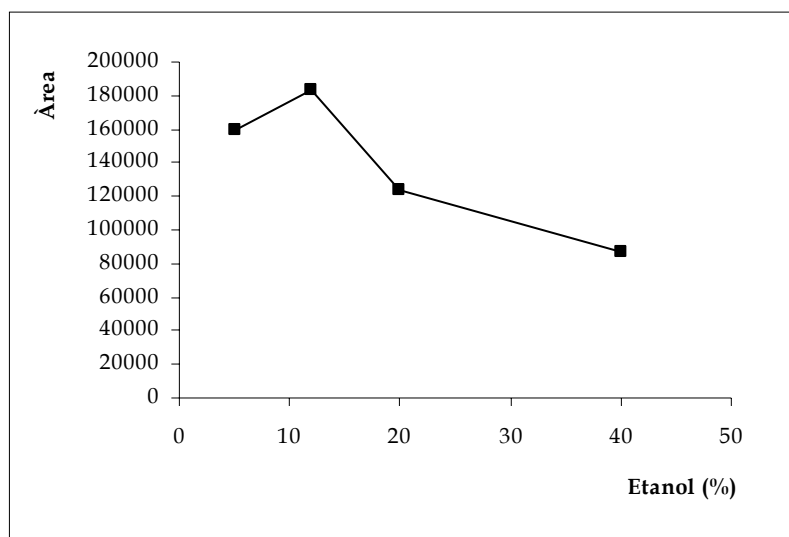


Figura III.9. Efecte del contingut d'etanol en la resposta dels analits (suma de les àrees dels èsters etílics).

En l'optimització dels altres paràmetres de l'extracció es va utilitzar una mostra hidroalcohòlica al 12% en etanol addicionada amb els èsters i que, a més, contenia 2 mg/L d'alcohol isoamílic, que és un compost majoritari de la fracció volàtil dels roms, per tal d'obtenir una matriu similar a una mostra de rom real. En l'estudi de l'efecte de la força iònica es van realitzar experiments a tres nivells diferents d'addició de NaCl: sense addició, 3 M i 5 M. Els resultats mostraven que en les mostres addicionades amb NaCl l'eficàcia d'extracció dels èsters era significativament més gran que en les mostres on no s'hi havia afegit sal. No obstant això, entre 3 M i 5 M (a aquest últim nivell la mostra ja es trobava saturada) no hi havia diferències significatives en l'extracció dels èsters, tot i que sí que n'hi havia en la dels alcohols com l'etanol i l'alcohol isoamílic que presentaven àrees més grans quan es saturava la mostra amb sal. Per tant, per no afavorir l'absorció dels alcohols a la fibra es va escollir 3 M com la concentració òptima de NaCl per a l'extracció dels èsters.

El següent paràmetre que es va estudiar va ser el volum de mostra a analitzar. Com ja s'ha comentat en l'apartat III.1.1.1, quan la concentració dels analits d'interès és molt baixa, una pràctica que es pot dur a terme per augmentar la sensibilitat del mètode és disminuir la relació entre el volum d'espai de cap i el de mostra. Com que aquest no era el cas del present estudi ja que els compostos a determinar eren compostos volàtils majoritaris de l'aroma, es va decidir fixar una relació 1:1 entre aquests dos volums ja que d'aquesta manera es treballava més còmodament perquè hi havia espai suficient al vial per exposar la fibra sense que hi hagués perill que en algun moment, a causa de l'agitació, aquesta entrés en contacte amb la mostra líquida. Així doncs es van assajar volums de mostra de 10 i 25 mL i utilitzant vials de 20 i 50 mL de capacitat, respectivament. Els millors resultats es van obtenir amb el volum més petit.

Pel fet que el temps i la temperatura d'extracció són dos paràmetres molt relacionats, es va considerar oportú optimitzar-los conjuntament. Amb aquest

objectiu es va dur a terme un disseny factorial amb dos factors i a dos nivells amb un punt central. Els rangs de temps i temperatura es van escollir tenint en compte els resultats obtinguts en la posta a punt del mètode per a l'anàlisi d'èsters en vi. La figura III.10 mostra el domini experimental assajat amb els punts on es van dur a terme l'experimentació. En cada punt experimental es van realitzar tres anàlisis de 10 mL de mostra addicionada amb una concentració 3 M de NaCl. Els millors resultats es van obtenir al punt central del disseny d'experiments, és a dir, extraient la mostra a 30°C i durant 35 minuts.

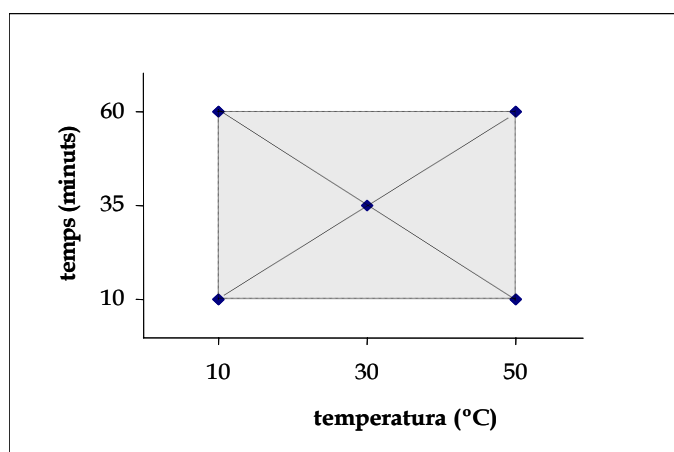


Figura III.10. Disseny experimental realitzat en la optimització del temps i la temperatura d'extracció.

Una vegada trobades les condicions d'extracció òptimes per a l'anàlisi dels èsters etílics, es van construir les rectes de calibratge addicionant diferents quantitats dels analits d'interès a una solució hidroalcohòlica al 12% en etanol que contenia 2 mg/L de 3-metil-1-butanol. Per l'experiència adquirida en el treball anterior amb la tècnica del patró extern, es va decidir utilitzar un patró intern per a la construcció de les rectes de calibratge. El compost escollit com a patró intern fou l'octanoat de metil ja que havia donat bons resultats en el treball anterior i, a més, tampoc és un compost natural de la composició volàtil dels roms. Tal com mostren els resultats

que es presenten en l'article annex, les rectes de calibratge obtingudes presentaven una bona linealitat en el rang de concentracions en què es va treballar. Els límits de detecció, de la mateixa manera que en el treball anterior, es van calcular a partir dels paràmetres de la recta amb el programa estadístic ULC [77] i els valors obtinguts variaven entre 7 i 27 µg/L.

Per comprovar que la matriu dels roms no produïa cap interferència en la determinació, es va aplicar la tècnica de les addicions estàndard en mostres de roms reals diluïdes al 12%. Una vegada es va verificar estadísticament que no hi havia diferències significatives entre els pendents de les rectes construïdes amb addicions estàndard i els de les rectes de calibratge, es va calcular la recuperació del mètode a tres nivells aprofitant els experiments duts a terme per a l'avaluació de l'efecte matriu. Els valors de recuperació obtinguts es trobaven entre el 91 i el 105% i amb unes desviacions estàndard relatives inferiors al 20%.

Finalment, el mètode es va aplicar a la determinació d'èsters etílics de diferents roms comercials. A la taula 3 de l'article annex es mostren, per a cadascun dels roms analitzats, els valors de concentració dels èsters que s'expressen com a mg per litre d'etanol, ja que aquesta és la manera usual d'expressar les concentracions en el sector de les begudes alcohòliques.

Tots els resultats i dades obtingudes es troben més àmpliament descrits a l'article que segueix a continuació que porta per títol *Headspace solid-phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma* i que va ser publicat a la revista científica *Journal of Chromatography A*.

*HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION OF HIGHER FATTY ACID
ETHYL ESTERS IN WHITE RUM AROMA*

Journal of Chromatography A, 954 (2002) 51-57



Journal of Chromatography A, 954 (2002) 51–57

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Headspace solid-phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma

J. Pino^a, M.P. Martí^b, M. Mestres^b, J. Pérez^a, O. Busto^b, J. Guasch^{b,*}

^aInstituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, Carretera del Guatao km 3½, 19200 La Habana, Cuba

^bDepartament 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 September 2001; received in revised form 17 December 2001; accepted 14 February 2002

Abstract

Fatty acid ethyl esters are the main components of rum aroma and play an important sensorial impact in these distilled alcoholic beverages. Herein, a method for analysing these volatile compounds is described. It involves a separation and concentration step using headspace solid-phase microextraction and determination by capillary gas chromatography using flame ionisation detection. The influence of different parameters related to the isolation and concentration step, such as ethanol concentration, ionic strength, sample volume, time and temperature of extraction, was studied. The developed method enabled recoveries >91% for the analyzed compounds with limits of detection between 0.007 and 0.027 mg/l, all of them lower than the range of concentrations found in rum samples. The method was successfully applied to the analysis of fatty acid ethyl esters in different commercial white rums. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Headspace analysis; Solid-phase microextraction; Aroma compounds; Fatty acid ethyl esters

1. Introduction

Rum is a fairly tasteless and neutral spirit mainly derived from the fermentation and distillation of sugar molasses. Once the alcohol has been obtained from the fermentation and distillation processes, it undergoes further processing such as passing through carbon filters, ageing in oak barrels and blending, which give rum its characteristic aroma.

Distilled alcoholic beverages have been distinguished by the presence of characteristic volatile components coming from the raw materials used in

fermentation, distillation and ageing. These components are mainly fusel alcohols, ethyl acetate, acetic acid, fatty acids and esters [1–3]. Fusel alcohols, acetic acid and ethyl acetate are present in these beverages at relatively large amounts, generally between 10 and 4000 mg per l of ethanol, and they can be determined directly by gas chromatography (GC). However, fatty acid ethyl esters are usually present at concentrations below 10 mg per l of ethanol and their determination requires the use of a preconcentration technique.

Solid-phase microextraction (SPME) is a solvent-free extraction technique that enables the extraction and concentration steps to be carried out simultaneously [4–9]. It has been shown to be a very suitable technique for the analysis of volatile and

*Corresponding author.

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

semi-volatile compounds in alcoholic beverages [10–14].

In the SPME, a fused-silica microfiber coated with a stationary phase, which is immersed either directly into the liquid sample (DI-SPME) or into the headspace above it (HS-SPME), is used. Recently, direct sampling has been shown to be very efficient for extracting various esters in vodkas and white rums [12]. However, HS-SPME is preferable to DI-SPME to isolate the volatile compounds, because it allows shorter extraction times [5] and the lifetime of the fibre is longer.

Taking into account these observations, the purpose of this work is the development of a method for determining higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma using HS-SPME as extraction technique and GC–FID as determination technique.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

The fatty acid ethyl esters studied were (CAS number in brackets): ethyl hexanoate [123-66-0], ethyl octanoate [106-32-1], ethyl decanoate [110-38-3] and ethyl dodecanoate [106-33-2]. Methyl octanoate [111-11-5] was used as internal standard (istd). They were supplied by Aldrich (Beerse, Belgium) and all had purity above 98%.

An individual standard solution of 5000 mg/l of each ester was prepared in HPLC-grade ethanol (Scharlau, Barcelona, Spain) and it was stored at 5 °C. A global standard solution containing all the esters was prepared with an aliquot of each individual standard solution and subsequent dilution with ethanol. Working solutions used in further studies were prepared by adding different amounts of the global standard solution to an ethanolic solution (12% v/v) that contained 2 mg/l of 3-methylbutanol (Aldrich, Beerse, Belgium) in order to obtain a matrix as similar as possible to a real rum.

2.2. Headspace and SPME

The SPME holder, for manual sampling, and the polydimethylsiloxane fibres (100 µm) used in this study were purchased from Supelco (Bellefonte,

USA). The fibres were conditioned by inserting them into the GC injector at 250 °C for 1 h and they were immediately used to prevent contamination.

In order to obtain optimal results, the experimental conditions were studied (Section 3.1). In the optimised procedure 10 ml of sample were placed in a 20-ml vial with 0.88 g of NaCl and were spiked with methyl octanoate as internal standard (0.5 mg/l). Then the vial was hermetically sealed with a silicone septum and shaken to obtain a homogeneous mixture. The HS-SPME of the sample was carried out at 30 °C in a thermostatic bath for 35 min with constant magnetic stirring (500 rpm). When the extraction step was finished, the SPME fibre was removed from the vial and inserted into the injection port of the GC for thermal desorption of the analytes at 250 °C, for 1 min, in splitless mode. For every sample, at least a duplicate analysis was carried out.

2.3. Chromatography

The analyses were carried out on a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionisation detector (FID). The injection was made in splitless mode for 1 min using an inlet of 0.75 mm I.D., which improves the GC resolution. The temperature of the injector and detector was 250 °C. The separations were performed using a SPB-5 column (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 µm) with an oven temperature program of 60 °C (2 min), 4 °C/min to 250 °C (20 min). The carrier gas was helium with a flow-rate of 1 ml/min.

To identify the esters and other rum volatiles, which were also extracted by the fibre, a Hewlett-Packard series 6890 (series II) gas chromatograph equipped with a HP-5973 mass-selective detector was used. The chromatographic conditions were the same as those described for GC–FID. The detector operated in electron impact mode (70 eV) at 230 °C. Detection was carried out in the scan mode between 30 and 400 amu.

3. Results and discussion

3.1. HS-SPME parameter optimisation

The parameters optimised were ethanol concen-

tration, sample ionic strength, sample volume, extraction time and temperature of the sample during extraction. In each experimental point, four samples were analyzed. The possible interference of the matrix was also taken into account.

The first parameter studied was the ethanol concentration. This alcohol is one of the major rum constituents and can compete with the other volatile components in the extraction process. In fact, some authors [15–18] have found that an increase in the ethanol content decreases the extraction efficiency. Furthermore, a high ethanol content can modify the nature of the matrix. Comer et al. showed that an amount of ethanol higher than 17% (v/v) increases the esters' solubility into the liquid sample and, therefore, the headspace concentration of these compounds is reduced [19]. To check these effects, samples of rum containing 40% v/v of ethanol were diluted to obtain different solutions with an alcohol

content of 5, 12 and 20% v/v, which were subsequently analysed. In the extraction, 25 ml of sample were placed in a 50-ml vial with 6 g of NaCl. The process was carried out at 25 °C, for 30 min. The data obtained (Fig. 1) show that the higher the ethanol concentration, the lower the extraction efficiency; however, with 5% of ethanol there was also a great dilution of the other volatile components. Therefore 12% of ethanol was fixed for subsequent analysis.

Another consideration that had to be taken into account was that, in some cases, the ethanol contents of rums differ by $\pm 2\%$ v/v from the alleged 40% v/v. After determining how these changes could affect the fatty acid esters profile, we concluded that these small variations in ethanol content do not affect significantly the response of the compounds analysed provided that an internal standard is used.

The addition of salt to the sample (salting out

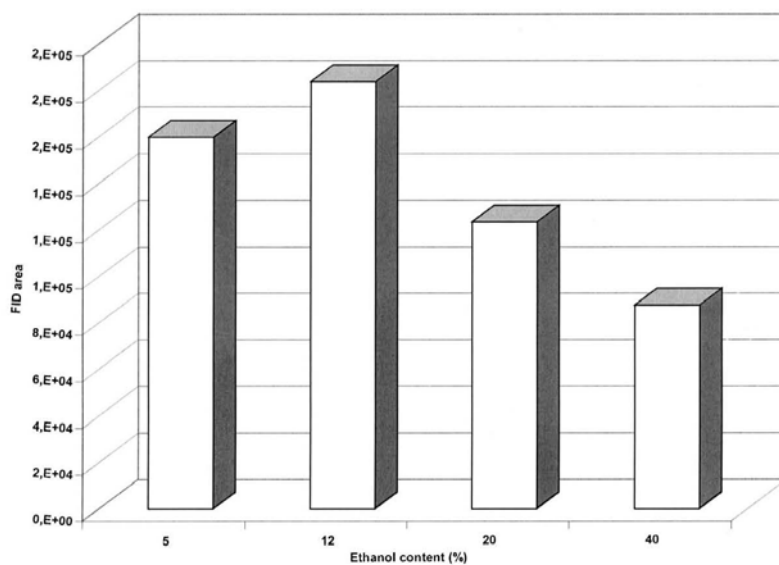


Fig. 1. Effect of ethanol content on the responses of analytes (summary of all the areas of the ethyl esters).

effect) can modify the extraction efficiency. It seems that the nature of the matrix can be modified by adding a salt because this addition can affect the liquid–gas partition coefficients of the analytes [6]. Therefore, the effect of the salt was investigated and several experiments were made with the same extraction conditions as in the previous study, but different amounts of sodium chloride (0–5 M) were added to a hydroalcoholic matrix (12% ethanol). As it is shown in Fig. 2, there are two types of behaviour: (a) for ethanol, adsorption increases when the salt concentration also increases; (b) for 3-methylbutanol, ethyloctanoate and ethyldecanoate, adsorption increases initially and then levels off at higher salt concentration. Since ethanol and 3-methylbutanol are major rum components and they can be measured by direct GC analysis without a concentration step, 3 M concentration was selected in all the HS-SPME experiences in order to increase ester extraction but not the alcohol extraction.

Once the salt concentration was fixed, the influence of the sample volume was also tested by working at a constant ratio of liquid–gas phases (1:1) with 20- and 50-ml vials. Absorption times of 30 min at 25 °C in 20-ml vials gave higher extractions than those obtained with 50-ml vials. This fact can be due to the reduction of the equilibration time when a smaller headspace is used because the analytes would take less time to diffuse through the headspace of the fibre [20]. Thus, a sample volume of 10 ml in a 20-ml vial was selected.

The SPME is strongly influenced by the sample temperature during extraction because the partition coefficients are temperature-dependent and the extraction of the analytes by the fibre is an exothermic

process [5]. Furthermore, the sample temperature is closely related to the extraction time, so both parameters were studied simultaneously. Periods of time of 10, 35 and 60 min were tested at 10, 30 and 50 °C. In these extractions the already ionic strength, sample volume and vial volume conditions were used. By way of example, the results for ethanol, ethyl octanoate and ethyl decanoate are shown in Fig. 3. The best results were obtained in 35 min at 30 °C, since at this experimental point there is a high extraction of ethyl esters, while the ethanol extraction is minimized.

3.2. Method validation

To check the matrix interference on the extraction process, a hydroalcoholic solution 12% (v/v) of ethanol spiked with different concentrations of fatty acid esters, and different rums diluted to 12% (v/v) of ethanol and also spiked with the same analytes at different concentration levels, were analysed under the optimal conditions of the extraction procedure. The calibration curves obtained from the analyses of the different ethanolic solutions and of the diluted rums were compared with the computer programme ULC (Univariate Linear Calibration) [21]. No differences at 95% confidence were observed between slopes of both curves for fatty acid ethyl esters. So, for determining the ester concentration in real samples, the calibration curves constructed with ethanolic solutions were used. Table 1 shows that the calibration curves were linear over the selected concentration ranges, with high determination coefficients ($r^2 > 0.99$). The limits of detection (LODs) ranged between 0.015 and 0.070 mg/l.

In order to calculate the recovery of the method, the matched matrix standard method was used. This parameter was determined as the quotient between the amount of analyte calculated from the calibration curves and the real amount of the analyte in the sample. This real concentration corresponds to initial concentration, which is determined using the standard addition technique, plus the quantity of analyte added. To calculate the recovery the analytes were added to a rum sample at three different concentrations (lower, middle and higher level) of the calibration range specified in Table 1. Table 2 shows the average recoveries with their relative standard

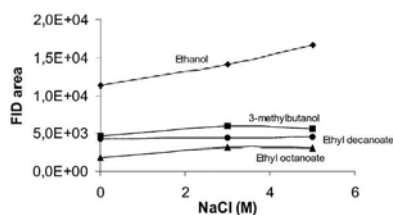


Fig. 2. Effect of salt concentration on the responses of the analytes.

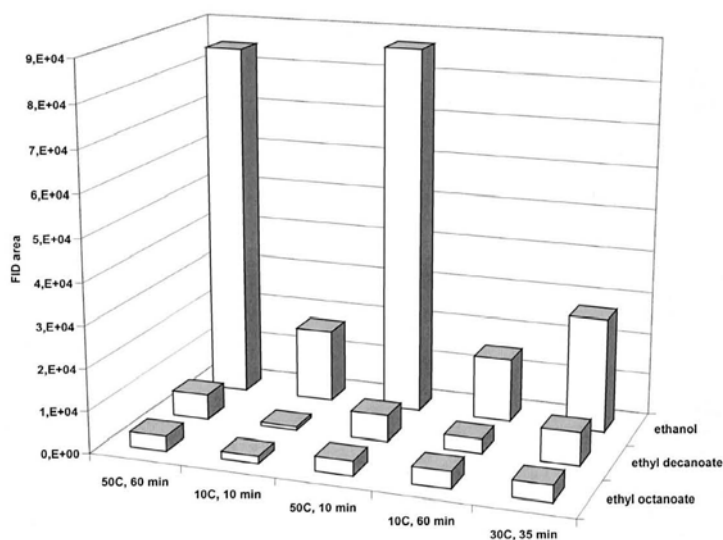


Fig. 3. Effect of time and sample temperature on the responses of the analytes.

Table 1
Parameters of the calibration curves and limits of detection of the method (LOD)

Compound	Range (mg/l)	Slope	Intercept	R ²	LOD (mg/l)
Ethyl hexanoate	0.05–2	0.3476	0.0140	0.998	0.007
Ethyl octanoate	0.05–1	5.2501	–0.0085	0.996	0.018
Ethyl decanoate	0.2–1	16.8630	–0.0142	0.998	0.015
Ethyl dodecanoate	0.1–2	3.2138	–0.0842	0.995	0.027

Table 2
Recovery percentages and relative standard deviations (in parentheses)

Compound	Low level	Middle level	High level
Ethyl hexanoate	99.6 (17.2)	96.8 (8.7)	99.7 (12.9)
Ethyl octanoate	100 (3.7)	100.6 (0.9)	99.6 (0.6)
Ethyl decanoate	100 (12.9)	105.6 (8.0)	100 (5.8)
Ethyl dodecanoate	98.7 (5.5)	91.1 (11.8)	99.2 (1.2)

deviations (RSDs). It can be seen that the recoveries ranged between 91 and 105% and their RSDs were lower than 20%.

The repeatability of the response ratios (analyte/internal standard) was determined using hydroalcoholic solutions (12% ethanol) with addition of different concentrations of analytes. The measurements ($n=4$) were found to be repeatable with 2–8% RSD, although for some analytes the precision deteriorated at low concentrations.

The reproducibility of the method was determined

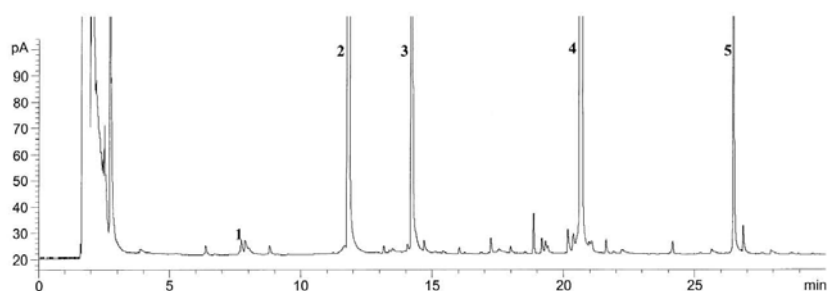


Fig. 4. Typical HS-SPME-GC analysis of a white rum (Cuban rum, 3 years old) using the proposed procedure. 1, Ethyl hexanoate; 2, methyl octanoate (istd); 3, ethyl octanoate; 4, ethyl decanoate; 5, ethyl dodecanoate.

using several rum samples which contain low and high levels of esters. The samples were analysed by duplicate, one analysis per week on two consecutive weeks. The determination of the analyte concentration was generally reproducible within 2–10% RSD.

Finally, the method was successfully applied to determine the fatty acid esters in different commercial white rums. A typical HS-SPME-GC profile of white rum is shown in Fig. 4. Table 3 shows the fatty acid ethyl ester concentration found in each rum analysed. Several distinct profiles were observed in the commercial rum brands.

4. Conclusions

Headspace solid-phase microextraction is a very simple and fast technique for determining fatty acid

ethyl esters in rums and shows very good reproducibility and recovery. A synthetic matrix was used for quantitative analysis because no differences to real sample behaviour were observed. However, the high ethanol content in distilled alcoholic beverages is a problem when SPME is used in the analyses of this kind of drinks. The interference of this major rum volatile constituent was minimised by diluting the sample at 12% v/v of ethanol.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain (Scientific Co-operation Program with Latin America) for the financial support given and the CICYT (project ALI97-0765) for providing Mrs. Martí's doctoral fellowship.

Table 3
Fatty acid ethyl esters (mg per l of ethanol) in commercial white rums (40% v/v ethanol)

Samples	Ethyl hexanoate	Ethyl octanoate	Ethyl decanoate	Ethyl dodecanoate
Cuban rum, 3 years old	0.15	6.80	39.17	0.75
Cuban rum, 7 years old	0.04	5.05	23.40	0.35
Cuban rum, aged	0.03	2.41	19.87	0.27
Bahamian rum	0.06	4.40	19.48	0.09
Spanish rum 1, golden	n.d.	0.65	3.79	0.03
Spanish rum 2, golden	0.04	14.14	103.33	1.59

n.d., not detected.

References

- [1] H.M. Liebich, W.A. Koenig, E. Bayer, *J. Chromatogr. Sci.* 8 (1970) 527.
- [2] G.E. Martin, R.H. Dyer, P.C. Buschmi, *J. AOAC* 57 (1974) 610.
- [3] J. Pino, *Alimentaria* 269 (1996) 79.
- [4] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1843.
- [5] Z. Zhang, M.J. Yang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 66 (1994) 844.
- [6] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [7] A.D. Harmon, *Solid phase microextraction for the analysis of flavors*, in: R. Marsili (Ed.), *Techniques for Analyzing Food Aroma*, Marcel Dekker, New York, 1997, p. 81.
- [8] R. Eisert, J. Pawliszyn, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 27 (2) (1997) 103.
- [9] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35.
- [10] L. Ng, M. Hupé, J. Harnois, D. Moccia, *J. Sci. Food Agric.* 70 (1996) 380.
- [11] D. De la Calle, M. Reichenbacher, K. Danzer, *J. High Resolut. Chromatogr.* 20 (1997) 665.
- [12] L. Ng, in: J. Pawliszyn (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999, p. 393.
- [13] S.E. Ebeler, M.B. Terrien, C.E. Butzke, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 625.
- [14] M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 583.
- [15] L. Urruty, M. Montury, *J. Agric. Food Chem.* 644 (1996) 3871.
- [16] C. Fischer, U. Fischer, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1995.
- [17] M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 808 (1998) 211.
- [18] M. Mestres, C. Sala, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 137.
- [19] J.M. Corner, L. Birkmyre, A. Paterson, J.R. Piggott, *J. Sci. Food Agric.* 77 (1998) 121.
- [20] X. Yang, T. Peppard, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1925.
- [21] R. Boqué, F.X. Rius, *J. Chem. Educ.* 71 (1994) 230.

III.2 ANÀLISI DE L'AROMA DEL VI MITJANÇANT LA GCO

De tota la gran quantitat de compostos que conformen la fracció volàtil dels aliments, en general, tan sols uns quants contribueixen a la seva aroma. A més, l'experiència mostra que molts dels compostos amb activitat aromàtica es troben presents a concentracions molt baixes i que, per tant, la seva importància sensorial és deguda bàsicament als seus baixos llindars de percepció sensorial. És per tot això que el perfil cromatogràfic que s'obté amb un detector convencional, com pot ser un detector d'ionització de flama (FID) o un d'espectrometria de masses (MSD), no té perquè reflectir el perfil aromàtic de l'aliment. En el cromatograma hi poden haver pics que corresponguin a compostos que no presenten cap olor i que, per tant, no tenen cap importància des del punt de vista de l'aroma o, per altra banda, també pot ser que compostos que contribueixin de manera important a l'aroma no s'identifiquin en l'anàlisi cromatogràfica perquè la seva concentració es troba per sota del límit de detecció del detector. Així doncs, una tasca molt important en l'anàlisi de l'aroma és distingir, d'entre tots els compostos volàtils, aquells que presenten olor i que per tant són susceptibles de participar en l'aroma de l'aliment en qüestió. La cromatografia de gasos amb detecció olfactimètrica (GCO) és l'eina que permet dur a terme aquesta important tasca.

III.2.1 La GCO

Aquesta tècnica consisteix en injectar al cromatògraf de gasos un extracte de l'aroma de la substància d'interès i avaluar amb el nas humà les característiques sensorials de l'efluent de la columna cromatogràfica per tal de determinar en quins temps de retenció s'hi detecten olors. El fet de que la detecció olfactimètrica es dugui a terme en paral·lel amb un detector químic (normalment un FID o un MSD), permet relacionar la informació química que proporcionen aquests detectors

amb la informació sensorial que proporciona el detector olfactimètric, amb la qual cosa s'aconsegueix identificar quins són els compostos volàtils aromàticament actius. D'alguna manera es pot dir que la GCO és un enllaç entre l'anàlisi química i l'anàlisi sensorial. La figura III.11 mostra un esquema de com es duu a terme una anàlisi olfactimètrica.

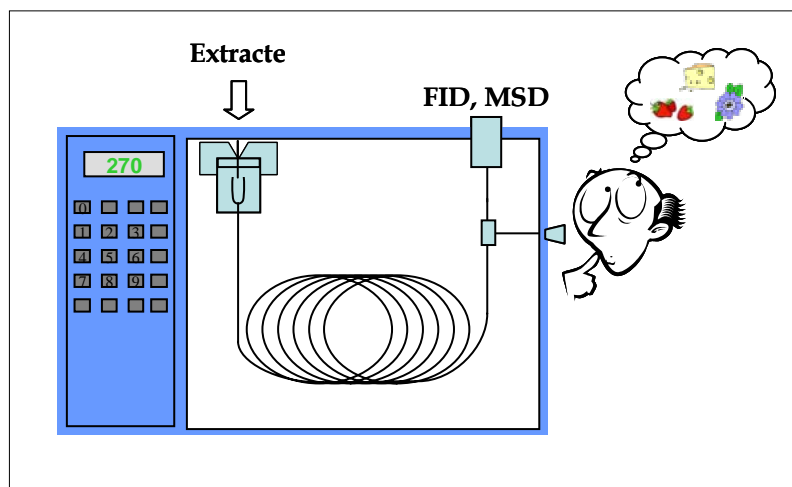


Figura III.11. Esquema d'una anàlisi olfactimètrica.

Els inicis de la GCO van molt lligats als inicis de la pròpia cromatografia de gasos. La utilització del nas com a detector cromatogràfic va ser proposada per Fuller i els seus col·laboradors l'any 1964 [78]. Aquest primer període va ser molt excitant per als químics de l'aroma ja que van aconseguir assignar descriptors d'olors als pics cromatogràfics i, a més, van poder detectar amb el seu nas compostos que no podien ser detectats pels detectors químics. De fet, tot i que en menor proporció, això encara passa avui en dia ja que, per alguns compostos, el nas humà és molt més sensible que qualsevol dels detectors químics que existeixen.

En els primers detectors olfactimètrics que es van utilitzar, la reproductibilitat era un greu problema que es devia bàsicament a la incomoditat que suposava olorar un efluent gasós sec i calent. Per tal de solucionar-ho, es va dissenyar un detector

que barrejava aire humidificat amb l'efluent calent que sortia de la columna, reduint d'aquesta manera la deshidratació nasal, la qual pot afectar de manera important la capacitat olfactiva de l'individu que realitza l'anàlisi olfactimètrica [79]. Actualment, es continua utilitzant aquest mateix sistema en gairebé tots els detectors olfactimètrics existents.

Un cop trobada l'eina que permetia identificar els compostos de l'extracte aromàtic que presentaven olor, el següent repte va ser determinar la importància relativa de cadascun d'ells en l'aroma global de la substància. La recerca en aquest camp, però, es pot dir que encara continua activa avui en dia. Tot i que s'han desenvolupat diferents tècniques olfactimètriques per tal d'avaluar la importància sensorial dels diferents compostos olorosos, tal com mostren diferents revisions bibliogràfiques que s'han realitzat sobre aquest tema [80-86] totes elles presenten limitacions i per tant no es pot dir que el problema estigui definitivament resolt.

III.2.1.1 Les tècniques olfactimètriques

El primer intent d'avaluar la contribució sensorial d'un compost en l'aroma d'una substància fou l'any 1963, abans del desenvolupament de la GCO, quan Rothe and Thomas van calcular la relació entre la concentració del compost a la mostra i el seu llindar de percepció sensorial. A aquesta relació la van anomenar valor d'aroma [87]. Segons aquesta teoria, aquells compostos que presentin un valor d'aroma superior a la unitat influiran en l'aroma de la substància en qüestió. Aquesta manera d'avaluar la importància sensorial dels compostos volàtils requereix, per tant, la quantificació i determinació del llindar de percepció sensorial d'un gran nombre de compostos, la qual cosa suposa una despesa de temps considerable.

Les tècniques olfactimètriques permeten obtenir una estimació de la importància sensorial dels diferents compostos en l'aroma de la substància d'una manera més

senzilla que no pas calculant els valors d'aroma de tots els compostos. Depenent del tipus de mesura, aquestes es poden classificar en quatre grups: tècniques de dilució, tècniques de temps-intensitat, tècniques d'intensitat posterior i tècniques de freqüència de detecció. A continuació es descriuen totes elles remarcant els seus avantatges i inconvenients.

Tècniques de dilució

Aquestes tècniques consisteixen en analitzar mitjançant la GCO un extracte de l'aroma de la substància d'interès per tal de determinar a quins temps de retenció apareixen olors. En una segona fase, es van duent a terme successives dilucions de l'extracte, normalment amb el mateix dissolvent orgànic utilitzat per a la seva obtenció, les quals s'analitzen també olfactimètricament. A mesura que va augmentant la dilució de l'extracte, es van detectant menys olors en la seva anàlisi mitjançant la GCO, fins que s'arriba a una dilució en la que ja no es detecta cap olor. Per a cada compost es determina el seu factor de dilució com l'última dilució en què s'ha detectat la seva olor. Com més gran és el factor de dilució d'un compost, és a dir, com més gran és la dilució en què s'ha detectat la seva olor per última vegada, més gran és la seva contribució a l'aroma de la substància en qüestió. D'aquesta manera s'obté una classificació jerarquizada dels compostos olorosos segons la seva potència aromàtica.

Les dues tècniques de dilució principals són el CHARM (*Combined Hedonic Aroma Response Measurements*), desenvolupada per Acree i col·laboradors [88], i l'AEDA (*Aroma Extract Dilution Analysis*) desenvolupada per Grosch i col·laboradors [89, 90]. La tècnica AEDA és la més senzilla de les dues ja que l'analista tan sols ha de concentrar-se en la detecció de les olors i en la descripció de les mateixes. El resultat s'expressa com el factor de dilució que, com ja s'ha dit, és la màxima dilució en la que encara s'ha detectat l'olor. La representació dels factors de dilució front el temps de retenció (o els índexs de Kovats) s'anomena aromagrama. En la

figura III.12 es mostra un exemple d'un aromagrama que correspon a l'anàlisi d'un extracte de l'aroma d'un cafè [82].

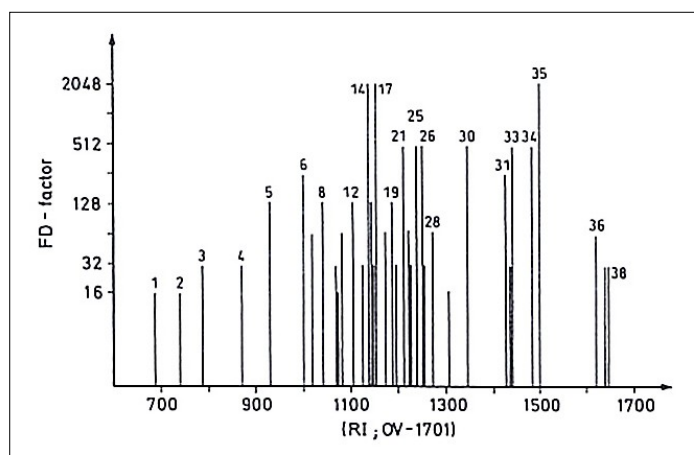


Figura III.12. Aromagrama d'un extracte aromàtic de cafè obtingut amb la tècnica AEDA [82].

En el CHARM l'analista, a més a més de descriure l'olor que detecta, ha d'assenyalar el moment en què comença l'olor i el moment en què acaba. Això s'aconsegueix amb un dispositiu connectat a un sistema informàtic en el que l'analista ha de pitjar un botó quan detecta l'olor i mantenir-lo pressionat fins que l'olor canvia o desapareix. D'aquesta manera el sistema informàtic enregistra l'interval de temps que dura cada olor. En aquest cas, en la construcció de l'aromagrama, a més a més del factor de dilució, es té en compte també la duració de l'olor, i això fa que tingui un aspecte més semblant a un cromatograma.

La figura III.13 mostra de manera esquemàtica com es construeixen els aromagrames amb la tècnica CHARM. En l'anàlisi de cada dilució, l'interval de temps de retenció de cada olor es representa mitjançant un senyal quadrat. El diagrama final es construeix superposant els senyals quadrats de cada dilució analitzada. L'àrea d'aquest senyal es coneix com el valor CHARM, que és el que

s'utilitza per a quantificar la potència aromàtica, i l'alçada correspon al factor de dilució.

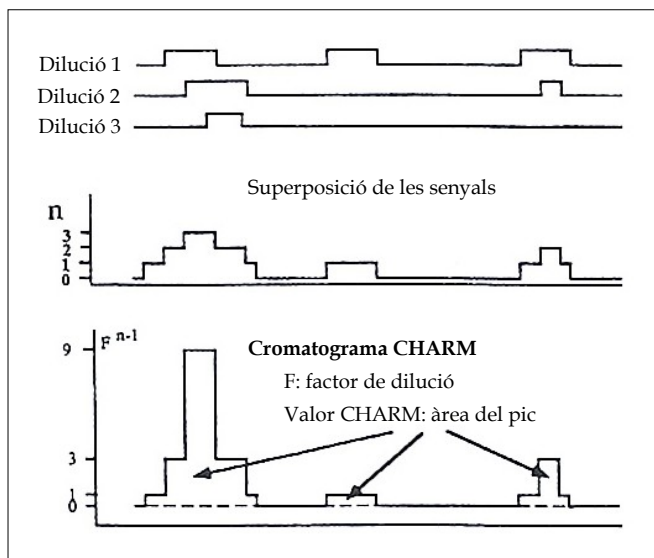


Figura III.13. Esquema de la construcció dels aromagrames CHARM [83].

En general, l'obtenció de l'extracte aromàtic és un dels passos més crítics dels mètodes olfactimètrics ja que cal extreure de manera representativa un gran nombre de compostos volàtils de diferent naturalesa química i que, a més, molts d'ells estan a concentracions baixes, per la qual cosa, en la majoria dels casos, cal concentrar l'extracte. Aquest procés, però, pot comportar pèrdues importants d'alguns compostos olorosos que falsejaran els resultats finals ja que la potència aromàtica d'aquests compostos es veurà subestimada en l'anàlisi olfactimètrica. Amb l'objectiu d'evitar aquest problema, s'ha desenvolupat l'AECA (*Aroma Extract Concentration Analysis*) una tècnica que conceptualment es pot englobar amb les tècniques de dilució, però que, enlloc d'analitzar-se per GCO successives dilucions de l'extracte, s'analitzen successives concentracions del mateix [91]. En l'AEDA s'analitzen per GCO dilucions d'un extracte que s'ha obtingut extraient els

compostos volàtils de la matriu i concentrant-los, mentre que en l'AECA s'analitza per GCO l'extracte obtingut aïllant els compostos de la matriu però sense sotmetre'ls a un procés posterior de concentració. Després, mitjançant l'eliminació del solvent, es va concentrant l'extracte de manera successiva i en cada pas de concentració s'analitza una alíquota de la mostra per GCO. D'aquesta manera es determinen també les olors que es poden perdre durant el procés de concentració.

La major part dels mètodes descrits en els que utilitzen les tècniques de dilució, l'extracte de la mostra que s'analitza és líquid i les dilucions del mateix es fan amb un dissolvent orgànic adequat. No obstant això, s'han desenvolupat alguns mètodes en els que analitzen l'espai de cap de la mostra. Guth i Grosch van proposar una nova modalitat de l'AEDA combinant la tècnica de l'espai de cap amb la GCO [92]. En aquest cas la dilució s'obtenia injectant volums decreixents de l'espai de cap al cromatògraf de gasos. Per altra banda, Deibler i els seus col·laboradors van desenvolupar un mètode utilitzant l'SPME com a tècnica d'extracció en el qual aconseguien l'efecte de dilució per calcular els valors CHARM, utilitzant fibres de diferent gruix i de diferents llargades [93]. Aquesta mateixa tècnica d'extracció també va ser utilitzada en aquesta tesi en el desenvolupament d'un mètode per a la caracterització de l'aroma del vi mitjançant GCO, però en aquest cas utilitzant la tècnica de dilució AEDA per a l'avaluació de la potència aromàtica dels compostos olorosos [58]. A diferència del treball de Deibler *et al.*, en el treball realitzat en aquesta tesi (apartat III.2.3) els factors de dilució es van determinar a partir de les anàlisis olfactimètriques dutes a terme als extractes de successives dilucions de la mostra.

Tant l'AEDA com el CHARM són tècniques que ens proporcionen una idea orientativa de la contribució dels compostos en l'aroma d'una substància però, en cap cas, els resultats s'han de considerar de manera categòrica. Aquestes tècniques estan basades en els llindars de percepció sensorial dels compostos volàtils en l'aire ja que, en l'anàlisi olfactimètrica, els compostos olorosos es volatilitzen de

l'extracte i llavors s'avaluen. No obstant això, la volatilitat dels compostos en els aliments depèn de la seva solubilitat en la matriu, així com també de les interaccions amb els components de la matriu que no són volàtils. És per això que en molts casos s'utilitzen aquestes tècniques com un pas previ a la determinació dels valors d'aroma [94]. D'aquesta manera es simplifica molt la feina ja que només es determina el valor d'aroma d'aquells compostos que han donat com a resultat una potència aromàtica important en l'anàlisi olfactimètrica.

Una vegada determinat quins són els compostos amb un impacte sensorial important en l'aroma d'una substància, és aconsellable dur a terme estudis de recombinació per tal de verificar els resultats obtinguts [83]. Aquests estudis consisteixen en elaborar una mostra sintètica a partir de la combinació dels compostos amb importància sensorial a les concentracions en què es troben en la mostra real i, mitjançant un panel de tastadors, determinar com s'assembla l'aroma de la mostra sintètica amb l'aroma de la mostra real. Després, mitjançant estudis de supressió, que consisteixen en avaluar de manera consecutiva les mostres sintètiques però sense afegir-les-hi un determinat compost, es pot conèixer el paper real que juga aquest compost en l'aroma de la substància analitzada.

Les tècniques de dilució, al igual que els valors d'aroma, han estat criticades pel fet de no complir les lleis psicofísiques de la percepció aromàtica. Aquestes tècniques assumeixen que la resposta a un estímul olfactiu és lineal amb la dilució i que tots els compostos tenen el mateix pendent de resposta quan augmenta la concentració. No obstant això, aquestes assumpcions es contradiuen amb la llei psicofísica d'Stevens la qual mostra que la relació entre la intensitat aromàtica i la concentració és exponencial:

$$I = k (C - T)^n$$

En aquesta equació I és la intensitat aromàtica, C és la concentració, T és el llindar de percepció sensorial, k és una constant de proporcionalitat que depèn de cada compost i n és un altra constant que pot variar entre 0.3 i 0.8. Segons aquesta llei,

dos compostos que es trobin a la mateixa concentració i que tinguin uns llindars de percepció sensorial molt semblants però que presentin exponents (n) diferents, poden presentar intensitats d'olor molt diferents i per tant no contribuiran de la mateixa manera a l'aroma global de la substància.

Un altre inconvenient de les tècniques de dilució és la gran quantitat de temps que requereixen ja que un estudi d'una mostra pot durar diversos dies. Cal tenir en compte que s'ha d'analitzar olfactimètricament l'extracte de la mostra i totes les dilucions que es facin del mateix fins que no es percebi cap olor i, en molts casos, el nombre de dilucions necessàries pot ser important. A més, cal fer repeticions de l'anàlisi de cada dilució. A tot això se li ha d'afegir que el nombre d'anàlisis olfactimètriques que pot fer un analista en un dia és molt limitat a causa dels problemes olfactius que li pot causar estar olorant un efluent de gasos calent durant un excés de temps.

Per altra banda, com més gran sigui el nombre d'analistes que duen a terme l'anàlisi olfactimètrica, més volum de feina implica i, per tant, més temps per a caracteritzar l'aroma d'una substància, ja que cada analista haurà de dur a terme, com a mínim per duplicat, l'anàlisi olfactimètrica de l'extracte i de totes les dilucions que s'hi facin. És per això que per tal de simplificar la feina i reduir el temps en la caracterització aromàtica d'una mostra, en la majoria dels casos tan sols duen a terme l'anàlisi olfactimètrica dos analistes, la qual cosa suposa no poder aplicar tests estadístics convencionals per tal de validar les diferències que s'observin entre aromagrames de productes diferents.

Tot i els inconvenients citats de les tècniques de dilució, aquestes són fins al moment les més utilitzades per a dur a terme una estimació de la contribució sensorial dels diferents compostos volàtils en l'aroma dels aliments, principalment, a causa de la seva senzillesa en el processament del senyal i de que no requereixen d'instrumentació sofisticada, sobretot la tècnica AEDA. A més, la component de subjectivitat de l'analista que existeix en altres tècniques, que s'expliquen a

continuació, no existeix en les tècniques de dilució ja que en aquestes l'analista tan sols ha d'indicar si percep o no una olor, i en el cas del CHARM indicar, a més a més, el moment en que aquesta comença i acaba.

Tècniques de temps-intensitat

Aquestes tècniques es basen en l'avaluació de la intensitat de l'olor. McDaniel i els seus col·laboradors van ser els primers en desenvolupar una tècnica de temps-intensitat a la qual van anomenar OSME [95, 96]. Aquest nom deriva d'una paraula grega que vol dir olor. Amb aquesta tècnica l'analista utilitza un dispositiu que consisteix en un indicador que es mou 150 mm longitudinalment i que està connectat a un sistema informàtic, amb el qual assenyala la intensitat de l'olor en un rang de 0 a 15. A més a més enregistra el temps de retenció i la descripció de l'olor. La representació de les intensitats de les olors front el temps de retenció s'anomena osmeograma i proporciona una representació gràfica de la importància sensorial dels compostos en l'aroma global de la substància. L'anàlisi la poden realitzar diversos analistes (els autors n'utilitzen quatre) i amb el tractament que es realitza a les dades obtingudes amb tots ells, l'aspecte final que presenta l'osmeograma és molt semblant al d'un cromatograma. A la figura III.14 es mostra un exemple d'osmeograma obtingut amb l'anàlisi d'una solució sintètica de compostos volàtils olorosos [82].

S'ha demostrat, amb la utilització d'una solució sintètica, que les intensitats de les olors detectades a la sortida de la columna cromatogràfica presenten una bona correlació amb la concentració dels compostos responsables de les olors [96]. No obstant això, en l'única aplicació que s'ha fet d'aquesta tècnica a mostres reals [97], sorprenentment els autors interpreten les diferències entre osmeogrames basant-se en les freqüències de detecció de les olors (tècnica que s'explica més endavant) i no en l'estimació de les intensitats que és el que estableix la tècnica OSME. Alguns autors atribueixen aquest fet a que aquesta tècnica presenta massa dificultats pels

analistes ja que s'observa una gran discrepància entre els diferents analistes en el nombre de compostos detectats i en la qualitat de les seves olors [98].

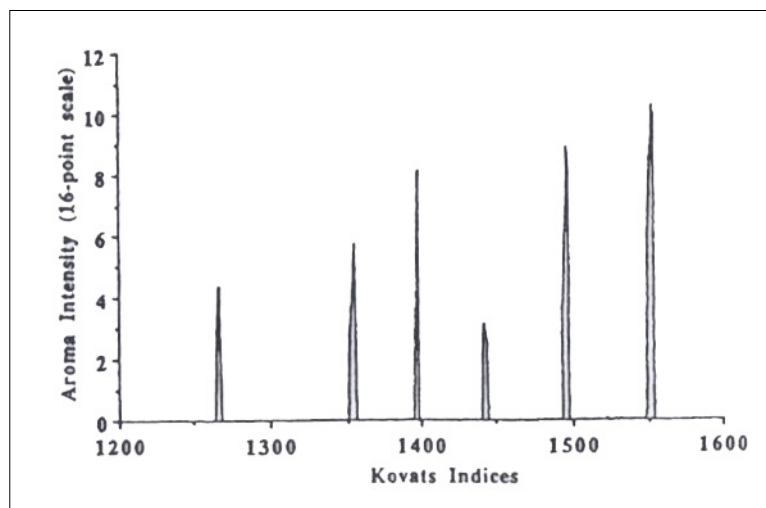


Figura III.14. Osmeograma d'una mostra sintètica [82].

Per tal de solucionar aquestes limitacions de la tècnica OSME, un grup d'investigadors del *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) de Dijon va desenvolupar una altra tècnica de temps-intensitat a la qual van anomenar *finger span cross modality matching* (FSCM) [98-99]. Aquesta tècnica es diferencia de l'OSME en la manera d'avaluar la intensitat. En l'FSCM l'analista assenyala la intensitat de l'olor que percep separant el dit gros i un altre dit que pot ser l'índex o el cor, mitjançant un dispositiu. Com més gran és la distància entre els dos dits, més intensa és l'olor. Aquesta manera d'avaluar la intensitat d'un estímul olfactiv havia estat descrita en estudis psicofísics realitzats a la dècada dels 60 i dels 70 [100]. El dispositiu que s'utilitza en l'FSCM mesura la distància entre els dits i aquesta es relaciona amb la intensitat aromàtica. El diagrama que s'obté en la representació de les intensitats front els temps de retenció és molt semblant a un

osmeograma. S'ha demostrat mitjançant l'anàlisi de solucions sintètiques que existeix una relació logarítmica entre els valors d'alçada de pic d'aquest diagrama i la concentració del compost responsable de l'estímul.

L'avantatge que presenta l'FSCM vers l'OSME és que la mesura de la intensitat de les olors és molt més ràpida ja que els analistes tan sols han de separar els dits de manera intuïtiva i no han de perdre temps buscant amb el cursor la intensitat corresponent. Cal tenir en compte que moltes vegades la duració de les olors és d'uns pocs segons i per tant la rapidesa en la mesura és un factor clau.

Les tècniques de temps-intensitat es basen en l'avaluació de la intensitat de l'olor i, per tant, a diferència de les tècniques de dilució, els seus principis no estan en desacord amb les lleis psicofísiques de la percepció olfactiva. Pel que fa al temps que requereixen per caracteritzar aromàticament una mostra, clarament també presenten avantatge respecte les tècniques de dilució ja que en aquest cas tan sols cal analitzar l'extracte de la mostra.

Per altra banda, però, en la determinació de la importància aromàtica dels diferents compostos, en les tècniques de temps-intensitat hi ha una component important de subjectivitat de l'analista a l'hora de mesurar les intensitats de les olors, la qual és molt més petita o, gairebé inexistente, en les tècniques de dilució.

Tècniques d'intensitat posterior

Aquestes tècniques, igual que les descrites en l'apartat anterior, consisteixen en mesurar la intensitat de l'olor. La diferència, però, és que l'analista avalua la intensitat de l'olor que ha percebut un cop el compost ja ha eluït de la columna cromatogràfica. És per això que alguns autors les classifiquen en un grup diferent a les anteriors [84]. En aquestes tècniques, l'anàlisi olfactimètrica la duen a terme un panel d'analistes que puntuen les intensitats amb una escala prèviament fixada. La mitjana del valor obtingut de tots els analistes és la mesura d'intensitat que se li

dona a cada olor, amb la qual cosa, al treballar amb valors mitjans d'un panel d'analistes, es redueix la subjectivitat dels mateixos en la mesura final. Alguns dels treballs que s'han fet recentment, mostren que les intensitats avaluades amb aquesta tècnica presenten una bona correlació amb la concentració dels compostos responsables de les olors i que, per tant, les tècniques d'intensitat posterior es poden utilitzar amb finalitats quantitatives [101, 102].

Tècniques de freqüència de detecció

En aquest tipus de tècniques, la mesura de la intensitat aromàtica d'un determinat compost es basa en el nombre d'analistes que han detectat la seva olor [103, 104]. L'anàlisi olfactimètrica és duta a terme per un panel d'analistes que, mitjançant un sistema informatitzat, enregistren els temps de retenció on detecten olors així com també la seva duració. L'aromagrama es construeix amb les dades obtingudes de tots els membres del panel, de manera molt semblant a com es construeixen els aromagrames CHARM. La figura III.15 mostra de manera esquemàtica com es construeix l'aromagrama de la mostra analitzada a partir dels olfactigrames de cada analista. En el gràfic final, l'alçada del pic correspon al nombre d'analistes que han detectat en aquell temps de retenció una olor, mentre que l'àrea està relacionada amb el temps de duració de les olors. Després de normalitzar a 100 (olor detectada per tots els membres del panel), l'alçada de pic resultant indica la freqüència de detecció d'aquella olor pel panel. L'alçada i l'àrea del pic s'anomenen NIF (*nasal impact frequency*) i SNIF (*surface of nasal impact frequency*) respectivament.

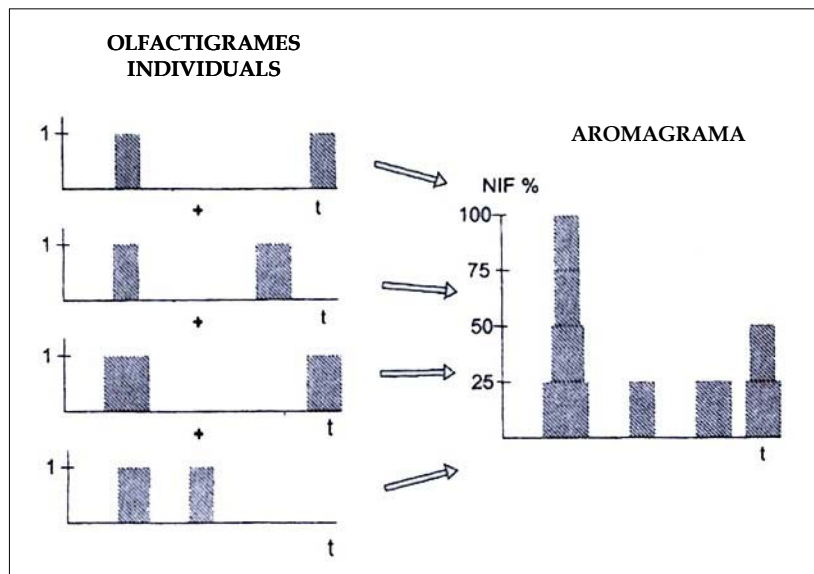


Figura III.15. Esquema de la construcció dels aromagrames NIF [105].

De la mateixa manera que les tècniques de temps-intensitat, les tècniques de freqüència compleixen les lleis psicofísiques de la percepció aromàtica, així com també permeten aplicar tests estadístics a les dades obtingudes pel fet que l'anàlisi la realitzen un nombre important d'analistes.

Per altra banda, s'ha demostrat que les tècniques de freqüència de detecció es poden utilitzar amb finalitats quantitatives [106]. No obstant això, per la gran quantitat d'anàlisis olfactimètriques que es requereixen quan es vol utilitzar la tècnica per a la determinació quantitativa dels analits, els mateixos autors del treball recomanen utilitzar-la tan sols en casos on sigui difícil utilitzar un altre tipus de detecció, ja sigui perquè la concentració en què es trobin els analits d'interès a la mostra sigui inferior a la sensibilitat dels detectors químics o perquè coelueixin amb un altre compost. En aquest últim cas serà possible la seva determinació si el compost que coelueix presenta una intensitat aromàtica menor.

III.2.1.2 Discussió sobre l'aplicació de la GCO

Tal com s'ha pogut anar observant en la discussió feta de les diferents tècniques olfactimètriques que s'han desenvolupat, totes elles presenten avantatges i inconvenients i, per tant, depenent dels objectius que es vulguin assolir en el treball a realitzar i els requeriments que s'exigeixin al mètode a desenvolupar, s'escollirà la tècnica més adequada.

Tot i que les tècniques que mesuren intensitats i les de freqüència de detecció sí que compleixen les lleis psicofísiques de la percepció, la mesura que proporcionen no és una mesura real del paper que juga un compost en l'aroma d'una substància ja que no hi ha cap garantia de que la concentració del compost que arriba al nas de l'analista en l'anàlisi olfactimètrica sigui la mateixa que arriba al nas del consumidor quan aquest olora o tasta el producte. Aquestes tècniques, però, presenten clars avantatges respecte les de dilució quan l'objectiu és la comparació de diferents mostres o, fins i tot, com a mètodes quantitius d'anàlisi. No obstant això, quan el que es vol és obtenir una llista jerarquitzada dels compostos olorosos segons la seva contribució sensorial a l'aroma de la substància, les tècniques de dilució són les més utilitzades, bàsicament, a causa de la seva senzillesa.

A part de les limitacions inherents a les diferents tècniques olfactimètriques que s'han comentat, n'existeixen d'altres associades al fet d'utilitzar el nas com a detector cromatogràfic i que afecten principalment a la reproductibilitat de l'anàlisi olfactimètrica. La fatiga i la saturació del sentit de l'olfacte en són dos exemples clars. Les condicions físiques i ambientals en què es dugui a terme l'anàlisi també poden influir en la validesa de les dades obtingudes. Així doncs, els sorolls, les distraccions, les olors estranyes i posicions poc confortables de l'analista poden induir a errors. Idealment, una anàlisi d'aquest tipus s'hauria de dur a terme en una habitació aïllada on no hi hagués soroll, amb una pressió d'aire positiva per tal d'eliminar les olors i l'analista hauria d'estar en una posició confortable, preferiblement assentat. Totes aquestes condicions ajuden a que la persona que

està olorant estigui concentrada en la detecció dels compostos que van eluint de la columna. Les pèrdues d'atenció afecten de manera important en compostos que presentin poca intensitat aromàtica o quan l'estímul té lloc durant un interval de temps molt curt.

Per altra banda, l'ordre d'elució, el caràcter aromàtic i la intensitat percebuda d'un determinat compost, poden afectar directament a la intensitat que es percep del compost que elueix immediatament després d'aquest. Aquest efecte, però, es pot corregir manipulant l'elució dels compostos mitjançant la variació de paràmetres cromatogràfics com són la temperatura o la pressió, o també variant el tipus de columna cromatogràfica.

L'èxit de la GCO en la caracterització de l'aroma d'un aliment depèn, en gran mesura, de la tècnica de pretractament que s'utilitzi per a aïllar els compostos volàtils de la matriu de l'aliment. El gran nombre de compostos volàtils que normalment estan presents en els aliments, les diferències en les seves propietats físiques i químiques i, en molts casos, els baixos nivells de concentració en què es troben, fan que el seu aïllament de manera representativa esdevingui un repte important.

No obstant això, la representativitat de l'extracte no és un terme absolut sinó que depèn de l'objectiu de la recerca. Per exemple, si l'estudi està centrat en un compost en concret o en una família de compostos, els requisits que ha de complir l'extracte és que la recuperació dels compostos d'interès sigui elevada. Mentre que si l'objectiu és per exemple la comparació de l'aroma de dues mostres diferents, llavors un extracte representatiu ha de contenir els compostos importants en l'aroma de l'aliment en qüestió i amb unes proporcions adequades. En aquest últim cas, una manera de comprovar la representativitat de l'extracte es duent a terme estudis sensorials, mitjançant tests triangulars o descriptius, per tal de comparar l'aroma de l'extracte obtingut amb el del producte original.

En general, no existeix cap tècnica ideal en l'extracció dels compostos volàtils dels aliments. L'elecció del mètode d'extracció depèn tant del tipus d'aliment com dels objectius que es pretengui assolir i, gairebé sempre, suposa un compromís. Si es comparen les tècniques d'espai de cap amb les d'extracció total de la mostra (extracció líquid-líquid, extracció en fase sòlida, destil·lació, destil·lació-extracció simultània), es pot pensar que les primeres aporten una informació més real ja que és la fracció que el nas detecta quan olorem la mostra. A més, si es controlen adequadament les condicions en què es forma l'espai de cap dins a la boca quan tastem el producte (temperatura, presència de saliva, dilució, emulsió, etc.), es possible imitar no tan sols la olfacció orthonasal sinó també la retronasal [107]. No obstant això, tot aquest raonament és teòric ja que a la pràctica les tècniques d'espai de cap, de la mateixa manera que les altres tècniques, presenten limitacions, tal i com s'ha descrit en l'apartat II.4.2.1. En el cas de l'espai de cap estàtic, el principal inconvenient és la baixa sensibilitat de la tècnica pel fet que no es duu a terme cap tipus de concentració dels analits. En les tècniques d'espai de cap dinàmic, en les que es duu a terme una concentració important dels analits i per tant permeten arribar a límits de detecció molt baixos, les limitacions estan associades principalment a l'ús de trampes amb materials adsorbents que poden comportar alguns problemes com són la generació d'artefactes o efectes memòria a causa de compostos que queden fortament retinguts a la trampa i que poden aparèixer en anàlisis posteriors.

III.2.1.3 La GCO en l'anàlisi de l'aroma del vi

Com ja s'ha anat exposant al llarg d'aquesta memòria, l'aroma del vi és molt complexa ja que està composta per centenars de compostos orgànics volàtils de famílies químiques diferents, amb propietats sensorials també molt diferents i amb la dificultat afegida que molts dels compostos que contribueixen a l'aroma es troben a concentracions molt baixes. Tot i les eines analítiques (tècniques

olfactimètriques i tècniques d'aïllament i concentració de compostos volàtils) que s'han anat desenvolupant durant els últims 20 anys, la caracterització de l'aroma d'un vi és una tasca complicada que encara no està ben resolta.

Els primers treballs publicats sobre la utilització de la GCO en el camp de l'enologia es remunten als anys 70 i en ells es fa palès que no existeix una relació directa entre la composició volàtil del vi i la seva aroma [108, 109]. A la dècada dels 80 és però quan s'obtenen els primers resultats exitosos en l'aplicació de la GCO en l'anàlisi del vi. La identificació dels compostos causants d'alguns defectes aromàtics, com per exemple la identificació del furaneol com a responsable de l'olor de maduixa i dolça que presenten alguns vins de varietats *Vitis labrusca* [110], o estudis de compostos responsables de les notes aromàtiques característiques d'alguns vins monovarietals com les olors de pebrot verd dels vins de Cabernet sauvignon conferides per metoxipirazines [111], en són alguns exemples. Altres treballs, també interessants, són els que es van enfocar a l'estudi de l'aroma d'alguns vins monovarietals, l'objectiu dels quals era identificar tots els compostos de la fracció volàtil que presentessin olor i que, per tant, podien ser susceptibles de participar en l'aroma d'aquell vi [112-116].

L'estudi olfactimètric que es duia a terme en aquests primers treballs consistia tan sols en olorar l'efluent de la columna per tal de poder identificar quins compostos presentaven olor i la descripció de la mateixa, però no es feia cap tipus de quantificació de l'olor. Acree *et al.* [117] i McDaniel *et al.* [97, 118] van presentar les primeres publicacions d'aplicació de tècniques olfactimètriques que permetessin conèixer la importància aromàtica de cadascun dels compostos olorosos en l'aroma del vi. Els primers autors van demostrar utilitzant la tècnica CHARM la implicació de l'o-aminoacetofenona en un defecte aromàtic molt comú en vins de varietats *Vitis labrusca* que es descriu com a "olor de guineu", mentre que els segons van utilitzar la tècnica OSME per tal de mesurar la influència del grau de maduresa dels raïms i l'anyada en els vins de Pinot noir. Aquests treballs realitzats a l'inici

dels anys noranta van ser els primers d'una llarga llista que arriba fins a l'actualitat on s'han aplicat les diferents tècniques olfactimètriques en la caracterització de l'aroma d'un gran nombre de vins, així com també en conèixer quins són els compostos causants de les diferències aromàtiques que presenten vins de diferents varietats, zones, edats, etc. A la taula III.7 es presenta un recull de tots aquests treballs elaborat a partir d'un estudi bibliogràfic iniciat per Ferreira *et al.* [85] i ampliat fins a l'actualitat.

Tal i com es pot observar en la taula, les tècniques de dilució (CHARM i AEDA) han estat les més emprades, i amb diferència, en la determinació de la importància aromàtica dels compostos volàtils del vi. El fet que aquestes tècniques fossin de les primeres que es van desenvolupar i la seva senzillesa respecte la tècnica OSME, que també va ser de les pioneres, podria haver propiciat el gran ús que se n'ha fet en el camp de l'enologia.

Guth va ser el primer en aplicar la tècnica AEDA a l'estudi de la composició aromàtica del vi, amb la qual va obtenir una llista jerarquizada dels compostos volàtils de vins de Schreube i Gewürztraminer segons la seva potència aromàtica [119]. L'estudi olfactimètric el va complementar amb un estudi quantitatiu per tal de determinar els valors d'aroma de cadascun dels odorants i, finalment, va dur a terme estudis de recombinació que li van permetre veure l'efecte sensorial de cada compost en l'aroma global de la mostra [120]. Un procediment similar va ser dut a terme per Ferreira *et al.* [121], amb el qual van obtenir una bona caracterització de l'aroma d'un vi rosat de Garnatxa, i per Escudero *et al.* [122], en la caracterització d'un vi de Macabeu amb la que van constatar que compostos amb valors d'aroma baixos poden tenir una contribució important en l'aroma del vi.

Any	Tècnica	Tipus d'estudi	Ref.
1990	CHARM	Demostració de l'activitat aromàtica de l'o-aminoacetofenona en raïms <i>Vitis Labrusca</i>	[117]
1990	OSME	Comparació de perfils aromàtics de vins elaborats amb raïms Pinot noir de diferents graus de maduresa	[118]
1992	OSME	Comparació de perfils aromàtics de vins elaborats amb raïms Pinot noir de diferents graus de maduresa	[97]
1992	CHARM	Determinació de l'impacte sensorial d'alguns compostos derivats de l'àcid sòrbic en un vi negre en mal estat	[130]
1994	CHARM	Estudi olfactimètric d'un vi de Chardonnay	[131]
1994	CHARM	Estudi de la correlació entre dades sensorials i olfactimètriques	[132]
1994	CHARM	Comparació dels perfils aromàtics de vins de Riesling amb altres vins blancs elaborats amb raïms híbrids franco-americans	[133]
1995	CHARM	Comparació dels perfils aromàtics d'un vi de Vidal blanc jove amb un de criança	[134]
1995	CHARM	Determinació dels compostos que influeixen més en l'aroma de vins de Pinot noir	[135]
1995	CHARM	Estudi de la representativitat de diferents tipus d'extracte de vi mitjançant anàlisi sensorial i olfactimètrica	[136]
1995	I	Identificació de la 4-metil-4-mercaptopentanona com un compost amb una contribució molt important en l'aroma dels vins de Sauvignon blanc	[125]
1997	AEDA	Classificació dels compostos volàtils de vins de Schreube i Gewürtztraminer segons la seva potència aromàtica	[119, 120]
1997	AEDA	Identificació dels compostos de la rapa del raïm més importants aromàticament i estudi de les seves possibilitats de ser els causants de les olors verdes al vi	[137]
1997	AEDA	Classificació dels compostos olorosos de mostos de Muscat segons la seva potència aromàtica	[138]
1997	I	Detecció d'un compost sofrat com a responsable d'una olor sofrada i de maduixa d'alguns vins que no són <i>Vitis vinifera</i>	[139]
1997	I	Estudi de la representativitat de diferents tipus d'extractes de xampany mitjançant anàlisi sensorial i olfactimètrica	[140]
1998	AEDA	Classificació dels compostos volàtils d'un vi de Garnatxa segons la seva potència aromàtica	[141]
1998	I	Identificació dels compostos responsables de les típiques olors dels vins dolços de Garnatxa	[142]

·/·

·/·

1998	I	Identificació d'alguns tiols com a responsables de notes empireumàtiques de l'aroma de vins de Cabernet sauvignon i Merlot	[143]
1998	AEDA	Estudi de la relació entre els factors de dilució i els OAV en solucions hidroalcohòliques	[144]
1999	CHARM	Comparació dels perfils aromàtics de litxis (frescos i en llauna) amb els de vins de Gewürtztraminer	[145]
1999	AEDA	Classificació dels compostos volàtils de vins monovarietals de Merlot, Cabernet sauvignon i Garnatxa segons la seva potència aromàtica	[146]
1999	NIF	Estudi de l'efecte de l'addició d'un antioxidant al xampany per tal d'evitar l'oxidació de compostos aromàtics durant la seva anàlisi	[147]
2000	NIF	Determinació dels compostos amb més importància aromàtica en dos vinagres de vi negre	[148]
2000	AEDA	Classificació dels compostos volàtils de vins de Merlot i Cabernet sauvignon de Bordeaux segons la seva potència aromàtica	[149]
2000	AEDA	Estudi dels canvis dels perfils aromàtics de vins blancs durant la seva oxidació	[150]
2000	I	Identificació del metional com a responsable de l'olor de vegetals cuïts que presenten alguns vins oxidats	[126]
2000	I	Identificació de la geosmina com a responsable de l'olor terrosa que presenten alguns vins	[127]
2001	AEDA	Classificació dels compostos volàtils de vins de la Rioja segons la seva potència aromàtica	[151]
2001	AEDA	Determinació dels compostos amb més importància aromàtica en quatre vins espanyols de gran qualitat	[152]
2001	AEDA IP NIF	Determinació dels compostos amb més importància aromàtica en tres mostos de varietats híbrides franco-rumaneses i mitjançant tres tècniques olfactimètriques	[123]
2001	I	Identificació de la 2,6,6-trimetil-2-ciclohexè-1,4-diona (TMCHD) com a responsable de l'olor de mel que presenten alguns vins joves portuguesos de la zona del Duero	[153]
2002	AEDA	Classificació dels compostos volàtils d'un vi rosat de Garnatxa segons la seva potència aromàtica	[121]
2002	FSCM	Comparació dels perfils aromàtics de vins de Gewürtztraminer de diferents zones de la regió francesa d'Alsàcia	[124]

·/·

·/·

2002	I	Identificació del 1,3-dimetoxibenzè com a responsable de l'olor medicinal, dolça, amb notes d'avellana i de fusta que presenten els vins de Porto	[128]
2002	AEDA	Determinació dels compostos responsables de les olors desagradables que es generen en l'oxidació dels vins blancs	[154]
2002	I	Identificació dels compostos aromàticament actius de vins de gel de diferents zones del Canadà i d'Alemanya	[155]
2003	NIF	Avaluació de la relació entre les dades obtingudes amb l'anàlisi sensorial i amb l'anàlisi olfactimètrica de vins de Chardonnay francesos	[156]
2003	AEDA	Determinació dels compostos responsables de les olors desagradables que presenten els vins blancs envellits prematurament	[157]
2003	IP	Comparació dels perfils aromàtics de vins monovarietals (Gual, Verdello, Marmajuelo, Listán blanc i Malvasia) de les illes Canàries	[158]
2003	AEDA	Classificació dels compostos volàtils d'un vi de Garnatxa segons la seva importància aromàtica	[58]
2004	IP	Comparació dels perfils aromàtics de vins negres de criança espanyols de gran qualitat	[159]
2004	AECA	Classificació segons la seva importància aromàtica de compostos provinents de la hidròlisi de precursors aromàtics extrets de raïms de Tempranillo i Garnatxa	[160]
2004	I	Identificació dels compostos amb importància aromàtica en vins de la varietat turca Kalecik Karast	[161]
2004	I	Estudi de la percepció retronasal, després de tastar el vi, dels compostos volàtils de dos vins Chardonnay	[129]
2004	AEDA	Classificació dels compostos volàtils d'un vi de Macabeu segons la seva potència aromàtica	[122]

Taula III.7. Estudis olfactimètrics realitzats en el camp de l'enologia. I: tan sols identificació; IP: intensitat posterior.

En els últims anys, tot i que es continuen utilitzant les tècniques de dilució, sobretot l'AEDA, s'estan emprant també i amb resultats força bons les tècniques de freqüència de detecció i les d'intensitat posterior. Serot *et al.* [123] mostren en un treball en què determinen els compostos aromàticament més importants d'uns mostos utilitzant tres tècniques olfactimètriques diferents (AEDA, freqüència de

detecció i intensitat posterior), que els resultats que obtenen amb les tres tècniques són força similars.

Pel que fa a les tècniques de temps-intensitat, aquestes han estat les menys utilitzades. Com ja s'ha comentat anteriorment, en l'aplicació que es va fer de la tècnica OSME en l'anàlisi de vi [97], els autors van interpretar les diferències entre osmeogrames basant-se en les freqüències de detecció i no en les intensitats a causa de la gran variabilitat de les mesures. No obstant això, la tècnica de temps-intensitat FSCM sembla més prometedora ja que recentment ha permès la comparació de perfils aromàtics de vins de Gewürztraminer d'Alsàcia [124].

Alguns treballs a destacar són també els que han permès identificar compostos amb gran importància sensorial en l'aroma d'alguns vins. Alguns exemples són la identificació de la 4-metil-4-mercaptopentanona com un compost amb una contribució important a l'aroma característica dels vins de Sauvignon blanc [125], un altre compost sofrat (metional) s'ha identificat com el responsable de l'olor de vegetals cuits que presenten alguns vins oxidats [126], la identificació de la geosmina com a responsable de l'olor terrosa d'alguns vins [127] o la importància de l'1,3-dimetoxibenzè en les notes d'avellana característiques dels vins de Porto [128]. En aquests treballs la GCO ha sigut una eina clau en l'atribució de les olors investigades als compostos responsables de les mateixes.

Recentment, Buettner [129] ha obert una nova línia en l'estudi de la percepció aromàtica del vi amb el desenvolupament d'una tècnica que permet fer un estudi dels compostos que tenen a veure amb la percepció retronasal, és a dir, els compostos responsables de l'aroma que percebem un cop ens hem introduït el vi a la boca. Aquesta tècnica, a la qual anomena BOSS (*buccal odor screening system*), consisteix, a grans trets, en estudiar els compostos volàtils que romanen a la boca un cop ingerit el vi, mitjançant l'extracció dels mateixos amb la tècnica SBSE (*stir bar sorptive extraction*). L'anàlisi consisteix en introduir una barra de SBSE a la boca, després d'ingerir el vi, per tal de que s'hi quedin retinguts els compostos volàtils.

Després aquests es recuperen mitjançant desorció tèrmica i es determinen cromatogràficament. L'ús d'un detector olfactimètric permet identificar els que fan olor i que, per tant, són susceptibles de participar en l'aroma retronasal.

Com ja s'ha comentat anteriorment, els resultats que s'obtinguin d'una anàlisi olfactimètrica depenen en gran mesura de l'obtenció de l'extracte aromàtic. L'elecció del mètode d'extracció no és gens fàcil ja que no existeix cap tècnica ideal per a l'extracció dels compostos volàtils del vi i, en cada cas, s'haurà d'escollir aquella que s'adeqüi més als objectius que es pretenguin assolir. Tot i que s'han dut a terme diversos estudis on s'ha avaluat la representativitat dels extractes de vi obtinguts amb diferents tècniques [136, 140, 148, 162], en cap d'ells s'ha arribat a conclusions definitives.

En la taula III.8 es mostra un recull bibliogràfic de les tècniques d'extracció utilitzades per a l'obtenció d'extractes aromàtics de vi per a la seva anàlisi olfactimètrica. La tècnica més emprada és l'extracció líquid-líquid utilitzant com a solvent extractant el diclorometà. Alguns autors han demostrat que aquest solvent proporciona uns extractes aromàtics del vi força representatius ja que és poc selectiu [148, 162]. En el cas que només interessin compostos que no siguin polars, el freó 113 és un bon extractant d'aquest tipus de compostos [85]. No obstant això, en ambdós casos l'addició de sal augmenta la recuperació dels compostos més polars.

En els últims anys, l'extracció en fase sòlida també ha donat bons resultats en l'obtenció d'extractes aromàtics representatius de l'aroma del vi. Ferreira *et al.*, en un estudi on comparen els resultats obtinguts amb diferents tipus d'adsorbents, mostren que el Amberlite XAD-4 és el que proporciona l'extracte menys selectiu [162].

Un altre mètode d'extracció utilitzat és la desmixturització del vi mitjançant l'addició de sals. Però, tot i que l'extracte etanòlic que s'obté conté gairebé tots els compostos volàtils aromàticament importants, també conté quantitats elevades de

polifenols i altres substàncies no volàtils que dificulten la seva anàlisi per cromatografia gasosa. Alguns autors proposen la destil·lació de l'extracte per tal de solucionar el problema [136, 140, 163], però això complica el mètode i implica més manipulació de la mostra, amb els inconvenients que això suposa.

Tècnica d'extracció	Substància extractant	Ref.
Extracció líquid-líquid (LLE)	Diclorometà	[123, 135, 137, 142, 143, 148, 149, 153-155, 157, 160, 161]
	Freó 113 i acetat d'etil	[97, 130, 133, 134, 145]
	Freó 11	[141, 146, 150]
	Pentà-eter etílic	[119]
	Hexà-eter etílic	[128]
	Pentà	[127]
	Acetat d'etil	[139]
Desmixturització	-	[126, 147]
Extracció en fase sòlida (SPE)	XAD-4	[122, 124, 151, 152]
	LiChrolut EN	[158, 159]
Espai de cap estàtic (SHS)	-	[120]
Espai de cap dinàmic (DHS)	Tenax-TA	[156]
Microextracció en fase sòlida (SPME)	DVB-CAR-PDMS	[58]
<i>Stir bar sorptive extraction (SBSE)</i>	PDMS	[129]

Taula III.8. Tècniques d'extracció utilitzades en l'anàlisi olfactiva del vi.

Altres tècniques utilitzades més esporàdicament en l'obtenció d'extractes aromàtics del vi per GCO han estat les tècniques d'espai de cap. En aquesta tesi

s'ha desenvolupat un mètode que utilitza l'SPME per a l'extracció dels compostos volàtils en la caracterització d'un vi mitjançant la tècnica olfactimètrica AEDA [58]. Una tècnica de recent aparició com és la SBSE també ha estat utilitzada, com ja s'ha comentat anteriorment, per a la determinació dels compostos que tenen a veure amb la percepció retronasal [129].

III.2.2 Caracterització de l'aroma de diferents vins monovarietals mitjançant la GCO

El vi és un aliment que, per les seves característiques, basa gran part del seu valor afegit en la qualitat aromàtica. La GCO, tal i com ja ha quedat palès en l'apartat anterior, és una eina important en l'avaluació d'aquesta propietat tan valuosa ja que ens permet conèixer quins són els compostos volàtils responsables de l'aroma que percebem quan tastem un vi.

L'objectiu del treball que s'exposa a continuació va ser la posta a punt de la tècnica de la GCO al nostre laboratori de recerca mitjançant la caracterització de l'aroma de vins monovarietals de les varietats Cabernet sauvignon, Viognier i Ull de llebre. Per a l'obtenció dels compostos volàtils es va utilitzar un mètode d'extracció líquid-líquid amb diclorometà adaptat de mètodes extrets de la bibliografia [136, 142]. Per a la determinació de la contribució sensorial de cada compost es va escollir la tècnica AEDA ja que és una tècnica senzilla que no requereix de cap instrumentació especial.

A continuació es descriu el treball experimental dut a terme així com els resultats obtinguts en la caracterització de l'aroma de cadascun dels vins analitzats olfactimètricament.

III.2.2.1 Materials i mètodes

Mostres

Es van analitzar tres vins de la varietat blanca Viognier i tres vins de les varietats negres Cabernet sauvignon i Ull de llebre, alguns elaborats al celler experimental "Mas dels Frares" de la Facultat d'Enologia i altres subministrats per diferents cellers catalans. Es van escollir aquestes varietats perquè, des del punt de vista

aromàtic, són prou diferents entre elles. La Viognier és una varietat blanca bastant aromàtica, el Cabernet sauvignon és una varietat, molt utilitzada actualment, que té unes notes aromàtiques molt característiques i l'Ull de llebre és una varietat autòctona que no destaca de manera especial per la seva aroma ja que és de les varietats que s'anomenen neutres.

Procediment d'extracció

En el procediment d'extracció dels compostos volàtils dels diferents vins, 250 mL de vi addicionats amb 6.4 mg/L de 4-nonanol (patró intern) i 20 g de NaCl, per tal d'augmentar la força iònica, es van extreure amb 100 mL de diclorometà. L'extracció es va dur a terme durant 1 hora, amb agitació, protegida de la llum i amb atmosfera de nitrogen. Un cop passat el temps establert, es va recollir la fase orgànica i es va centrifugar durant 8 minuts a 10000 rpm per tal de trencar l'emulsió que es formava en l'extracció. Seguidament es va assecar la fase orgànica amb sulfat sòdic anhidre i es va filtrar. L'extracte aromàtic es va concentrar al rotavapor fins a 5 mL, a temperatura ambient i amb el refrigerant a una temperatura per sota de 0 °C per tal d'evitar pèrdues. Es va recollir l'extracte concentrat i es va sotmetre a un altre procés de concentració fins a 1 mL en un bany a 43 °C i emprant una columna rectificadora Vigreux. L'extracte aromàtic final es va guardar en un vial de vidre a -23 °C, protegit de la llum i en atmosfera de nitrogen fins al moment de la injecció.

Anàlisi cromatogràfica

Les anàlisis cromatogràfiques es van dur a terme en un cromatògraf de gasos Hewlett-Packard 6890 equipat amb un FID i amb un detector olfactimètric. La figura III.16 mostra un esquema del sistema cromatogràfic emprat. En aquest es pot observar que al final de la columna analítica es disposava d'un sistema de

divisió de fluxos que dividia l'efluent de la columna en dues parts, una que es dirigia al FID i l'altra que es dirigia cap a l'exterior del cromatògraf de gasos on les analistes efectuaven la detecció olfactiva.

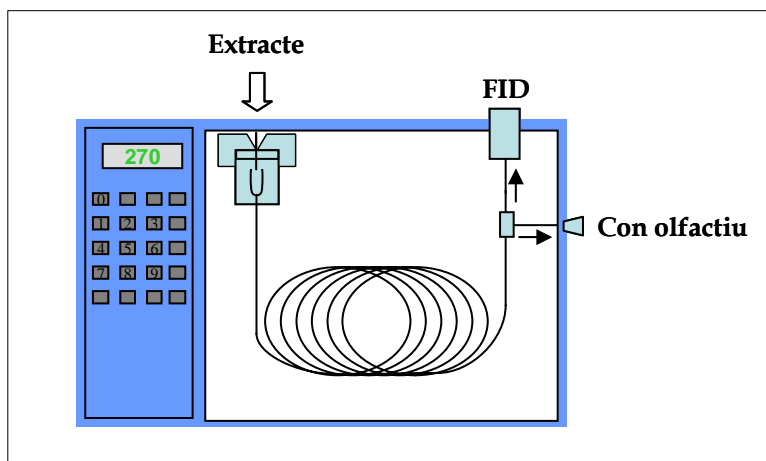


Figura III.16. Esquema del sistema cromatogràfic emprat.

En l'anàlisi cromatogràfica 4 μL de l'extracte aromàtic s'injectaven manualment en l'injector del GC amb mode *splitless* durant 1 minut a 250 $^{\circ}\text{C}$. La separació cromatogràfica es duia a terme amb una columna capil·lar CP-Wax 57 CB (50 m x 0.25 mm i.d., 0.2 μm de gruix) de Chrompack, utilitzant He com a gas portador amb un flux de 0.8 mL/min i aplicant la següent programació de temperatura: 30 $^{\circ}\text{C}$ (1 min), 70 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fins a 60 $^{\circ}\text{C}$, 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fins a 210 $^{\circ}\text{C}$ (30 min). La temperatura del FID era de 250 $^{\circ}\text{C}$ i la flama s'alimentava amb 40 mL/min d'hidrogen, 450 mL/min d'aire i 45 mL/min d'heli que actuava com a gas auxiliar.

Per a la detecció olfactiva es va emprar un dispositiu comercialitzat per SGE International constituït per un sistema de divisió de fluxos (ODO-I) que, mitjançant una microvàlvula de control (OSS-2), proporcionava una divisió de flux variable entre els dos detectors. La relació de flux que es va utilitzar entre el FID i el detector olfactiva va ser 2:8. El detector olfactiva portava incorporat un

sistema de transferència de calor del forn del cromatògraf fins a la sortida a l'exterior de la columna per evitar la pèrdua d'olors en l'anàlisi olfactimètrica deguda a la condensació d'alguns compostos, així com també un sistema que mesclava aire humidificat amb l'efluent de la columna per tal d'evitar una possible deshidratació nasal de l'analista. Aquests dos sistemes es troben indicats a l'esquema del detector olfactimètric emprat que mostra la figura III.17.

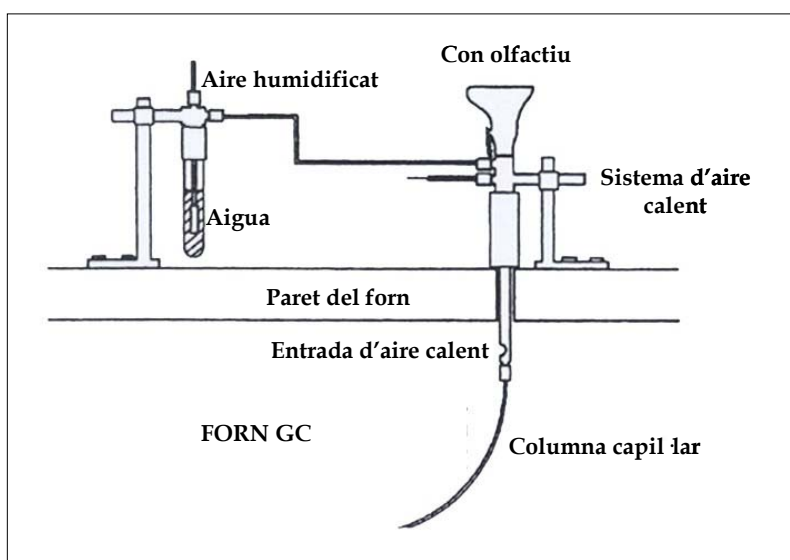


Figura III.17. Esquema del detector olfactimètric.

Les anàlisis olfactimètriques les van dur a terme dues analistes que prèviament s'havien sotmès a un procés d'entrenament. Aquest, va consistir, per una banda, en olorar patrons de vi que es van preparar segons un protocol descrit per Noble *et al.* i els seus col·laboradors [164] per tal de familiaritzar-se amb els diferents tipus d'olors que es poden trobar en els vins. També es van realitzar anàlisis olfactimètriques de solucions sintètiques que contenien compostos olorosos que apareixen habitualment en els extractes de vi. Les anàlisis dels vins monovarietals

es van fer per duplicat i alternant-se les dues analistes cada 20 minuts en la detecció de les olors dels compostos que eluïen de la columna.

La identificació dels compostos es va fer principalment per espectrometria de masses. Les anàlisis GC-MS es van dur a terme en un cromatògraf de gasos Hewlett-Packard 5890 (series II) acoblat a un detector de masses Hewlett-Packard 5972. La separació cromatogràfica es va dur a terme en les mateixes condicions descrites anteriorment en l'anàlisi per GC-FID i GCO per tal de poder identificar els compostos segons el temps de retenció. La ionització dels compostos en l'espectròmetre de masses es va fer per impacte electrònic a 70 eV i amb el detector a una temperatura de 280 °C. La detecció es va fer en mode *scan* entre 30 i 300 amu.

L'estimació de la contribució sensorial de cada compost en l'aroma dels diferents vins analitzats, es va dur a terme utilitzant la tècnica AEDA. Es van analitzar olfactimètricament i per duplicat successives dilucions 1:5 de l'extracte aromàtic amb diclorometà fins a la dilució on ja no es va detectar cap olor.

III.2.2.2 Resultats i discussió

A la taula III.9 es mostren les regions aromàticament més importants ($FD \geq 625$) que es van trobar en els vins d'Ull de llebre ordenades segons el temps de retenció relatiu, que correspon al temps de retenció on apareix l'olor respecte el temps de retenció del patró intern (4-nonanol). Aquesta normalització del temps de retenció es va fer per tal de corregir les petites diferències que s'observaven d'aquest paràmetre en alguns cromatogrames i que es devien, principalment, a la injecció manual de l'extracte en el cromatògraf de gasos.

La identificació dels compostos responsables de les olors es va fer per espectrometria de masses. Alguns d'ells, però, no es van poder identificar pel fet que es trobaven a una concentració inferior a la del nivell de detecció del MSD, o bé, a què sortien molt solapats amb altres compostos, la qual cosa dificultava la

seva identificació. En alguns casos, com per exemple la γ -undecalactona, es va identificar el compost per la seva olor característica i, mitjançant la injecció del patró, es va confirmar la seva identitat amb el temps de retenció.

Nº	TRR	Descriptor de l'olor	Compost	FD		
				U1	U2	U3
1	0.36	Mantega	Diacetil	625	625	15625
2	0.36	Afruitada, maduixa	<i>Desconegut</i>	625	<625	3125
3	0.38	Afruitada	<i>Desconegut</i>	<625	625	<625
4	0.39	Afruitada, maduixa	Butirat d'etil	15625	625	625
5	0.41	Afruitada	Isovaleriat d'etil	-	625	<625
6	0.46	Química, fruita seca, herbàcia	2-metil-1-propanol	<625	625	<625
7	0.52	Química, herbàcia	<i>Desconegut</i>	15625	<625	625
8	0.57	Química, rànica, fruita seca	Alcohol isoamílic	15625	3125	15625
9	0.62	Afruitada	Hexanoat d'etil	3125	3125	<625
10	0.73	Bolets, brou de carn	<i>Desconegut</i>	<625	78125	625
11	0.77	Afruitada	<i>Desconegut</i>	-	625	-
12	0.92	Herbàcia, vinosa	<i>Desconegut</i>	<625	3125	3125
13	0.94	Vinagre	Àcid acètic	<625	625	<625
14	0.94	Afruitada	<i>Desconegut</i>	-	-	625
15	1.23	Formatge	Àcid butíric	<625	<625	625
16	1.31	Formatge	Àcid 3-metilbutíric i àcid 2-metilbutíric	625	625	3125
17	1.42	Patates bullides	3-metil-1-propanol	<625	625	3125
18	1.55	Melmelada de préssec, afruitada, pomes bullides	<i>Desconegut</i>	-	3125	3125
19	1.58	Formatge, floral	Àcid hexanoic	<625	3125	<625
20	1.67	Roses	2-Feniletanol	<625	78125	15625

·/·

·/·

21	1.89	Sucre cremat, melmelada, dolça	5,6-dihidro-4-metil-2H-piran-2-ona	625	15625	3125
22	1.93	Sucre cremat, afruitada	<i>Desconegut</i>	625	625	625
23	1.96	Sucre cremat, afruitada	<i>Desconegut</i>	-	3125	3125
24	1.97	Sucre cremat, afruitada	<i>Desconegut</i>	-	625	625
25	1.99	Floral, afruitada, dolça	<i>Desconegut</i>	-	3125	<625
26	2.02	Afruitada, dolça, almívar	<i>Desconegut</i>	-	625	<625
27	2.05	Floral, dolça	<i>Desconegut</i>	-	15625	-
28	2.10	Fusta	<i>Desconegut</i>	-	<625	625
29	2.13	Fusta, curri	4-Etoxietylguaiacol	-	625	<625
30	2.17	Coco	γ -Undecalactona*	-	-	625
31	2.30	Fusta, castanyes crues	<i>Desconegut</i>	-	15625	<625
32	2.64	Vainilla	Vainil·lina	-	625	625
33	2.70	Vainilla, dolça, floral	Vainillat de metil	-	625	3125
34	2.85	Dolça	Àcid tetradecanoic	-	-	3125

Taula III.9. Ull de llebre: olors amb una potència aromàtica important (FD \geq 625).

(*) No s'ha pogut identificar per GC-MS. Identificació segons l'olor i el temps de retenció.

(-) No s'ha detectat la seva olor a l'extracte.

TRR: temps de retenció relatiu; U1: Ull de llebre 1; U2: Ull de llebre 2; U3: Ull de llebre 3

Tal i com es pot observar a la taula, en general, es detecten gairebé les mateixes olors als tres vins però presenten factors de dilució diferents, és a dir, contribueixen de manera diferent a la seva aroma global. No obstant això, en l'última regió dels cromatogrames dels vins d'Ull de llebre 2 i 3, apareixen tota una sèrie d'olors de sucre cremat, fusta, coco i vainilla que no es detecten en l'Ull de llebre 1. Alguns dels compostos identificats responsables d'aquestes olors són el 4-etoxietylguaiacol, la γ -undecalactona, la vainil·lina i el vainillat de metil, els quals formen part de l'aroma terciari, és a dir, s'originen durant els processos d'envelliment del vi. El fet de que l'Ull de llebre 1 fos un vi jove i que, per tant, no va ser sotmès a

cap procés de criança, explicaria que no es detectessin les olors de fusta, coco i vainilla en aquest vi.

Els resultats de l'anàlisi olfactimètrica dels tres vins de Viognier es mostren a la taula III.10. En aquests vins, i sobretot en el Viognier 2, destaquen tota una sèrie d'olors florals que apareixen en els temps de retenció relatiu entre 1.52 i 1.67, algunes de les quals, com les del 2-feniletanol o l'acetat de 2-feniletil, també tenen factors de dilució importants en alguns dels altres vins. Fins i tot, l'olor floral que apareix al temps de retenció relatiu 1.60 no es va detectar en cap vi de les altres varietats.

N°	TRR	Descriptor de l'olor	Compost	FD		
				V1	V2	V3
1	0.31	Afruitada, maduixa	<i>Desconegut</i>	625	-	-
2	0.36	Mantega	Diacetil	-	3125	<625
3	0.36	Afruitada, maduixa	<i>Desconegut</i>	-	-	<625
4	0.38	Afruitada	<i>Desconegut</i>	<625	-	-
5	0.39	Afruitada, maduixa	Butirat d'etil	<625	3125	<625
6	0.46	Làctica, dolça	<i>Desconegut</i>	3125	-	-
7	0.52	Química, herbàcia	<i>Desconegut</i>	<625	625	<625
8	0.57	Química, rànica, fruita seca	Alcohol isoamflic	625	15625	625
9	0.62	Afruitada	Hexanoat d'etil	625	3125	625
10	0.66	Herbàcia, picant	<i>Desconegut</i>	625	-	-
11	0.73	Bolets, brou de carn	<i>Desconegut</i>	<625	15625	15625
12	0.76	Làctica	<i>Desconegut</i>	78125	-	-
13	0.92	Herbàcia, vinosa	<i>Desconegut</i>	<625	3125	3125
14	1.10	Floral, fresca, dolça	Linalool	<625	<625	625
15	1.23	Formatge	Àcid butíric	<625	15625	3125

∴/∴

·/·

16	1.31	Formatge	Àcid 3-metilbutíric i acid 2-metilbutíric	625	<625	<625
17	1.52	Roses	Acetat de 2-feniletíl	<625	625	15625
18	1.55	Mermelada de préssec, afruitada, pomes bullides	<i>Desconegut</i>	625	15625	15625
19	1.58	Formatge, floral	Àcid hexanoic	<625	625	625
20	1.60	Floral, afruitada	<i>Desconegut</i>	<625	3125	-
21	1.62	Floral, afruitada, balsàmica	Alcohol benzílic	<625	625	<625
22	1.67	Roses	2-Feniletanol	3125	15625	78125
23	1.78	Coco, fusta	Whiskey lactona	<625	3125	-
24	1.89	Sucre cremat, mermelada, dolça	5,6-dihidro-4-metil-2H-piran-2-ona	625	15625	625
25	1.93	Sucre cremat, afruitada	<i>Desconegut</i>	<625	3125	625
26	1.96	Sucre cremat, afruitada	<i>Desconegut</i>	625	3125	625
27	1.97	Sucre cremat, afruitada	<i>Desconegut</i>	625	-	-
28	1.99	Floral, afruitada, dolça	<i>Desconegut</i>	625	3125	<625
29	2.08	Fumat	4-vinilguaiacol	<625	625	<625
30	2.13	Fusta, curri	4-Etoxietilguaiacol	<625	625	<625
31	2.19	Floral, peres bullides	<i>Desconegut</i>	<625	625	<625
32	2.30	Fusta, castanyes crues	<i>Desconegut</i>	3125	15625	3125
33	2.32	Làctica	<i>Desconegut</i>	<625	625	<625
34	2.64	Vainilla	Vainil lina	<625	3125	<625
35	2.83	Fusta, floral, incens	<i>Desconegut</i>	<625	3125	<625

Taula III.10. Viognier: olors amb una potència aromàtica important (FD ≥ 625).

(*) No s'ha pogut identificar per GC-MS. Identificació segons l'olor i el temps de retenció.

(-) No s'ha detectat la seva olor a l'extracte.

TRR: temps de retenció relatiu; V1: Viognier 1; V2: Viognier 2; V3: Viognier 3

En el Viognier 1 apareix una olor làctica al temps de retenció relatiu de 0.76, de la qual no se'n va poder identificar el compost responsable, que és la que presenta una major potència aromàtica en aquest vi ja que es detecta fins a l'última dilució.

En un dels vins de Cabernet sauvignon analitzats es va detectar la mateixa olor en el mateix temps de retenció, tot i que el seu factor de dilució va ser molt més baix (< 625).

A la taula III.11 es mostren les olors amb major potència aromàtica detectades en els vins de Cabernet sauvignon. Al igual que en els altres casos, les olors que es detecten en els tres vins són gairebé les mateixes i el que varia és la intensitat. La excepció, però, són unes olors de sucre cremat, dolces, de fusta i de vainilla que elueixen a temps de retenció elevats i que només es detecten al Cabernet sauvignon 3. Tot i que, en vins d'altres varietats, també s'havien detectat.

Nº	TRR	Descriptor de l'olor	Compost	FD		
				C1	C2	C3
1	0.36	Mantega	Diacetil	3125	15625	625
2	0.36	Afruitada, maduixa	<i>Desconegut</i>	3125	625	<625
3	0.38	Afruitada	<i>Desconegut</i>	15625	3125	-
4	0.39	Afruitada, maduixa	Butirat d'etil	625	<625	625
5	0.41	Afruitada	Isovaleriat d'etil	625	3125	<625
6	0.46	Química, fruita seca, herbàcia	2-metil-1-propanol	3125	-	<625
7	0.47	Alls, cautxú, goma	<i>Desconegut</i>	3125	<625	-
8	0.49	Plàtan	Acetat d'isoamil	3125	<625	<625
9	0.52	Química, herbàcia	<i>Desconegut</i>	3125	625	<625
10	0.57	Química, rànica, fruita seca	Alcohol isoamílic	15625	15625	3125
11	0.73	Bolets, brou de carn	<i>Desconegut</i>	78125	625	78125
12	0.74	Bolet, làctica	<i>Desconegut</i>	3125	78125	-
13	0.94	Vinagre	Àcid acètic	625	<625	<625
14	0.99	Patates bullides	<i>Desconegut</i>	78125	625	<625
15	1.00	Herbàcia, patates bullides	<i>Desconegut</i>	-	625	-
16	1.07	Herbàcia, plàstic, floral	<i>Desconegut</i>	625	625	625

∴/∴

·/·

17	1.23	Formatge	Àcid butíric	625	<625	<625
18	1.31	Formatge	Àcid 3-metilbutíric i àcid 2-metilbutíric	3125	625	3125
19	1.42	Patates bullides	3-metiltio-1-propanol	<625	<625	625
20	1.43	Floral, plàstic	<i>Desconegut</i>	<625	625	<625
21	1.51	Patates bullides, formatge	<i>Desconegut</i>	<625	3125	-
22	1.52	Roses	Acetat de 2-feniletíl	625	625	<625
23	1.55	Mermelada de préssec, afruitada, pomes bullides	<i>Desconegut</i>	-	-	625
24	1.67	Roses	2-Feniletanol	15625	15625	78125
25	1.89	Sucre cremat, mermelada, dolça	5,6-dihidro-4-metil-2H-piran-2-ona	-	<625	15625
26	1.89	Mermelada de préssec, dolça	γ -decalactona	15625	-	-
27	1.93	Sucre cremat, afruitada	<i>Desconegut</i>	15625	625	625
28	1.96	Sucre cremat, afruitada	<i>Desconegut</i>	-	-	625
29	1.99	Floral, afruitada, dolça	<i>Desconegut</i>	625	3125	<625
30	2.02	Afruitada, dolça, almívar	<i>Desconegut</i>	-	-	625
31	2.30	Fusta, castanyes crues	<i>Desconegut</i>	-	-	3125
32	2.70	Vainilla, dolça, floral	Vainillat de metil	-	-	625

Taula III.11. Cabernet sauvignon: olors amb una potència aromàtica important (FD \geq 625).

(*) No s'ha pogut identificar per GC-MS. Identificació segons l'olor i el temps de retenció.

(-) No s'ha detectat la seva olor a l'extracte.

TRR: temps de retenció relatiu; C1: Cabernet sauvignon 1; C2: Cabernet sauvignon 2; C3: Cabernet sauvignon 3.

En els vins de Cabernet sauvignon 1 i 3 apareix una olor de bolets i de brou de carn al temps de retenció 0.73 que, en els dos casos, juntament amb l'olor de roses del 2-feniletanol, és la que presenta un factor de dilució més gran. Aquesta mateixa olor apareix en altres vins però en cap cas se n'ha pogut identificar el compost responsable.

Tal i com ja s'ha comentat, l'objectiu d'aquest treball no era la caracterització dels vins monovarietals analitzats sinó que era l'aprenentatge de la tècnica de la GCO i

la familiarització amb les olors que es detecten en els vins. És per aquest motiu que no es va dur a terme un treball exhaustiu en la identificació dels compostos responsables de les olors que hagués comportat, per exemple, analitzar tots els extractes en una altra columna de diferent polaritat, adquirir patrons que presentessin olors dels compostos no identificats i injectar-los al cromatògraf de gasos per tal de comprovar si coincidia l'olor i el temps de retenció amb la del compost desconegut.

Tot l'aprenentatge adquirit en l'anàlisi de tots aquests vins monovarietals va ser de molta utilitat en el desenvolupament del treball que es presenta a continuació, el qual sí que suposa una nova aportació al camp de la recerca en l'aroma del vi. En aquest es va desenvolupar un mètode que utilitza l'SPME per a l'obtenció d'un extracte representatiu de l'aroma del vi i que permet la determinació de la potència aromàtica dels diferents compostos olorosos mitjançant una nova modalitat de la tècnica de dilució AEDA.

III.2.3 Desenvolupament d'una nova modalitat de l'AEDA mitjançant SPME-GCO i aplicació a la caracterització d'un vi negre de Garnatxa

En la revisió bibliogràfica presentada anteriorment de l'aplicació de la GCO en el camp del vi, s'ha mostrat que l'extracció líquid-líquid és la tècnica més utilitzada per a l'extracció dels seus compostos volàtils. No obstant això, tal i com s'ha pogut comprovar en el treball anterior, els mètodes que utilitzen aquesta tècnica són llargs i tediosos ja que requereixen de molts passos per a l'obtenció de l'extracte final, la qual cosa pot comportar pèrdues importants de compostos volàtils aromàticament importants.

La microextracció en fase sòlida (SPME), que ha estat àmpliament explicada a la primera part d'aquest capítol, ja havia donat bons resultats en l'extracció de compostos volàtils del vi (taula III.1). Les seves característiques de rapidesa i senzillesa en l'extracció dels compostos volàtils i l'experiència que es tenia en el nostre grup de recerca en la utilització d'aquesta tècnica, ens va fer pensar en la possibilitat d'aplicar-la a l'obtenció d'extractes aromàtics de vins per a la seva caracterització mitjançant la GCO.

Així doncs, amb aquest objectiu, es va procedir a desenvolupar un mètode que permetés conèixer quins són els compostos aromàticament actius d'un vi i fer una estimació de la importància sensorial dels mateixos mitjançant una nova modalitat de la tècnica de dilució AEDA, en la que s'utilitza l'SPME per a l'obtenció de l'extracte aromàtic. El mètode es va aplicar a la caracterització de l'aroma d'un vi negre de la varietat Garnatxa del qual es va determinar la potència aromàtica dels compostos olorosos. Posteriorment, es van avaluar els valors d'aroma dels compostos amb una major potència aromàtica, és a dir, els més influents en l'aroma segons l'estudi olfactimètric. Tota l'experimentació duta a terme i els resultats obtinguts en el desenvolupament del mètode olfactimètric, es troben recollits en un article que s'adjunta al final d'aquest capítol el qual porta per títol "*Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively*

diluted samples. A new approach of the Aroma Extract Dilution Analysis applied to the characterization of wine aroma” i que va ser publicat a la revista científica Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 (2003) 7861-7865.

III.2.3.1 Desenvolupament del mètode d'extracció

El primer paràmetre d'extracció que es va considerar va ser el tipus de fase estacionària de la fibra de sílice que s'utilitza en l'SPME. En base a l'experiència que es tenia amb aquest tipus d'extracció, es va decidir provar tres tipus de fases estacionàries: la de polidimetilsiloxà (PDMS) que és apolar, la de poliacrilat (PA) que és polar i la de divinilbenzè-carboxen-polidimetilsiloxà (DVB-CAR-PDMS) que conté mesclades de diferents fases estacionàries i presenta una bona capacitat de retenció. Es van fer extraccions d'un vi negre amb les tres fibres i a diferents condicions de temps i temperatura d'extracció. En la figura III.18, on es mostren tres cromatogrames obtinguts duent a terme l'extracció a 30 °C durant 3 hores amb cadascun dels tres tipus de fases estacionàries, es pot observar que el cromatograma corresponent a la fibra DVB-CAR-PDMS és el que presenta major nombre de pics.

No obstant això, en el tipus d'estudi que s'havia plantejat, el nombre de pics detectats pel FID no podia ser una paràmetre decisiu a l'hora d'escollir el tipus de fibra que més compostos olorosos extreia ja que, com s'ha explicat reiteradament, no té perquè haver-hi una relació directa entre el perfil cromatogràfic obtingut amb un detector químic i el perfil aromàtic del vi. Per tant, de manera simultània a la detecció amb l'FID, es va dur a terme també la detecció olfactimètrica. Ja que l'objectiu de l'estudi era la caracterització de l'aroma d'un vi i, per tant, interessava extreure el nombre més gran possible de compostos olorosos, es va escollir la fibra de DVB-CAR-PDMS perquè era amb la que es detectava un nombre més gran d'olors.

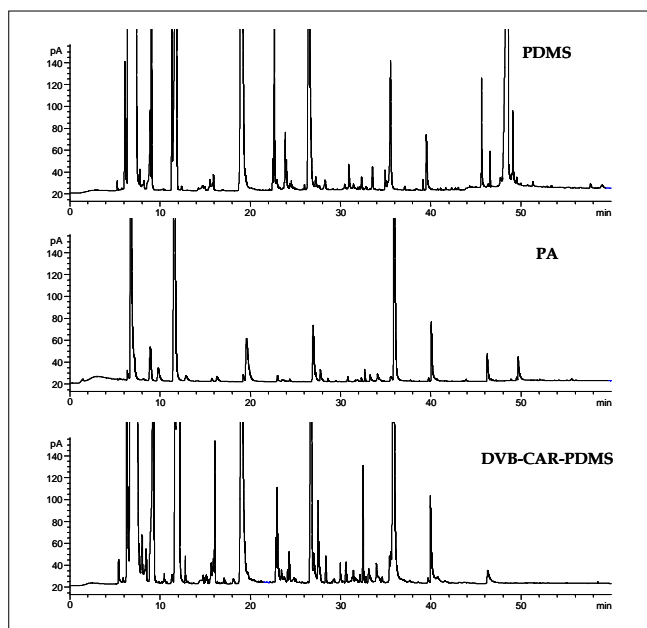


Figura III.18. Cromatogrames resultants de l'SPME d'un vi negre amb els tres tipus diferents de fibres.

Una vegada escollit el tipus de fase estacionària es van optimitzar els altres paràmetres de l'extracció com són la força iònica, el volum de mostra, la relació entre el volum de mostra i el volum d'espai de cap, el temps i la temperatura. En tots els casos, a l'hora d'escollir les millors condicions, es van tenir en compte tant les àrees cromatogràfiques obtingudes amb el FID com el nombre i la intensitat aromàtica dels compostos detectats olfactimètricament. Així doncs, en les anàlisis dutes a terme amb les condicions òptimes, 25 mL de mostra s'introduïen en un vial de 50 mL de capacitat juntament amb 8.7 g de clorur sòdic i una petita barra magnètica. Un cop tancat hermèticament el vial amb un *septum*, aquest es deixava preequilibrar en un bany a 40 °C durant 15 minuts i amb agitació magnètica. Passat aquest temps s'exposava la fibra a l'espai de cap de la mostra durant 4 hores a la mateixa temperatura. Un cop realitzada l'extracció dels analits, aquests es desorbien a l'injector del cromatògraf de gasos exposant-hi la fibra durant 1 minut a 270 °C.

III.2.3.2 Determinació de la potència aromàtica dels compostos olorosos

Amb el mètode d'extracció optimitzat es va procedir a l'anàlisi olfactimètrica d'un vi negre de Garnatxa de la Denominació d'Origen Qualificada Priorat per tal de caracteritzar la seva aroma. En l'anàlisi duta a terme per dues analistes entrenades, es van detectar 70 regions aromàticament actives, 7 de les quals, però, van ser detectades també en les anàlisis en blanc que es van dur a terme extraient l'espai de cap del vial buit, sense mostra. Per tant, aquestes 7 olors no es van considerar olors del vi de Garnatxa.

El següent objectiu va ser determinar la importància relativa de cadascuna de les 63 olors restants en l'aroma del vi de Garnatxa. La tècnica de dilució AEDA és la que s'havia emprat en els estudis anteriors (apartat III.2.2) però, amb la utilització de l'SPME com a tècnica d'extracció, la dilució de l'extracte aromàtic no era possible ja que, en aquesta tècnica, l'extracte està retingut a la fibra i, per raons òbvies, aquest no es pot diluir. Alguns autors havien proposat de simular l'efecte de la dilució amb l'SPME utilitzant fibres de diferent gruix o exposant diferents llargades de fibra a l'espai de cap de la mostra [93]. Aquesta estratègia, però, presenta l'inconvenient de que, per una banda, no totes les fases estacionàries es comercialitzen amb diferents gruixos i, pel que fa a l'exposició de diferents llargades, les fibres més llargues són de tan sols 2 cm i per tant és complicat utilitzar varies llargades amb aquestes dimensions tan petites. Per tal de solucionar el problema, la nostra proposta va ser diluir la mostra successivament i dur a terme les extraccions amb SPME sobre les mostres diluïdes fins a la dilució en que ja no es detectés cap olor. D'aquesta manera, el factor de dilució (FD) d'un determinat compost correspondria a la última dilució de la mostra on s'ha detectat la seva olor i seria anàleg al factor de dilució que s'obté quan el que es dilueix és l'extracte. Per tal de que al diluir el vi no es produïssin canvis importants en la matriu que poguessin afectar a la volatilitat dels compostos, les dilucions es van fer amb un vi sintètic que contenia el mateix percentatge d'etanol del vi objecte d'estudi (13.5%).

Amb l'aplicació de la nova modalitat de la tècnica AEDA a l'anàlisi del vi de Garnatxa, de les 63 regions aromàticament actives que s'havien detectat en l'anàlisi olfactimètrica de l'extracte de la mostra, 38 van presentar importants factors de dilució (entre 64 i 4096). Aquestes es mostren a la taula III. 12 ordenades segons el seu índex de retenció.

Nº	IR	Descriptor de l'olor	FD	Compost	Identificació		
					MS	IR	olor
1	893	Afruitada, maduixa	256	Desconegut			
2	938	Afruitada, química	256	Propanoat d'etil	a	+	+
3	960	Maduixa	4096	Isobutirat d'etil	+	+	+
4	980	Mantega	256	Diacetil	a	+	+
5	1010	Cola, química	64	Desconegut			
6	1033	Afruitada, maduixa	64	Butirat d'etil	+	+	+
7	1051	Poma verda	4096	2-metilbutirat d'etil	+	+	+
8	1069	Afruitada	1024	Isovaleriat d'etil	+	+	+
9	1115	Herbàcia, sofrada	64	Desconegut			
10	1142	Afruitada	4096	Valeriat d'etil	+	+	+
11	1181	Fruita madura, química	256	Desconegut			
12	1229	Química, rànica	4096	Alcohol isoamílic	+	+	+
13	1248	Afruitada, poma verda	1024	Hexanoat d'etil	+	+	+
14	1311	Bolet	64	1-octen-3-ona	b	+	+
15	1468	Patates bullides	256	Metional	+	+	+
16	1546	Floral	256	Linalool	+	+	+
17	1565	Formatge	256	Àcid isobutíric	+	+	+
18	1690	Gerani	64	Desconegut			
19	1694	Formatge blau	256	Àcid isovalèric	+	+	+
20	1720	Dolça, anisada	64	Desconegut			
21	1739	Patates bullides	64	Metionol	+	+	+
22	1770	Melmelada de préssec	64	Desconegut			

·/·

∴∴∴

23	1795	Floral, rosa	64	Fenilacetat d'etil	+	+	+
24	1825	Rosa	64	Acetat de 2-feniletíl	+	+	+
25	1828	Gerani	256	<i>Desconegut</i>			
26	1832	Melmelada de préssec	1024	β-damascenona	+	+	+
27	1871	Desagradable, verda	1024	3-mercapto-1-hexanol	b	+	+
28	1890	Fumat, química	1024	Guaiacol	+	+	+
29	1905	Fruita madura, dolça	256	Dihidrocinamat d'etil	+	+	+
30	1941	Rosa	1024	2-feniletanol	+	+	+
31	2060	Fumat, especiada	1024	Etilguaiacol	+	+	+
32	2071	Dolça, xarop	256	Furaneol	b	+	+
33	2112	Caramel	64	Homofuraneol	b	+	+
34	2165	Afruitada, dolça	1024	Cinamat d'etil	+	+	+
35	2173	Dolça, préssec	64	γ-decalactona	+	+	+
36	2191	Especiada, clau	64	Eugenol	+	+	+
37	2206	Estable, animal	256	4-etilfenol	+	+	+
38	2239	Especiada, curri	256	Sotolon	+	+	+

Taula III.12. Regions aromàticament actives més importants del vi de Garnatxa estudiat (FD ≥ 64). (a) No va ser possible la identificació mitjançant GC-MS a causa de la interferència del solvent. (b) No va ser possible la identificació mitjançant GC-MS a causa de la baixa concentració del compost. IR: Índex de retenció; FD: Factor de dilució

La identificació dels compostos responsables de les olors es va fer analitzant l'extracte per GC-MS i també comparant les olors i els temps de retenció amb patrons que es van injectar al cromatògraf de gasos. No obstant això, no es va poder identificar el compost responsable de 8 de les 38 olors que es van considerar importants.

La comparació dels resultats amb els d'altres autors que havien estudiat l'aroma de vins de Garnatxa utilitzant altres metodologies diferents [121, 141, 146, 165], va posar de manifest que amb l'SPME es poden obtenir de manera senzilla i sense gaire manipulació de la mostra, extractes aromàtics amb un rang ampli de compostos olorosos, adequats per a la seva anàlisi mitjançant GCO. A més, la nova

modalitat d'AEDA proposada permet obtenir una llista jerarquizada dels compostos volàtils segons la seva importància aromàtica.

III.2.3.3 Determinació dels valors d'aroma (OAVs)

La tècnica AEDA i, en general, totes les tècniques de dilució, estan basades en els llindars de percepció sensorial dels compostos volàtils en l'aire i, per tant, no tenen en compte la solubilitat dels compostos volàtils en la matriu de l'aliment en qüestió ni tampoc les interaccions d'aquests compostos amb altres components de la matriu que no són volàtils. És per això que alguns investigadors de l'aroma [94] aconsellen determinar els valors d'aroma dels compostos amb importància aromàtica seleccionats en l'estudi olfactimètric, ja que aquests estan basats en els llindars de percepció sensorial en l'aliment i per tant proporcionen una millor estimació de la contribució dels diferents compostos a l'aroma de l'aliment.

El següent pas, doncs, va ser determinar la concentració dels compostos volàtils seleccionats en l'estudi olfactimètric per tal de poder calcular-ne els valors d'aroma. Amb aquest objectiu es va desenvolupar un mètode cromatogràfic amb detecció per espectrometria de masses (GC-MS). Per a l'extracció dels compostos volàtils del vi es va utilitzar el mateix mètode, mitjançant l'SPME, que s'havia optimitzat per a l'anàlisi olfactimètrica.

Solucions patró

En alguns estudis de compostos volàtils del vi on s'utilitzava l'SPME com a tècnica d'extracció [21, 30, 54, 57], es van detectar interferències de la matriu que impedièren l'ús de rectes de calibratge amb solucions sintètiques per a la quantificació dels analits. És per aquest motiu que es va optar per utilitzar el mètode de les addicions estàndard per a l'anàlisi quantitativa dels analits d'interès del vi de Garnatxa.

Es van preparar solucions mare de cada analit de 1000 mg/L en etanol i, per dilució d'aquestes amb el mateix solvent, es van preparar solucions de 10 mg/L de tots els analits. Les solucions de calibratge mitjançant la tècnica de les addicions estàndard, es van preparar addicionant alíquotes de les solucions mare de cada analit al vi de Garnatxa. Les addicions es van fer a tres nivells diferents de concentració (baix, mitjà i alt) en el rang de concentracions en què es troben normalment aquests analits en el vi, el qual s'especifica a la taula III.13. A les solucions de calibratge s'hi va addicionar també octanoat de metil i 4-metil-2-pentanol, en una concentració de 10 i 1 µg/L respectivament, els quals es van utilitzar com a patrons interns. Es van escollir aquests dos compostos perquè no es troben presents al vi de forma natural i pertanyen a dos famílies químiques (els èsters i els alcohols) a les quals pertanyen una bona part dels compostos aromàticament importants identificats en el vi de Garnatxa.

Procediment d'extracció

Com ja s'ha comentat, el procediment d'extracció dels compostos d'interès utilitzat va ser el mateix que s'havia posat a punt en l'estudi olfactimètric i que es troba detallat en l'apartat anterior i a l'article que s'adjunta al final del capítol.

Anàlisi cromatogràfica

Les anàlisis cromatogràfiques es van dur a terme mitjançant un cromatògraf de gasos Hewlett-Packard 6890 equipat amb un detector d'espectrometria de masses Hewlett-Packard 5973. Per a la separació cromatogràfica es va utilitzar la mateixa columna polar que en les anàlisis olfactimètriques (CP Wax 57 CB de Chrompack) i amb les mateixes condicions de flux i temperatura.

Els espectres de masses es van adquirir mitjançant una ionització per impacte electrònic a 70 eV. Les temperatures de la font d'ionització i del quadrupol van ser

de 230 i 150 °C respectivament. Per tal d'augmentar la sensibilitat i la selectivitat del mètode, el detector es va utilitzar amb mode *selecting ion monitoring* (SIM). L'elecció de l'ió (m/z) a monitoritzar per a cada analit es va fer tenint en compte l'abundància, ja que com més gran és l'abundància major és la sensibilitat del mètode per a aquell compost, i que no hi haguessin compostos que eluïssin a un temps de retenció proper i que donessin el mateix ió en la seva fragmentació. La taula III.13 mostra l'ió que es va seleccionar per a cada compost. En el cas dels patrons interns es va seguir el mateix criteri i es va escollir l'ió de m/z 127 per a l'octanoat de metil i l'ió de m/z 87 per al 4-metil-2-pentanol.

Tot i la selectivitat aconseguida amb la programació duta a terme dels ions a analitzar en cada temps de retenció, a causa de la complexitat de la fracció volàtil del vi, aquesta no va ser suficient per a obtenir una bona separació dels 30 compostos d'interès. Aquest fet el mostra el cromatograma de la Figura III.19, en el que es pot observar que alguns d'ells eluïen molt junts i, per tant, la integració de les seves àrees no es podia fer de manera correcta. Aquest és el cas, per exemple, del propionat d'etil, l'isobutirat d'etil i el diacetil que eluïen en un rang de temps molt curt, entre 7.6 i 8.2 minuts.

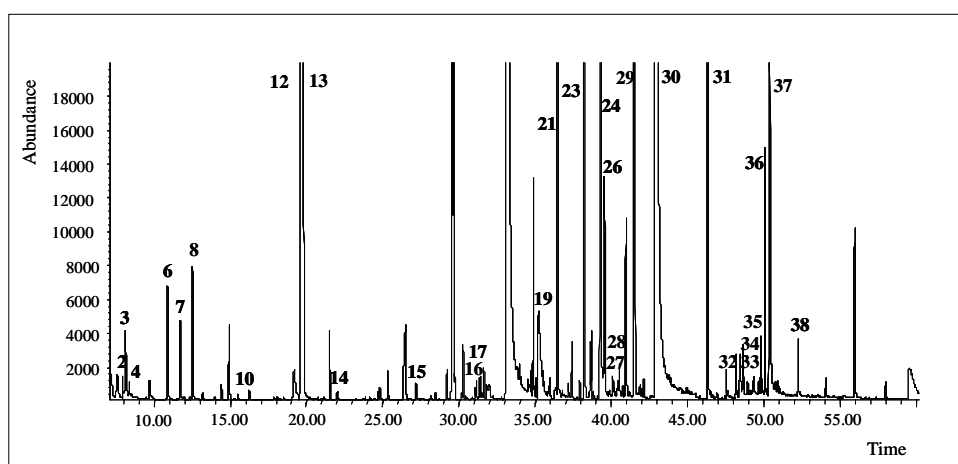


Figura III.19. Cromatograma obtingut amb l'anàlisi dels 30 compostos a la vegada mitjançant GC-MS amb mode SIM.

Així doncs, i amb l'objectiu de determinar la concentració de tots els compostos amb una exactitud adequada, cadascuna de les mostres de calibratge es va analitzar dues vegades mitjançant GC-MS utilitzant dues programacions d'ions diferents en les que es determinaven compostos diferents en cadascuna d'elles. La figura III.20 mostra els cromatogrames obtinguts amb les dues programacions d'ions diferents i els compostos determinats en cadascuna d'elles.

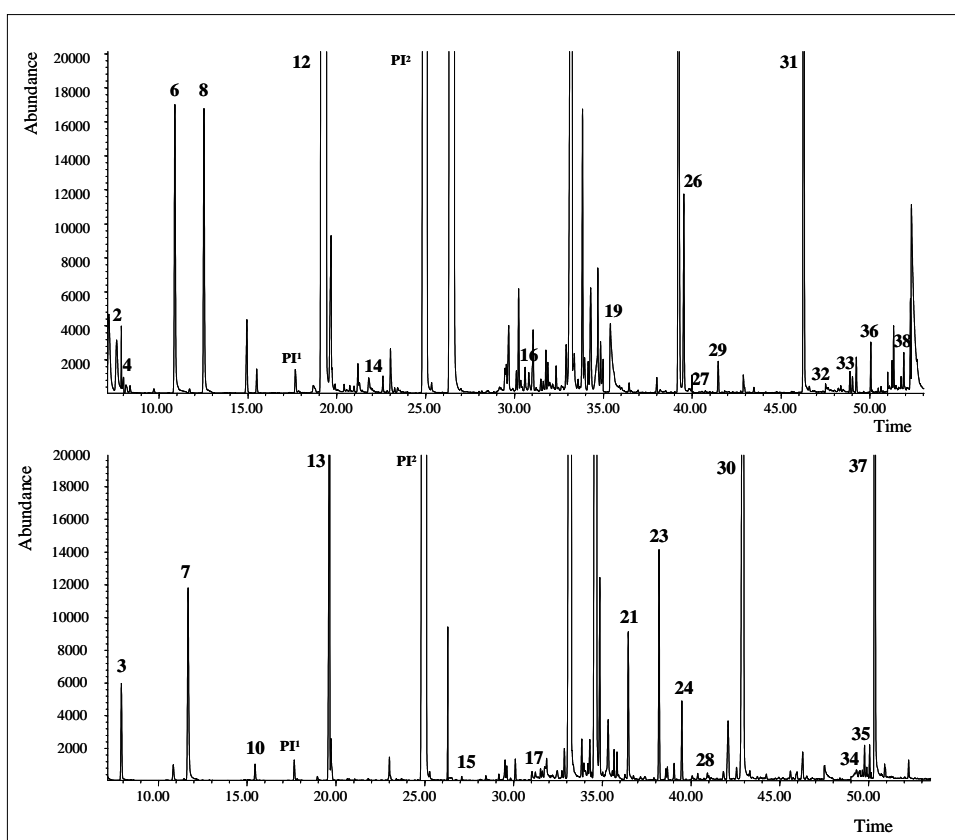


Figura III.20. Cromatogrames obtinguts en l'anàlisi dels 30 compostos mitjançant GC-MS amb mode SIM utilitzant el mètode proposat. PI¹: 4-metil-2-pentanol; PI²: octanoat de metil.

Resultats de l'anàlisi quantitativa

La taula III.13 mostra els paràmetres de les rectes de calibratge obtingudes per als diferents analits. Els valors dels coeficients de correlació (r) indiquen una bona linealitat de la resposta en els rangs de concentració en els que es va treballar. La precisió intermitja del mètode, expressada com a desviació estàndard relativa, va ser de 4.7%, el qual és un valor força bo tenint en compte que els compostos analitzats tenien propietats químiques diferents i es trobaven a nivells de concentració també molt diferents, la majoria d'ells a nivells traça.

Nº	Compost	Ió (m/z)	Rang concentracions (µg/L)	Pendent	Ordenada a l'origen	r
2	Propanoat d'etil	57	65-160	0.01	5.58	0.99
3	Isobutirat d'etil	102	50-165	0.03	4.65	0.99
4	Diacetil	86	8-18	0.02	0.45	0.99
6	Butirat d'etil	88	105-150	0.08	14.81	0.97
7	2-metilbutirat d'etil	102	6-12	0.32	11.54	0.97
8	Isovaleriat d'etil	88	45-70	0.26	13.41	0.99
10	Valeriat d'etil	88	2-4	0.34	0.72	0.99
12	Alcohol isoamílic	57	4000-9000	0.07	0.21	0.99
13	Hexanoat d'etil	115	90-290	0.003	0.07	0.99
14	1-octen-3-ona	70	1-3	0.17	0.03	0.99
15	Metional	104	20-75	0.002	0.13	0.97
16	Linalool	71	8-11	0.65	2.86	0.98
17	Àcid isobutíric	73	420-1480	0.001	0.38	0.97
19	Àcid isovalèric	60	1400-1600	0.01	7.55	0.99
21	Metionol	106	30-60	0.04	6.73	0.99
23	Fenilacetat d'etil	164	4-8	0.78	9.07	0.98
24	Acetat de 2-feniletíl	104	10-16	0.004	0.19	0.99
26	β-damascenona	190	4-8	0.06	3.40	0.99
27	3-mercapto-1-hexanol	100	20-60	0.001	0.02	0.97
28	Guaiacol	124	1-3	0.14	0.32	0.98
29	Dihidrocinnamat d'etil	178	1.0-2.5	1.78	0.96	0.99
30	2-feniletanol	103	130-195	0.08	65.10	0.99

.. / ..

31	Etilguaiacol	152	90-190	0.001	0.19	0.99
32	Furaneol	128	115-360	0.001	0.05	0.96
33	Homofuraneol	142	30-60	0.02	0.87	0.98
34	Cinamat d'etil	176	1.0-2.5	0.52	0.03	0.99
35	γ -decalactona	85	0.4-1.5	0.57	0.87	0.99
36	Eugenol	164	5-9	0.44	1.03	0.96
37	4-etilfenol	122	60-190	0.001	0.31	0.99
38	Sotolon	83	42-75	0.007	0.32	0.99

Taula III.13. Ions seleccionats per a l'anàlisi quantitativa mitjançant GC-MS amb mode SIM i paràmetres obtinguts de les rectes de calibratge.

La bona capacitat de retenir compostos volàtils de la fibra de DVB-CAR-PDMS juntament amb l'elevada sensibilitat del detector d'MS quan es treballa en mode SIM, van permetre obtenir un mètode per a la determinació simultània dels 30 compostos d'interès. Aquest va ser un repte important tenint en compte la diversitat química dels compostos i els diferents nivells de concentració als que es troben. La senzillesa i rapidesa d'aquest mètode són clars avantatges front altres protocols que apareixen a la bibliografia donat que requereixen de diversos mètodes, amb tècniques d'extracció diferents en cadascun d'ells, per a la quantificació de tots els compostos.

Càlcul dels valors d'aroma (OAV)

Una vegada quantificats els compostos d'interès, es van calcular els corresponents valors d'aroma a partir dels llimars de percepció sensorial trobats a la bibliografia. Dels 30 compostos amb major importància aromàtica identificats amb la tècnica AEDA, 13 presentaven un valor d'aroma superior a 1 i, per tant, segons aquesta teoria, aquests són els compostos que realment poden contribuir a l'aroma del vi de Garnatxa. La taula III.14 mostra la concentració, els llimars de percepció

sensorial i els OAV d'aquests 13 compostos que es trobaven al vi de Garnatxa a una concentració superior al seu llindar de percepció sensorial.

Nº	Compost	Concentració (µg/L)	Llindar percepció sensorial		OAV
			µg/L ¹	Ref.	
26	β-damascenona	54	0.05 (b)	[120]	1076
27	3-mercapto-1-hexanol	19	0.06 (a)	[166]	315
19	Àcid isovalèric	614	33.4 (c)	[165]	18.4
8	Isovaleriat d'etil	51	3 (c)	[165]	17.1
13	Hexanoat d'etil	231	14 (c)	[165]	16.6
12	Alcohol isoamílic	313323	30000 (b)	[120]	10.4
3	Isobutirat d'etil	150	15 (c)	[165]	10
31	Etilguaiacol	324	33 (c)	[165]	9.8
6	Butirat d'etil	185	20 (b)	[120]	9.2
38	Sotolon	43	5 (a)	[167]	8.7
32	Furaneol	40	5 (d)	[121]	8.1
7	2-metilbutirat d'etil	35	18 (c)	[165]	2.0
17	Àcid isobutíric	384	230 (c)	[165]	1.7

Taula III.14. Concentració, llindar de percepció sensorial i valor d'aroma (OAV) dels compostos amb una contribució important a l'aroma del vi de Garnatxa estudiat segons els valors d'aroma. ¹S'indica entre parèntesi la matriu en la que es van determinar els llindars de percepció sensorial: (a) solució hidroalcohòlica al 12%; (b) solució hidroalcohòlica al 10%; (c) solució hidroalcohòlica al 10% amb un contingut en glicerina de 7 g/L i amb un pH de 3.2; (d) solució hidroalcohòlica al 10% amb un pH de 3.

Tal i com es pot observar en la taula, la β-damascenona i el 3-mercapto-1-hexanol són, amb diferència, els compostos que més contribueixen a l'aroma del vi de Garnatxa analitzat. Altres compostos olorosos importants són 5 èsters etílics, 2 àcids i un alcohol (l'alcohol isoamílic), tots ells productes de la fermentació, així com també l'etilguaiacol, el sotolon i el furaneol. Aquests resultats són molt similars als trobats per Ferreira *et al.* [121] en l'anàlisi d'un vi rosat també de la varietat Garnatxa en el que la β-damascenona i el 3-mercapto-1-hexanol eren també

els compostos amb un valor d'aroma més elevat. A més a més, exceptuant el 2-metilbutirat d'etil i l'etilguaiacol, la resta de compostos de la taula III.14 van ser determinats també en el vi rosat de Garnatxa amb una concentració superior al seu llindar de percepció sensorial. Tot i que l'origen del vi caracteritzat per Ferreira *et al.* era diferent al caracteritzat en aquest estudi i les tècniques de pretractament utilitzades en tots dos treballs també van ser diferents, existeix una bona concordança entre els resultats obtinguts en ambdós estudis.

Tot i que, com s'ha dit reiteradament, no existeix cap mètode ideal per a la obtenció d'extractes representatius de l'aroma del vi, en aquest estudi s'ha demostrat que l'SPME és una tècnica adequada per a l'extracció d'un ampli rang de compostos així com també per a obtenir una llista jerarquizada dels compostos segons la seva importància aromàtica, quan aquesta es combina amb la GCO. A més, el mateix mètode d'extracció desenvolupat per a l'anàlisi olfactimètrica es pot utilitzar amb finalitats quantitatives. L'elevada capacitat d'extracció de compostos olorosos de les fibres de DVB-CAR-PDMS combinada amb la detecció cromatogràfica en mode SIM, permeten obtenir un mètode amb elevades sensibilitat i selectivitat per a la determinació simultània de tots els compostos que contribueixen a l'aroma del vi.

A continuació s'inclou l'article que porta per títol "*Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the Aroma Extract Dilution Analysis applied to the characterization of wine aroma*" en el que es presenta el mètode desenvolupat per a la caracterització de l'aroma del vi utilitzant l'SPME com a tècnica d'extracció.

*SOLID-PHASE MICROEXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY
OLFACTOMETRY ANALYSIS OF SUCCESSIVELY DILUTED SAMPLES. A NEW
APPROACH OF THE AROMA EXTRACT DILUTION ANALYSIS APPLIED TO
THE CHARACTERIZATION OF WINE AROMA*

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 (2003) 7861-7865

**Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography
Olfactometry Analysis of Successively Diluted Samples. A New
Approach of the Aroma Extract Dilution Analysis Applied to the
Characterization of Wine Aroma**

MARIA PILAR MARTÍ,* MONTSERRAT MESTRES, 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, Avenida Ramón y Cajal, 70,
E-43005 Tarragona, Spain

The relationship between the composition and the aroma of the wine can be established by using gas chromatography with olfactometric detection (sniffing or GCO), which combines the chromatographic response with the human nose response. To evaluate the contribution of the odor compounds in wine aroma, we designed a new approach of the aroma extract dilution analysis (AEDA) that lies in the GCO analysis of serially diluted wine samples using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) as the extraction technique. The fiber coating used was Flex divinyl-carboxen-polydimethylsiloxane. The method developed was applied to determine the aromatic composition of a red Grenache wine from Priorat (Spain). The method allows 38 important odorants to be determined in the AEDA study, 30 of them precisely identified. These results are similar to those reported by other studies related to this variety of wine. HS-SPME is a suitable technique to obtain representative extracts of wine aroma with several advantages such as simplicity, speediness, and little sample manipulation.

KEYWORDS: Wine; flavor; characterization; organic volatile compounds; gas chromatography-olfactometry; solid-phase microextraction

INTRODUCTION

The presence or absence of some aroma compounds plays a definitive role in the quality of most food and beverages. In the case of wine, the aroma properties have a direct influence on the acceptance or rejection of the product.

The aroma of a wine is influenced by the action of several different compounds on the sensory organs. These volatile aromatic compounds are produced through metabolic pathways during ripening and harvest of grapes, during their fermentation and/or also during the storage of wine (1–2). Among these origins, it is well known that the variety of the grape gives a characteristic aroma. This varietal aroma allows the classification and even the labeling of wines, so it is important to know the typical aromatic pattern of a wine variety in order to ensure its quality (3–6).

To determine the wine aroma composition, the chemical analysis of the volatile compounds is not satisfactory, because not all of them are odorants, thus an analytical study directed to the identification and quantification of the ones that are flavor-active is required. This fact implies the use of an analytical tool that correlates sensory and instrumental analysis. In this context, gas chromatography olfactometry (GCO) seems to be the most

appropriate technique, because the human and electronic responses are blended to maximize the available detection capabilities (7). On the other hand, several techniques have been developed to collect and process GCO data and to estimate the sensory contribution of each odorant. Among these techniques, the aroma extract dilution analysis (AEDA) has been widely used to determine the relative odor potency of compounds present in a sample extract of many different products, including wine (5, 6, 8, 9–14).

Wine aroma contains hundreds of components that belong to very heterogeneous groups such as alcohols, aldehydes, ketones, esters, acids, terpenes, etc. Furthermore, the concentration levels of each of these compounds are very variable, ranging from several mg/L to a few ng/L. This complexity and these low levels of concentration require the use of extraction and also concentration techniques.

Therefore, several different sampling techniques have been used: liquid–liquid extraction, solid–liquid extraction, distillation, headspace techniques, demixing, etc. (5, 6, 8, 15–19). The solid-phase microextraction (SPME) is an extraction technique appeared more recently than the others, although it has already given good results for the analysis of different wine volatiles (20–28). Its main advantages are simplicity and little sample manipulation.

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

Table 1. Chemical Standards Used in the Study

compound	CAS no.	source
acetic acid	[64-19-7]	99.7% Aldrich
acetone	[513-86-0]	>97% Fluka
butane-2,3-dione (diacetyl)	[431-03-8]	97% Aldrich
butyric acid	[107-92-6]	99+% Aldrich
β -damasconone	[23726-91-2]	99+% Fluka
5-hydroxydecanoic acid δ -lactone (δ -decalactone)	[705-86-2]	98+% Aldrich
4-hydroxydecanoic acid γ -lactone (γ -decalactone)	[706-14-9]	99% Aldrich
2,6-dimethoxyphenol	[91-10-1]	99% Aldrich
2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (furanol)	[3658-77-3]	>99% Fluka
ethyl acetate	[141-78-6]	>99.5% Fluka
ethyl butyrate	[105-54-4]	>98% Fluka
ethyl cinnamate	[103-36-6]	99% Aldrich
ethyl dihydrocinnamate	[2021-28-5]	98% Fluka
ethyl hexanoate (ethyl caproate)	[123-66-0]	99+% Aldrich
2-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (Homofuranol)	[27538-09-6]	97% Aldrich
4-ethyl-2-methoxyphenol (ethylguaiaicol)	[2785-89-9]	98% Lancaster
ethyl 2-methylbutyrate	[7452-79-1]	99% Aldrich
ethyl 3-methylbutyrate (ethyl isovalerate)	[108-64-5]	>99% Fluka
ethyl 2-methylpropanoate (ethyl isobutyrate)	[87-62-1]	99% Aldrich
ethyl octanoate (ethyl caprylate)	[106-32-1]	99+% Aldrich
ethyl pentanoate (ethyl valerate)	[539-82-2]	99% Aldrich
4-ethylphenol	[123-07-9]	>97% Fluka
ethyl phenylacetate	[101-97-3]	99% Fluka
ethyl propanoate	[105-37-3]	>99% Fluka
4-allyl-2-methoxyphenol (eugenol)	[87-53-0]	99% Aldrich
hexanoic acid	[142-62-1]	99.5% Aldrich
3-methyl-1-butyl acetate (isoamyl acetate)	[123-92-2]	>99% Aldrich
3-methylbutyric acid (isovaleric acid)	[503-74-2]	>98% Fluka
2-methyl-3-furanthiol	[28588-74-1]	Interchim
2-methylpropanoic acid (isobutyric acid)	[79-31-2]	>99.5% Fluka
3-methyl-1-butanol (isoamyl alcohol)	[123-51-3]	>99% Fluka
linalol	[78-70-6]	97% Aldrich
3-mercapto-1-hexanol	[51755-83-0]	Interchim
methyl anthranilate	[134-20-3]	Fluka
2-methoxyphenol (guaiaicol)	[90-05-1]	98% Aldrich
3-methylthio-1-propanal (methional)	[3268-49-3]	Aldrich
3-methylthio-1-propanol (methionol)	[505-10-2]	98% Aldrich
octanoic acid	[124-07-2]	99.5% Aldrich
1-octen-3-one	[4312-99-6]	97% Lancaster
2-phenylethanol (β -phenethyl alcohol)	[60-12-8]	>99% Fluka
phenylacetic acid	[103-82-2]	99% Aldrich
2-phenylethyl acetate	[103-45-7]	>99% Fluka
4-vinylphenol	[2628-17-3]	10% sol. Lancaster
4,5-dimethyl-3-hydroxy-2,5-dihydrofuran-2-one (sotolon)	[28664-35-9]	97% Aldrich

The aim of the following investigation is to demonstrate the usefulness of SPME combined with GCO for the characterization of wine aroma and to elucidate the most odor-active compounds in a Grenache wine by applying this technique.

MATERIALS AND METHODS

Samples. Among several different young Grenache wines (2001) from AOC Priorat, we selected the most representative from this wine growing zone of the North-East of Spain, according to a panel of wine experts.

Reagents and Chemicals. The standards of the different aroma compounds studied were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), Fluka (Madrid, Spain), Lancaster (Bischheim, France) or Interchim (Montluçon, France). The CAS number, the source and purity of each compound are specified in Table 1. All the other chemicals and reagents used were of analytical grade.

When samples had to be diluted, we used a synthetic wine that was obtained by dissolving 3.5 g of L(+)-tartaric acid and 135 mL of ethanol in a suitable amount of Milli-Q quality water to give 1 L of solution. The pH was adjusted to 3.5 with 1N NaOH. The percent of ethanol and pH value were 13.5% and 3.5, respectively, to reproduce the properties of the young Grenache wine studied (20, 21).

SPME. The SPME holder, for manual sampling, and fibers used in this investigation were purchased from Supelco (Bellefonte, PA). Different commercially available stationary phases and various film

thickness of the fibers were tested: polydimethylsiloxane (PDMS) 100 μ m, polyacrylate (PA) 85 μ m and StableFlex divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS) 50/30 μ m. All the fibers were conditioned before use and cleaned between analyses by inserting them into the GC injector, where they were kept at the recommended temperature, and to prevent contamination, were used immediately after conditioning.

Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) Analysis. The different parameters that influence the HS-SPME analyses were studied (28–30): sample ionic strength, sample volume, extraction time, and temperature of the sample during the process. The experiments made to evaluate the influence of each of these factors were carried out with the Grenache wine selected. The results are discussed in the next section. The optimal conditions were as follows: for each analysis, 25 mL of sample (wine or diluted wine) was placed into a 50-mL glass vial with 8.7 g of NaCl (6M) and a little magnetic stir bar. Then, the vial was tightly capped with a silicon septum and was pre-equilibrated for 15 min at 40 °C in a thermostatic bath. Afterward, the stainless steel needle, where the fiber is housed, was pushed through the vial septum, then the fiber was pushed out of the housing and exposed for 3 h at 40 °C to the headspace generated in the sample vial. After extraction, the fiber was pulled into the housing, and the SPME device was removed from the vial and inserted into the injection port of the GC for thermal desorption of the analytes at 270 °C for 1 min.

Gas-Chromatography Analysis. GC-FID. These analyses were performed with a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) and a olfactory detector. The injection was made in the splitless mode at 270 °C for 1 min, using an inlet liner of 0.75- μ m i.d. to minimize peak broadening. Chromatographic separations were performed using a Chrompack CP-WAX 57 CB (50-m \times 0.25-mm i.d., 0.2- μ m film thickness) fused silica capillary column with helium as carrier gas at a constant flow-rate of 1 mL/min. The initial oven temperature was 40 °C; after 10 min it was raised at 5 °C/min to 100 °C, then at 3 °C/min to 180 °C, and finally at 20 °C/min to 210 °C, which was held for 10 min. The temperature of the FID was set to 250 °C. The column used to verify the identity of the compounds was a HP-5 MS (30-m \times 0.25-mm i.d., 0.25- μ m film thickness) fused silica capillary column with helium as carrier gas at a constant flow-rate of 1 mL/min. The oven temperature was 40 °C; after 5 min, it was raised at 2 °C/min to 120 °C and then at 10 °C/min to 210 °C, which was held for 30 min.

GC-O Analyses. GCO was carried out using an olfactory detector commercialized by SGE International. This device has an outlet splitter system (ODO-1) that provides a continuously variable range of split ratios by a micro control valve (OSS-2). The split ratio used in the olfactometric analysis was 1:10 into the FID and into the sniffing port, respectively, using two deactivated and uncoated fused silica capillaries (40 cm \times 0.25 mm) as a transfer lines between the valve and the detectors. The olfactory detector also incorporates a heated transfer section from the GC oven to the glass detection cone that it maintains the unit at a temperature high enough to transfer the compounds to the detection cone without losses due to condensation. Moreover, the glass cone is purged with humidified air to prevent nasal mucous membranes from drying out over long periods and so maintains olfactory sensitivity.

The analyses were made under the analytical conditions described for the GC-FID analysis. Timing and description of aromas were recorded by two trained researchers (replaced at 15 min intervals) after sample extract injection. Each trained researcher analyzed each extract in duplicate using two different fibers to take into account the efficiency variability of SPME Stable Flex fibers.

A new approach of the AEDA technique was developed to estimate the sensory contribution of each odorant. It consists of carrying out successively dilutions of the Grenache wine sample (steps 1:4) with synthetic wine before the SPME.

To check the linear recovery of this new procedure, we prepared a model mixture by adding some compounds, in a concentration level similar to a real wine, to a synthetic wine solution. This model mixture, and also the successively dilutions (1:4) of it, were analyzed using the methodology developed.

GC-MS Analyses. GC-MS analyses were carried out using a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph coupled to an HP-5973 mass selective

Aroma Extract Dilution Analysis of Wine Aroma

J. Agric. Food Chem., Vol. 51, No. 27, 2003 7863

Table 2. FID Areas of Different Compounds Obtained from Different Coating Fibers

	PDMS	PA	DVB/CAR/PDMS
isobutanol	604	725	2692
isoamyl acetate	834	256	2705
isoamyl alcohol	6304	9548	33922
ethyl hexanoate	490	207	1942
hexanol	61	114	540
ethyl octanoate	3956	788	9141
linalool	13	2	31
ethyl decanoate	2314	658	4130
2-phenylethyl acetate	50	61	500
2-phenylethanol	1083	3008	9615
octanoic acid	1095	2921	901
decanoic acid	239	208	265
4-ethylphenol	15	17	676

detector. Separation was achieved under the same conditions described before, using the same columns as in the GC-FID and GC-O analyses to identify the odorant compounds using the retention time parameter. The mass spectrometer was operated in the electron impact ionization mode (70 eV). Interface, source, and quadrupole temperatures were 200 °C, 230 °C, and 150 °C, respectively. Mass range was from 35 to 300 amu.

Compound Identification. The odorants detected were identified by comparison with reference substances on the basis of the following criteria: odor quality as well as odor intensity perceived at the sniffing-port, mass spectra obtained, and retention index (RI) on two stationary phases of different polarity (CP-WAX 57CB and HP-5 MS). To calculate these RI values, we added a series of *n*-alkanes (from 6 to 26 carbon atoms) to a synthetic wine sample which was extracted by SPME and analyzed under the GC conditions aforementioned.

RESULTS AND DISCUSSION

1. HS-SPME. Comparison of Different Fiber Types. Three fiber coatings were compared for the extraction of the wine aroma volatiles: PDMS, PA, and DVB/CAR/PDMS. Microextractions were made at different time and temperature conditions. The results showed that, although PDMS (apolar coating) was more sensitive to esters than PA (polar coating) and PA was more sensitive to alcohols than PDMS, the best overall extraction efficiency was obtained when we used DVB/CAR/PDMS coating. This behavior can be seen in **Table 2**, where are shown the FID areas obtained in the analysis of 25 mL of sample into a vial of 50 mL for 2 h at 30 °C and with a NaCl concentration of 4M, with the three different coating fibers.

However, taking into account that the aim of this study was to extract the odorant compounds, we also checked which coating extracted most of these compounds. So, the extracts obtained by using the different kinds of coating fiber were also analyzed by GCO, and the results agreed with the first ones. The number of odorants detected with the PDMS and PA fibers were 21 and 22 respectively, whereas with the DVB/CAR/PDMS fiber, 38 odorants were detected. Therefore, the DVB/CAR/PDMS coating fiber was chosen as the most suitable for this study.

HS-SPME Parameter Optimization. In the optimization of the parameters influencing the extraction equilibria, we evaluated both the chromatographic areas of the compounds extracted (FID response) and the number and intensity of odorants extracted (GCO response).

The results showed that, in general, high ionic strength increased the extraction efficiency, so samples were saturated with NaCl to get a concentration of 6 M. On the other hand, we also verified that the volume of the sample vial and the ratio sample/headspace have an important influence on the extraction. The experiments made with vials of 100, 50, and 20 mL of sample with ratios of 1/1, 3/1 and 1/3 showed that the

Table 3. Linearity of the FID Response in Relation to the Sample Dilutions

	linear range	r^2
ethyl butyrate	2.5–160.0 µg/L	0.998
3-methyl-1-butanol	0.1–33.0 mg/L	0.990
ethyl hexanoate	0.4–110.0 µg/L	0.988
linalool	0.16–2.50 µg/L	0.993
β-damascenone	0.09–5.70 µg/L	0.982
2-phenylethanol	0.02–0.31 mg/L	0.998
4-ethylphenol	0.9–15.0 µg/L	0.999

efficiencies improved as the headspace decreased. However, repeatability worsened as the volumes increased. So, vials of 50 mL with 25 mL of sample were chosen as the best volume conditions.

With regard to time and temperature, it is well known that the extraction rate is strongly influenced by temperature, so both parameters were studied simultaneously (28). To determine the optimum values of these parameters, several experiments were carried out in a range from 10 to 40 °C and from 1 to 4 h. The results showed that when using shorter sampling times and lower temperatures, the chromatographic profiles were poorer. On the other hand, although times longer than 4 h and temperatures higher than 40 °C improved the extraction of compounds with low volatility, the overall extraction efficiency did not improve. Therefore, 3 h at 40 °C was chosen as the optimal condition, because although equilibrium was not totally reached, the response obtained was good enough. In fact, the signal (both chromatographic and olfactometric) of most of the target compounds only improved by 10–15% when equilibrium state was reached after 4 h.

2. SPME-GCO. Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA).

With the SPME technique, it is not possible to dilute the extract. So, to solve this problem, we successively diluted the Grenache wine samples. To ensure the linear recovery of the analytes with this new procedure, we carried out a study with a model mixture added with some selected compounds. In **Table 3** are shown the determination coefficients (r^2) of the calibration curves from the analyses of the model mixture dilutions by GC-FID. As can be observed, all of them were above 0.9. We checked that some compounds had a nonlinear behavior at high levels of concentration because of a saturation effect of the fiber. However, this fact did not affect the determination of the sensory contribution of each odorant with the method proposed, because the FID response at low concentrations was always linear.

In this way, it is possible to consider this procedure as a new concept of aroma extraction dilution analysis, and the flavor dilution factors (FD) of the odor active compounds can be determined, taking into account the last dilution in which the different odorous regions are detected. In fact, these FD values are totally analogous to the factor dilution value used in AEDA.

GC-O. The volatiles extracted by SPME from Grenache wine were analyzed by the new concept of AEDA, described above, to find the most potent odorants. As it is summarized in **Table 4**, the results yielded 38 odor active regions with important flavor dilution factors (ranging from 64 to 4096), which have been arranged following their retention indices (polar column). The compounds with highest FD factors (4096) are three esters (ethyl isobutyrate, ethyl 2-methylbutyrate, and ethyl valerate) and one alcohol (isoamyl alcohol), which give fruity and chemical notes. A second important group of components (FD of 1024) also consists of esters (ethyl isovalerate, ethyl hexanoate, ethyl cinnamate) and one alcohol (2-phenylethanol) but also of one ketone (β-damascenone), two phenols (guaiacol and ethylguaiacol), and one sulfur compound (3-mercapto-1-

Table 4. Main Odorants Found in Grenache Red Wine from Priorat (FD ≥ 64)

no.	RI polar	RI apolar	odor quality	FD	odorant	identification		
						MS	RI	odor
1	893		fruity, strawberry	256	unknown			
2	938	705	fruity, chemical	256	ethyl propanoate	a	x	x
3	960	739	strawberry	4096	ethyl isobutyrate	x	x	x
4	980	612	butter	256	diacetyl	a	x	x
5	1010		glue, chemical	64	unknown			
6	1033	802	fruity, strawberry	64	ethyl butyrate	x	x	x
7	1051	846	green apple	4096	ethyl 2-methylbutyrate	x	x	x
8	1069	851	fruity, berry	1024	ethyl isovalerate	x	x	x
9	1115		herbaceous, sulfurous	64	unknown			
10	1142	902	fruity	4096	ethyl valerate	x	x	x
11	1181		ripe fruit, chemical	256	unknown			
12	1229	710	chemical, harsh, stale	4096	isoamyl alcohol	x	x	x
13	1248	1001	fruity, green apple	1024	ethyl hexanoate	x	x	x
14	1311	983	mushroom	64	1-octen-3-one	b	x	x
15	1468	909	cooked potatoes	256	methional	x	x	x
16	1546	1100	flowery	256	linalool	x	x	x
17	1565	790	cheese	256	isobutyric acid	x	x	x
18	1690		geranium	64	unknown			
19	1694	869	blue cheese	256	isovaleric acid	x	x	x
20	1720		sweet, anise	64	unknown			
21	1739	978	cooked potatoes	64	methionol	x	x	x
22	1770		sweet, peach jam	64	unknown			
23	1795	1243	flowery, rose	64	ethyl phenylacetate	x	x	x
24	1825	1256	rose	64	2-phenylethyl acetate	x	x	x
25	1828		geranium	256	unknown			
26	1832	1380	peach jam, sweet	1024	β -damascenone	x	x	x
27	1871	1125	unpleasant	1024	3-mercapto-1-hexanol	b	x	x
28	1890	1088	smoky, chemical	1024	guaiaicol	x	x	x
29	1905	1347	ripe fruit, fruit jam, sweet	256	ethyl dihydrocinnamate	x	x	x
30	1941	1110	rose	1024	2-phenylethanol	x	x	x
31	2060	1276	smoky, spicy	1024	ethylguaicol	x	x	x
32	2071	1098	sweet, syrup	256	furanol	b	x	x
33	2112	1175	caramel	64	homoluraneol	b	x	x
34	2165	1464	fruity, sweet	1024	ethyl cinnamate	x	x	x
35	2173	1439	sweet, peach	64	γ -decalactone	x	x	x
36	2191	1356	spicy, clove	64	eugenol	x	x	x
37	2206	1178	stall, animal	256	4-ethylphenol	x	x	x
38	2239	1112	spicy, curry	256	sotolon	x	x	x

^a GC-MS identification not possible due to the solvent interference. ^b GC-MS identification not possible due to the low concentration of the target compound.

hexanol). This second group of compounds contributes to wine aroma with fruity, sweet, flowery, and smoky odors. Other compounds with significant FD values (256–64) are acids, sulfur compounds, terpenes, lactones, enolones, and phenols. Their aromatic properties are very different depending on each compound.

These results are very similar to those obtained by researchers who have used other extraction techniques. If we focus on Grenache wine, we should compare our results to those obtained by Ferreira et al. who carried out the most recent studies about this wine variety (6, 10, 13, 14). However, to make these comparisons, it has to be taken into account that the wines analyzed in those studies were from another AOC and the sample preparation and extraction techniques were also different to those used in the present study.

In a general way, these comparisons showed that, whichever it was the technique used, the odorant compounds extracted are almost the same ones and the differences lie in the perception of some of these compounds (different FD values). In fact, besides the compounds specified in Table 4, we identified other compounds in the AEDA with FD values below 64, which had important FD values in the studies made by Ferreira et al. These compounds are isoamyl acetate, butyric acid, acetic acid, octanoic acid, phenylacetic acid, γ -nonalactone, δ -decalactone, methyl anthranilate, 2,6-dimethoxyphenol and 4-vinylphenol. On the contrary, we have identified other compounds with important FD values in our study but with low FD, according to Ferreira et al. The compounds with this behavior are ethyl propanoate, ethyl 2-methylbutyrate, ethyl valerate, 1-octen-3-

one, methional, ethyl phenylethyl, 2-phenylethyl acetate, ethylguaiaicol, and eight compounds that we could not identify. The compound with RI 893 and with fruity odor has the same RI as the ethyl acetate, but its odor is different; however, this overlap of both chromatographic peaks made impossible its identification. The unknown with RI of 1181 could be an ethyl ester, because its MS spectrum showed the usual fragment ions of this kind of compounds and its fruity odor is also typical of this chemical family. From the unknown with RI 1720, we can suspect that it could be the same compound that Ferreira et al. have already found in their studies, because the odor descriptor and the RI are similar. Related to compounds with RI 1115, 1690 and 1828, taking into account their odor descriptions and that the fiber-coating used in this study has high affinity to sulfur compounds, it seems probable that they belong to this family of chemicals.

On the other hand, ethyl octanoate, hexanoic acid, 1-hexanol, and acetone are compounds that we identified by GC-MS, but although in other studies they gave important FD values, in our olfactometric analysis, we did not perceive them. However, from the odor threshold of these compounds (500 μ g/L, 8 mg/L, 8 mg/L and 150 mg/L, respectively), and their usual concentrations in wines (usually below the odor threshold values, except for ethyl octanoate (1, 9, 13)) it is obvious that depending on the extraction technique used they can be detected or not in the olfactometric analysis.

Another compound with a high FD value, according to other studies, was 2-methyl-3-furanthiol. The literature and our own experience in the analysis of sulfur compounds in wine aroma

Aroma Extract Dilution Analysis of Wine Aroma

(14, 20, 31) show that the best extraction of this family of chemicals is obtained by HS-SPME with fibers coated with Carboxen/polydimethylsiloxane. However, we could not find this compound in our wine, neither using our optimized SPME conditions nor using the SPME conditions established by other authors (14).

From these results, we can conclude that the Carboxen-polydimethylsiloxane-coated fiber is the most suitable for analyzing odor compounds, because its micropores retain smaller analytes (C3–C20) at trace levels better than other coating fibers do. Therefore, the HS-SPME technique is a good technique to obtain wine aroma extracts with a wide range of odorants and can be suitable for GCO, because it provides information about the composition of volatile fraction that will be perceived by the consumer when smelling wine. Furthermore, with the new approach of the AEDA presented here, it is possible to establish a hierarchy on the contribution of each compound to wine aroma. However, with GCO data themselves, is not possible to conclude anything about the contribution of the different constituents to the overall wine aroma. To achieve this, the application of aroma extract dilution analysis must be followed by quantitative analysis and calculation of odor activity values (OAVs). This is the present objective of our studies.

LITERATURE CITED

- (1) Etiévant, P. X. Wine. In *Volatile Compounds in Foods and Beverages*; Maarse, H., Ed.; Dekker Inc: New York, 1991; pp 483–546.
- (2) Maarse, H.; Vischer, C. A. *Volatile Compounds in Food. Alcoholic Beverages. Qualitative and Quantitative Data*, TNO-CIVO, Food Analysis Institute: Zeist, The Netherlands, 1989.
- (3) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. L'arôme des cépages. In *Traité d'Oenologie. Chimie du vin*, Dunod: Paris, France, 1998; Vol. 2, pp 239–259.
- (4) Darriet, P.; Lavigne, V.; Boïdron, J.; Dubourdieu, D. Characterisation de l'arome varietal des vins de Sauvignon par couplage chromatographique en phase gazeuse-odometrie. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 1991, 25, 167–174.
- (5) Guth, H. Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3022–3026.
- (6) 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.
- (7) Mayol, A. R.; Acree, T. E. Advances in Gas Chromatography-Olfactometry. In *Gas Chromatography-Olfactometry. The State of the Art*, Leland, J. V., Schieberle, P., Buettner, A., Acree, T. E., Eds.; ACS Symposium Series 782: Washington D.C., 2001; pp 1–10.
- (8) Aznar, M.; López, R.; Cacho, J. F.; Ferreira, V. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-Olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2924–2929.
- (9) Guth, H. Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3027–3032.
- (10) Ferreira, V.; Lopez, R.; Escudero, A.; Cacho, J. F. The aroma of Grenache red wine. Hierarchy and nature of its main odorants. *J. Sci. Food Agric.* 1998, 77, 259–267.
- (11) Guth, H.; Grosch, W. Evaluation of important odorants in foods by dilution techniques. *Flavor Chem.* 1999, 377–386.
- (12) 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.
- (13) Ferreira, V.; Lopez, 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.
- (14) Ferreira, V.; Ortin, N.; Escudero, A.; Lopez, R.; Cacho, J. F. Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination and sensory reconstitution studies. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4048–4054.
- (15) Moio, L.; Chambellant, E.; Lesschaevé, I.; Issanchou, S.; Schlich, P.; Etiévant, P. X. Production of representative wine extracts for chemical and olfactory analysis. *Ital. J. Food Sci.* 1995, 3, 265–278.
- (16) Blanch, G. P.; Reglero, G.; Herraiz, M. Rapid extraction of wine aroma compounds using a new simultaneous distillation solvent extraction device. *Food Chem.* 1996, 56 (4), 439–444.
- (17) Priser, C.; Etiévant, P. X.; Nicklaus, S.; Brun, O. Representative champagne wine extracts for gas chromatography-olfactometry analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3511–3514.
- (18) Ortega, M.; Gonzalez, M. L.; Beltran, S. Aroma composition of wine studied by different extraction methods. *Anal. Chim. Acta* 2002, 455 (1) 85–93.
- (19) Le Fur, Y.; Mercurio, V.; Moio, L.; Blanquet, J.; Meunier, J. M. A new approach to examine the relationships between sensory and gas chromatography-olfactometry data using generalized procrustes analysis applied to six French Chardonnay wines. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 443–452.
- (20) Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Simultaneous analysis of thiols, sulphides, and disulphides in wine aroma by HS-SPME-GC. *J. Chromatogr. A* 1999, 849, 293–297.
- (21) Whitton, R. S.; Zoecklein, B. W. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of wine aroma compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 2000, 51 (4) 379–382.
- (22) Bellavia, V.; Natangelo, M.; Fanelli, R.; Rotilio, D. Analysis of benzothiazole in Italian wines using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1239–1242.
- (23) Sala, C.; Mestres, M.; Marti, M. P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxy-pyrazines in wines. *J. Chromatogr. A* 2002, 953 (1–2), 1–6.
- (24) Martorell, N.; Marti, M. P.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Determination of 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol in red wines using HS-SPME-GC. *J. Chromatogr. A* 2002, 975, 349–354.
- (25) Rin, M.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and GC-ECD. *J. Chromatogr. A* 2002, 977, 1–8.
- (26) Rodríguez-Bencomo, J. J.; Conde, J. E.; Rodríguez-Delgado, M. A.; García-Montelongo, F.; Pérez-Trujillo, J. P. Determination of esters in dry and sweet white wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 2002, 963, 213–223.
- (27) Bonino, M.; Schellino, R.; Rizzi, C.; Aigotti, R.; Delfini, C.; Baiocchi, C. Aroma compounds of an Italian wine (Ruche) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS. *Food Chem.* 2003, 80 (1) 125–133.
- (28) Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A* 2000, 880, 35–62.
- (29) Pawliszyn, J. *Solid-Phase Microextraction. Theory and Practice*, Wiley-VCH Inc.: New York, 1997.
- (30) Rocha, S.; Ramalheira, V.; Barros, A.; Delgado, I.; Coimbra, M. A. Headspace solid-phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5142–5151.
- (31) Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Application of HS-SPME to the determination of sulphur compounds with low volatility in wines. *J. Chromatogr. A* 2002, 945, 211–219.

Received for review May 28, 2003. Revised manuscript received September 20, 2003. Accepted October 5, 2003. Financial support provided by Ministerio de Ciencia y Tecnología/INIA (project VIN00-045).

JF0345604

III.3 BIBLIOGRAFIA

- [1]. M. González, G. Reglero, M. Herraiz, M.D. Cabezudo. *El análisis íntegro de los vinos. I. Componentes volátiles mayoritarios*. Alimentación, Equipos y Tecnología, marzo-abril (1985) 131-135
- [2]. M. González, G. Reglero, M. Herraiz, M.D. Cabezudo. *El análisis íntegro de los vinos. II. Componentes volátiles minoritarios*. Alimentación, Equipos y Tecnología, septiembre-octubre (1985) 87-92
- [3]. G. Vernin. *Les composants volatils des arômes de vin et de jus de raisin*. Parfums, cosmétiques, arômes, 68 (1986) 83-93
- [4]. M.P. Romero, A. Casp, J.M. Carrasco. *Determinación de componentes volátiles en vinos*. Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment., 26 (1986) 338-348
- [5]. P.X. Etiévant. *Mise au point sur les techniques d'extraction et de séparation des constituants volatils du vin*. Connais. Vigne Vin, 21 (1987) 247-265
- [6]. G.P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz, J. Tabera. *A comparison of different extraction methods for the volatile components of grape juice*. J. Chromatogr. Sci., 29 (1991) 11-15
- [7]. S. Gianotti, R. Di Stefano. *Metodo per la determinazione dei composti volatili di fermentazione*. Enotecnico (1991) 61-64
- [8]. C.L. Arthur, J. Pawliszyn. *Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Anal. Chem., 62 (1990) 2145-2148
- [9]. C.L. Arthur, L.M. Killam, K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, J.R. Berg. *Automation and optimization of solid-phase microextraction*. Anal. Chem., 64 (1992) 1960-1966
- [10]. Z. Zhang, J. Pawliszyn. *Headspace solid-phase microextraction*. Anal. Chem., 65 (1993) 1843-1852
- [11]. H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn. *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*. J. Chromatogr. A, 880 (2000) 35-62
- [12]. J. Pawliszyn (ed). *Solid-phase microextraction: theory and practice*. Wiley-VCH Inc., New York (1997)
- [13]. Z. Zhang, M.J. Yang, J. Pawliszyn. *Solid-phase microextraction*. Anal. Chem., 66 (1994) 844A-852A
- [14]. Z. Zhang, J. Pawliszyn. *Quantitative extraction using an internally cooled solid phase microextraction device*. Anal. Chem., 67 (1995) 34-43
- [15]. H. Prosen, L. Zupancic-Kralj. *Solid-phase microextraction*. Trends Anal. Chem., 18 (1999) 272-282

- [16]. Y. Hayasaka, E.J. Bartowsky. *Analysis of diacetyl in wine using solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem., 47 (1999) 612-617
- [17]. N. Martorell, M.P. Martí, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. *Determination of 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol in red wines using HS-SPME-GC*. J. Chromatogr. A, 975 (2002) 349-354
- [18]. R. Castro-Mejias, R. Natera-Marin, M.V. Garcia-Moreno, C. Garcia-Barroso. *Optimisation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile phenols in wine*. J. Chromatogr. A, 995 (2003) 11-20
- [19]. M.C. Monje, C. Privat, V. Gastine, F. Nepveu. *Determination of ethylphenol in wine by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection*. Anal. Chim. Acta, 458 (2002) 111-117
- [20]. M. Mestres. *Anàlisi de compostos sofrats a l'aroma del vi*. Tesi Doctoral, Universitat Rovira i Virgili (2001)
- [21]. M. Mestres, C. Sala, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch. *Headspace solid-phase microextraction of sulphides and disulphides using carboxen-polydimethylsiloxane fibers in the analysis of wine aroma*. J. Chromatogr. A, 835 (1999) 137-144
- [22]. M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. *Simultaneous analysis of thiols, sulphides, and disulphides in wine aroma by HS-SPME-GC*. J. Chromatogr. A, 849 (1999) 293-297
- [23]. M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch. *Analysis of low-volatility organic sulphur compounds in wines by solid-phase microextraction and gas chromatography*. J. Chromatogr. A, 881 (2000) 583-590
- [24]. M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. *Application of headspace solid-phase microextraction to the determination of sulphur compounds with low volatility in wines*. J. Chromatogr. A 945 (2002) 211-219
- [25]. A.B. Majcenovic, R. Schneier, J.P. Lepoutre, V. Lempereur, R. Baumes. *Synthesis and stable isotope dilution assay of ethanethiol and diethyl disulfide in wine using solid-phase microextraction. Effect of aging on their levels in wine*. J. Agric. Food Chem., 50 (2002) 6653-6658
- [26]. M.A. Segurel, A.J. Razungles, C. Riou, M. Salles, R.L. Baumes. *Contribution of dimethyl sulfide to the aroma of Syrah and Grenache Noir wines and estimation of its potential in grapes of these varieties*. J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 7084-7093
- [27]. J.A. Vinson, J. Jinhee, Y. Jihong, Y. Dabbagh, L. Xiquan, M. Serry, J. Proch, C. Songhuai. *Headspace solid-phase microextraction for the analysis of dimethyl sulfide in beer*. J. Agric. Food Chem., 47 (1999) 2505-2508
- [28]. P.G. Hill, R. M. Smith. *Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection*. J. Chromatogr. A, 872 (2000) 203-213

- [29]. C. Fischer, U. Fischer. *Analysis of cork taint in wine and cork material at olfactory subthreshold levels by solid phase microextraction*. J. Agric. Food Chem., 45 (1997) 1995-1997
- [30]. M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. *Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and GC-ECD*. J. Chromatogr. A, 977 (2002) 1-8
- [31]. R. Alzaga, L. Ortiz, F. Sanchez-Baeza, M.P. Marco, J.M. Bayona. *Accurate determination of 2,4,6-trichloroanisole in wine at low parts per trillion by solid-phase microextraction followed by GC-ECD*. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 3509-3514
- [32]. A. Martínez-Urunuela, J.M. Gonzalez-Saiz, C. Pizarro. *Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine*. J. Chromatogr. A, 1056 (2004) 49-56
- [33]. A. Martínez-Urunuela, J.M. Gonzalez-Saiz, C. Pizarro. *Optimisation of the derivatisation reaction and subsequent headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chlorophenols in red wine*. J. Chromatogr. A, 1048 (2004) 141-151
- [34]. S. Insa, V. Salvado, E. Antico. *Development of solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples*. J. Chromatogr. A, 1047 (2004) 15-20
- [35]. H. H. Jelen, K. Wlazly, E. Wasowicz, E. Kaminski. *Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: comparison with static headspace method*. J. Agric. Food Chem., 46 (1998) 1469-1473
- [36]. J. Pino, M.P. Martí, M. Mestres, J. Pérez, O. Busto, J. Guasch. *Headspace solid-phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma*. J. Chromatogr. A, 954 (2002) 51-57
- [37]. E. Vianna, S.E. Ebeler. *Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem., 49 (2001) 589-595
- [38]. E. Vianna, S. Ebeler. *Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem., 49 (2001) 589-595
- [39]. S.J. Lee, D. Rathbone, S. Asimont, R. Adden, S.E. Ebeler. *Dynamic changes in ester formation during chardonnay juice fermentation with different yeast inoculation and initial brix conditions*. Am. J. Enol. Vitic., 55 (2004) 346-354
- [40]. B. Vallejo-Cordoba, A.F. Gonzalez-Cordova, M.C. Estrada-Montoya. *Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis*. J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 5567-5571
- [41]. C. Sala, M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch. *Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines*. J. Chromatogr. A, 953 (2002) 1-6

- [42]. C. Sala, O. Busto, J. Guasch, F. Zamora. *Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from Vitis vinifera variety Cabernet sauvignon*. J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 3492-3497
- [43]. D.J. Wampfler, G.S. Howell. *Simplified method for detection and quantification of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in wine*. Am. J. Enol. Vitic., 55 (2004) 276-278
- [44]. D. M. Chapman, J.H. Thorngate, M.A. Matthews, J.X. Guinard, S.E. Ebeler. *Yield effects on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine concentration in Cabernet sauvignon using a solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry method*. J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 5431-5435
- [45]. P.J. Hartmann, H.M. McNair, B.W. Zoecklein. *Measurement of 3-alkyl-2-methoxypyrazines by headspace solid-phase microextraction in spiked model wines*. Am. J. Enol. Vitic., 53 (2002) 285-288
- [46]. D. De la Calle, S. Magnaghi, M. Reichenbacher, K. Danzer. *Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction*. J. High Resol. Chromatogr., 19 (1996) 257-262
- [47]. D. De la Calle, M. Reichenbacher, K. Danzer, C. Hurlbeck, C. Bartsch, K.H. Feller. *Use of solid-phase microextraction-capillary-gas chromatography (SPME-CGC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods*. Fresenius J. Anal. Chem., 360 (1998) 784-787
- [48]. J.S. Camara, P. Herbert, J.C. Marques, M.A. Alves. *Varietal flavour compounds of four grape varieties producing Madeira wines*. Anal. Chim. Acta, 513 (2004) 203-207
- [49]. M. Steinhaus, H.T. Fritsche, P. Schieberle. *Quantitation of (R)- and (S)-linalool in beer using solid phase microextraction (SPME) in combination with a stable isotope dilution assay (SIDA)*. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 7100-7105
- [50]. P. Vesely, L. Lusk, G. Basarova, J. Seabrooks, D. Ryder. *Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 6941-6944
- [51]. W. Wardencki, P. Sowinski, J. Curylo. *Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages*. J. Chromatogr. A, 984 (2003) 89-96
- [52]. D. De la Calle, M. Reichenbacher, K. Danzer, C. Hurlbeck, C. Bartsch, K.H. Feller. *Investigations on wine bouquet components by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography (SPME-CGC) using different fibers*. J. High Resol. Chromatogr., 20 (1997) 665-668
- [53]. G.Y. Vas, K. Koteleky, M. Farkas, A. Dobó, K. Vékey. *Fast screening method for wine headspace compounds using solid-phase microextraction (SPME) and capillary GC technique*. Am. J. Enol. Vitic., 49 (1998) 100-104

- [54]. D. De la Calle, M. Reichenbächer, K. Danzer, C. Hurlbeck, C. Bartzsch, K.H. Feller. *Analysis of wine bouquet components using headspace solid-phase microextraction-capillary gas chromatography*. J. High Resol. Chromatogr., 21 (1998) 373-377
- [55]. R.S. Whiton, B.W. Zoecklein. *Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of wine aroma compounds*. Am. J. Enol. Vitic., 51 (2000) 379-382
- [56]. M.A. Pozo-Bayón, E. Pueyo, P.J. Martín-Álvarez, M.C. Polo. *Polydimethylsiloxane solid-phase microextraction-gas chromatography method for the analysis of volatile compounds in wines. Its application to the characterization of varietal wines*. J. Chromatogr. A, 922 (2001) 267-275
- [57]. S. Rocha, V. Ramalheira, A. Barros, I. Delgadillo, M.A. Coimbra. *Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model*. J. Agric. Food Chem., 49 (2001) 5142-5151
- [58]. M.P. Martí, M. Mestres, C. Sala, O. Busto, J. Guasch. *Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma*. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 7861-7865
- [59]. S. Cabredo-Pinillos, T. Cedron-Fernandez, A. Parra-Manzanares, C. Saenz-Barrio. *Determination of volatile compounds in wine by automated solid-phase microextraction and gas chromatography*. Chromatographia, 59 (2004) 733-738
- [60]. G. Vas, I. Blechschmidt, T. Kovacs, K. Vekey. *Examination of aroma production kinetics of different commercial wine yeasts in fermenting Muscat Ottonel wines with the help of SPME headspace sampling and fast GC analysis*. Acta Alimentaria, 28 (1999) 133-140
- [61]. A.C. Silva Ferreira, P. Guedes de Pinho. *Analytical method for determination of some aroma compounds on white wines by solid phase microextraction and gas chromatography*. J. Food Sci., 68 (2003) 2817-2820
- [62]. J.J. Rodriguez-Bencomo, J.E. Conde, F. Garcia-Montelongo, J.P. Perez-Trujillo. *Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography*. J. Chromatogr. A, 991 (2003) 13-22
- [63]. M. Bonino, R. Schellino, C. Rizzi, R. Aigotti, C. Delfini, C. Baiocchi. *Aroma compounds of an Italian wine (Ruche) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS*. Food Chem., 80 (2003) 125-133
- [64]. E. Marengo, M. Aceto, V. Maurino. *Classification of Nebbiolo-based wines from Piedmont (Italy) by means of solid-phase microextraction-gas-chromatography-mass spectrometry of volatile compounds*. J. Chromatogr. A, 943 (2002) 123-137

- [65]. T.E. Siebert, H.E. Smyth, D.L. Capone, C. Neuwohner, K.H. Pardon, G.K. Skouroumounis, M. Herderich, M.A. Sefton, A.P. Pollnitz. *Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS*. Anal. Bioanal. Chem., 381 (2005) 937-947
- [66]. R. Castro, R. Natera, P. Benitez, C.G. Barroso. *Comparative analysis of volatile compounds of "fino" sherry wine by rotatori and continuous liquid-liquid extraction and solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography-mass spectrometry*. Anal. Chim. Acta, 513 (2004) 141-150
- [67]. K.K. Ganic, M. Staver, D. Persuric, M. Banovic, D. Komes, L. Gracin. *Influence of blending on the aroma of Malvasia istriana wine*. Food Tech. Biotech., 41 (2003) 305-314
- [68]. J.C.R. Demyttenaere, P. Sandra, S. Kallithraka, R. Verhe, N. De Kimpe. *Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 985 (2003) 233-246
- [69]. S. Francioli, M. Guerra, E. López-Tamames, J.M. Guadayo, J. Caixach. *Aroma of sparkling wines by headspace-solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Am. J. Enol. Vitic., 50 (1999) 404-408
- [70]. S. Francioli, J. Torrens, M. Riu-Aumatell, E. Lopes-Tamames, S. Buxaderas. *Volatile compounds by SPME-GC as age markers of sparkling wines*. Am. J. Enol. Vitic., 54 (2003) 158-162
- [71]. S.E. Ebeler, M.B. Terrien, C. E. Butzke. *Analysis of brandy aroma by solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction*. J. Sci. Food Agric., 80 (2000) 625-630
- [72]. V.A. Watts, C.E. Butzke, R.B. Boulton. *Study of aged cognac using solid-phase microextraction and partial least-squares regression*. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 7738-7742
- [73]. L.K. Ng, M. Hupé, J. Harnois, D. Moccia. *Characterisation of commercial vodkas by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis*. J. Sci. Food Agric., 70 (1996) 380-388
- [74]. J.C.R. Demyttenaere, J.I.S. Martinez, R. Verhe, P. Sandra, N. De Kimpe. *Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction*. J. Chromatogr. A, 985 (2003) 221-232
- [75]. V.A. Watts, C.E. Butzke. *Analysis of microvolatiles in brandy: relationship between methylketone concentration and Cognac age*. J. Sci. Food Agric., 83 (2003) 1143-1149
- [76]. A. Bertrand, P. Guedes de Pinho, A. Anocibar Beloqui. *Les constituants organiques majoritaires du vin, les constituants volatils: teneurs trouvees, exemples d'analyses*. Office International de la Vigne et du Vin, FV 971 (1994)
- [77]. R. Boqué, F.X. Rius, D.L. Massart. *Straight line calibration. Something more than slopes, intercepts and correlation coefficients*. J. Chem. Educ., 70 (1994) 230-232

- [78]. G.H. Fuller, R. Steltenkamp, G.A. Tisserand. *The gas chromatograph with human sensor: perfumer model*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 116 (1964) 711-724
- [79]. A. Dravnieks, O'Donnell. *Principles and some techniques of high resolution headspace analysis*. J. Agric. Food Chem., 19 (1971) 1049-1056
- [80]. W. Grosch. *Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis*. Trends Food Sci. Technol., 4 (1993) 68-73
- [81]. T.E. Acree. *GC/Olfactometry*. Anal. Chem., 69 (1997) 170A-175A
- [82]. I. Blank. *Gas chromatography-olfactometry in food aroma analysis*. En: R. Marsili (ed.) *Techniques for analyzing food aroma*. Marcel Dekker Inc., New York (1997) 293-331
- [83]. B.S. Mistry, T. Reineccius, L.K. Olson. *Gas chromatography-olfactometry for the determination of key odorants in foods*. En: R. Marsili (ed.) *Techniques for analyzing food aroma*. Marcel Dekker Inc., New York (1997) 265-292
- [84]. S.M. van Ruth. *Methods for gas chromatography-olfactometry: a review*. Biomolecular Engineering, 17 (2001) 121-128
- [85]. V. Ferreira, R. López, M. Aznar. *Olfactometry and aroma extract dilution analysis of wines*. En: J.F. Jackson, H.F. Linskens (eds.) *Analysis of taste and aroma*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2002) 89-122
- [86]. S.J. Lee. *Finding key odorants in foods: gas chromatography olfactometry (GC/O)*. Food Sci. Biotechnol., 12 (2003) 597-602
- [87]. M. Rothe, B. Thomas. *Aromastoffe des Brotes*. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 119 (1963) 302-310
- [88]. T.E. Acree, J. Barnard, D.G. Cunningham. *A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents*. Food Chem., 14 (1984) 273-286
- [89]. F. Ullrich, W. Grosch. *Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during auto-oxidation of linoleic acid*. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 184 (1987) 277-282
- [90]. P. Schieberle, W. Grosch. *Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis*. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 185 (1987) 111-113
- [91]. R. Kerscher, W. Grosch. *Comparative evaluation of potent odorants of boiled beef by aroma extract dilution and concentration analysis*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, 204 (1997) 3-6
- [92]. H. Guth, W. Grosch. *Identification of potent odorants in static headspace samples of green and black tea powders on the basis of aroma extract dilution analysis (AEDA)*. Flavour Fragrance J., 8 (1993) 173-178
- [93]. K.D. Deibler, L.H. Lavin, T.E. Acree. *Solid phase microextraction for dilution analysis based gas chromatography/olfactometry*. J. Agric. Food Chem., 4 (1999) 1616-1618

- [94]. W. Grosch. *Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs)*. *Flavour Fragrance J.*, 9 (1994) 147-158
- [95]. M.R. McDaniel, R. Miranda-López, B.T. Watson, N.J. Micheals, L.M. Libbey. *Pinot noir aroma: a sensory/gas chromatographic approach*. En: G. Charalambous (ed.) *Flavors and off-flavors*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1990) 23-36
- [96]. M. da Silva, D.S. Lundahl, M.R. McDaniel. *The capability and psychophysics of Osme: a new GC-olfactometry technique*. En: H. Maarse, D.G. van der Heij (eds.) *Trends in Flavour Research*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1994) 191-209
- [97]. R. Miranda-López, L.M. Libbey, B.T. Watson, M.R. McDaniel. *Odor analysis of Pinot noir grapes of different maturities by a gas chromatography-olfactometry technique (Osme)*. *J. Food Sci.*, 57 (1992) 985-993
- [98]. P.X. Etievant, G. Callement, D. Langlois, S. Issanchou, N. Coquibus. *Odor intensity evaluation in gas chromatography-olfactometry by finger span method*. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) 1673-1680
- [99]. H. Guichard, E. Guichard, D. Langlois, S. Issanchou, N. Abbott. *GC sniffing analysis: olfactive intensity measurement by two methods*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 201 (1995) 344-350
- [100]. P.X. Etiévant. *Odour intensity evaluation in GC-olfactometry by finger span method*. En: J.F. Jackson, H.F. Linskens (eds.) *Analysis of taste and aroma*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2002) 223-237
- [101]. S.M. van Ruth, C.H. O'Connor. *Evaluation of three gas chromatography-olfactometry methods: comparison of odour intensity-concentration relationships of eight volatile compounds with sensory headspace data*. *Food Chem.*, 74 (2001) 341-347
- [102]. V. Ferreira, J. Peřka, M. Aznar, J. Cacho. *Quantitative gas chromatography-olfactometry. Analytical characteristics of a panel of judges using a simple quantitative scale as gas chromatography detector*. *J. Chromatogr. A*, 1002 (2003) 169-178
- [103]. S.M. Van Ruth, J.P. Roozen. *Gas chromatography/sniffing port analysis and sensory evaluation of commercially dried bell peppers (Capsicum annuum) after rehydration*. *Food Chem.*, 51 (1994) 165-170
- [104]. P. Pollien, A. Ott, F. Montigon, M. Baumgartner, R. Muñoz-Box, A. Chaintreau. *Hyphenated headspace-gas chromatography-sniffing technique: screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons*. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 2630-2637
- [105]. A. Chaintreau. *Quantitative use of gas chromatography-olfactometry: the GC-"SNIF" method*. En: R. Marsili (ed.) *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel (2002) 333-348
- [106]. P. Pollien, L.B. Fay, M. Baumgartner, A. Chaintreau. *First attempt of odorant quantitation using gas chromatography-olfactometry*. *Anal. Chem.*, 71 (1999) 5391-5397

- [107]. D. Roberts, T.E. Acree. *Simulation of retronasal aroma using a modified headspace technique: investigating the effects of saliva, temperature, shearing and oil on flavor release*. J. Agric. Food Chem., 43 (1995) 2179-2186
- [108]. D.J. Stern, D. Guadagni, K.L. Stevens. *Aging of wine: qualitative changes in the volatiles of zinfandel wine during two years*. Am. J. Enol. Vitic., 26 (1975) 208-213
- [109]. R.R. Nelson, T.E. Acree. *Concord wine composition as affected by maturity and processing technique*. Am. J. Enol. Vitic., 29 (1978) 83-86
- [110]. A. Rapp, W. Knipser, L. Engel, H. Ullemeyer, W. Heimann. *Fremdkomponenten im aromam von trauben und weinen interspezifischer rebsorten I. Die Erdbeernote*. Vitis, 19 (1980) 13-23
- [111]. R.W. Slingsby, R.E. Kepner, C.J. Muller, A.D. Webb. *Some volatile components of Vitis vinifera variety Cabernet sauvignon wine*. Am. J. Enol. Vitic., 31 (1980) 360-363
- [112]. O.P.H. Augustyn, A. Rapp, C.J. Van Wyk. *Some volatile aroma components of Vitis vinifera L. Cv. Sauvignon blanc*. S. Afr. J. Enol. Vitic., 3 (1982) 53-60
- [113]. W.J. Criddle, R.W. Goswell, M.A. Williams. *The chemistry of Sherry maturation. An investigation of the volatile components present in standard Sherry base wine*. Am. J. Enol. Vitic., 34 (1983) 61-71
- [114]. P.X. Etiévant, S.N. Issanchou, C.L. Bayonove. *The flavour of Muscat wine: the sensory contribution of some volatile compounds*. J. Sci. Food Agric., 34 (1983) 497-504
- [115]. R.F. Simpson, G.C. Miller. *Aroma composition of Chardonnay wine*. Vitis, 23 (1984) 143-158
- [116]. R. Baumes, R. Cordonnier, S. Nitz, F. Drawert. *Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars*. J. Sci. Food Agric., 37 (1986) 927-943
- [117]. T.E. Acree. E.H. Lavin. *o-Aminoacetophenone, the "foxy" smelling component of Labruscana grapes*. En: Y. Bessière, A.F. Thomas (eds.) Flavor science and technology. Wiley, New York (1990) 49-52
- [118]. M.R. McDaniel, R. Miranda-López, B.T. Watson, N.J. Micheals, L.M. Libbey. *Pinot noir aroma: a sensory/gas chromatographic approach*. En: G. Charalambous (ed.) Flavors and off-flavors'89. Elsevier, Amsterdam (1990) 23-26
- [119]. H. Guth. *Identification of character impact odorants of different white wine varieties*. J. Agric. Food Chem., 45 (1997) 3022-3026
- [120]. H. Guth. *Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties*. J. Agric. Food Chem., 45 (1997) 3027-3032
- [121]. V. Ferreira, N. Ortín, A. Escudero, R. López, J. Cacho. *Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies*. J. Agric. Food Chem., 50 (2002) 4048-4054

- [122]. A. Escudero, B. Gogorza, M.A. Menús, N. Ortín, J. Cacho, V. Ferreira. *Characterization of the aroma of a wine from Macabeo. Key role placed by compounds with low odor activity values.* J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 3516-3524
- [123]. T. Serot, C. Prost, L. Visan, M. Burcea. *Identification of the main odor-active compounds in musts from french and romanian hybrids by three olfactometric methods.* J. Agric. Food Chem., 49 (2001) 1909-1914
- [124]. C. Bernet, N. Dirninger, P. Claudel, P. Etiévant, A. Schaeffer. *Application of finger span cross modality matching method (FSCM) by naïve assessors for olfactometric discrimination of Gewürztraminer wines.* Lebensm.-Wiss. U.-Technol., 35 (2002) 244-253
- [125]. P. Darriet, T. Tominaga, V. Lavigne, J.N. Boidron, D. Dubordieu. *Identification of a powerful aromatic component of Vitis vinifera L. var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one.* Flavour Fragrance J., 10 (1995) 385-392
- [126]. A. Escudero, P. Hernández-Orte, J. Cacho, V. Ferreira. *Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines.* J. Agric. Food Chem., 48 (2000) 4268-4272
- [127]. P. Darriet, M. Pons, S. Lamy, D. Dubordieu. *Identification and quantification of geosmin, and earthy odorant contaminating wines.* J. Agric. Food Chem., 48 (2000) 4835-4838
- [128]. F.S.S. Rogerson, Z. Azavedo, N. Fortunato, V.A.P. de Freitas. *1,3-Dimethoxybenzene, a newly identified component of port wine.* J. Sci. Food Agric., 82 (2002) 1287-1292
- [129]. A. Buettner. *Investigation of potent odorants and afterodor development in two Chardonnay wines using the Buccal Odor Screening System (BOSS).* J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 2339-2346
- [130]. M.G. Chisholm, J.M. Samuels. *Determination of the impact of the metabolites of sorbic acid on the odor of a spoiled red wine.* J. Agric. Food Chem., 40 (1992) 630-633
- [131]. L. Moio, P. Schlich, P. Etiévant. *Acquisition et analyse d'aromagrammes de vins de Bourgogne issus du cépage Chardonnay.* Sci. Aliment., 14 (1994) 601-608
- [132]. P. Schlich, L. Moio. *Corrélation entre les profils aromatiques et les aromagrammes de vins de Bourgogne issus de cépage Chardonnay.* Sci. Aliment., 14 (1994) 609-615
- [133]. M.G. Chisholm, L.A. Guiher, T.M. Vonah, J.L. Beaumont. *Comparison of some french-american hybrid wines with white Riesling using gas chromatography-olfactometry.* Am. J. Enol. Vitic., 45 (1994) 201-212
- [134]. M.G. Chisholm, L.A. Guiher, S. Zaczekiewicz. *Aroma Characteristics of aged Vidal blanc wine.* Am. J. Enol. Vitic., 46 (1995) 56-62
- [135]. L. Moio, P.X. Etiévant. *Ethyl anthranilate, ethyl cinnamate, 2,3-dihydrocinnamate, and methyl anthranilate: four important odorants identified in Pinot noir wines of Burgundy.* Am. J. Enol. Vitic., 46 (1995) 392-398

- [136]. L. Moio, E. Chambellant, I. Lesschaeve, S. Issanchou, P. Schlich, P.X. Etiévant. *Production of representative wine extracts for chemical and olfactory analysis*. Ital. J. Food Sci., 3 (1995) 265-278
- [137]. K. Hashizume, T. Samuta. *Green odorants of grape cluster stem and their ability to cause a wine stemmy flavor*. J. Agric. Food Chem., 45 (1997) 1333-1337
- [138]. H.H. Baek, K.R. Cadwallader, E. Marroquin, J.L. Silva. *Identification of predominant aroma compounds in muscadine grape juice*. J. Food Sci., 62 (1997) 249-252
- [139]. P. Guedes de Pinho, A. Anocibar Beloqui, A. Bertrand. *Détection d'un composé soufré responsable de l'arôme typique de vins issus de certains cépages non Vitis vinifera*. Sci. Aliments, 17 (1997) 341-348
- [140]. C. Priser, P.X. Etiévant, S. Nicklaus, O. Brun. *Representative champagne wine extracts for gas chromatography olfactometry analysis*. J. Agric. Food Chem., 45 (1997) 3511-3514
- [141]. V. Ferreira, R. López, A. Escudero, J.F. Cacho. *The aroma of Grenache red wine: hierarchy and nature of its main odorants*. J. Sci. Food Agric., 77 (1998) 259-267
- [142]. R. Schneider, R. Baumes, C. Bayonove, A. Razungles. *Volatile compounds involved in the aroma of sweet fortified wines (vins doux naturels) from Grenache noir*. J. Agric. Food Chem., 46 (1998) 3230-3237
- [143]. P. Bouchilloux, P. Darriet, D. Dubourdieu. *Identification d'un thiol fortement odorant, le 2-méthyl-3-furanthiol, dans les vins*. Vitis, 37 (1998) 177-180
- [144]. V. Ferreira, M. Ardanuy, R. López, J.F. Cacho. *Relationship between flavor dilution values and odor unit values in hydroalcoholic solutions: role of volatility and a practical rule for its estimation*. J. Agric. Food Chem., 46 (1998) 4341-4346
- [145]. P.K.C. Ong, T.E. Acree. *Similarities in the aroma chemistry of Gewürztraminer variety wines and Lychee (Litchi chinesis Sonn.) fruit*. J. Agric. Food Chem., 47 (1999) 665-670
- [146]. R. López, V. Ferreira, P. Hernández, J.F. Cacho. *Identification of impact odorants of young red wines with Merlot, Cabernet sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study*. J. Sci. Food Agric., 79 (1999) 1461-1467
- [147]. A. Escudero, P. Etiévant. *Effect of antioxidants on the flavor characteristics and the gas chromatography/olfactometry profiles of champagne extracts*. J. Agric. Food Chem., 47 (1999) 3303-3308
- [148]. M. Charles, B. Martin, C. Ginies, P. Etiévant, G. Coste, E. Guichard. *Potent aroma compounds of two red wine vinegars*. J. Agric. Food Chem., 48 (2000) 70-77
- [149]. Y. Kotseridis, R. Baumes. *Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine*. J. Agric. Food Chem., 48 (2000) 400-406

- [150]. A. Escudero, J. Cacho, V. Ferreira. *Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study*. Eur. Food Res. Technol., 211 (2000) 105-110
- [151]. M. Aznar, R. López, J.F. Cacho, V. Ferreira. *Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions*. J. Agric. Food Chem., 49 (2001) 2924-2929
- [152]. V. Ferreira, M. Aznar, R. López, J. Cacho. *Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality spanish aged red wines*. J. Agric. Food Chem., 49 (2001) 4818-4824
- [153]. F.S.S. Rogerson, H. Castro, N. Fortunato, Z. Azavedo, A. Macedo, V.A.P. De Freitas. *Chemicals with sweet aroma descriptors found in portuguese wines from the Douro region: 2,6,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione and diacetyl*. J. Agric. Food Chem., 49 (2001) 263-269
- [154]. A.C. Silva Ferreira, P. Guedes de Pinho, P. Rodrigues, T. Hogg. *Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters*. J. Agric. Food Chem., 50 (2002) 5919-5924
- [155]. M. Cliff, D. Yuksel, B. Girard, M. King. *Characterization of canadian ice wines by sensory and compositional analyses*. Am. J. Enol. Vitic., 53 (2002) 46-53
- [156]. Y. Le Fur, V. Mercurio, L. Moio, J. Blanquet, J.M. Meunier. *A new approach to examine the relationships between sensory and gas chromatography-olfactometry data using generalized procrustes analysis applied to six french Chardonnay wines*. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 443-452
- [157]. A.C. Silva Ferreira, T. Hogg, P. Guedes de Pinho. *Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines*. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 1377-1381
- [158]. R. López, N. Ortín, J.P. Pérez-Trujillo, J. Cacho, V. Ferreira. *Impact odorants of different young white wines from the Canary islands*. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 3419-3425
- [159]. L. Culleré, A. Escudero, J. Cacho, V. Ferreira. *Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines*. J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 1653-1660
- [160]. R. López, E. Ezpeleta, I. Sánchez, J. Cacho, V. Ferreira. *Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry*. Food Chem., 88 (2004) 95-103
- [161]. S. Selli, T. Cabaroglu, A. Canbas, H. Erten, C. Nurgel, J.P. Lepoutre, Z. Gunata. *Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karast grown in central Anatolia*. Food Chem., 85 (2004) 207-213

- [162]. V. Ferreira, L. Ortega, A. Escudero, J.F. Cacho. *A comparative study of the ability of different solvents and adsorbents to extract aroma compounds from alcoholic beverages*. J. Chromatogr. Sci., 38 (2000) 469-476
- [163]. C. Bernet, N. Dirniger, P. Etiévant, A. Schaeffer. *Évaluation de la représentativité aromatique d'extraits de vins de Gewurztraminer*. Sci. Aliments, 19 (1999) 701-709
- [164]. A.C. Noble, R.A. Arnold, J. Buechsenstein, E.J. Leach, J.O. Schmidt, P.M. Stern. *Modification of a standardized system of wine aroma terminology*. Am. J. Enol. Vitic., 38 (1987) 143-146
- [165]. V. Ferreira, R. López, J.F. Cacho. *Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties*. J. Sci. Food Agric., 80 (2000) 1659-1667
- [166]. T. Tominaga, M.L. Murat, D. Dubordieu. *Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from Vitis vinifera L. Cv. Sauvignon Blanc*. J. Agric. Food Chem., 46 (1998) 1044-1048
- [167]. B. Martin, P. X. Etiévant, J.L. Le Quéré, P. Schlich. *More clues about sensory impact of sotolon in some flor sherry wines*. J. Agric. Food Chem., 40 (1992) 475-478

CAPÍTOL IV

Anàlisi de l'aroma mitjançant el nas electrònic

Les tècniques cromatogràfiques permeten obtenir un coneixement a fons de la composició de l'aroma del vi, tant qualitativament com quantitativa. A més, tal com s'ha mostrat en el capítol anterior, la utilització del nas humà com a detector cromatogràfic permet investigar quins són els compostos responsables de l'aroma i determinar el complex perfil aromàtic del vi. No obstant això, tot i els avenços que hi ha hagut en aquest camp, és difícil encara contrastar els resultats d'una anàlisi sensorial amb la informació obtinguda amb la GCO, ja que aquesta última està lluny encara de poder interpretar les percepcions que es reben durant la degustació i que, en definitiva, són les que es tindran en compte a l'hora d'avaluar la qualitat del producte.

És per aquest motiu que l'anàlisi sensorial és la tècnica més utilitzada en la indústria per a l'avaluació de la qualitat aromàtica dels seus productes. Tanmateix, el disposar d'un conjunt de persones entrenades que tan sols poden analitzar un nombre limitat de mostres cada dia, suposa un problema per a moltes empreses. A més, la subjectivitat del tastador a l'hora de determinar les olors i els seus canvis de sensibilitat a causa de l'edat, de la fatiga, dels refredats, de l'estat emocional, etc. poden afectar de manera important al resultat de les anàlisis. Tota aquesta problemàtica va ser la causa de que, a començaments dels anys 80, s'iniciés una important recerca en el desenvolupament d'un instrument que pogués imitar el sentit de l'olfacte i que proporcionés, de manera ràpida i objectiva, informació sensorial de les mostres (similituds i diferències entre l'aroma de diferents mostres, presència de defectes aromàtics, etc.). El resultat d'aquesta recerca, que encara continua activa avui en dia, són els anomenats "nassos electrònics".

Són nombroses les empreses de sectors com la cosmètica, la perfumeria, la química, l'automòbil, etc. que ja han incorporat nassos electrònics per al control de qualitat dels seus productes i/o de les matèries primeres. Però, sens dubte, la indústria que ofereix un major potencial en l'aplicació d'aquest instrument és l'agroalimentària.

En aquesta, a part del control de la qualitat de les matèries primeres i dels productes acabats, el nas electrònic es pot utilitzar en la monitorització dels processos de fabricació (cuinat, fornejat, torrat, fermentació, etc.), de curació (en pernils i embotits) i maduració (en formatge i vins). També es pot utilitzar per a determinar l'autenticitat de l'origen d'alguns productes (olis vegetals, vi), per avaluar l'estat de conservació (peix, carn, grasses, vegetals crus), el grau de maduresa (fruita) o la interacció entre el producte i el seu embalatge.

Tot i les nombroses aplicacions que s'han dut a terme ja en el camp dels aliments [1-6], en el moment en què es va plantejar la present tesi doctoral, a la bibliografia es van trobar tan sols unes poques aplicacions d'aquesta tècnica a l'anàlisi de vins [7-9] i que, a més, no presentaven uns resultats massa exitosos. Aquest fet era perquè l'elevat contingut d'etanol que conté el vi saturava els sensors de gasos dels quals està compost el sistema de detecció d'aquests instruments. La recent aparició al mercat d'un nou tipus de nas electrònic que es basava en la tecnologia de l'espectrometria de masses enlloc de la de sensors de gasos, ens va fer pensar en la possibilitat d'aplicar-lo a l'anàlisi de vi, ja que l'espectrometria de masses en si era una tècnica prou consolidada i molt utilitzada com a detector cromatogràfic en l'anàlisi de la seva aroma [10].

En aquest capítol es presenten els resultats de la recerca duta a terme en l'aplicació d'un nas electrònic basat en l'espectrometria de masses a l'anàlisi de vins i d'aiguardents de canya de sucre. En el cas del vi, la tècnica s'ha aplicat a la diferenciació i classificació de vins segons diversos paràmetres d'interès enològic com són la varietat, l'origen i el temps d'envelliment, així com també al seguiment i control dels processos de maduració del raïm i vinificació. Una altra aplicació de caire diferent ha estat la determinació ràpida del 2,4,6-tricloroanisole, el principal compost responsable del defecte aromàtic conegut com a "gust de suro" que actualment preocupa molt al sector enològic. En el cas dels aiguardents de canya de sucre, la tècnica s'ha aplicat a la determinació del temps d'envelliment d'aquest

producte en bótes de roure, així com també s'ha estudiat el seu potencial en realitzar la mateixa tasca que un panel de tastadors, és a dir, en imitar al sistema olfactiv humà en l'anàlisi sensorial de les mostres.

L'experimentació realitzada en aquests estudis ha donat lloc a diverses publicacions en revistes científiques, cadascuna de les quals s'inclou a l'apartat corresponent d'aquest capítol.

IV.1 EL NAS ELECTRÒNIC

Definir què és un nas electrònic no és una tasca gens fàcil a causa de la varietat d'instruments que es poden englobar dins d'aquest terme. L'any 1994, Gardner i Bartlett [11] van definir-lo com "un instrument dotat d'un conjunt de sensors químics amb especificitat parcial i d'un programa quimiomètric de reconeixement de models, que és capaç de reconèixer olors individuals o complexes". La seva finalitat, doncs, no és conèixer quins compostos químics integren l'aroma d'una determinada substància i en quines quantitats s'hi troben sinó, de manera similar a com actua el sistema olfactiu humà, obtenir informació qualitativa que permeti reconèixer l'aroma i classificar-la.

Pel fet que el disseny d'aquests instruments es va basar en el funcionament del sentit de l'olfacte, existeix un paral·lelisme entre el nas electrònic i el nas humà, el qual es mostra a la figura IV.1.

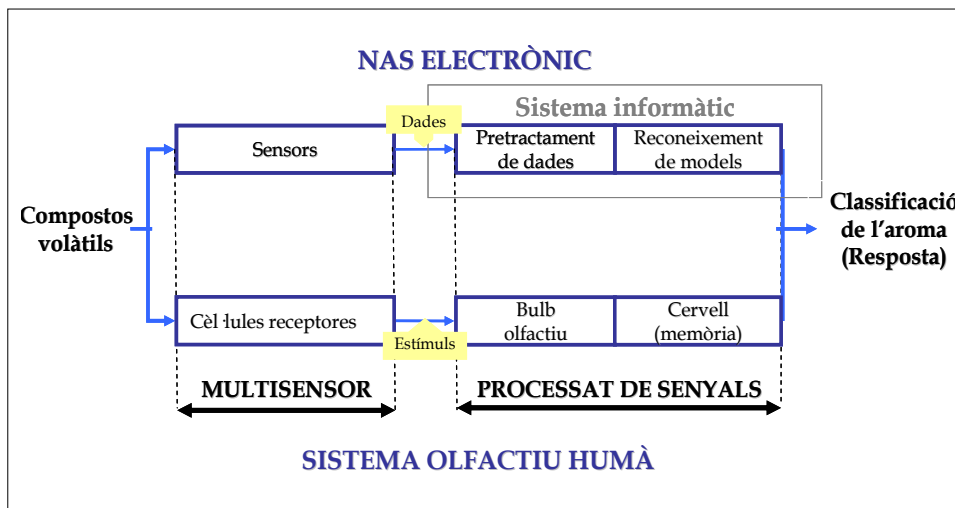


Figura IV.1. Paral·lelisme entre el sistema olfactiu humà i el nas electrònic.

Tal i com s'ha explicat en el capítol II, quan olorem una substància, les molècules volàtils arriben fins a les fosses nasals on té lloc la seva interacció amb les cèl·lules receptores, les quals tenen especificitats parcialment solapades, és a dir, cada cèl·lula receptora és sensible a un ampli ventall de molècules oloroses. Els senyals produïts per aquestes cèl·lules són enviats al bulb olfatori i, des d'allí, al cervell que és el que processa tota la informació. Es creu que la sensibilitat de les cèl·lules receptores és de l'ordre de parts per milió i que la seva vida mitjana és d'uns 22 dies. Però, el processat neural que té lloc posteriorment al cervell és capaç d'incrementar la sensibilitat, eliminar les derives associades a l'envelliment o a la substitució de les cèl·lules receptores i permetre la discriminació entre milers d'aromes [1, 12].

De manera anàloga, en els instruments desenvolupats per tal d'imitar el nas humà, els compostos volàtils presents a l'espai de cap de la mostra interaccionen amb un sistema de sensors, el qual genera un conjunt de senyals que es pot considerar com una empremta digital de l'aroma de la substància analitzada. Quan s'analitzen diverses mostres, es genera una matriu de dades que es tractada amb tècniques quimiomètriques per tal de buscar similituds i diferències entre elles segons la seva composició volàtil i, si s'escau, classificar-les segons el seu origen, puresa, tractament rebut o qualsevol altra propietat d'interès. Així doncs, aquesta tècnica, a diferència de les tècniques cromatogràfiques, no proporciona informació sobre els compostos que constitueixen l'aroma sinó que, de manera similar al sistema olfatiu humà, proporciona una informació global del perfil aromàtic de la substància analitzada que permet la seva comparació amb els de les altres substàncies analitzades.

La majoria dels nassos electrònics desenvolupats es basen en la tecnologia dels sensors de gasos. A finals dels anys 90, però, es va desenvolupar una nova generació de nassos electrònics basats en la tecnologia de l'espectrometria de masses [13]. Tot i les diferències instrumentals, l'objectiu d'ambdós tipus de nassos

electrònics és essencialment el mateix: la comparació i la posterior classificació de mostres segons la seva composició volàtil, d'una manera ràpida i senzilla.

IV.1.1 L'instrument

Tot i que en el mercat existeixen diferents tipus de nassos electrònics, tots ells consten de tres parts bàsiques, que són: un sistema de mostreig, un sistema de detecció i un sistema informàtic de tractament de dades capaç de convertir en informació útil els senyals originats al detector. La funció del sistema de mostreig és extreure els compostos volàtils de la mostra i introduir-los al sistema de detecció. Normalment, s'utilitzen tècniques d'espai de cap ja que els sistemes de detecció estan dissenyats per a que els analits hi entrin en forma gasosa. El sistema de detecció és la part més important d'un nas electrònic ja que és la que proporciona l'empremta digital de l'aroma de la mostra analitzada, ja sigui mitjançant la interacció dels compostos amb sensors de gasos, en els instruments que utilitzen aquesta tecnologia, o mitjançant l'obtenció d'un espectre de masses global de l'aroma en els instruments basats en l'espectrometria de masses. Per últim, el sistema de tractament de dades és el que permet, mitjançant tècniques quimiomètriques, establir les similituds i diferències entre l'aroma de diferents substàncies, crear models de classificació per a conèixer propietats d'interès de mostres futures (origen, maduresa, varietat, puresa, etc.) o, fins i tot utilitzant tècniques de calibratge multivariant, crear models per a la predicció de variables contínues com pot ser la concentració d'un analit, el temps d'envelliment d'un vi, el temps de curat d'un formatge, etc.

A continuació es descriu cadascuna d'aquestes tres parts de què consta un nas electrònic, detallant les diferents tècniques que es poden utilitzar en cadascuna d'elles.

IV.1.1.1 Sistema de mostreig

En principi, qualsevol de les tècniques de mostreig de l'espai de cap descrites en el capítol II es podria utilitzar per a extreure els compostos volàtils. No obstant això, la tècnica de l'espai de cap estàtic és, amb diferència, la més utilitzada a causa, principalment, de la seva senzillesa i rapidesa. En aquesta tècnica, les variables que cal tenir en compte són la temperatura de la mostra, el temps necessari per a què es produeixi l'equilibri dels compostos entre l'espai de cap i la mostra, el volum de mostra a analitzar, la relació entre el volum de mostra i el volum d'espai de cap i, per últim, el volum d'espai de cap a injectar en el detector.

La baixa sensibilitat que presenta aquesta tècnica és, però, un inconvenient important en algunes aplicacions. Llavors, cal recórrer a tècniques on, a més a més de l'extracció, tingui lloc un procés de concentració dels compostos volàtils. La tècnica de l'espai de cap dinàmic és una de les utilitzades com a sistema de mostreig en algunes aplicacions on es requereix d'una major sensibilitat [14-16]. Cal tenir en compte, però, que amb l'ús d'aquesta tècnica es veu compromès un dels requisits que se li exigeix a un nas electrònic com és la rapidesa. La concentració dels analits a la trampa és un pas més que s'introdueix al mètode d'extracció i que, per tant, implica un temps d'anàlisi més llarg.

Altres tècniques amb una gran capacitat de concentració i que han estat també utilitzades en algunes aplicacions són la microextracció en fase sòlida (SPME) [14, 17-19] i la *stir bar sorptive extraction* (SBSE) [20].

IV.1.1.2 Sistema de detecció

Tot i que cadascuna de les tres parts de que consta un nas electrònic és important i del tot indispensable, el sistema de detecció es podria dir que és la part principal de l'instrument. De fet, els diferents tipus de nassos electrònics existents al mercat es caracteritzen, principalment, pel sistema de detecció que els conformen. Com ja

s'ha comentat, hi ha una divisió molt clara entre els instruments que utilitzen sensors de gasos i els que utilitzen la tecnologia de l'espectrometria de masses com a sistema de detecció. A continuació es descriuen per separat aquests dos tipus d'instruments emfatitzant els avantatges i inconvenients de cadascun.

Sensors de gasos

Els instruments que utilitzen la tecnologia dels sensors de gasos són els més emprats, en gran part perquè van ser els primers en desenvolupar-se. El sistema de detecció d'aquests instruments està constituït per una bateria de sensors composts d'un material sensible a gasos i vapors, el qual modifica alguna de les seves propietats elèctriques, mecàniques o òptiques en estar-hi en contacte. Aquest material es troba dipositat sobre un transductor que mesura aquest canvi de propietat i el tradueix a una variació en alguna magnitud elèctrica, per exemple tensió o corrent elèctric. Els sensors presenten especificitat parcial, la qual cosa vol dir que cadascun respon de manera més selectiva a un grup de compostos químics però que, a la vegada, també pot donar resposta a altres compostos. D'aquesta manera, un nombre no molt gran de sensors (normalment entre 8 i 32) poden respondre a un ampli ventall d'olors diferents i no cal tenir un sensor específic per a cada compost químic, o família de compostos.

La resposta que s'obté de cada sensor és deguda a tot el conjunt de molècules que hi hagin interaccionat. El diagrama resultant de les respostes de tots els sensors (figura IV.2), com ja s'ha dit, es pot interpretar com una empremta digital de l'aroma de la substància analitzada.

En general, la resposta dels sensors de gasos es veu influenciada per canvis en les condicions ambientals de temperatura i humitat, per tant, en el seu ús, cal tenir molta cura en controlar de manera rigorosa aquestes condicions. Convé també que el volum d'espai de cap de la mostra que s'introdueix a la cambra dels sensors es

perllongui durant un temps superior al de la resposta dels sensors però, al mateix temps, no gaire superior per tal d'evitar enverinaments. El temps de recuperació dels sensors després d'analitzar una mostra cal que sigui tan breu com sigui possible per tal que el temps que calgui esperar per a l'anàlisi de la següent mostra sigui el mínim.

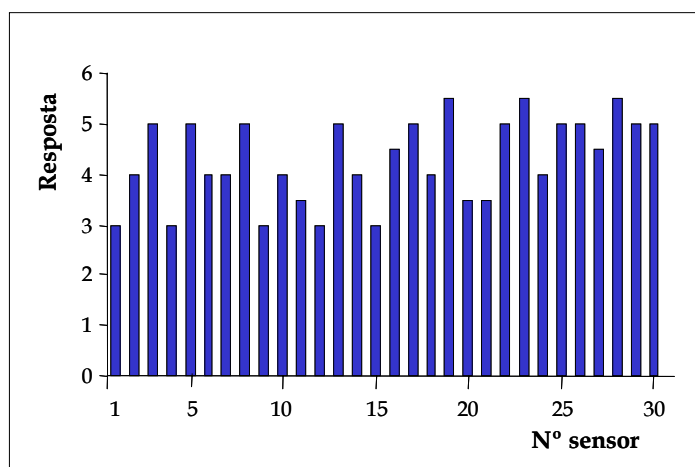


Figura IV.2. Senyals obtinguts amb un detector de sensors de gasos.

Els sensors de gasos presenten problemes de deriva de la línia base i pèrdua de sensibilitat amb el seu ús, sobretot en presència d'elevades concentracions de compostos volàtils majoritaris, com l'aigua o l'etanol en les begudes alcohòliques, que en alguns casos, a més, provoquen problemes de saturació dels sensors. Un altre inconvenient és el seu temps de vida limitat, que obliga a substituir-los periòdicament, la qual cosa implica calibratges continus de l'instrument.

Les prestacions dels nassos electrònics queden fonamentalment condicionades per les característiques dels sensors que integren l'agrupació. Per aquesta raó, s'han desenvolupat diversos tipus de sensors, basats en diferents materials i principis de

funcionament [1, 2, 5, 6, 21-23]. Mentre que alguns d'ells estan ja ben establerts, altres estan encara en fase de recerca i desenvolupament.

Els òxids de metalls semiconductors (MOS) i els polímers conductors (CP) són els sensors més clàssics i també els més comunament utilitzats. Els primers treballen a temperatures elevades (entre 100 i 600 °C) produint-se a la seva superfície la combustió dels vapors detectats. L'alteració de la concentració d'oxigen adsorbit a la superfície del sensor a causa de la reacció provoca una variació de la seva conductivitat elèctrica. Els MOS són molt sensibles a un ampli ventall de compostos orgànics i són, potser, els que presenten un millor balanç entre deriva, temps de vida i sensibilitat. No obstant això, la seva resposta es veu molt afectada per la presència de compostos volàtils a la mostra a concentracions elevades, com per exemple l'etanol en les begudes alcohòliques, el qual satura els sensors. Un altre problema que presenten en l'anàlisi d'aliments és que les molècules de pes molecular elevat fan que la recuperació de la línia base després d'una anàlisi sigui molt lenta. A més, són molt susceptibles a l'enverinament per compostos que continguin sofre o per àcids febles.

El principi de funcionament dels polímers conductors, els quals treballen a temperatura ambient, es basa en l'adsorció reversible de les molècules volàtils a la capa activa polimèrica dipositada sobre uns elèctrodes, produint-se un canvi en la conductivitat elèctrica. Aquests sensors presenten una selectivitat més gran que els anteriors i també són més resistents a l'enverinament. Tanmateix, la seva resposta és molt sensible a la humitat, la qual cosa fa difícil el seu ús en mostres aquoses o amb un gran contingut d'aigua.

Un altre tipus de sensors són les microbalances de cristall de quars (QMB) i els fonamentats en ones acústiques de superfície (SAW). Aquests es basen també en la interacció dels compostos volàtils amb polímers però que, en aquest cas, estan dipositats sobre dispositius piezoelèctrics, de manera que l'adsorció de les molècules de l'aroma en la capa polimèrica produeix una variació en la freqüència

d'oscil·lació del sensor. L'avantatge més clar d'aquests sensors front els descrits anteriorment és la seva elevada sensibilitat. Mentre que la dels MOS i CP és de l'ordre de mg/L, la sensibilitat dels QMB i SAW és de l'ordre de µg/L. Per altra banda, la dependència de la seva resposta amb la temperatura i la baixa reproductibilitat són factors a tenir en compte a l'hora d'utilitzar-los.

Per últim, un altre tipus són els sensors químics de fibra òptica. Aquests estan constituïts per una sonda de fibra òptica modificada amb polímers que porten incorporats un colorant fluorescent. Aquest últim experimenta canvis en la seva longitud d'ona d'emissió depenent de la polaritat del polímer, la qual es veu modificada amb la interacció de les molècules volàtils de la mostra. Els sensors òptics són petits, econòmics i es poden fabricar amb un ampli ventall de polímers la qual cosa permet disposar de molts sensors diferents. El seu principal avantatge és la seva rapidesa de resposta. Mentre que el temps de resposta dels altres tipus de sensors és de varis minuts, aquests responen en fraccions de segon. Les limitacions dels sensors de fibra òptica són, però, que tenen un temps de vida relativament curt i que requereixen d'instrumentació molt sofisticada.

Espectrometria de masses

Els nassos electrònics que utilitzen un espectròmetre de masses (MS) com a sistema de detecció han estat desenvolupats més recentment [13, 24]. En aquest tipus d'instrument, s'introdueix l'espai de cap de la mostra dins la font d'ionització del detector sense separació prèvia dels compostos. Cal remarcar que l'MS és el mateix que s'utilitza com a detector en cromatografia de gasos. La diferència està en que enlloc d'analitzar individualment els compostos que van eluint de la columna del cromatògraf de gasos, s'analitzen tots al mateix temps. D'aquesta manera el que s'obté és un espectre de masses que correspon a la fragmentació de tots els compostos a la vegada, és a dir, un espectre global de la fracció volàtil de la mostra.

Aquest espectre global també es pot interpretar com una empremta digital de l'aroma de la substància analitzada.

A la figura IV.3 es mostren els dos tipus de senyals que s'obtenen en l'anàlisi d'una mostra. El primer (IV.3.a) correspon al senyal del detector en funció del temps d'anàlisi, on l'abundància, en cada temps, és deguda a la suma de tots els ions (m/z) que s'hi han detectat. El segon gràfic (IV.3.b) correspon a l'espectre de masses global de la mostra, on l'abundància de cada ió (m/z) s'obté a partir de la suma de tots els fragments amb aquella m/z que s'han detectat durant tot el temps d'anàlisi, en aquest cas entre 0.5 i 1 minut. Per tant, l'abundància d'un determinat ió no és deguda a un sol compost sinó a tots els compostos que hagin donat aquell ió en la seva fragmentació.

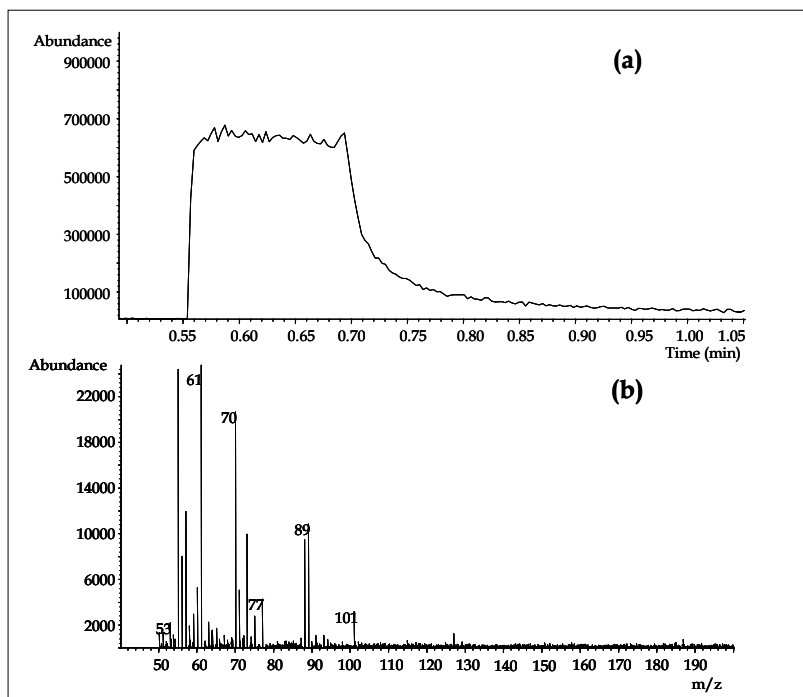


Figura IV.3. Senyals obtinguts amb el detector d'MS en l'anàlisi d'un vi. (a) Senyal en funció del temps d'anàlisi; (b) Espectre de masses global.

Si s'estableix un paral·lelisme entre aquests instruments i els que utilitzen sensors de gasos, cada ió equivaldria a un sensor. Una diferència important, però, és el nombre de "sensors" que pot tenir cada instrument. Mentre que els instruments de sensors de gasos tenen com a màxim al voltant de 30 sensors, el nombre d'ions que es poden detectar amb un MS és molt superior, en la majoria dels casos se n'analitzen més de 100.

Una altra característica important d'aquesta nova generació d'instruments, és que els ions de l'espectre de masses contenen informació química de la mostra ja que són fragments de les molècules que conformen l'aroma. En alguns casos aquest fet pot proporcionar informació sobre el tipus de compostos responsables de les diferenciacions entre mostres. A més, els resultats es poden comparar directament amb els resultats obtinguts d'una anàlisi de la mostra mitjançant GC-MS.

En el cas de que es vulgui obtenir més informació de l'origen molecular dels fragments, enlloc d'ionitzar les molècules mitjançant impacte electrònic, que és la manera més usual, es pot fer mitjançant ionització química, amb la qual la fragmentació és més suau. No obstant això, treballant amb impacte electrònic també es pot modificar el voltatge d'ionització per tal d'aconseguir efectes semblants [25]. En alguns casos, aquestes estratègies, a la vegada, milloren també els resultats de classificació o predicció [26].

La sensibilitat i selectivitat de l'instrument es pot augmentar, en aquelles aplicacions que ho requereixin, treballant en mode SIM (*selected ion monitoring*). Aquesta tècnica de treball és molt utilitzada en GC-MS i també es pot utilitzar en aplicacions amb nas electrònic [27].

Un fet interessant és que un cromatògraf de gasos acoblat a un detector de masses (HS-GC-MS), que és un instrument usual en els laboratoris d'anàlisi, es pot utilitzar com a nas electrònic si, enlloc d'utilitzar una columna analítica, s'utilitza una columna buida, sense fase estacionària, de manera que els analits no quedin retinguts i entrin tots de manera ràpida i simultània al detector. Una altra

possibilitat és utilitzar una columna analítica, amb fase estacionària, i aplicar unes condicions de flux i temperatura que no permetin la separació dels compostos, o que aquesta sigui la mínima possible i que, amb pocs minuts, es transfereixin tots al sistema de detecció. D'aquesta manera s'obté un instrument més versàtil, ja que tan sols variant les condicions cromatogràfiques l'instrument es pot utilitzar com a HS-GC-MS o com a nas electrònic (HS-MS).

Tot i que l'MS és una tècnica molt consolidada, hi ha alguns aspectes encara que cal millorar quan aquesta s'utilitza com a sistema de detecció d'un nas electrònic. Un d'ells, i segurament el més important, és la inestabilitat del senyal amb el temps. Aquest problema provoca que el senyal d'una mostra analitzada al cap d'un temps, variï de manera significativa respecte l'original, és a dir, que una mateixa mostra doni un perfil aromàtic diferent quan aquesta és analitzada al cap d'un temps que, en alguns casos, pot ser relativament curt. Les causes d'aquesta inestabilitat del senyal poden ser diverses. Per exemple, que es vagi embrutant la font d'ionització, que el buit no sigui estable, que el multiplicador d'ions vagi perdent eficàcia o que s'hagi canviat algun filament.

Una de les estratègies que s'ha desenvolupat per solucionar aquest problema és l'estandardització interna [18]. Aquesta consisteix en addicionar a la mostra un patró intern i, en el tractament de les dades, dividir l'abundància de tots els ions de la mostra per l'abundància d'un dels ions del patró intern. El requeriment que ha de complir un compost per a poder utilitzar-lo com a patró intern és que el seu espectre no interfereixi en el perfil de la mostra. En el cas de mostres sòlides, on l'addició d'un patró intern, en la majoria dels casos, no és gens fàcil, s'ha desenvolupat una tècnica a la qual se l'anomena addicions estàndard de gas [28]. Aquesta consisteix en introduir de manera continua a la font d'ionització de l'MS una petita quantitat de xenó, de manera que, en el tractament de les dades, l'abundància de cada fragment es normalitza respecte l'abundància del xenó mesurat durant l'anàlisi.

Tant l'estandardització interna com l'addició estàndard de gas són tècniques vàlides quan la inestabilitat del senyal és constant en tots els fragments, és a dir, quan l'abundància de tots els ions varia de la mateixa manera. En nombroses ocasions, però, aquesta inestabilitat és irregular, de manera que no tots els ions presenten les mateixes variacions d'abundància. Fins i tot, l'abundància d'alguns pot augmentar amb el temps mentre que la d'altres pot disminuir. En aquest cas, per a solucionar el problema, cal recórrer a les tècniques de transferència de calibratge [29].

Per a l'aplicació d'aquestes tècniques cal analitzar cada vegada, juntament amb les mostres, un conjunt de mostres de referència. La transferència de calibratge consisteix en corregir els espectres de les mostres obtinguts al cap d'un temps, tenint en compte les variacions que han sofert els espectres de les mostres de referència. El fet d'haver d'analitzar cada vegada un conjunt de mostres addicionals no suposa una càrrega de feina important per a una tècnica tan ràpida i senzilla com és el nas electrònic basat en l'MS. Però, el que sí que suposa realment un problema, i sobretot en el camp de l'anàlisi d'aliments, és el poder disposar de mostres de referència adequades i que siguin estables en el temps, tant des d'un punt de vista físic com químic.

Com a conclusió de la discussió presentada en aquest apartat sobre els dos tipus de sistemes de detecció que s'utilitzen en els nassos electrònics, els instruments basats en l'MS ofereixen prestacions superiors tot i que a canvi d'un major cost econòmic. A més, presenten menys problemes de deriva i de pèrdua de sensibilitat, i la resposta en general és més ràpida. La interferència que produeixen en molts casos els compostos volàtils majoritaris en els sensors de gasos és fàcil d'eliminar quan s'utilitza un detector d'MS ja que aquest pot discriminar els senyals que provenen d'aquests compostos interferents. Per exemple, en el cas de les begudes alcohòliques es pot eliminar la interferència de l'etanol no analitzant els ions amb una relació m/z inferior a 46, que és el pes molecular d'aquest alcohol. Per altra

banda, en els casos en que es necessiti un instrument portàtil, per exemple, per a fer mesures *in-situ*, els instruments d'MS no poden competir encara amb els de sensors de gasos.

IV.1.1.3 Sistema de tractament de dades

L'última part, però no per això menys important, d'un nas electrònic és el sistema de tractament de les dades. La quantitat d'informació obtinguda amb el sistema de detecció és molt gran ja que cada mostra està definida en un espai multidimensional, amb tantes dimensions (variables) com sensors tingui l'instrument. En el cas dels instruments basats en l'MS el nombre de dimensions correspon al nombre d'ions analitzats pel detector.

Un paràmetre important a considerar quan es treballa amb un nas electrònic és el nombre de mostres a analitzar. Cal disposar d'un nombre representatiu de mostres de cadascuna de les propietats que es volen estudiar. Per exemple, si es volen diferenciar mostres segons el seu origen cal analitzar un conjunt de mostres representatives de cada origen. Cal tenir en compte que en el cas dels aliments existeix una variabilitat natural i, en molts casos, també tecnològica de les mostres. És a dir, dues mostres de les mateixes característiques poden tenir perfils aromàtics diferents, la qual cosa implica analitzar un nombre important de mostres per a poder contemplar aquesta variabilitat.

Així doncs, quan s'analitza tot el conjunt de mostres, es genera una matriu de dades com la que es mostra a la figura IV.4, on les files corresponen a les mostres i les columnes a les variables, que poden ser entre 4 i 32 en els instruments que utilitzen sensors de gasos, però més de 100 en els que utilitzen l'espectrometria de masses. Per a poder manipular i treure informació útil d'aquest gran conjunt de dades cal recórrer a les tècniques quimiomètriques [30-34].

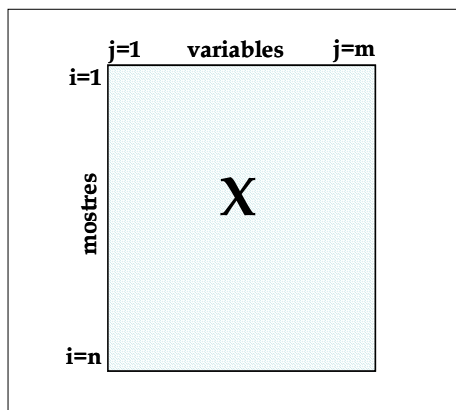


Figura IV.4. Matriu de dades generada en l'anàlisi d'un conjunt de mostres.

Tècniques de pretractament de dades

El primer pas en l'anàlisi de les dades consisteix en el pretractament matemàtic dels senyals generats pels sensors o pel MS, amb la finalitat d'eliminar o reduir fonts de variabilitat en el senyal que no estan relacionades amb la propietat d'interès. Existeixen diferents tipus de pretractaments, com són la normalització, el suavitzat, la correcció de la línia base o el centrat de variables, que s'escolliran en funció del tipus de dades o del comportament que s'hagi observat en elles [35]. En aquesta tesi, els pretractaments que s'han realitzat a les dades obtingudes analitzant les mostres amb el nas electrònic han estat la normalització a 100, excepte en aplicacions quantitatives, i el centrat de variables.

La normalització consisteix en posar totes les mostres en una mateixa escala, dividint cada variable per una constant, per tal d'eliminar variacions sistemàtiques que, normalment, estan associades a la quantitat total de mostra que s'ha analitzat. En el cas d'aplicacions quantitatives, per exemple el calibratge de la concentració d'un analit, no és recomanable normalitzar ja que es podria perdre informació important sobre la concentració, en cada mostra, de l'analit en qüestió. En la normalització a 100 es divideix, per a cada mostra, el valor de cada variable per un

factor (f_i), que es calcula com l'arrel quadrada del sumatori dels valors de totes les variables al quadrat, i el resultat es multiplica per 100.

$$f_i = \sqrt{\sum_j^m x_{ij}^2}$$

Pel que fa al centrat de variables, aquest generalment es duu a terme perquè les relacions que existeixen entre les mostres es visualitzen millor quan es situa l'origen de la representació al centre del conjunt de dades. A més, s'accentuen també les diferències dels senyals entre mostres ja que s'elimina la tendència comuna. El centrat de cada variable consisteix en restar el seu valor mitjà a totes les mostres.

$$x_{ij}^c = x_{ij} - \bar{x}_j$$

Tècniques de reconeixement de models no supervisades

Una vegada pretractades les dades, el següent pas és la seva exploració. El fet de que cada mostra estigui definida en un espai de més de tres dimensions (multidimensional), fa que sigui impossible la seva visualització en tot el conjunt de variables. Les tècniques d'anàlisi exploratòria el que fan és, d'alguna manera, reduir la complexitat del conjunt de dades per tal de poder visualitzar de forma gràfica les agrupacions naturals i les tendències de les mostres en relació amb les variables que s'estan estudiant (la resposta dels sensors o l'abundància dels ions), així com també poder detectar mostres discrepants o *outliers*.

S'anomenen tècniques de reconeixement de models no supervisades perquè no s'utilitza la informació sobre la pertinença de les mostres a una determinada classe. Les classes, o categories, fan referència als diferents valors de la propietat que es vol estudiar. Per exemple, en un estudi de diferenciació d'olis segons la matèria

primera a partir de la qual s'han elaborat, les classes serien les diferents matèries primeres de les mostres (oliva, palma, gira-sol, etc.).

Les tècniques no supervisades més utilitzades són l'anàlisi d'agrupacions (HCA, *Hierarchical Cluster Analysis*) i l'anàlisi de components principals (PCA, *Principal Component Analysis*).

L'anàlisi d'agrupacions examina les distàncies que existeixen entre els objectes (mostres o variables). La informació es representa amb un dendograma on els objectes s'agrupen de forma jeràrquica segons la seva distància. A causa de que els valors de distància varien amb el tipus de mesura, aquests es transformen en valors de similitud mitjançant la següent equació:

$$S_{ab} = 1 - \frac{d_{ab}}{d_{\max}}$$

On S_{ab} i d_{ab} són la similitud i la distància entre els punts a i b respectivament, i d_{\max} és la distància entre els punts més allunyats de tot el conjunt. D'aquesta manera les similituds queden acotades entre 0 i 1. Existeixen diferents tipus de distàncies, però normalment es considera l'euclidiana, que entre dues mostres, a i b, es calcula de la següent manera:

$$d_{ab} = \sqrt{\sum_j^m (x_{aj} - x_{bj})^2}$$

El dendograma es construeix unint els punts un a un, començant pels dos més pròxims, els quals constitueixen el primer grup. El següent pas consisteix en substituir aquest grup per un punt que el representi, per exemple, el punt mig del segment que uneix els dos punts. Però aquesta no és l'única manera, ja que per a l'elecció d'aquest representant del grup existeixen diversos criteris. No obstant això, si la matriu de dades mostra tendències ben definides, les conclusions de l'estudi seran les mateixes independentment del criteri escollit. La construcció del

dendograma finalitza quan tots els punts s'han unit fins arribar a un tronc comú. D'aquesta manera l'aspecte que presenta aquest gràfic és el d'un arbre que es bifurca des d'un tronc comú fins a tantes rames o objectes com es vulguin agrupar. Com més curta és la rama que uneix dos objectes, o dos grups d'objectes, més gran és la similitud entre ells. A la figura IV.5 es mostra un exemple de dendograma obtingut en un test triangular de vins realitzat amb un nas electrònic basat en l'espectrometria de masses. Aquest test s'acostuma a fer en anàlisi sensorial i consisteix en distingir entre tres copes (dues d'elles amb el mateix vi), quina conté el vi diferent. En l'exemple que es mostra, es van analitzar diverses rèpliques d'un vi de la varietat Chardonnay (mostres A i B) i d'un altre de la varietat Macabeu (mostra C) [36]. El gràfic mostra que les mostres A i B són del tot diferents de les C ja que la similitud entre les dues agrupacions és zero.

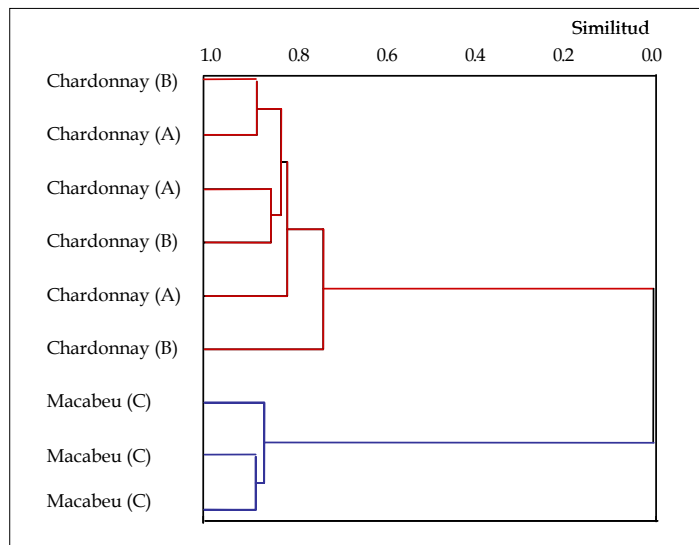


Figura IV.5. Exemple d'un anàlisi d'agrupacions en un anàlisi de vins amb el nas electrònic [36].

En l'anàlisi de components principals (PCA) es duu a terme una reducció de les variables de manera que la informació rellevant que conté la matriu

multidimensional pot quedar reflectida en unes poques variables, que són combinació lineal de les variables originals, i que es coneixen com a components principals o factors. D'aquesta manera, amb la representació de les mostres en funció dels 2 o 3 primers components principals, es poden visualitzar gràficament les agrupacions naturals que existeixen entre elles. Els components principals s'ordenen segons el tant per cent de variabilitat que expliquen. Així doncs, el primer component principal és sempre el que explica la màxima variabilitat de les dades, és a dir, és el que conté més informació sobre les similituds i diferències que existeixen entre les mostres. El següent és el segon component principal i així successivament.

La figura IV.6 mostra la representació de les mostres de l'exemple anterior sobre els dos primers components principals del PCA realitzat a les dades. Tal i com es pot observar, les mostres de Chardonnay i les mostres de Macabeu s'agrupen entre elles. El primer component principal, que explica un 96.6% de la variabilitat total de les mostres, diferencia clarament els dos vins. Aquest gràfic on es representen les mostres sobre els components principals s'anomena gràfic d'*scores*.

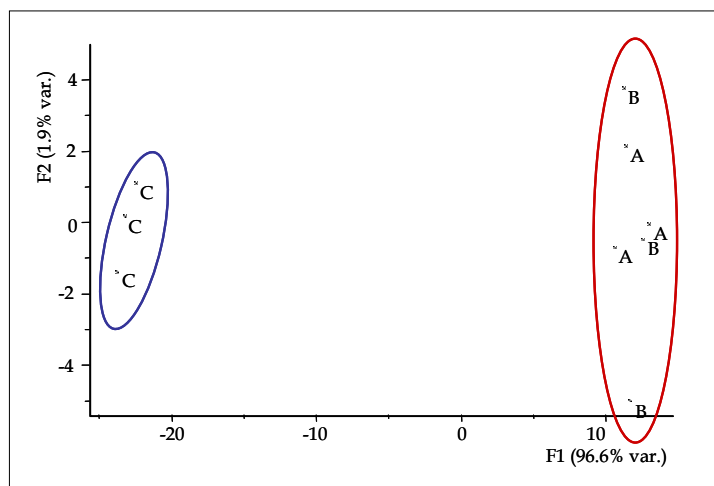


Figura IV.6. Gràfic d'*scores* del PCA realitzat a un test triangular de vins. A i B: Chardonnay; C: Macabeu [36].

Si enlloc de les mostres es representen les variables originals (gràfic de *loadings*), es pot obtenir informació de les correlacions que existeixen entre elles i també del seu poder discriminant sobre les mostres. La figura IV.7 mostra el gràfic de *loadings* corresponent al mateix exemple de diferenciació de vins. Les variables que estan més separades del nucli que formen la majoria de les variables, el qual està situat al voltant del punt (0, 0) de l'eix de coordenades definit pels dos components principals, són les que tenen una contribució més gran a aquests dos components principals i, per tant, les que més influeixen a les diferenciacions entre mostres. En aquest cas s'observa que els ions 88 i 55 són les variables que més contribueixen al primer component principal, que és el que diferencia els dos vins.

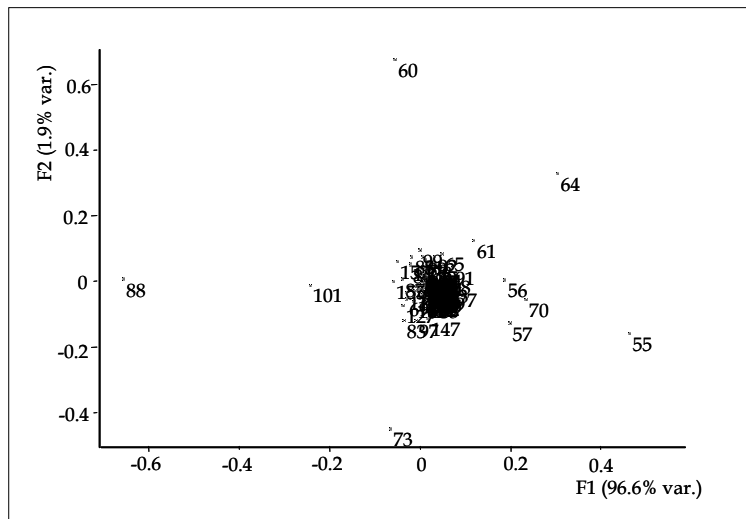


Figura IV.7. Gràfic de *loadings* del PCA realitzat a un test triangular de vins [36].

Tècniques de reconeixement de models supervisades

En molts casos, l'aplicació de les tècniques de reconeixement de models no supervisades és un pas previ a l'anàlisi classificatòria. En aquesta, es construeixen models estadístics amb l'objectiu de classificar mostres futures. El SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*), el KNN (*K-Nearest Neighbors*) i l'anàlisi discriminant (LDA, *Linear Discriminant Analysis*) són les tècniques de classificació més utilitzades. Aquestes tècniques es diu que són supervisades ja que en la construcció dels models s'utilitza informació sobre la classe o categoria a la qual pertany cada mostra, és a dir, el valor de la propietat a estudiar (l'origen, la varietat, l'edat, etc.).

Així doncs, per a construir el model cal disposar d'un conjunt de mostres de les quals en coneguem el valor de la propietat a estudiar. Aquest conjunt de mostres constitueix el conjunt d'entrenament amb el qual es construirà el model de classificació.

Una vegada construït el model matemàtic, cal validar-lo determinant la seva habilitat de classificació i la seva estabilitat o robustesa. Per a dur a terme la validació cal disposar d'un segon conjunt de mostres (conjunt de validació) que no hagin estat utilitzades per a la construcció del model i de les quals també se'n conegui la classe a la qual pertanyen. L'habilitat de classificació del model serà el percentatge de mostres del conjunt de validació que hagin estat classificades correctament pel model. Per altra banda, un model és estable si l'eliminació d'algunes mostres del conjunt d'entrenament, o la seva substitució per altres, no fa variar la seva habilitat de classificació. Els models que es construeixen amb un nombre insuficient de mostres tendeixen a ser inestables.

El SIMCA és la tècnica de classificació que s'ha utilitzat en aquesta tesi. D'una manera molt simplificada, es pot dir que consisteix en la construcció d'un model de components principals per a cada classe predefinida i l'establiment d'un interval de confiança al voltant d'aquest model. Després, en la classificació d'una

nova mostra es determina en quin dels diferents models s'ajusta millor el vector de dades (resposta de les diferents variables) obtingut amb l'anàlisi de la mostra, així com també es comprova que estigui dins de l'interval de confiança establert en aquell model. En el cas de que alguna mostra no sigui classificada en cap dels models, es pot pensar que és un *outlier* i que no pertany a cap de les classes que s'han definit. El gràfic de la figura IV.8 mostra de manera esquemàtica i simplificada com funciona el SIMCA. Amb el conjunt de mostres de cada classe, en aquest cas són dues classes, es construeix el model de components principals. Per a conèixer la classe a la qual pertany una mostra nova, aquesta es projecta sobre cadascun dels models i es compara la seva dispersió en el model amb la dispersió de la resta de mostres amb les que s'ha construït el model, o dit d'una altra manera, s'avalua la distància de la mostra al centre del model. En l'exemple de la figura IV.8 es pot observar que la mostra desconeguda s'ajusta millor al model de components principals de la classe 1 que al de la classe 2, per tant aquesta mostra es classificaria a la classe 1. Aquest gràfic en dues dimensions està molt simplificat ja que no hi apareix l'interval de confiança de cada model, el qual es representaria amb una gran esfera que envoltaria el model.

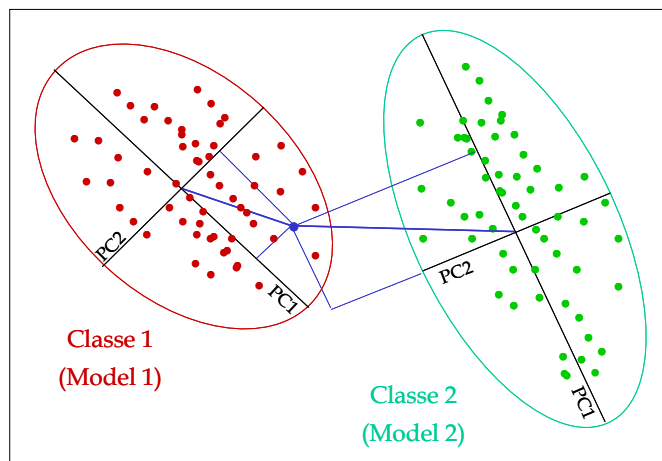


Figura IV.8. Esquema de la construcció d'un model SIMCA.

La distància entre classes és un paràmetre que proporciona aquesta tècnica i que indica com de separades estan les classes predefinides o, dit d'una altra manera, com de diferents són els models construïts. Una distància entre dues classes superior a 3 indica que aquestes estan estadísticament ben diferenciades [26].

Tècniques de calibratge multivariant

Quan la variable que interessa modelar no és una variable categòrica sinó que és contínua, per exemple la concentració d'un analit, llavors cal recórrer a les tècniques de calibratge multivariant. La regressió per mínims quadrats parcials (PLS, *Partial Least Squares*) i la regressió per components principals (PCR, *Principal Component Regression*), són les més utilitzades.

Pel que fa al procediment a seguir en l'aplicació d'aquestes tècniques, existeix un clar paral·lelisme amb el de les tècniques de classificació, el qual es mostra a l'esquema de la figura IV.9.

Primerament, per a construir el model cal escollir un conjunt de mostres de calibratge de les quals coneguem el valor de la variable que volem modelar. Els valors han d'estar ben distribuïts dins del rang que s'hagi establert prèviament en el plantejament de l'estudi. Un cop analitzades les mostres amb el nas electrònic, s'aplicarà a les dades el mètode de regressió escollit per tal de construir el model. El model es validarà avaluant la seva habilitat de predicció mitjançant un conjunt de mostres diferents a les utilitzades per a construir-lo i de les quals coneguem també el valor de la variable que hem modelat. Finalment, el model ja es podrà utilitzar per a la quantificació de mostres problema.

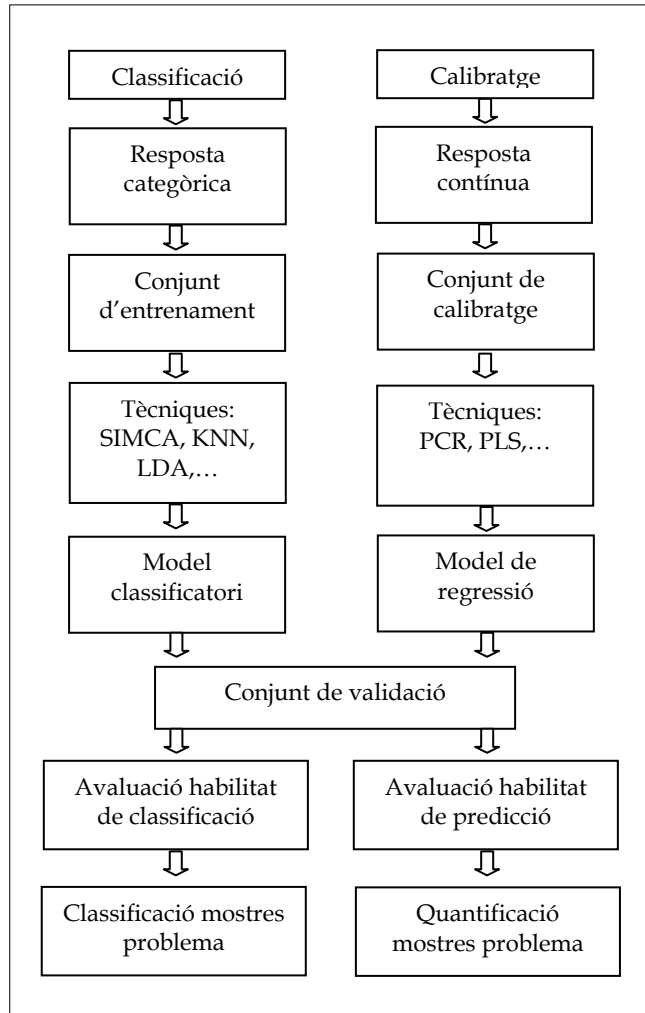


Figura IV.9. Esquema del procediment a seguir en les tècniques de classificació i en les de calibratge.

Els mètodes de regressió estableixen una relació, o model, entre una propietat de la mostra, la qual és una variable dependent, com per exemple la concentració d'un analit, i un conjunt de variables independents que són les respostes dels sensors o l'abundància de les relacions m/z. L'esquema de la figura IV.10 mostra les dues matrius de dades de que es disposa en un calibratge multivariant: la matriu X que

conté les variables independents mesurades a les diferents mostres i la matriu Y que conté les variables dependents. En el cas que la matriu Y contingui més d'una variable dependent, s'establirà un model per a cadascuna d'elles.

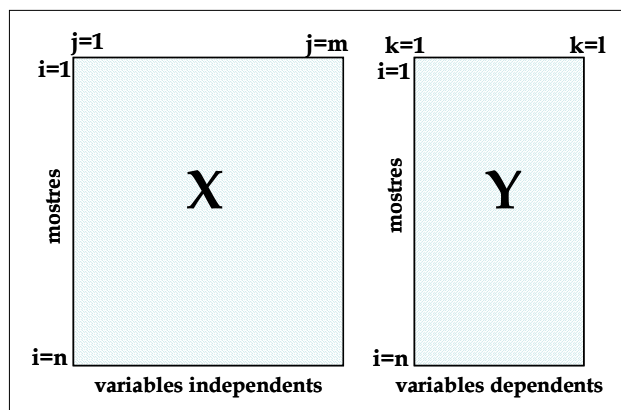


Figura IV.10. Matrius de dades en calibratge multivariant.

El primer pas en la construcció del model és escollir les mostres del conjunt de calibratge. Aquestes han de ser representatives de les futures mostres de predicció i han d'incloure suficient variabilitat dels fenòmens que facin variar la resposta, així com també de les interferències que hi puguin haver, per tal de que el model sigui robust.

Tant la tècnica PCR com la PLS estan basades en la reducció de variables per tal de disminuir la complexitat de les dades i extreure'n el màxim d'informació rellevant. Per tant, un element a tenir en compte en la construcció del model, és el nombre de factors que s'utilitzaran. Aquesta elecció és bastant crítica ja que, si no es tenen en compte totes les fonts de variabilitat significatives que influeixen sobre la resposta, s'obtenen models "subajustats" que es caracteritzen per dur a terme prediccions esbiaixades. En el cas oposat, el model té més paràmetres que els estrictament necessaris per a representar totes les fonts de variabilitat rellevants correlacionades

amb la resposta i es diu que el model està “sobreajustat”. Les prediccions dutes a terme amb un model sobreajustat tenen variàncies excessivament grans pel fet que el model inclou vectors que aporten informació redundant, o tan sols soroll, la qual cosa incrementa l'incertesa de les prediccions.

L'elecció del nombre de factors es basa en l'estudi de l'evolució d'un error de predicció mitjà amb models que inclouen cada vegada més factors. Si es disposa d'un conjunt independent de mostres (que no s'han utilitzat en el calibratge) aquest error es pot calcular com l'arrel quadrada de l'error mitjà de predicció (RMSEP, *Root Mean Square Error of Prediction*) del conjunt de mostres que no han participat en el calibratge:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

Per cada mostra del conjunt independent, y_i és el valor mesurat (conegut) de la variable dependent, \hat{y}_i és el valor predit pel model i n és el nombre de mostres del conjunt independent. Les unitats de l'RMSEP són les mateixes que les de la variable dependent que s'ha modelat i, per tant, pot utilitzar-se de forma qualitativa com una estimació de l'exactitud de les prediccions.

Si no es disposa d'un conjunt independent de mostres, l'estimació de l'error mitjà de predicció es pot fer mitjançant el mètode de la validació creuada o *cross-validation*. Aquest consisteix en excloure una, o varies, de les mostres del conjunt de calibratge en la construcció del model i després predir el seu valor amb el nou model que s'ha construït sense ella, o elles. Aquest procés es fa de manera iterativa per totes les mostres del conjunt de calibratge. En aquest cas s'obté un error de

predicció similar a l'RMSEP que s'anomena arrel quadrada de l'error mitjà de validació creuada (RMSECV, *Root Mean Square Error of Cross-Validation*):

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

Per cada mostra de validació, y_i és el valor mesurat de la variable dependent, \hat{y}_i és el valor predit pel model construït sense la mostra "i" i n és el nombre de mostres del conjunt de calibratge que s'han tret en la validació creuada.

Així doncs, la representació de l'RMSEP o l'RMSECV front el nombre de factors del model (figura IV.11) permet veure el nombre de factors que ha de tenir el model per a que l'error de predicció sigui mínim. Normalment s'agafa com a valor òptim el primer mínim local o el mínim absolut.

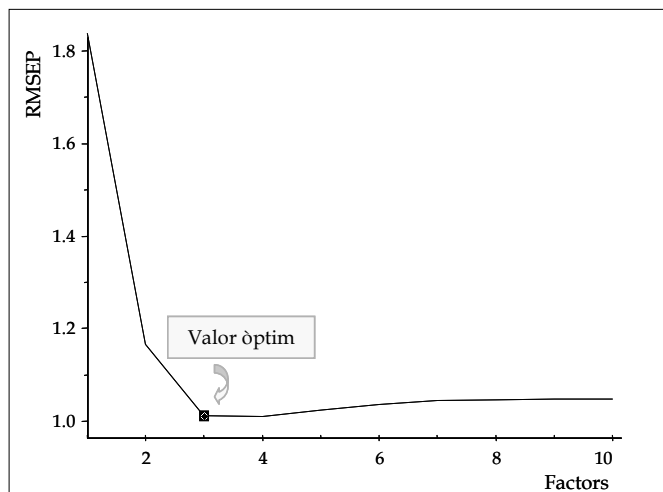


Figura IV.11. Representació de l'RMSEP front el nombre de factors.

La presència o absència d'error sistemàtic es comprova mitjançant una regressió lineal entre els valors mesurats i els predits pel model multivariant. Si no existeix error sistemàtic, el resultat d'aquesta regressió hauria de ser una recta de pendent la unitat i d'ordenada a l'origen zero. Però, a causa d'errors de tipus aleatoris, aquests valors poden ser lleugerament diferents a 1 i a 0 respectivament. Llavors, mitjançant un test estadístic conjunt del pendent i l'ordenada a l'origen, es pot determinar si els valors trobats d'aquests dos paràmetres són significativament diferents dels esperats (1 i 0), la qual cosa voldria dir que el model està esbiaixat.

La concordança existent entre els valors mesurats i els predits pel model es pot determinar mitjançant el càlcul de l'error mitjà (RMSEP) descrit anteriorment. Aquest paràmetre ens permetrà conèixer l'error que obtindrem en la predicció de mostres futures.

L'RMSEP ens aporta informació sobre l'exactitud dels valors predits pel model, és a dir, la diferència que hi ha entre el valor conegut (mesurat) i el predit. Pel que fa a la precisió, aquesta està relacionada amb la desviació estàndard dels residuals de predicció corregits pel biaix (SEP, *Standard Error of Prediction*):

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (y_i - \hat{y}_i - \text{biaix})^2}{n - 1}}$$

On el biaix és:

$$\text{biaix} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (y_i - \hat{y}_i)}{n}$$

Per tant, la relació que hi ha entre l'RMSEP i l'SEP és la següent:

$$\text{RMSEP}^2 = \text{SEP}^2 + \text{biaix}^2$$

L'elecció del millor model de calibratge dependrà de l'equilibri entre la variància (SEP^2) i el biaix, a través del nombre de factors òptim que proporcionï el mínim RMSEP.

Per altra banda, la representació dels valors predits pel model front els valors mesurats de les mostres, permet visualitzar fàcilment la capacitat de predicció del model (figura IV.12). Com ja s'ha dit, en el cas d'un model ideal, els punts s'haurien d'ajustar a una recta d'ordenada a l'origen zero i pendent la unitat. El coeficient de correlació d'aquesta recta (r) també ens donarà una idea de l'ajust dels valors reals amb els predits.

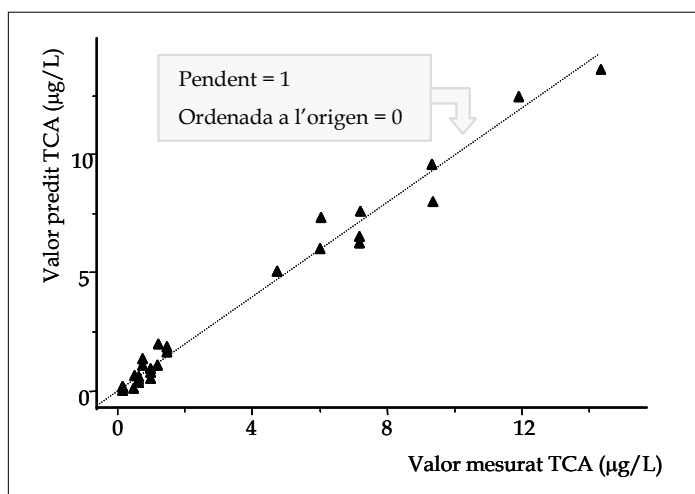


Figura IV.12. Representació dels valors mesurats de les mostres front els predits pel model en la determinació de TCA en vins blancs amb un nas electrònic [27].

Un altre element a tenir en compte a l'hora de construir el model, és la presència en el conjunt de calibratge de mostres discrepants o *outliers*. Aquestes mostres es poden detectar mitjançant diversos gràfics de representació de les mostres. A mode

d'exemple, la figura IV.13 mostra dos gràfics que poden ser útils a l'hora de detectar *outliers*: el gràfic d'*scores* (a) i el gràfic d'influència (b).

En l'exemple del gràfic d'*scores* que es mostra, es pot observar que una de les mostres és molt diferent a tota la resta, per tant, es podria pensar que aquesta és una mostra discrepant o *outlier*. En els gràfics d'influència es representa els residuals de les mostres front el seu *leverage*, que és la distància de la mostra al centre del model. Una mostra amb un residual gran és probable que sigui un *outlier*, però en el cas de que la mostra a més a més tingui un *leverage* elevat, llavors és un *outlier* perillós ja que és una mostra discrepant amb una gran influència en el model.

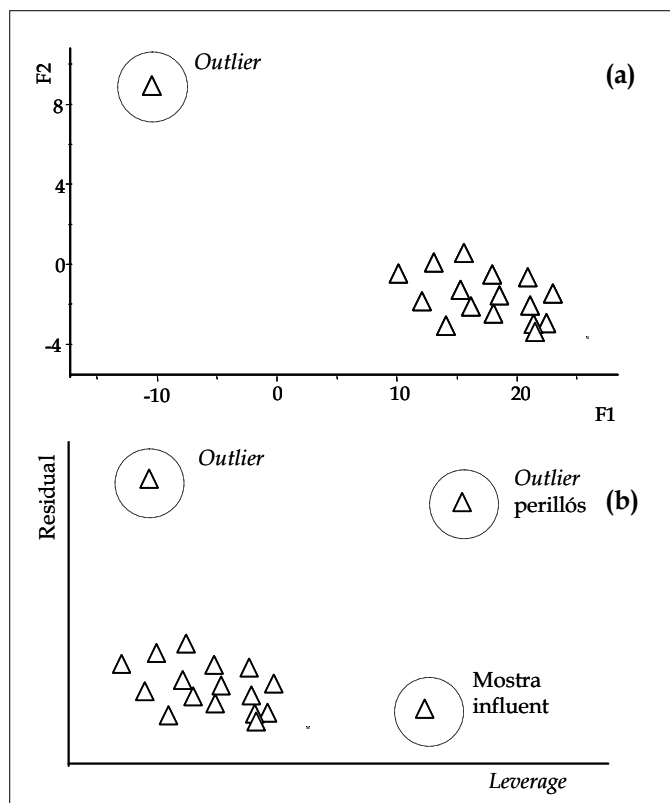


Figura IV.13. Exemples de detecció d'*outliers*. (a) gràfic d'*scores*; (b) gràfic d'influència.

Una vegada trobat el model òptim, aquest ja es pot utilitzar per a la predicció de mostres desconegudes.

Xarxes neuronals artificials

Totes les tècniques quimiomètriques descrites fins ara proporcionen bons resultats quan la resposta instrumental és lineal. Aquest és el cas dels instruments basats en l'espectrometria de masses. Moltes vegades, però, la resposta dels sensors de gasos no és lineal, amb la qual cosa abans d'aplicar aquestes tècniques cal transformar les dades. En alguns casos, una simple transformació logarítmica pot donar bons resultats. Una altra opció és aplicar tècniques no lineals com les xarxes neuronals artificials (ANN, *Artificial Neural Network*).

Una xarxa neuronal artificial és un procediment de reconeixement de models que es basa en el funcionament dels sistemes nerviosos biològics i que és capaç de predir, amb precisió, variables categòriques i també contínues [31]. Per a obtenir resultats, hi ha d'haver un entrenament previ de la xarxa neuronal. La seva capacitat d'aprenentatge dependrà de la manera com s'hagi construït i del mètode que s'hagi escollit per a dur a terme el seu entrenament. En algunes aplicacions, una xarxa neuronal ben entrenada pot donar millors resultats que els que s'obtenen amb les altres tècniques lineals descrites anteriorment.

IV.1.2 Aplicació a l'anàlisi de begudes alcohòliques

Com ja s'ha comentat en la introducció d'aquest capítol, quan es va plantejar aquesta tesi, es van trobar a la bibliografia nombroses aplicacions de nassos electrònics a l'anàlisi d'aliments però, un nombre molt petit a begudes alcohòliques.

La principal causa de que aquests instruments hagin estat poc utilitzats en la diferenciació i classificació de begudes alcohòliques, és els problemes de saturació que causa l'elevat contingut d'etanol en alguns tipus de sensors. Cal tenir en compte que el desenvolupament d'instruments basats en MS és molt recent i que, per tant, els instruments més utilitzats són els que es basen en sensors de gasos.

Per altra banda, el senyal de l'etanol pot emmascarar el senyal dels altres compostos volàtils que són minoritaris respecte aquest alcohol, amb la qual cosa, les diferenciacions que s'observen entre les mostres, en molts casos, són degudes a les variacions en el contingut d'etanol i no a les variacions dels altres compostos volàtils que són els que tenen a veure amb l'aroma. En un treball dut a terme amb un nas electrònic que combina tres tipus de sensors de gasos (MOS, CP i QMB), s'ha demostrat que no és possible distingir una solució sintètica amb un contingut d'etanol del 12% de la mateixa solució addicionada amb 1 g/L d'àcid acètic o 300 mg/L d'acetat d'etil [37]. Cal remarcar que un vi amb unes concentracions tan elevades d'aquests dos compostos, valors indicatius d'una acidesa volàtil molt elevada, és inacceptable. L'elevat contingut d'etanol també provoca que el senyal dels sensors tardi un temps relativament llarg a recuperar-se després de cada anàlisi, la qual cosa incrementa el temps real d'anàlisi per mostra.

Per tal de solucionar aquests problemes alguns autors han desenvolupat metodologies en les que s'intenta disminuir el contingut en etanol de la mostra abans de que aquesta sigui analitzada pel sistema de sensors. Entre elles hi ha utilitzar una columna cromatogràfica per tal de separar l'etanol de la resta de compostos volàtils abans de ser introduïts al sistema de sensors [38]. Una altra estratègia utilitzada ha estat l'aplicació de tècniques de pervaporació que consisteixen en separar els compostos d'una manera selectiva mitjançant membranes. L'ús de membranes amb poca afinitat per l'etanol permet enriquir l'extracte de manera important amb els compostos de l'aroma respecte l'etanol. Aquesta tècnica de separació ha estat utilitzada amb èxit en la monitorització de

l'evolució de l'aroma durant el procés de fermentació del most [39]. També s'ha estudiat la seva aplicació a la diferenciació de vins treballant, però, amb mostres sintètiques addicionades amb etanol i altres compostos volàtils que formen part de l'aroma del vi [40, 41].

La utilització de tècniques d'extracció com el purga i trampa o l'SPME, enlloc de l'espai de cap estàtic que és la més utilitzada, també ha proporcionat bons resultats en alguns casos [7, 42, 43]. Aquest fet és perquè algunes de les trampes que s'utilitzen en la tècnica del purga i trampa, sobretot les menys polars, i també algunes de les fibres que s'utilitzen en l'SPME, retenen poc l'etanol. D'aquesta manera, en l'extracte obtingut amb aquestes tècniques, el contingut d'etanol disminueix respecte el de la mostra original, mentre que el contingut de la resta de compostos volàtils augmenta.

Totes aquestes estratègies que s'han dut a terme per tal de disminuir la quantitat d'etanol que arriba al sistema de sensors, han donat bons resultats i han permès aplicar els nassos electrònics basats en sensors de gasos a l'anàlisi de begudes alcohòliques amb resultats prou satisfactoris. No obstant això, la seva utilització implica la introducció d'un nou pas en el mètode d'anàlisi que va en detriment de la rapidesa i la simplicitat de la tècnica, dues característiques molt valorades en aquests instruments.

La taula IV.1 mostra les principals aplicacions que s'han dut a terme amb els nassos electrònics basats en sensors de gasos a l'anàlisi de begudes alcohòliques. En algun d'aquests estudis, però, no s'ha tingut en compte el contingut d'etanol de les mostres, amb la qual cosa hi podrien haver errors en la interpretació dels resultats [8, 9, 44-50]. Per altra banda, el nombre de mostres analitzades en la majoria dels casos, és molt petit. Com ja s'ha dit, en aquest tipus d'estudis que es duen a terme amb els nassos electrònics, els quals tenen una gran component estadística, cal que el nombre de mostres analitzades sigui elevat per tal de poder

garantir la validesa dels resultats, així com també per a poder obtenir models robustos en el cas d'estudis de classificació o de calibratge.

Any	Mostra	Nº mostres	Tipus d'estudi	Extracció ^a	Detecció ^b	Tractament dades ^c	Ref.
1991	Whisky	5	Diferenciació de 5 whiskies japonesos	Flux de vapor	QMB	ANN	[44]
1991	Vi, cervesa, aiguardent	8	Diferenciació de 7 tipus de begudes alcohòliques	DHS	MOS	PCA, HCA	[7]
1991	Whisky, cognac	5	Classificació de 4 whiskies diferents i un cognac	DHS	MOS	LDA	[7]
1992	Cervesa	3	Diferenciació de cerveses	Flux de vapor	MOS	ANN	[45]
1993	Brandy, ginebra, aiguardent	4	Diferenciació de 2 brandies, una ginebra i un aiguardent	SHS	CP	PCA	[51]
1995	Vi	4	Diferenciació de vins de 4 anyades diferents	SHS	MOS	PCA	[8]
1996	Vi	4	Diferenciació de vins de 4 vinyes diferents	SHS	MOS	ANN	[9]
1998	Cervesa	4	Diferenciació de cerveses adicionades amb 3 compostos diferents	Flux de vapor	CP	PCA, DFA, ANN	[46]
2000	Cervesa	8	Diferenciació de cerveses de 8 marques diferents	SHS	QMB	PCA	[38]
2000	Vi	5	Diferenciació de vins de 5 varietats diferents	SHS	MOS	PCA	[38]
2000	Vi	3	Diferenciació de vins de 3 orígens diferents	DHS	CP	PCA	[42]
2001	Licor de coco	30	Diferenciació de licors de coco de diferents orígens	SHS	CP+QMB +MOS	PCA	[47]
2001	Vi	3	Diferenciació de vins de 3 orígens diferents	SPME	CP	PCA	[43]

·/·

·/·

2001	Vi	2	Diferenciació de 2 vins negres amb diferent envelliment	SPME	CP	PCA	[43]
2002	Vi	10	Monitorització de l'evolució del perfil aromàtic d'un vi durant la fermentació alcohòlica	SHS	CP	PCA	[39]
2004	Vi	8	Diferenciació de vins adulterats amb metanol, etanol o altres vins	SHS	MOS	PCA, ANN	[48]
2004	Vi	9	Diferenciació de vins blancs, negres i rosats	SHS	MOS	PCA, ANN	[49]
2004	Vi	36	Correlació entre les dades del nas electrònic i diferents descriptors determinats en l'anàlisi sensorial	SHS	QMB	PCA, PLS	[50]

Taula IV.1. Principals aplicacions dels nassos electrònics basats en els sensors de gasos a l'anàlisi de begudes alcohòliques (ordre cronològic).

^aDHS: espai de cap dinàmic; SHS: espai de cap estàtic; SPME: microextracció en fase sòlida.

^bQMB: microbalances de cristall de quars; MOS: òxids de metalls semiconductors; CP: polímers conductors.

^cANN: xarxes neuronals artificials; PCA: anàlisi de components principals; HCA: anàlisi d'agrupacions; LDA: anàlisi discriminant lineal.

El desenvolupament recent de nassos electrònics que es basen en la tècnica de l'MS ha suposat un avenç en l'aplicació d'aquesta tècnica a alguns camps on els instruments basats en sensors de gasos presenten limitacions importants. Un d'ells, que és el que s'estudia en aquesta tesi, és el de les begudes alcohòliques. La taula IV.2 mostra les aplicacions que s'han dut a terme amb els nassos electrònics basats en l'espectrometria de masses en el camp de les begudes alcohòliques des de l'aparició d'aquests instruments.

Com s'ha esmentat anteriorment, en aquests nous instruments, l'elevat contingut d'etanol de les mostres no satura el detector. Per altra banda, el problema d'emascament dels compostos de l'aroma causat per compostos volàtils

majoritaris es pot solucionar fàcilment eliminant del rang d'anàlisi els ions resultants de la fragmentació del compost interferent. Així doncs, l'etanol no suposa cap problema en l'anàlisi de begudes alcohòliques si els ions que s'analitzen tenen una relació m/z superior a 46, que és el pes molecular de l'etanol.

Any	Mostra	Nº mostres	Tipus d'estudi	Extracció ^a	Detecció ^b	Tractament dades ^c	Ref.
2002	Whisky	6	Detecció d'adulteracions	SHS, SBSE	MS	PCA, SIMCA, PCR	[20]
2002	Cervesa	5	Diferenciació de 5 cerveses alemanyes diferents	SPME	MS	PCA	[52]
2003	Vi	18	Determinació de la concentració de TCA	SHS	MS (SIM)	PLS	[27]
2003	Vi	4	Diferenciació de vins de dues varietats diferents	SHS	MS	PCA	[53]
2004	Vi	209	Diferenciació de vins de tres varietats diferents	SHS	MS	PCA, SIMCA	[54]
2004	Vi	25	Diferenciació de vins de dos orígens diferents	SHS	MS	PCA, SIMCA	[54]
2004	Vi	131	Diferenciació de vins amb diferents temps d'envelliment	SHS	MS	PCA, SIMCA	[54]
2005	Aiguardent	20	Determinació del temps d'envelliment	SHS	MS	PLS	[55]
2005	Aiguardent	20	Determinació de la intensitat de diferents descriptors aromàtics definits en l'anàlisi sensorial	SHS	MS	PLS	[56]

Taula IV.2. Principals aplicacions dels nassos electrònics basats en l'espectrometria de masses a l'anàlisi de begudes alcohòliques (ordre cronològic).

^aDHS: Espai de cap dinàmic; SHS: espai de cap estàtic; SPME: microextracció en fase sòlida; SBSE: *stir bar sorptive extraction*.

^bMS: espectrometria de masses; SIM: *selected ion monitoring*.

^cPCA: anàlisi de components principals; SIMCA: *soft independent modeling of class analogy*; PLS: regressió per mínims quadrats parcials; PCR: regressió per components principals.

És per tot això que els nassos electrònics basats en l'MS tenen un gran potencial en l'anàlisi de begudes alcohòliques, el qual s'ha estudiat en la present tesi doctoral amb l'anàlisi de vins i d'aiguardents de canya de sucre.

Tot seguit, es presenta l'article de revisió bibliogràfica que porta per títol "*Electronic noses in the quality control of alcoholic beverages*", publicat a la revista *Trends in Analytical Chemistry*, 24 (2005) 57-66. En aquest es presenta una visió general dels diferents instruments desenvolupats, fent un especial èmfasi en els avantatges i inconvenients de cadascun, així com també es fa un recull de les diferents aplicacions que s'han desenvolupat en el camp de les begudes alcohòliques.

*ELECTRONIC NOSES IN THE QUALITY CONTROL OF ALCOHOLIC
BEVERAGES*

Trends in Analytical Chemistry, 24 (2005) 57-66

Electronic noses in the quality control of alcoholic beverages

M. Pilar Martí, Ricard Boqué, Olga Busto, Josep Guasch

In the last 20 years, there has always been research into electronic noses with the main aim of achieving an instrument that can differentiate samples according to their complete volatile composition, quickly and objectively, so that quality in industry can be ensured and controlled. The electronic noses developed so far can be classified into two groups on the basis of their detection systems: classical instruments, which are based on solid state gas sensors, and new instruments, which are based on mass spectrometry (MS). In general, MS-based instruments have the advantage over the classical instruments (e.g., in stability, sensitivity and versatility). Furthermore, in the analysis of alcoholic beverages, the advantages of MS-based instruments are even more evident because the high ethanol content of the samples interferes with solid-state gas sensors.

This article presents an overview of electronic nose applications in the field of alcoholic beverages. We describe the electronic noses that have been developed and discuss their advantages and disadvantages.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Alcoholic beverages; Electronic nose; Gas sensors; Mass spectrometry; Multivariate analysis

M. Pilar Martí, Olga Busto,
Josep Guasch*
Departament de Química
Analítica i Química Orgànica,
Unitat d'Enologia (CeRTA),
Facultat d'Enologia, Universitat
Rovira i Virgili, Av. Ramón y
Cajal, 70, E-43005 Tarragona,
Catalonia, Spain

Ricard Boqué
Departament de Química
Analítica i Química Orgànica,
Facultat de Química,
Universitat Rovira i Virgili, Pl.
Imperial Tàrraco, 1, E-43005
Tarragona, Catalonia, Spain

*Corresponding author.
Tel.: +34 77 250 000;
Fax: +34 77 250 347;
E-mail: qenol@fe.urv.es

1. Introduction

Food aroma, in most cases, is composed of complex mixtures of hundreds of volatile organic compounds with different sensory and chemical properties. Subtle differences in the relative amounts of these compounds can often determine the smell of the product. However, not all the volatile compounds contribute to sample aroma. The contribution of each compound depends on its concentration and its sensory threshold (the minimum concentration that can be perceived by the human nose). The ratio between these two parameters is defined as the odor activity value (OAV). When the OAV of a compound is greater than 1, it will contribute to food aroma [1].

The human nose is still the most commonly used "instrument" in many industries for evaluating the quality of food odor. It is certainly the most appropriate because the complexity of most food

aromas means that they are very difficult to characterize with conventional flavor analysis techniques, such as gas chromatography (GC) or gas chromatography olfactometry (GCO) [2]. However, sensory analysis by a panel of experts is a costly process for industries because it requires trained people who can work for only relatively short periods of time. There are also other problems, such as the subjectivity of human response to odors and the variability between individuals. Consequently, there is enormous demand for an instrument that can overcome the problems of human sensory panels.

The earliest publications about instruments for odor assessment appeared at the beginning of the 1980s [3]. The main purpose of the new research was to develop an instrument that could mimic the human sense of smell and provide rapid sensory information (e.g., differences and similarities among samples, and presence of aromatic defects).

Instruments were thus designed on the basis of how the human olfactory system operated. When we smell something, we breathe the volatile compounds into the nose, where they interact with receptor proteins in the cell membrane. Then, it is thought that a chain of molecular events encodes most of the information about the quality and concentration of each odoriferous compound in the output signals of the olfactory receptor cells. Finally, this olfactory information is sent to the brain, where it is transformed into a unified sensory experience that is associated with previous experiences [4]. It is surprising that the sensitivity of the human nose does not come from the binding constants of the receptors in the primary olfactory-receptor cells. It is the amplification processes and the subsequent neural

processing (which occurs in the brain) that are responsible for noise reduction, drift elimination, sensitivity enhancement by approximately three orders of magnitude and discrimination between thousands of odors [5]. Similarly, in the instruments developed, the volatile compounds interact with an array of gas sensors. Each gas sensor responds more selectively to a certain group of chemical compounds but also shows a broad, overlapping response to the others (cross-selectivity). In this way, a small number of gas sensors (usually 8–32) can respond to a variety of different complex odors and there is no need to have one specific sensor for each individual compound. In a subsequent step, the data are processed with chemometric techniques in order to compare and/or to classify the samples according to their volatile composition. This technique does not provide information on the amounts of the individual aroma compounds; rather, it makes a global, qualitative estimation of the aroma profile. In this respect, it is similar to human olfactory perception.

“Electronic nose” (e-nose) is the term most commonly used in the literature to refer to this type of instrument, although other terms are also used, such as artificial nose, mechanical nose, odor-sensing system or electronic olfactometry. Gardner and Bartlett [3] defined the e-nose as “an instrument, which comprises an array of electronic chemical sensors with partial specificity and an appropriate pattern-recognition system, capable of recognizing simple or complex odors”. Although the definition was appropriate at that time, nowadays it does not include all the e-nose systems that are available on the market. At the end of the 1990s, a new type of e-nose based on MS was developed [6]. Even though some researchers do not consider that the MS-based system is an e-nose [7], the purpose of this new instrument, like the classical ones, is to differentiate and subsequently to classify samples according to their volatile composition in a fast, simple way.

This article presents the state of the art of the various e-noses, with particular reference to the field of food analysis, and gives an overview of the applications developed in the quality control (QC) of alcoholic beverages.

2. Instrumental aspects

The general principle of the e-nose technique is that the volatile compounds in the headspace of the sample are introduced into a detection system. Then, for each sample analyzed, the detector generates a set of signals that contains the information about the volatile composition of the sample. This set of signals is like a “fingerprint” of the sample analyzed. When several samples are analyzed, a data matrix is generated that is subsequently treated with chemometric techniques so that the samples can be

compared on the basis of their volatile composition, and classified or discriminated depending on their origin, variety, purity, ripeness, aging, or any other property of interest. When these statistical techniques are used, it should be borne in mind that results will be reliable only if a significant number of samples of the different categories of the property of interest are analyzed. However, this is not a drawback, because e-noses are simple to use and provide fast responses.

An e-nose is therefore a union of three elements: the sample handling system; the detection system; and, last but by no means least, the data analysis system. In this section, we describe the underlying techniques on which each of these three elements is based. We also explain their advantages and disadvantages with particular reference to the field of food analysis.

2.1. Sample handling

As mentioned above, speed and simplicity are two important characteristics of e-noses. Sample handling is therefore a critical step that depends on the technique chosen to extract the volatile compounds from the sample. Static headspace (SHS) is the most common technique (see Tables 1 and 2) because it is very simple to use. Sample temperature, equilibration time, vial size and sample quantity are the main parameters that have to be optimized. Because of the poor repeatability of manual headspace injection, it is recommended that an automatic HS sampler be used. In some applications a vapor-flow system [8–10] has been used, and has provided better control than manual headspace injection of the operating temperature and the amount of analyte that is introduced into the detector.

For some applications, the SHS technique has the drawback of low sensitivity because the volatile compounds are not preconcentrated. To increase the sensitivity, the dynamic headspace (DHS) technique has been used in some applications [11–13]. Although DHS improves the sensitivity of the system, it introduces a supplementary step in the method, which increases the time of analysis. Moreover, analytical artifacts (memory effects, bleeding or irreversible adsorption) are generated in some cases.

Another extraction technique is solid-phase micro-extraction (SPME) [11,14–16]. This technique has a considerable concentration capacity and it is very simple because, unlike DHS, it does not require especial equipment [17].

Even though it has been developed only recently, stir bar sorptive extraction (SBSE) is a promising extraction technique when very high sensitivity is required [18].

Although, a priori, any sampling headspace technique can be used as the sample-handling part of an e-nose, the choice must be made with care and take into account the type of sample and the method specifications required.

Table 1. Main applications of e-noses based on gas sensors in alcoholic beverage analysis (chronological order)

Year	Sample	Number of samples	Type of study	Extraction system ^a	Detector system ^b	Data treatment ^c	Ref.
1991	Whisky	5	Differentiation of five Japanese whiskies	Vapor-flow system	QMB	ANN	[8]
1991	Wine, Beer, Spirits	8	Differentiation of seven kind of alcoholic beverages	DHS	MOS	PCA, HCA	[37]
1991	Whisky, Cognac	5	Classification of four different whiskies and one cognac	DHS	MOS	LDA	[37]
1992	Beer	3	Differentiation of three beers	Vapor-flow system	MOS	ANN	[9]
1993	Brandy, Gin, Spirit	4	Differentiation of two brandies, a gin and a spirit	SHS	CP	PCA	[40]
1995	Wine	4	Differentiation of wines of four different vintages	SHS	MOS	PCA	[31]
1996	Wine	4	Differentiation of wines coming from four different vineyards	SHS	MOS	ANN	[32]
1998	Beer	4	Differentiation of beer samples spiked with three different compounds	Vapor-flow system	CP	PCA, DFA, ANN	[10]
2000	Beer	8	Differentiation of eight different beer brands	SHS	QMB	PCA	[34]
2000	Wine	5	Differentiation of wines of five different varieties	SHS	MOS	PCA	[34]
2000	Wine	3	Differentiation of wines from three different origins	DHS	CP	PCA	[35]
2001	Cocoa Liquor	30	Differentiation of cocoa liquors from different origin	SHS	CP + QMB + MOS	PCA	[33]
2001	Wine	3	Differentiation of wines from three different origins	SPME	CP	PCA	[36]
2001	Wine	2	Differentiation of two red wines of different ageing	SPME	CP	PCA	[36]
2002	Wine	10	Monitoring of the aroma profile evolution during the alcoholic fermentation of one sample	SHS	CP	PCA	[38]

^aDHS: Dynamic headspace; SHS: Static headspace; SPME: Solid-phase microextraction.
^bQMB: Quartz microbalances; MOS: Metal oxide semiconductors; CP: Conducting polymers.
^cANN: Artificial neural networks; PCA: Principal component analysis; HCA: Hierarchical cluster analysis; LDA: Linear discriminant analysis; DFA: Discriminant function analysis.

2.2. Detection system

In many ways, the detection system is the main part of an e-nose, so e-noses can be classified into two groups according to the detection system based on: gas sensors; and, MS. In this section, these two technologies are described and their advantages and disadvantages are discussed.

2.2.1. Gas sensors. As explained above, gas-sensor e-noses operate on the basis of physical and/or chemical interactions of the volatile compounds with an array of solid state gas sensors, each of which has a partial specificity. Ideally, the sensors should fulfill a number of requirements, such as broad selectivity, high sensitivity, robustness, stability, rapid response and rapid recovery times. Moreover, if they are used in poorly controlled environments, they will be required to have a low sen-

sitivity to environmental variables, such as temperature and humidity. Although no single technology fulfils all these requirements at the moment, a range of sensor technologies has been reported for e-nose applications [19].

Current gas sensors can also be divided into two main groups according to the working temperature [20]: high temperatures (175–450°C); and, room temperatures. Of the former, metal-oxide semiconductors (MOSs) are probably the most widely used in e-nose applications. They display a high level of sensitivity for a range of organic vapors and provide perhaps the best balance between drift, lifetime and sensitivity [21].

However, an important disadvantage of MOS devices is the logarithmic dependence of the sensor response on the gas concentration. This causes problems in the presence of high concentrations of detectable species

Table 2. Applications of MS-based e-noses in alcoholic beverage analysis (chronological order)

Year	Sample	Number of samples	Type of study	Extraction system ^a	Detector system ^b	Data treatment ^c	Ref.
2002	Sugar-cane spirits	13	Calibration of aging time in oak barrels	SHS	MS	PLS	[42]
2002	Whisky	6	Detection of adulteration	SHS, SBSE	MS	PCA, SIMCA, PCR	[18]
2002	Beer	5	Differentiation of 5 different German beers	SPME	MS	PCA	[43]
2003	Wine	18	Calibration of TCA concentration	SHS	MS (SIM)	PLS	[26]
2003	Wine	4	Differentiation of wines of two different varieties	SHS	MS	PCA	[44]
2004	Wine	209	Differentiation of wines of three different varieties	SHS	MS	PCA, SIMCA	[41]
2004	Wine	25	Differentiation of wines of two different origins	SHS	MS	PCA, SIMCA	[41]
2004	Wine	131	Differentiation of wines with four different aging times	SHS	MS	PCA, SIMCA	[41]

^aDHS: Dynamic headspace; SHS: Static headspace; SPME: Solid-phase microextraction.
^bQMB: Quartz microbalances; MOS: Metal oxide semiconductors; CP: Conducting polymers.
^cANN: Artificial neural networks; PCA: Principal component analysis; HCA: Hierarchical cluster analysis; LDA: Linear discriminant analysis; DFA: Discriminant function analysis.

(e.g., ethanol in alcoholic beverages). Other potential problems have also been reported when MOS devices are used with food products (e.g., the baseline recovery is slow when they are exposed to high molecular weight compounds or they are susceptible to poisoning by sulphur-containing species or by weak acids [21]).

Of the sensors that operate at room temperature, conducting polymer (CP) sensors are most commonly used. Their selectivity is generally better than that of MOS sensors and they are relatively resistant to poisoning. But the polymer response is sensitive to humidity. This is an important drawback when water is a major component of the sample headspace, because it can act as a serious interference, even when the conditions are rigorously controlled.

The quartz crystal microbalances (QMBs) and the surface acoustic wave transducers (SAWs), both of which are acoustic wave devices, appear to be highly promising. Their sensitivity is at the $\mu\text{g/l}$ level whereas the sensitivities of MOS and CP sensors are at the mg/l level [20]. However, acoustic wave devices, like other technologies, still have several problems that need to be addressed (e.g., poor batch-to-batch reproducibility during manufacture and dependence of the response on temperature [21]).

Finally, fiber-optic chemical sensors are small, simple to fabricate, inexpensive and can be made with a wide range of coatings. It should be pointed out that their response is fast. Whereas the response time of other types of gas sensors is several minutes, the response time of

fiber-optic chemical sensors is between 100 ms and 3 s. However, the lifetime of these sensors is limited by photobleaching processes. Moreover, the optical format also requires relatively sophisticated instrumentation to be used [5].

At first, e-noses tended to be based on an array of gas sensors of the same type, but practical experience has shown that often this does not produce enough information for many real-world problems. Increasingly, the tendency is to combine different types of gas sensors to produce hybrid systems. However, this involves more complex electronics and it is then necessary to normalize or standardize the different sensor outputs [21].

Despite the considerable number of applications that appear in food-analysis literature [5,20–22], much development is still required before e-noses based on gas sensors can reach their full potential.

2.2.2. MS. E-noses based on MS were developed only a few years ago [6]. This new instrument introduces the volatile compounds into the ionization chamber of a MS instrument without prior chromatographic separation [17,23]. The mass spectrum obtained results from the simultaneous ionization and fragmentation of all the volatile compounds. Each fragment ion (m/z ratio) represents a "pseudo sensor" and its abundance is equivalent to the sensor signal. Therefore, the number of "pseudo sensors" in MS-based e-noses is much larger than in gas-sensor-based e-noses. Moreover, by selecting the optimum set of fragment ions (the optimum "sensor

array”), the instrument can be tailored to particular applications with successful discriminations. The selection of particular fragment ions may be based on knowledge of the headspace composition – analytical chemistry can provide the necessary tools to characterize the samples – or on the results of mathematical feature extraction. The sensitivity and the selectivity of the instrument can be improved using MS in the selected ion monitoring (SIM) mode.

Another important advantage is that these “pseudo sensors” contain chemical information about the sample. So, information about what kinds of compounds are responsible for the differences between samples can be obtained from the ion-fragmentation patterns. These results can then be compared directly with the results obtained from conventional GC–MS instruments.

Furthermore, more specific information about the molecular origin of the fragment ions can be provided by using an interface that permits soft ionization of the molecules at atmospheric pressure instead of electronic impact ionization at 70 eV, which is the most common type of ionization, in association with a time-of-flight (TOF) analyzer [17]. Results can be similar with chemical ionization because it does not fragment the analytes so much.

In some cases, these strategies improve the classification or prediction results [24]. Alternatively, the quality of spectral fingerprints can be enhanced by modifying the ionization energy level in an electronic impact configuration. It has been shown that, in general, the total abundance of the mass fragments and the discriminating power of the mass spectra increase with the ionization energy level. However, the energy level that yields the best signal-to-noise ratios depends on the material studied [25].

It is interesting that a GC–MS instrument can be used as an e-nose by simply using an uncoated deactivated retention gap as a transfer line between the sample-handling device and the detector instead of the chromatographic column. In this way, all the compounds are introduced into the MS rapidly and simultaneously, because there is no chromatographic separation.

An e-nose configuration can also be achieved by applying strong chromatographic conditions (high temperature and high carrier gas flow) to an analytical capillary column. With this configuration, it is easy to switch from a GC–MS working as an e-nose to a conventional GC–MS, simply by changing the temperature program and the column-gas flow.

Another advantage of using a chromatographic column is that a minimum separation can be carried out that might help to uncover minor differences in trace components that would otherwise be masked by other constituents with higher concentrations. This strategy has been shown to improve classification and prediction results [26].

Despite the great potential of the MS-based e-noses in the field of food analysis, there are still some aspects of the technique that need to be improved. Signal instability is one of the problems of MS-based e-noses that has not yet been solved completely. It causes the mass spectrum of a sample to change when the same sample is analyzed some days later. Many factors contribute to signal instability and their origin can be found in the MS itself (e.g., gradual fouling of the ion source, vacuum instability, aging of the ion multiplier, and change of a filament).

Strategies such as internal standardization have been used to correct signal instability. This involves dividing the abundance of each fragment ion (mass intensity) by the intensity of one fragment ion of an internal standard that has been added to the samples [15]. The problem of this strategy lies in finding a suitable internal standard, which must have a fragmentation pattern that does not interfere with the sample profile. Furthermore, internal standardization is very difficult in the case of solid samples. One way of correcting mass spectra in solid samples is the standard gas-addition technique [27], which introduces a very small quantity of xenon continuously into the MS source. Then, the abundance of each mass-fragment ion in the spectrum of the product analyzed is normalized with respect to the abundance of xenon measured during the analysis.

Sometimes, sensitivity changes are not constant along the mass axis and the signal increases differently for some fragment ions or even decreases for others. In such cases, internal standardization and standard gas-addition techniques cannot solve the problem of signal instability and calibration transfer techniques have to be used.

Calibration transfer is based on the signal variation observed for a set of reference samples that must be analyzed together with the problem samples [28]. Then, when a new set of samples is analyzed, the mass spectrum of each sample is corrected taking into account the changes in the mass spectra of the reference samples. This requires an additional set of samples to be analyzed at regular intervals, which is not a big drawback because the MS-based e-nose technique is rapid. The main problem is the management of the reference samples (selection, physical and chemical stability, and storage), especially in food analysis.

Another problem of the MS-based instruments is the difficult of portability, which is a disadvantage in on-line or *in situ* applications.

2.3. Data-analysis techniques

The first step in data analysis is to pre-process the signals generated by the gas sensors or the MS. This process transforms the data into their most appropriate form and enhances the features within the data that are useful in the subsequent steps. The pre-processing steps include mass-spectra normalization, baseline correction, and noise reduction or variable weighing, among others

[29]. Afterwards, pre-processed data are analyzed by various chemometric techniques, which are available in statistical software packages that are usually included in the instrument.

The chemometric techniques used include unsupervised and supervised pattern recognition (PR) techniques. The former reveal natural groupings of the samples in the data set and also detect outlying samples. Hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) are the most commonly used unsupervised PR techniques.

Figs. 1 and 2 show the results of applying PCA and HCA, respectively, to the data we obtained from analyzing brandies of different ages from Jerez using an MS-based e-nose. In increasing order of age, the brandies are Solera, Solera Reserva and Solera Gran Reserva. Fig. 1 shows that the brandies cluster according to the aging time. In HCA, the relationships between samples are presented in the form of a hierarchical tree (dendrogram) and the length of the branches linking two clusters is related to their similarity: the shorter the branch, the greater the similarity between samples or clusters of samples. Fig. 2 shows that the Solera brandies are completely different (similarity 0) from the rest of the samples and that one of the sets of Solera Gran Reserva brandies is more similar to the Solera Reserva than to the other Solera Gran Reserva brandies.

In the supervised PR techniques, class membership is known in advance. The aim of these techniques is to build a model to discriminate between several predefined classes or to assign an "unknown" sample to a given predefined class. Soft independent modeling of class analogy (SIMCA), K-nearest neighbors (KNN), linear discriminant analysis (LDA) or discriminant function

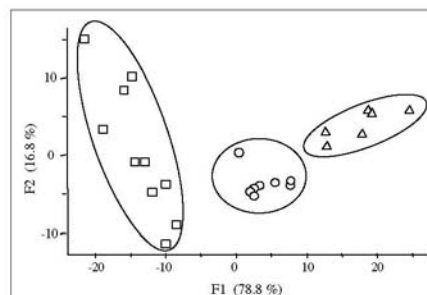


Figure 1. PCA score plot obtained in the analysis of different aged brandies using an MS-based e-nose. Brandies: Solera (Δ); Solera Reserva (\circ); Solera Gran Reserva (\square).

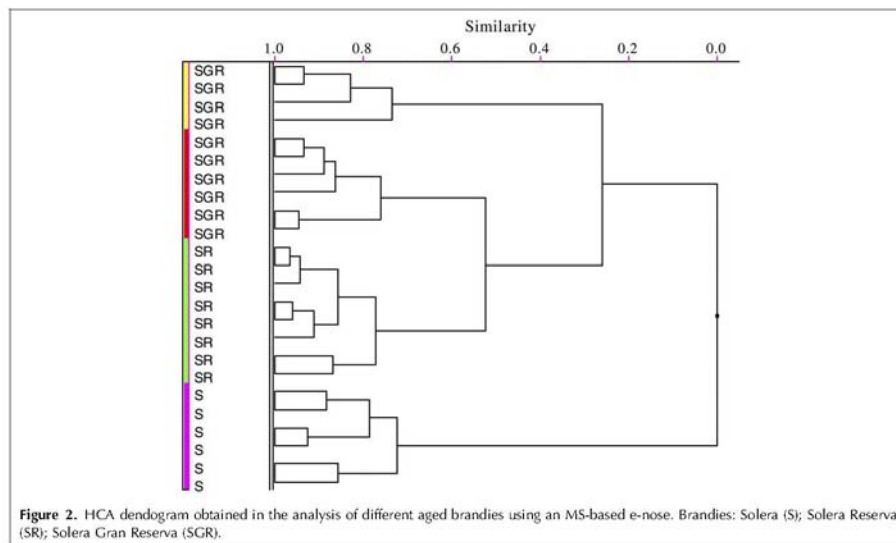


Figure 2. HCA dendrogram obtained in the analysis of different aged brandies using an MS-based e-nose. Brandies: Solera (S); Solera Reserva (SR); Solera Gran Reserva (SGR).

Table 3. Results of the SIMCA model of brandies with different aging times

Classes	Interclass distance
Solera/Solera Reserva	3.4
Solera/Solera Gran Reserva	11.5
Solera Reserva/Solera Gran Reserva	6.0

analysis (DFA) are the supervised PR techniques that are most commonly used. Table 3 shows the results obtained when the SIMCA technique was applied to the data found for the brandies. The interclass distance of a SIMCA model is a useful measure of class separation. Therefore, taking into account that an interclass distance above 3 indicates a good differentiation between classes [24], it can be concluded that the SIMCA model is able to differentiate brandies with different aging times.

Finally, when the purpose of the analysis is to predict a continuous property (e.g., analyte concentration or aging time), regression methods are required, such as partial least squares (PLS) or principal component regression (PCR).

When the instrumental responses recorded are linear, as in MS-based e-noses, all the aforementioned statistical methods give very good results. However, in gas-sensor-based e-noses, instrumental responses are essentially non-linear. In such cases, input data must be transformed into linear responses before applying the chemometric techniques described above. The use of artificial neural networks (ANNs) is another alternative for analyzing e-nose non-linear data [20].

3. MS vs. gas sensors in the analysis of alcoholic beverages

As shown in the previous section, MS-based e-noses have several advantages over the classical gas-sensor-based e-noses. In the analysis of alcoholic beverages, MS-based e-noses have an additional advantage because ethanol interferes with gas sensors but not with MSs. This section gives an overview of the applications developed in the analysis of alcoholic beverages and discusses the potential of the technique in this field.

3.1. Gas sensors

Food analysis is probably the field in which the greatest number of applications using e-noses have been developed. However, in alcoholic beverage research, few studies have been made with this type of instrumentation because of the problems that ethanol causes in gas sensors. In many cases, the high ethanol content of alcoholic beverages saturates the gas sensors and masks the response of the sensor array to other volatile compounds. Consequently, the samples may be differentiated

on the basis of variations in their ethanol content instead of variations in the contents of the volatile compounds that are responsible for the aroma. A hybrid e-nose that combines three different types of sensors (MOS, CP and QMB) has been used to show that it is impossible to distinguish a reference solution with an ethanol content of 12% from the same solution that also has 1 g/l of acetic acid or 300 mg/l of ethyl acetate [30]. It is well known that a wine with these concentrations of acetic acid and ethyl acetate – indicating high volatile acidity, surely caused by bad storage of the product – is unacceptable.

Table 1 shows the main alcoholic beverage applications using e-noses based on gas sensors. Some studies, have not taken the ethanol content of the samples into account [8–10,31–33] and, as mentioned above, this may distort the interpretation of the results.

Several strategies have been developed to decrease the ethanol content of the samples and increase the concentration of the other volatile compounds before the analysis with an e-nose. Heberle et al. [34] proposed using a chromatographic column between the HS sampler and the sensor array to separate the ethanol from the other volatile compounds. Other strategies have been to use extraction and concentration techniques, such as DHS and SPME, instead of the classical SHS [35–37]. It has been shown that these two techniques decreased the ethanol and water content of wine extracts and also increased the concentration of the other volatile compounds. This can be observed in Fig. 3, which shows the results of the PCA carried out on the data obtained from analyzing three different wines, water and an ethanolic solution (15% v/v) using an e-nose based on conducting polymer gas sensors [35]. The results shown in Fig. 3(a) were obtained using the SHS as the sample-handling technique. It can be observed that the sensors were capable of distinguishing only the water vapor from the rest of the samples. However, when the DHS technique was used (Fig. 3(b)), the separation of the clusters was enhanced and the different samples could be discriminated.

A pervaporation technique was used by Pinheiro et al. [38] to monitor aroma production during wine-must fermentation. In this way, the aroma compounds were enriched relative to ethanol and, consequently, sample discrimination was improved. In this selective membrane separation process, the aroma compounds are concentrated in the permeate because the membrane has a greater affinity for these compounds than for ethanol and even less for water [30]. In a wine classification study using e-noses based on MOS sensors, Fort et al. [39] applied the same separation technique to water solutions spiked with ethanol and other volatile compounds.

Although all these strategies improve the results of analyzing alcoholic beverages with e-noses based on gas sensors, the speed and the simplicity, two of the main

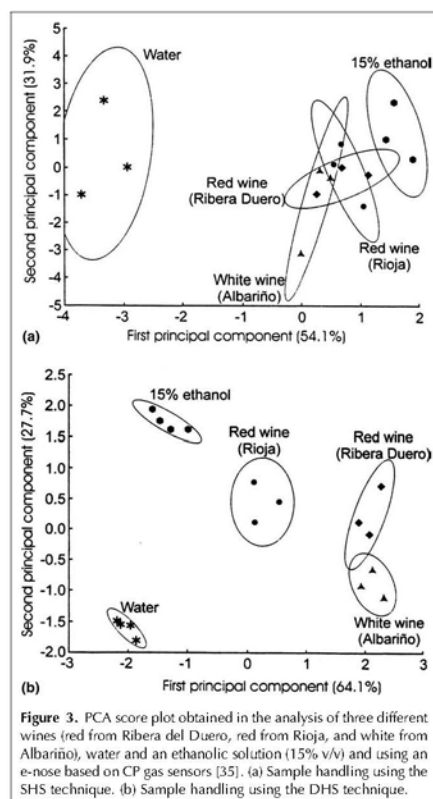


Figure 3. PCA score plot obtained in the analysis of three different wines (red from Ribera del Duero, red from Rioja, and white from Albariño), water and an ethanolic solution (15% v/v) and using an e-nose based on CP gas sensors [35]. (a) Sample handling using the SHS technique. (b) Sample handling using the DHS technique.

advantages of the e-nose systems, are compromised. Slater et al. [40] avoided the ethanol problem by making the ethanol concentration the same in all the samples. However, if this strategy is to be successfully applied, the ethanol content of each sample must be known.

3.2. MS

The most recently developed MS-based e-noses are promising instruments for the analysis of alcoholic beverages because ethanol does not cause saturation problems in the MS, unlike in gas sensors. However, the ethanol fragment ions are much more abundant than the fragment ions of the other volatile compounds. As a consequence, when the chemometric analysis is performed, samples may be differentiated by their ethanol content alone. This problem can easily be

solved if the fragment ions corresponding to ethanol are not included in the fragment-ion range selected for the MS analysis.

Table 2 shows the applications developed using this new generation of instruments in the field of alcoholic beverages. An e-nose consisting of an SHS autosampler and an MS was successfully applied to differentiate and to classify wines according to various oenological parameters [41]. Fig. 4 shows the results of the PCA carried out on the data obtained from analyzing different wines. It can be observed that wines cluster according to their origin. It should be pointed out that a considerable number of wines were analyzed during these studies (Table 2). This was possible because the total run-time analysis of a sample by an MS-based e-nose is around 5 min. Such a short time makes it possible to analyze the large number of samples necessary for obtaining reliable results in the chemometric data analysis.

MS-based e-noses have also been shown to be suitable for making quantitative analyses of alcoholic beverages. A multivariate calibration was carried out to determine the concentration of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) in wines [26]. This compound is the main cause of a wine off-flavor known as "cork taint". The method developed made it possible to carry out a fast screening of the TCA content in wines. The high sensitivity of the technique when the detector is used in SIM mode enabled the concentration to be determined at ultratrace (sub- $\mu\text{g/l}$) levels with suitable performance parameters (calibration and prediction errors of around 0.44 and 0.74 $\mu\text{g/l}$, respectively). Another quantitative study was carried out with Cuban sugar-cane spirits to determine the aging time of the samples in oak barrels [42]. Fig. 5 shows that there was a good fit between the number of months of aging predicted by the PLS model and the actual number of months of aging of the samples. The sugar-cane spirits were also sensorily evaluated by a panel of trained judges. The correlation between the

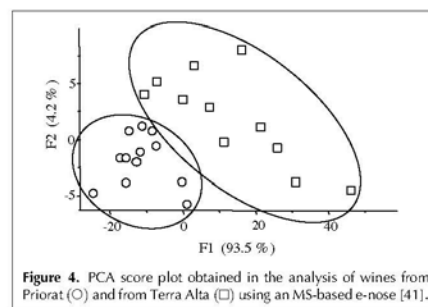


Figure 4. PCA score plot obtained in the analysis of wines from Priorat (○) and from Terra Alta (□) using an MS-based e-nose [41].

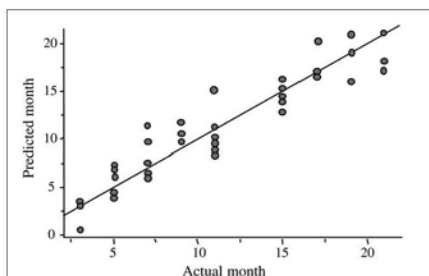


Figure 5. Aging time of sugar-cane spirit samples predicted by a PLS model vs. actual aging time of the samples [42].

sensory data and the MS signal was good and this made it possible to accurately predict panelists' scores [42].

Since MS-based e-noses have been developed recently, few studies on alcoholic beverages have yet been carried out. However, these studies show that the technique has considerable potential in this field. The simplicity and the speed of analyzing complex samples are important advantages over the classical chromatographic techniques and also over sensory analysis in quality-control applications.

3.3. MS vs. gas sensors

There is no doubt that MS-based systems have considerable advantages over the commonly used gas-sensor arrays, in terms of adaptability and sensitivity. With regard to adaptability, when a classical e-nose is purchased, the number and the type of gas sensors that have to be incorporated must be specified, taking into account the possible applications that will be carried out with the instrument. With the MS pre-configuration, this is unnecessary and the instrument can be tailored to particular applications simply by selecting the optimum set of fragment ions. In fact, as explained above, any conventional GC-MS can be used as an e-nose device. An optimal instrument configuration also allows the same instrument to be used as a rapid screening tool (e-nose) and also as a research tool for revealing further chemical information about doubtful samples. Therefore, an MS-based e-nose can be used to determine not only if one sample is different from another, but also why it is different.

Sensitivity often prevents gas-sensor-based e-noses from being used in the field of alcoholic beverages because gas sensors are often subject to interferences from the water and ethanol in the sample, which reduces the sensitivity to other constituents. Furthermore, the signal of the sensors often takes a long time

to recover before it can analyze the next sample, which involves a very long real run-time analysis for each sample.

Long term stability – which is of major importance in routine measurements – is, in general, an unresolved problem in e-nose devices. Gas sensors are known to be subject to short-term and long-term drift because of changes (e.g., in relative humidity, and temperature). In addition, individual sensors have to be replaced periodically, which contributes to the instability of the technique and involves continually carrying out instrument calibrations. Even though the problem of signal stability is less pronounced in MS-based e-noses, it is still important in the long term. As has been discussed above, various strategies (internal standardization, standard gas addition and calibration transfer) have been developed to solve this problem. However, considerable research is still necessary, mainly to model sensitivity changes that affect each fragment ion in a different way. Calibration transfer techniques seem to be the most suitable solution to this problem even though they involve additional work.

4. Conclusions

There is no doubt about the great potential of the e-nose technique in the QC of foods and, particularly, in the QC of alcoholic beverages. However, because of the interferences that ethanol causes in gas sensors, the success of the results obtained in alcoholic beverages applications can be very different depending on the type of instrument used.

Although some strategies have been developed to solve the ethanol problem in gas-sensor-based e-noses, they compromise the speed and the simplicity of the technique. On the other hand, MS-based e-noses are promising instruments for the analysis of alcoholic beverages.

In general, MS-based instruments have clear advantages over gas-sensor-based instruments (e.g., in stability, sensitivity and versatility). Furthermore, taking into account that "pseudo sensors" (fragment ions) contain chemical information about the sample, the information that can be obtained with an e-nose improves substantially with the MS-based devices. Perhaps the main drawback of the MS-based e-noses is price because they are much more expensive than gas-sensor-based instruments. However, the adaptability and the versatility of MS-based e-noses are also much more greater and, consequently, the same instrument can be used for very different applications. In some cases where on-line use and portability is a requirement, gas sensors have clear advantages over the MS-based instruments.

A good approach could therefore be to consider gas-sensor-based e-noses for screening purposes and MS-based sensors for confirmatory purposes.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología for providing Mrs. Martí's doctoral fellowship and the Ministerio de Ciencia y Tecnología/INIA (project VIN00-045) for their financial support.

References

- [1] B.S. Mistry, T. Reineccius, L.K. Olson, in: R. Marsili (Editor), *Techniques for Analyzing Food Aroma*, Marcel Dekker Inc, New York, USA, 1997, p. 265.
- [2] I. Blank, in: R. Marsili (Editor), *Techniques for Analyzing Food Aroma*, Marcel Dekker Inc, New York, USA, 1997, p. 293.
- [3] J.W. Gardner, P.N. Bartlett, *Sens. Actuators, B* 18 19 (1994) 211.
- [4] G.A. Bell, *Trends Food Sci. Technol.* 7 (1996) 425.
- [5] T.A. Dickinson, J. White, J.S. Kauer, D.R. Walt, *Tibtech* 16 (1998) 250.
- [6] B. Dittmann, S. Nitz, G. Horner, *Adv. Food Sci.* 20 (1998) 115.
- [7] P. Mielle, F. Marquis, C. Latrasse, *Sens. Actuators, B* 69 (2000) 287.
- [8] T. Nakamoto, A. Fukuda, T. Morizumi, Y. Asakura, *Sens. Actuators, B* 3 (1991) 221.
- [9] H.V. Shurmer, J.W. Gardner, *Sens. Actuators, B* 8 (1992) 1.
- [10] T.C. Pearce, J.W. Gardner, *Analyst (Cambridge, UK)* 123 (1998) 2057.
- [11] E. Schaller, S. Zehhäusern, T. Zesiger, J.O. Bosset, F. Escher, *Analisis* 28 (2000) 743.
- [12] C. Pérès, C. Denoyer, P. Tournayre, J.L. Berdagué, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1386.
- [13] N. Boudaoud, L. Eveleigh, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1530.
- [14] R.T. Marsili, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 648.
- [15] R.T. Marsili, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 3470.
- [16] C. Pérès, C. Viallon, J.L. Berdagué, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1030.
- [17] C. Pérès, F. Begnaud, L. Eveleigh, J.L. Berdagué, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 858.
- [18] V.R. Kinton, E.A. Pfannkoch, *Gerstel Application Note* 9/2002, 2002. Available from: <<http://www.gerstel.com/>>.
- [19] E. Zubritsky, *Anal. Chem.* 72 (2000) 421A.
- [20] C. García, M.E. Fernández, J.L. Pérez, B. Moreno, *Química Analítica* 20 (2001) 3.
- [21] D.J. Strike, M.G.H. Meijerink, M. Koudelka-Hep, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 364 (1999) 499.
- [22] J.W. Gardner, K.C. Persaud (Editors), *Electronic Noses and Olfaction 2000*, IOP Publishing, Bristol, UK, 2000.
- [23] B. Dittmann, S. Nitz, *Sens. Actuators, B* 69 (2000) 253.
- [24] R. Marsili, in: R. Marsili (Editor), *Flavor Fragrance and Odor Analysis*, Marcel Dekker Inc, New York, USA, 1992, p. 349.
- [25] F. Begnaud, J.L. Berdagué, *Sens. Actuators, B* 81 (2002) 351.
- [26] M.P. Martí, R. Boqué, M. Riu, O. Busto, J. Guasch, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 497.
- [27] C. Pérès, F. Begnaud, L. Eveleigh, J.L. Berdagué, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2279.
- [28] J.L. Pérez, M. Del Nogal, C. García, M.E. Fernández, B. Moreno, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6361.
- [29] F. Brakstad, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 29 (1995) 157.
- [30] E. Privat, S. Roussel, P. Grenier, V. Bellon-Maurel, *Sci. Aliments* 18 (1998) 459.
- [31] C. Di Natale, F.A.M. Davide, A. D'Amico, G. Sberveglieri, P. Nelli, G. Faglia, C. Perego, *Sens. Actuators, B* 24 25 (1995) 801.
- [32] C. Di Natale, F.A.M. Davide, A. D'Amico, P. Nelli, S. Groppelli, G. Sberveglieri, *Sens. Actuators, B* 33 (1996) 83.
- [33] C. Nicolas-Saint Denis, P. Visani, G. Trystam, J. Hossenlopp, R. Houdard, *Sci. Aliments* 21 (2001) 537.
- [34] I. Heberle, A. Liebming, U. Weimar, W. Göpel, *Sens. Actuators, B* 68 (2000) 53.
- [35] A. Guadarrama, J.A. Fernández, M. Isimniguez, J. Souto, J.A. de Saja, *Anal. Chim. Acta* 411 (2000) 193.
- [36] A. Guadarrama, J.A. Fernández, M. Isimniguez, J. Souto, J.A. de Saja, *Sens. Actuators, B* 3894 (2001) 1.
- [37] T. Aishima, *Anal. Chim. Acta* 243 (1991) 293.
- [38] C. Pinheiro, C.M. Rodrigues, T. Schäfer, J.G. Crespo, *Biotechnol. Bioeng.* 77 (2002) 632.
- [39] A. Fort, N. Machetti, S. Rocchi, B. Serrano, L. Tonà, N. Ulivieri, V. Vignoli, G. Sberveglieri, *IEEE Trans. Instrum. Meas.* 52 (2003) 921.
- [40] J. Slater, J. Paynter, E. Watt, *Analyst (Cambridge, UK)* 118 (1993) 379.
- [41] M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A*, 1057 (2004) 211.
- [42] M.P. Martí, J. Pino, R. Boqué, O. Busto, J. Guasch, 10as Jornadas de Análisis Instrumental (Internacional Symposium), Barcelona, 2002, p. 107.
- [43] B. Kolahgar, A.C. Heiden, *Gerstel Application Note* 11/2002, 2002. Available from: <<http://www.gerstel.com/>>.
- [44] V.R. Kinton, E.A. Pfannkoch, M.A. Mabud, S.M. Dogar, A.C. Heiden, C. Gil, *Gerstel Application Note* 2/2003, 2003. Available from: <<http://www.gerstel.com/>>.

IV.2 ESTUDI DEL POTENCIAL DEL NAS ELECTRÒNIC EN EL CONTROL DE QUALITAT DEL VI

Tal com s'ha remarcat en l'apartat anterior, els nassos electrònics basats en l'MS presenten clars avantatges respecte els instruments més clàssics basats en sensors de gasos pel que fa a estabilitat, sensibilitat i versatilitat. En el camp de les begudes alcohòliques, però, aquests avantatges encara es fan més palesos a causa dels problemes que causa l'etanol en els sensors de gasos i que, a priori, no succeeixen, o es poden solucionar fàcilment, en els instruments basats en l'MS.

Tot i la recent aparició d'aquesta nova generació d'instruments, en el camp de l'anàlisi dels aliments són diverses les aplicacions desenvolupades. A la bibliografia es troben treballs en el control de qualitat de formatges [57-60], llet [17, 18], olis [61, 62], suc de fruita [63], preparats de llet infantil [64], fruita [65], tomàquets [66] i mel [67]. En el cas de les begudes alcohòliques, una de les empreses que comercialitza aquest tipus d'instruments, ha publicat recentment alguns treballs que deixen entreveure el potencial d'aquesta tècnica en el control de qualitat de cervesa [52], vi [53] i whisky [20]. Però, en cap cas, són treballs rigorosos des d'un punt de vista analític, ja que el nombre de mostres que s'hi analitzen és molt limitat.

Preveient, doncs, el potencial que pot tenir aquesta tècnica en l'anàlisi del vi, en aquesta tesi s'ha estudiat l'aplicació d'un nas electrònic constituït per un sistema de mostreig d'espai de cap estàtic i un espectròmetre de masses (HS-MS) al control de qualitat del vi. Amb aquest objectiu, s'han realitzat estudis de diferenciació de vins segons el seu origen, la varietat del raïm, el temps d'envelliment, així com també s'ha fet un seguiment del procés de maduració del raïm i de vinificació per tal d'estudiar la utilitat de l'instrument en el control d'aquests processos.

A continuació es descriuen tots els treballs realitzats i es presenten els resultats obtinguts en cadascun d'ells. Al final d'aquest apartat s'adjunta l'article publicat al

Journal of Chromatography A, 1057 (2004) 211-217 i que porta per títol “*Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing*”, en el qual s’hi troben detallades les condicions experimentals de l’anàlisi i s’hi presenten els resultats més rellevants obtinguts en aquest estudi de l’aplicació del nas electrònic HS-MS al control de qualitat del vi.

IV.2.1 Materials i mètodes

Mostres

La fiabilitat dels resultats obtinguts amb un nas electrònic depèn, en gran mesura, del nombre de mostres que s’hagin analitzat i de la seva representativitat. Per tant, la primera tasca a realitzar per poder dur a terme el treball que s’havia plantejat, era aconseguir un nombre important de mostres representatives dels diferents paràmetres enològics que es volien estudiar. En el cas del vi, aquesta tasca és complicada perquè en les etiquetes dels vins comercials no sempre s’especifiquen les característiques del vi i la manera com ha estat elaborat. A més, en les que sí que ho especifiquen, moltes vegades no es té la certesa de que el que s’indica a l’etiqueta sigui del tot cert. Així doncs, amb l’objectiu d’aconseguir un nombre important de mostres fiables, es va contactar amb diferents Consells Reguladors de Denominacions d’Origen (D.O. Catalunya, D.O. Penedès, D.O. Priorat, D.O. Terra Alta, D.O. Tarragona, D.O. Conca de Barberà, D.O. Costers de Segre i D.O. Ribera del Duero), així com també es van establir convenis de col·laboració amb diferents cellers de la Rioja (Granja Nuestra Señora de Remelluri, C.V.N.E.) i de la Ribera del Duero (Dehesa de los Canónigos, Emilio Moro, Real Sitio de Ventosilla, Marqués de Velilla).

Les mostres es van analitzar amb el nas electrònic en ordre aleatori per evitar que possibles errors sistemàtics de l’instrument induïssin a errors en la interpretació

dels resultats. L'anàlisi de les mostres es va dur a terme per triplicat. Abans, però, d'aplicar les tècniques quimiomètriques, es va fer la mitjana de les dades obtingudes amb els replicats, obtenint-se per a cada mostra un espectre de masses que era la mitjana dels tres espectres inicials obtinguts en l'anàlisi de les rèpliques. No obstant això, la primera anàlisi exploratòria de les dades es feia amb totes les rèpliques per tal de poder detectar si, en alguna mostra, l'anàlisi d'algun dels triplicats no havia sortit bé. Si es donava el cas, la rèplica errònia s'eliminava de la matriu de dades i es feia la mitjana amb les dues restants. Per altra banda, si es detectava en l'anàlisi d'agrupacions i en el PCA que les tres rèpliques diferien clarament de la resta de mostres, la qual cosa volia dir que aquella mostra era discrepant, o *outlier*, la mostra s'excloïa de la matriu de dades.

Un fet que es va observar ja en els primers estudis realitzats amb el nas electrònic HS-MS, era que si es duïa a terme una anàlisi exploratòria amb dades obtingudes en dies molt diferents, les mostres s'agrupaven segons el dia que havien estat analitzades. Aquest fet era a causa del problema comentat anteriorment de la inestabilitat del senyal amb el temps que presenten aquest tipus d'instruments. Després de detectar aquest problema, en cadascun dels estudis que es van realitzar, es van analitzar totes les mostres al mateix temps.

Instrumentació

Les anàlisis es van dur a terme amb una nas electrònic HS-MS compost d'un sistema de mostreig automàtic d'espai de cap estàtic (HS) Hewlett-Packard 7694 i un espectròmetre de masses (MS) amb analitzador de quadropol Hewlett-Packard 5973. En els primers estudis que es van realitzar, hi havia un acoblament directe del sistema d'espai de cap a l'espectròmetre de masses, de manera que els compostos volàtils extrets pel sistema de mostreig eren introduïts directament i de manera simultània a la font d'ionització de l'MS.

Aquesta configuració inicial de l'instrument, però, es va modificar amb l'objectiu de disposar d'un instrument més versàtil, introduint-hi un cromatògraf de gasos Hewlett-Packard 6890, de manera que la columna cromatogràfica actuava com a línia de transferència entre el sistema de mostreig i el detector. En aquesta segona configuració, que és amb la que es van fer la majoria de les anàlisis, l'espai de cap de la mostra era injectat a l'injector del cromatògraf de gasos on els analits eren transferits al detector d'MS mitjançant una columna cromatogràfica. Cal remarcar que, en aquest cas, la funció de la columna cromatogràfica no era la de separar els analits, sinó que la seva funció era transferir-los al detector. Aplicant unes condicions cromatogràfiques de flux i temperatura elevades, s'aconseguia que aquesta transferència es dugués a terme en tan sols cinc minuts. La figura IV.14 mostra el senyal del detector en funció del temps que s'obtenia en l'anàlisi d'un vi mitjançant l'acoblament directe de l'HS i l'MS (a) i utilitzant una columna cromatogràfica per a la transferència dels analits d l'HS a l'MS (b).

Amb aquesta nova configuració, malgrat l'increment del temps d'anàlisi (d'1 a 5 minuts), l'instrument era molt més versàtil ja que, tan sols variant les condicions cromatogràfiques de flux i temperatura, es podia utilitzar com a nas electrònic (HS-MS) o com a HS-GC-MS. En els estudis realitzats es va utilitzar una columna analítica HP-5MS, encara que també es podia utilitzar una columna sense fase estacionària, fent que la transferència dels analits a l'MS fos més ràpida ja que aquests no quedarien gens retinguts a la columna. No obstant això, es va optar per utilitzar una columna analítica perquè així no era necessari canviar la columna cada vegada que es volia fer una anàlisi cromatogràfica. Per altra banda, tal com es mostra més endavant en un altre dels treballs realitzats (apartat IV.3), en algunes aplicacions, l'ús d'una columna analítica permet dur a terme una mínima separació de compostos volàtils majoritaris que, algunes vegades, emmascaren la resposta de compostos que estan a nivells traces i que poden ser de gran importància en l'estudi que s'estigui realitzant. D'aquesta manera s'aconsegueix millorar els resultats de classificació o predicció.

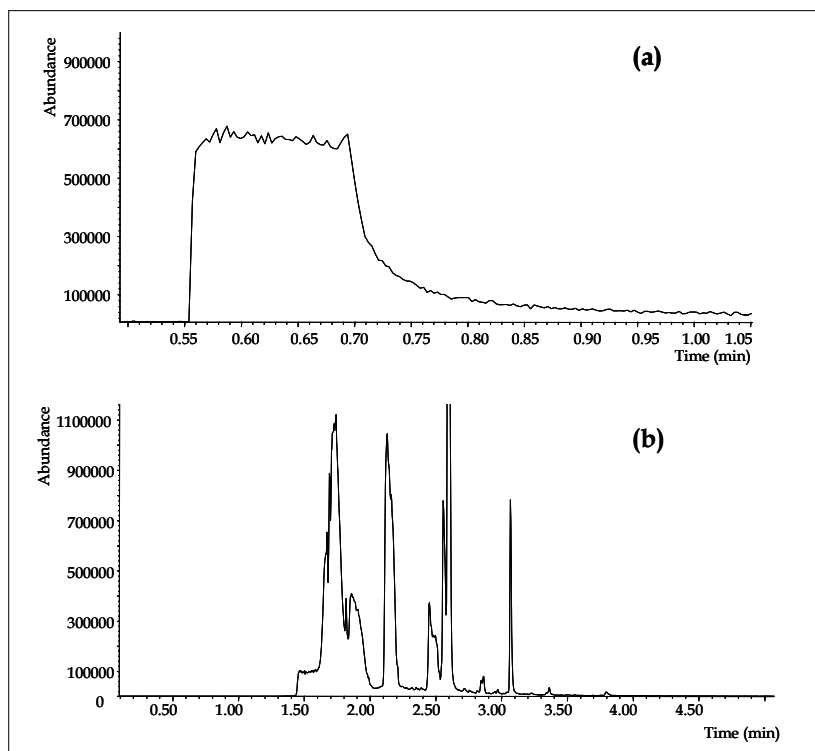


Figura IV.14. Senyals obtinguts en funció del temps amb el detector d'MS. (a) acoblament directe HS-MS; (b) transferència dels analits del sistema d'HS a l'MS mitjançant una columna cromatogràfica.

Tractament de dades

L'anàlisi multivariant de les dades es va dur a terme amb el programa informàtic Pirouette 2.6 d'Infometrix. Les tècniques quimiomètriques que es van utilitzar per a dur a terme l'anàlisi exploratòria de les dades van ser l'anàlisi de components principals (PCA) i l'anàlisi d'agrupacions (HCA). En els casos en què es van construir models de classificació es va utilitzar la tècnica SIMCA. Abans d'aplicar les tècniques esmentades, però, les dades es van pretractar duent a terme una normalització a 100 dels espectres i un centrat de la matriu de dades.

IV.2.2 Optimització de variables

La primera part de l'estudi va consistir en optimitzar totes les variables que podien afectar a la resposta. El criteri escollit per a trobar el valor òptim de cadascuna, va ser que els ions amb una relació m/z entre 50 i 200 presentessin la màxima abundància. Es va escollir aquest rang d'anàlisi perquè els ions amb una m/z superior a 200 presentaven una abundància molt petita que es podia considerar soroll de fons. Per altra banda, per sota de 50 hi apareixien els ions provinents de la fragmentació de l'etanol ($PM=46$) que, si s'analitzessin, podrien produir interferències importants en l'anàlisi de les dades a causa de la seva elevada abundància respecte la de la resta d'ions provinents de la fragmentació dels altres compostos presents a la fracció volàtil. Cal tenir en compte que els vins contenen al voltant d'un 12% d'etanol i que, per tant, és el component majoritari, i amb diferència, de la fracció volàtil del vi.

La tècnica d'extracció de l'espai de cap estàtic és una tècnica senzilla en la que les variables que cal tenir en compte són: el temps i la temperatura d'extracció, la força iònica, el volum de mostra, la relació entre el volum de mostra i el de l'espai de cap i el volum d'espai de cap que s'analitzarà. Exceptuant aquesta última, la resta de variables van ser les que es van optimitzar seguint el criteri d'obtenir la màxima resposta. Els experiments es van dur a terme amb un vi negre comercial. El volum d'espai de cap injectat no es va optimitzar ja que aquest paràmetre venia determinat pel *loop* de l'aparell automàtic de mostreig, el qual era d'1 mL.

En el cas del temps i la temperatura d'extracció, pel fet que són dues variables molt relacionades entre elles, es van optimitzar les dues a la vegada mitjançant un disseny factorial de dos factors i a dos nivells amb un punt central. La figura IV.15 mostra el domini experimental assajat amb els punts on es va dur a terme l'experimentació.

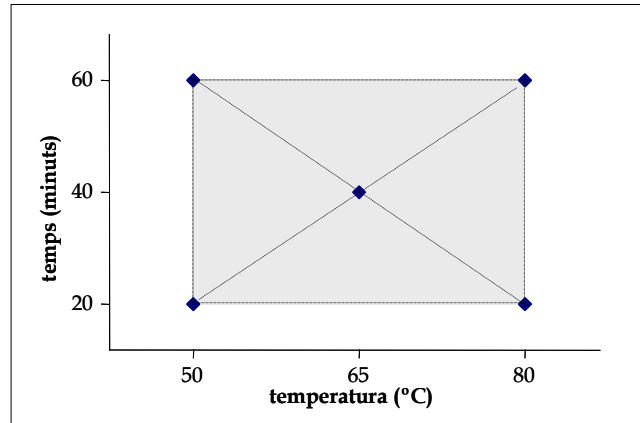


Figura IV.15. Disseny experimental dut a terme en la optimització del temps i la temperatura d'extracció.

En el punt central (40 minuts a 65 °C) va ser on es va obtenir la màxima resposta. No obstant això, es van assajar punts al seu voltant i es va trobar que la resposta a 60 minuts era millor que a 40 minuts. Per tant, es va escollir 60 minuts a 65 °C com el punt òptim.

Tot i que el temps d'extracció era de 60 minuts, el temps real que tardava l'instrument per analitzar una mostra era de tan sols 10 minuts. Això era possible gràcies a la seqüenciació que es podia dur a terme amb el sistema automàtic de mostreig de l'espai de cap en l'anàlisi de les mostres. El forn del sistema de mostreig tenia capacitat per a 6 vials, per tant, com que el temps d'anàlisi del detector era de 5 minuts, de manera seqüencial, cada 10 minuts s'injectava al detector una mostra que ja havia estat 60 minuts al forn i, al seu lloc, s'introduïa una altra mostra al forn del sistema de mostreig.

Pel que fa a la força iònica, es va analitzar la mostra addicionada amb diferents quantitats de clorur sòdic. Els millors resultats es van aconseguir quan la concentració de clorur sòdic era 2 M. En el cas de l'optimització del volum de mostra, l'instrument permetia utilitzar vials de 10 i 20 mL de capacitat. La màxima resposta es va obtenir analitzant 5 mL de mostra en el vial de 10 mL.

Així doncs, en el procés d'extracció optimitzat, 5 mL de mostra i 0.58 g de clorur sòdic s'introduïen en un vial de 10 mL de capacitat que es tancava hermèticament amb un *septum* de silicona/PTFE. Per tal de que s'establís l'equilibri dels compostos volàtils entre el vi i l'espai de cap, la mostra es mantenia a 65°C i amb agitació constant durant 1 hora. Passat aquest temps, s'introduïa, automàticament, 1 mL de l'espai de cap de la mostra a l'injector del GC o directament al detector, en funció de la configuració de l'instrument.

Quan es va introduir el GC a l'instrument, es van buscar les condicions cromatogràfiques que permetessin la transferència dels analits al detector d'MS amb el menor temps possible. La primera idea fou dur a terme la transferència a unes condicions elevades de flux i temperatura. El flux del gas portador es va fixar a 1.8 mL/min (el flux màxim que permet el detector d'MS és de 2 mL/min) i la temperatura del forn del GC a 180 °C. La sorpresa fou, però, que el senyal que s'obtenia amb aquestes condicions era molt petit. Es van realitzar diferents experiments variant el flux i la temperatura, fins que es va trobar que duent a terme la transferència a una temperatura per sota de 80 °C, el senyal es tornava a recuperar.

Així doncs, enlloc d'una isoterma, es va establir una programació de temperatura del forn en la que, a l'inici de la transferència es mantenia el forn a 70 °C durant 1 minut. Després, s'aplicava una rampa forta de temperatura (70 °C/min) de manera que, amb poc més d'un minut, s'assolia la temperatura de 180 °C, la qual es mantenia durant 2.5 minuts. Utilitzant aquesta programació de temperatura, el temps total d'anàlisi era de 5 minuts.

La figura IV.16 mostra el senyal que s'obtenia amb una isoterma a 180 °C (a) i amb la programació de temperatura final que es va establir (b). No coneixem la causa d'aquest fenomen, però pensem que hi té a veure el fet de que l'etanol sigui el component majoritari de la fracció volàtil i que, quan aquest és introduït a la

columna a una temperatura superior a la del seu punt d'ebullició (78 °C), causa aquest efecte.

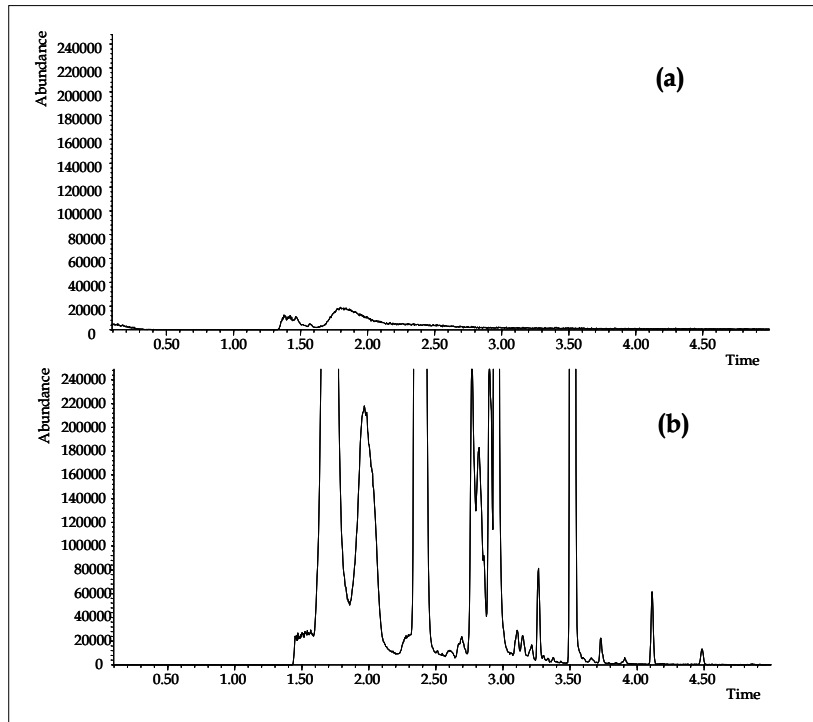


Figura IV.16. Senyal del detector en funció del temps. (a) isoterma a 180 °C; (b) programació de temperatura optimitzada.

IV.2.3 Aplicació a la diferenciació de vins segons diversos paràmetres enològics

L'aroma del vi, com ja s'ha explicat en el capítol II, ve determinada per multitud de factors que fan que sigui gairebé impossible que dos vins facin la mateixa olor. No obstant això, alguns factors, com per exemple la varietat del raïm, el seu origen o la manera com s'ha envellit, poden marcar-la de manera perceptible. Com ja s'ha dit,

els tastadors experts poden conèixer, mitjançant una anàlisi sensorial, l'origen d'un vi o la varietat de raïm amb la que ha estat elaborat, entre d'altres paràmetres.

En els treballs que es presenten en aquest apartat, s'ha estudiat el potencial del nas electrònic HS-MS en diferenciar vins, a partir de la seva composició volàtil, segons diversos paràmetres com l'origen, la varietat del raïm o el temps d'envelliment.

IV.2.3.1 Diferenciació de vins segons l'origen

Històricament, quan un producte obtenia prestigi en el mercat, hi havia una tendència a designar-lo dient el seu lloc d'origen. Aquest fet, però, donava lloc a que molt sovint es cometessin frauds en l'atribució de l'origen d'alguns productes, entre ells el vi. Avui en dia, les Denominacions d'Origen (D.O.) no només garanteixen l'origen geogràfic dels vins que es comercialitzen sota el seu nom, sinó que també garanteixen la seva qualitat i que aquests han estat elaborats a partir d'unes determinades varietats i amb pràctiques vitícoles i enològiques establertes prèviament.

En aquest estudi de diferenciació de vins segons el seu origen, es van analitzar vins negres de diferents D.O. de Catalunya que van ser subministrats pels mateixos Consells Reguladors de les D.O. estudiades, amb la qual cosa l'origen i la qualitat de les mostres estaven garantits.

La figura IV.17 mostra el gràfic d'*scores* de l'anàlisi de components principals (PCA) dut a terme amb les dades obtingudes en l'anàlisi de vins de diferents orígens. A la llegenda de la figura, entre parèntesis, s'indica el nombre de mostres analitzades de cada D.O. En el gràfic es representen les mostres sobre els tres primers factors que, tots junts, expliquen un 85.5% de la seva variabilitat total. Tot i que no es diferencien clarament grups de vins segons el seu origen, sí que s'observa una certa distribució de les mostres segons aquest paràmetre. El grup de mostres de la D.O. Tarragona, però, solapen tots els altres grups. Aquest fet podria ser degut a que aquesta D.O. abasta molt territori i, a més, geogràficament és molt

propera a la D.O. Conca de Barberà, la D.O. Priorat i la D.O. Terra Alta. Cal tenir en compte que l'any en què es van recollir aquestes mostres (l'any 2000), la D.O. Tarragona comprenia encara l'actual D.O. Montsant, la qual limita geogràficament amb la D.O. Priorat i és molt propera a la D.O. Terra Alta.

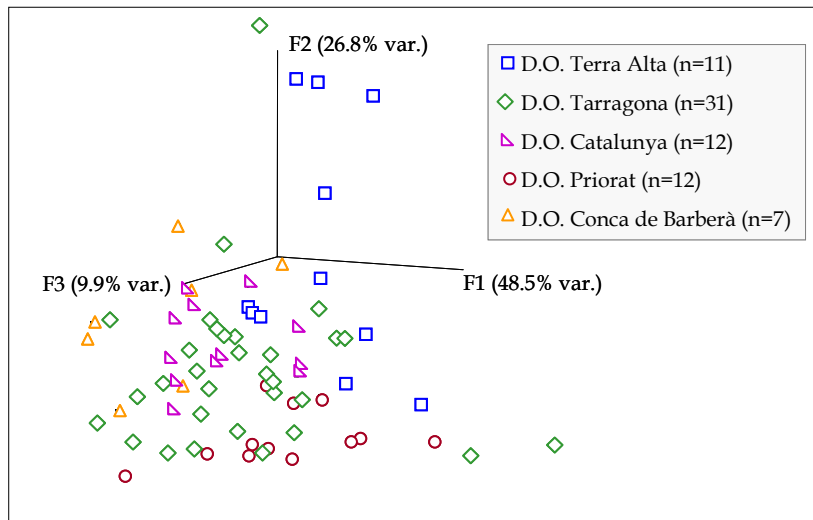


Figura IV.17. Gràfic d'scores del PCA de vins de la D.O. Terra Alta, D.O. Tarragona, D.O. Catalunya, D.O. Priorat i D.O. Conca de Barberà.

Al repetir l'anàlisi exploratòria de les dades, però, sense les mostres de la D.O. Tarragona, es podia apreciar més clarament la distribució de les mostres segons el seu origen (figura IV.18). En el cas de les mostres de la D.O. Catalunya, els resultats obtinguts són força curiosos ja que aquesta D.O. té la particularitat de que els seus vins poden provenir de qualsevol zona vitivinícola de Catalunya, la qual cosa vol dir que poden ser vins elaborats als territoris que comprenen les altres D.O. estudiades. Per aquest motiu, es podia esperar que les mostres de la D.O. Catalunya estiguessin molt més disperses en el gràfic d'scores, tal com passava amb les de la D.O. Tarragona.

Un resultat sorprenent és la diferenciació que s'observa entre els vins de la D.O. Priorat i els de la D.O. Terra Alta. Cal tenir en compte que aquestes dues zones són molt properes geogràficament i, a més, els vins estudiats són els vins tradicionals

que s'elaboren en totes dues que, majoritàriament, són cupatges de les mateixes varietats: Garnatxa i Carinyena.

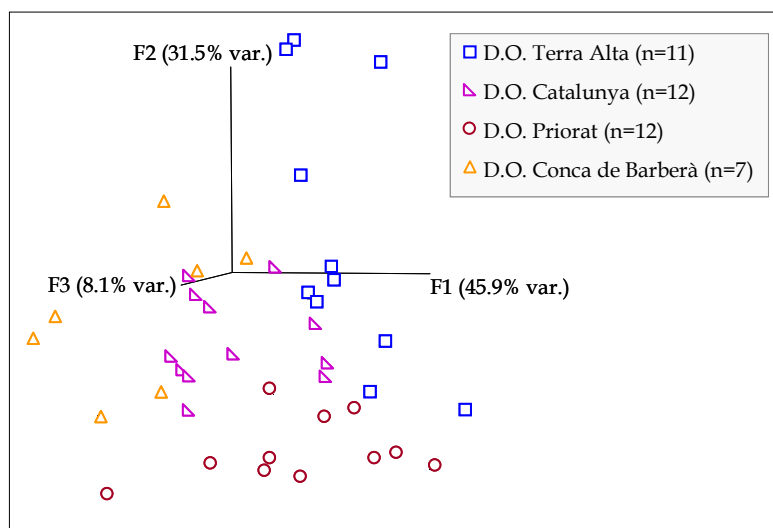


Figura IV.18. Gràfic d'scores del PCA de vins de la D.O. Terra Alta, D.O. Priorat, D.O. Catalunya i D.O. Conca de Barberà.

En base als resultats obtinguts en aquesta primera anàlisi exploratòria, es va centrar l'estudi en la diferenciació dels vins de la D.O. Priorat i la D.O. Terra Alta. En el PCA dut a terme amb les dades obtingudes en l'anàlisi de les mostres d'aquestes dues zones, es va observar un grup de variables que influeixen de manera important en la seva diferenciació. Aquestes variables eren els ions amb una relació m/z de 70, 73, 88, 101 i 115. La representació lineal de l'espectre global de totes les mostres és un dels gràfics on es podia observar la influència d'aquests ions en la diferenciació de les mostres, el qual es mostra a la figura IV.19. En aquesta es representa l'espectre de masses global de cada mostra mitjançant una línia contínua que fa que tingui un aspecte semblant al d'un cromatograma. D'aquesta manera, al superposar els espectres de les mostres, es poden observar gràficament les diferències de resposta de cada ió en les diferents mostres, la qual cosa no seria possible si es superposessin els espectres de masses convencionals de diagrames de

barres. La resposta que s'indica en aquest gràfic són els valors obtinguts després de dur a terme els pretractaments corresponents a les dades d'abundància originals.

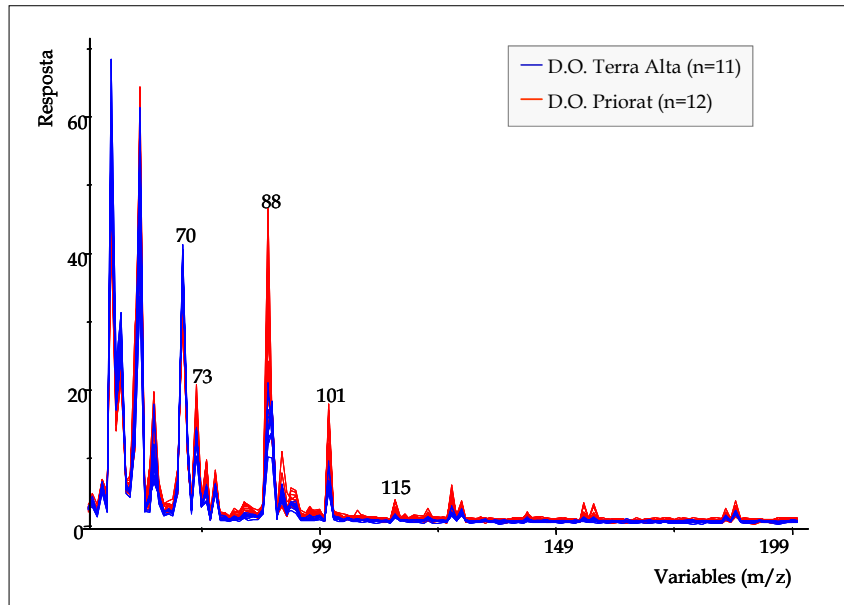


Figura IV.19. Representació lineal de l'espectre global de totes les mostres.

Trobats els ions que més influeixen en la diferenciació de les mostres, el següent pas va ser fer un nou PCA però utilitzant com a variables independents tan sols els ions diferenciadors enlloc de tot el rang 50-200 m/z. La figura IV.20 mostra el gràfic d'*scores* d'aquest nou PCA en el que els dos primers components principals aconseguixen explicar el 97.7% de la variabilitat total de les dades. Tal i com es pot observar en el gràfic, els vins de les dues D.O. es diferencien clarament.

També es va aplicar a la matriu de dades la tècnica SIMCA per tal de construir models de classificació dels vins d'aquestes dues zones. Tot i que no es disposava d'un altre conjunt de mostres per tal de validar els models, el valor obtingut de la distància entre classes, és a dir, la distància entre el model del Priorat i el de la

Terra Alta, va ser 14.5. Aquest valor era indicatiu de que els dos grups de vins eren significativament diferents.

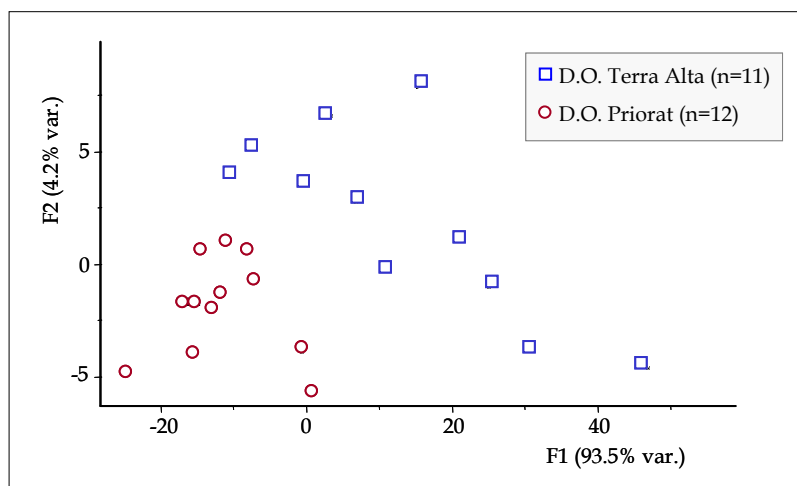


Figura IV.20. Gràfic d'scores del PCA de vins de la D.O. Priorat i D.O. Terra Alta.

Els resultats obtinguts en aquest estudi són molt prometedors ja que mostren el potencial del nas electrònic HS-MS en diferenciar vins segons el seu origen, fins i tot quan són vins de zones properes geogràficament com és el cas dels vins del Priorat i la Terra Alta. Per tant, aquest instrument podria ser una eina útil, per exemple, per als Consells Reguladors de les Denominacions d'Origen en la detecció de frauds. La construcció de models robustos, és a dir amb un nombre important de mostres representatives de les zones d'interès, permetria detectar si algun dels vins ha estat importat d'altres zones vitivinícoles.

IV.2.3.2 Diferenciació de vins segons la varietat del raïm

La varietat del raïm és un altre factor que pot afectar a la composició aromàtica del vi. En algunes varietats, les olors que aporten alguns compostos provinents del raïm és el que dona el toc distintiu als seus vins. Un exemple molt clar són els vins de Moscatell, en els que la seva olor afrutada característica, deguda als compostos

terpènics, permet que tastadors no experts puguin distingir-los fàcilment d'altres vins. Però, la gran majoria de varietats, conegudes com a varietats neutres, no tenen una influència tan gran en l'aroma dels seus vins. No obstant això, alguns tastadors experts són capaços d'identificar la varietat d'alguns d'aquests vins per la seva aroma.

En aquest estudi de diferenciació de vins segons la varietat del raïm, es van analitzar vins monovarietals blancs i negres de diferents zones vitivinícoles de Catalunya. Les varietats a estudiar es van escollir en funció de la disponibilitat de mostres. Així doncs, els vins blancs analitzats van ser de les varietats Chardonnay, Xarel·lo i Macabeu, i els negres van ser de les varietats Cabernet sauvignon, Merlot i Ull de llebre. Els estudis de diferenciació de vins segons la varietat es van repetir durant tres collites consecutives (1999-2001) amb les mostres recollides en cadascuna d'elles.

La figura IV.21 mostra el gràfic d'*scores* del PCA dut a terme amb les dades de l'anàlisi de vins blancs monovarietals de la collita de 1999. En aquest es pot observar que les mostres de Chardonnay es diferencien clarament de la resta. Les mostres de Xarel·lo i Macabeu, però, tot i que no estan completament mesclades en un mateix grup, no es pot dir que el nas electrònic les pugui diferenciar. Caldria disposar d'un nombre més gran de vins d'aquestes dues varietats per a poder treure'n conclusions.

El mateix estudi es va repetir al cap d'un any amb mostres de les mateixes varietats però de la següent anyada. En aquest cas es disposava d'un nombre més gran de vins de la varietat Xarel·lo, però, de tan sols tres de la varietat Macabeu. La figura IV.22 mostra la representació de les mostres sobre els dos primers components principals del PCA realitzat a aquest segon grup de mostres. Tal i com es pot observar, els resultats obtinguts foren similars als de l'any anterior. Les mostres de Chardonnay es diferencien de la resta, tot i que no tan clarament com en l'estudi anterior, mentre que les de les altres dues varietats continuen sense diferenciar-se.

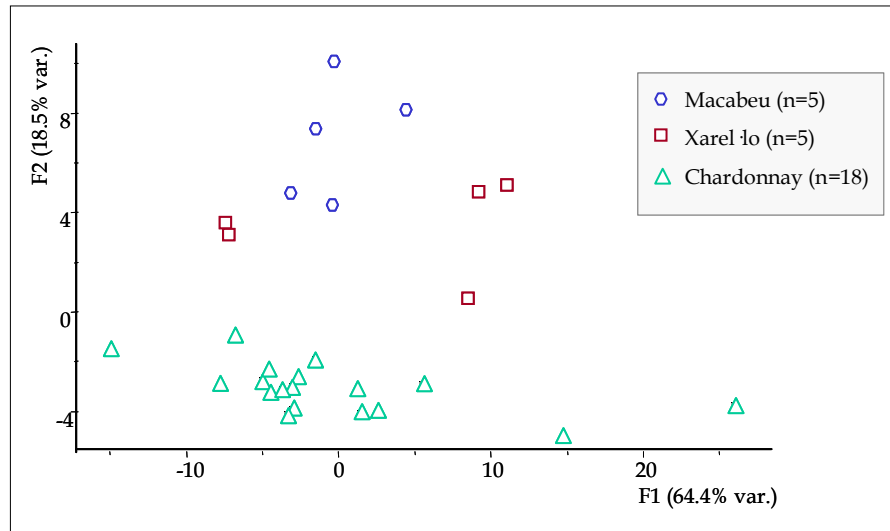


Figura IV.21. Gràfic d'scores del PCA de vins blancs de les varietats Macabeu, Xarel·lo i Chardonnay de la collita de 1999.

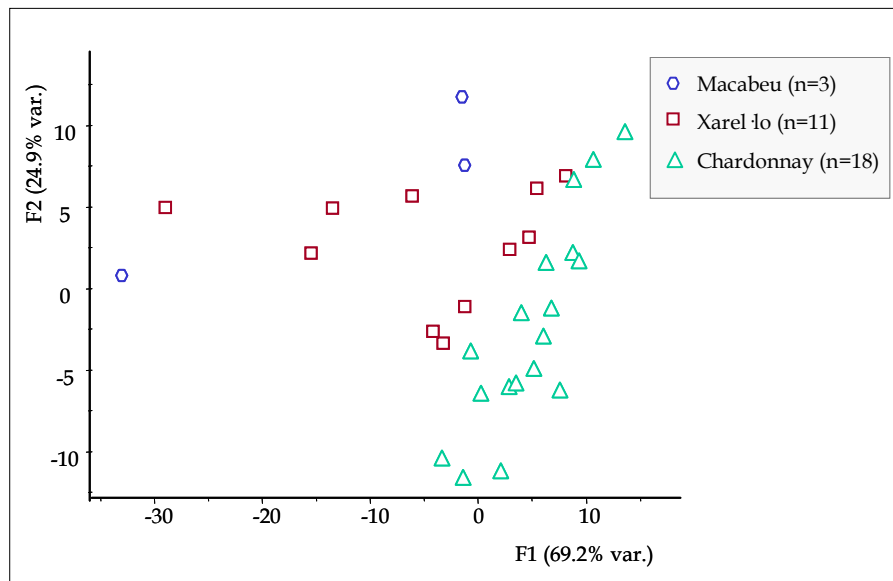


Figura IV.22. Gràfic d'scores del PCA de vins blancs de les varietats Macabeu, Xarel·lo i Chardonnay de la collita de 2000.

Amb l'objectiu d'obtenir una millor diferenciació dels vins de Chardonnay dels de Xarel·lo, que eren dels que disposàvem d'un nombre significatiu de mostres, es va buscar quines eren les variables que tenien una major influència en la seva diferenciació. Mitjançant el gràfic de la representació lineal de l'espectre global de totes les mostres, es va trobar que els ions amb una relació m/z de 56, 57, 61, 64, 85, 86 i 87 eren els que presentaven majors diferències en la seva abundància segons la varietat del raïm amb què s'havia elaborat el vi. La figura IV.23 mostra el gràfic d'*scores* del PCA realitzat amb les variables seleccionades. El primer component principal, el qual tot sol explica un 91.8% de la variabilitat total de les mostres, diferencia clarament els vins de Xarel·lo dels de Chardonnay.

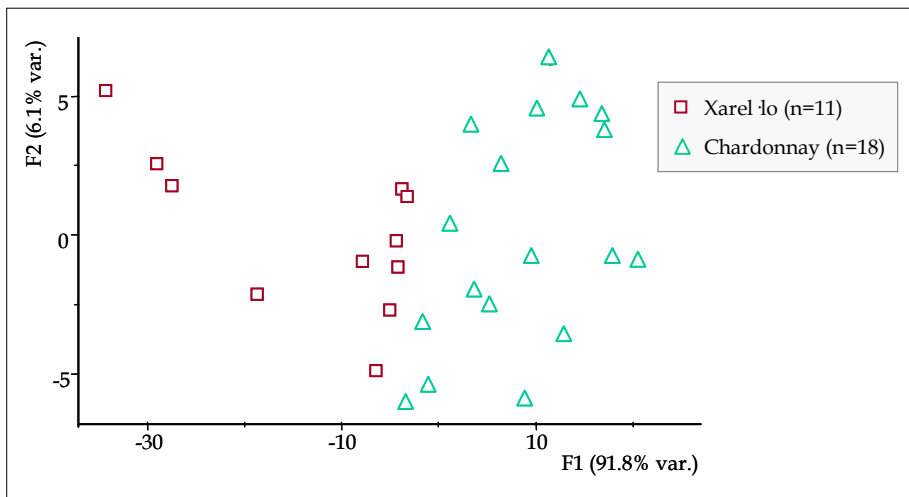


Figura IV.23. Gràfic d'*scores* del PCA, realitzat amb una selecció de les variables, de vins blancs de les varietats Xarel·lo i Chardonnay de la collita de 2000.

Aquest estudi de diferenciació de vins monovarietals, es va realitzar també amb vins negres de les varietats Cabernet sauvignon, Merlot i Ull de llebre. En el primer any que es va fer l'estudi, l'anàlisi exploratòria de les dades mostrava una lleugera diferenciació dels vins segons la varietat. Procedint de la mateixa manera que en els estudis anteriors, es va trobar que realitzant el PCA amb el grup de variables

que més influïen en la diferenciació (51-53, 57, 58, 67, 73-75, 77 i 108 m/z), els resultats milloraven de manera considerable. Tot i això, continuava havent-hi un solapament important dels vins d'Ull de llebre amb els de les altres dues varietats, el qual es pot observar en el gràfic d'*scores* que mostra la figura IV.24.

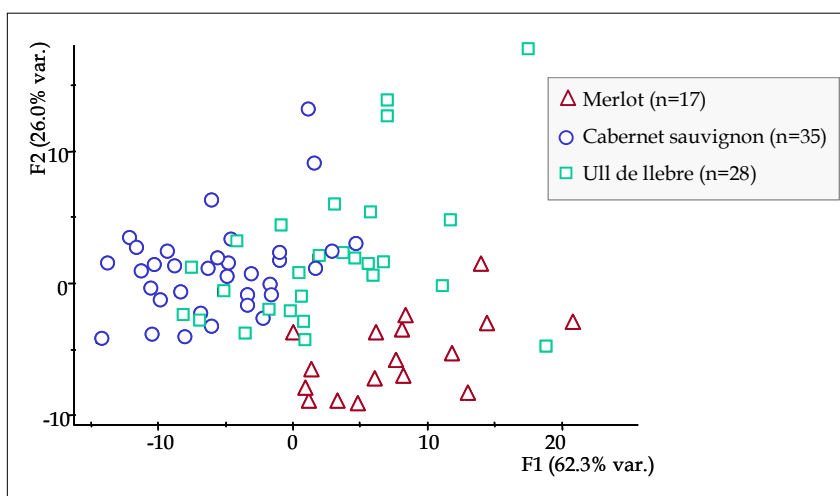


Figura IV.24. Gràfic d'*scores* del PCA, realitzat amb una selecció de les variables, de vins negres de les varietats Merlot, Cabernet sauvignon i Ull de llebre de la collita de 1999.

Per altra banda, els resultats del PCA dut a terme tan sols amb les mostres de Cabernet sauvignon i Merlot, mostraven una clara diferenciació dels vins d'aquestes dues varietats. La figura IV.25 mostra la representació de les mostres (gràfic d'*scores*) i la de les variables (gràfic de *loadings*) sobre els dos primers components principals que, entre tots dos, expliquen el 91.4% de la variabilitat total de les mostres. Tal i com es pot observar en el gràfic de *loadings*, els ions 58 i 73 són les variables que més contribueixen al primer component principal, que és el que més diferencia els vins de les dues varietats.

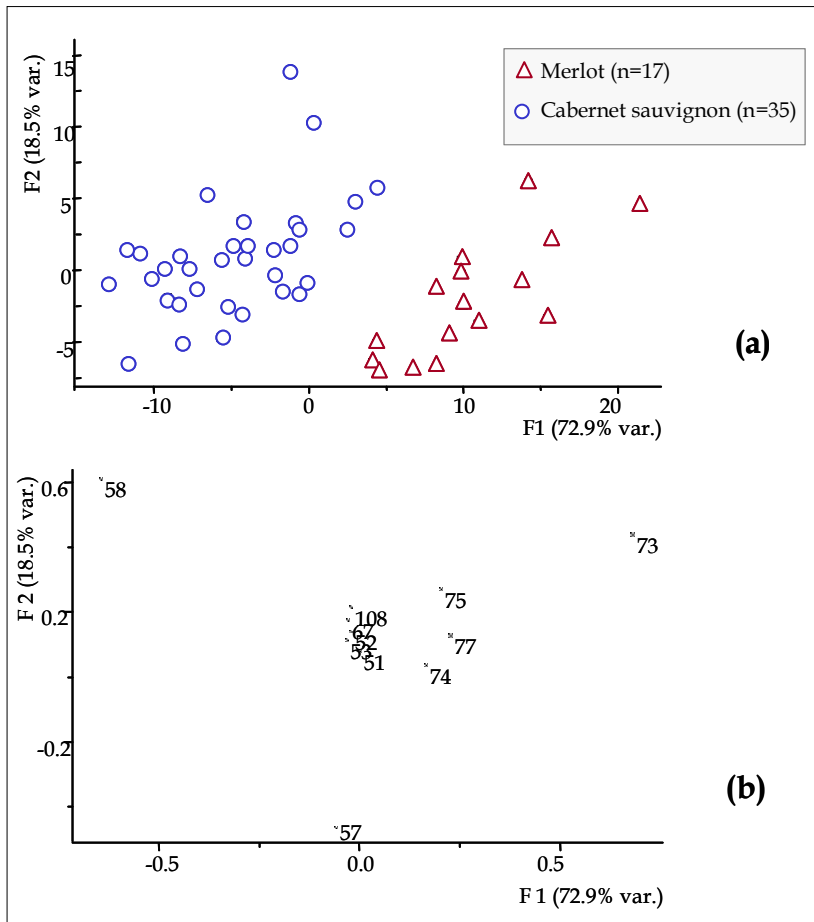


Figura IV.25. PCA, realitzat amb una selecció de variables, de vins negres de les varietats Cabernet sauvignon i Merlot de la collita de 1999. (a) gràfic d'*scores*; (b) gràfic de *loadings*.

Aquest tipus d'informació que proporcionen els nassos electrònics basats en l'MS, és molt útil en el cas de que es vulgui indagar sobre la naturalesa química dels compostos responsables de les diferenciacions. A mode d'exemple, ja que aquest no era l'objectiu d'aquest treball, l'ió 73 és característic de diversos àcids orgànics presents a l'aroma del vi com són els àcids butíric, isobutíric, hexanoic i octanoic. Si es superposen els dos gràfics de la figura IV.25, es podria establir la hipòtesi de que

en els vins de Merlot la concentració d'aquests àcids és més gran que en els vins de Cabernet sauvignon. Pel que fa a l'ió 58, l'abundància del qual és més gran en els vins de Cabernet sauvignon, podria provenir de la fragmentació del 3-metiltio-1-propanol que és un compost sofrat que es troba habitualment en els vins d'aquesta varietat [68]. Per a poder confirmar aquestes hipòtesis, però, caldria dur a terme un estudi de la composició volàtil d'aquests vins mitjançant cromatografia de gasos.

En l'estudi dut a terme amb les mostres de la següent collita no es van obtenir uns resultats tan exitosos. En la primera anàlisi exploratòria de les dades, els vins de les tres varietats apareixien tots mesclats i no s'observava ni una mínima tendència a separar-se. Es va trobar un grup de variables (67-69, 71, 81-84 m/z), però, que permetien una mínima diferenciació dels vins de Merlot dels de Cabernet sauvignon, la qual es mostra al gràfic d'*scores* de la figura IV.26. Tal i com es pot observar en el gràfic, el segon component principal, malgrat explicar tan sols un 28.3% de la variança total, és el més important en la diferenciació dels vins de les dues varietats.

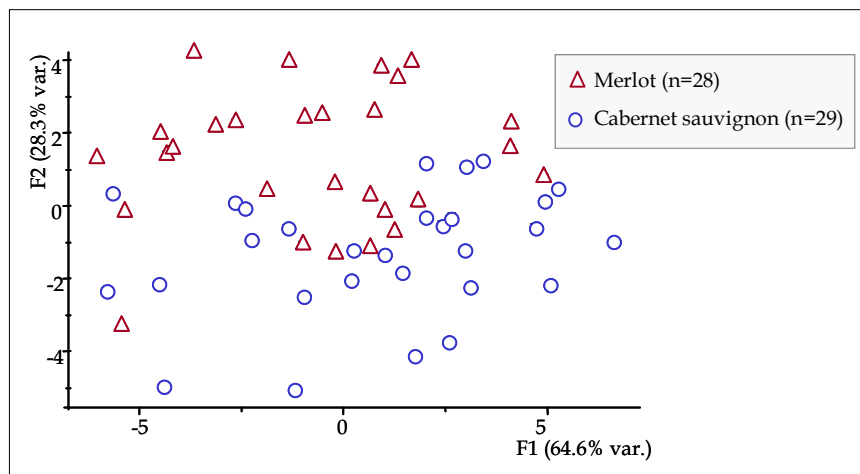


Figura IV.26. Gràfic d'*scores* del PCA, realitzat amb una selecció de les variables, de vins negres de les varietats Merlot i Cabernet sauvignon de la collita de 2000.

Els resultats obtinguts amb els vins de la tercera collita foren millors que els de la segona pel que fa a la diferenciació de les tres varietats. La figura IV.27 mostra el gràfic d'scores del PCA realitzat a aquest tercer grup de mostres. Si es compara amb el gràfic obtingut amb els vins de la primera anyada (figura IV.24) es pot observar que tenen un aspecte similar però que, en aquest cas, són els vins de Merlot els que estan situats entre els de les altres dues varietats.

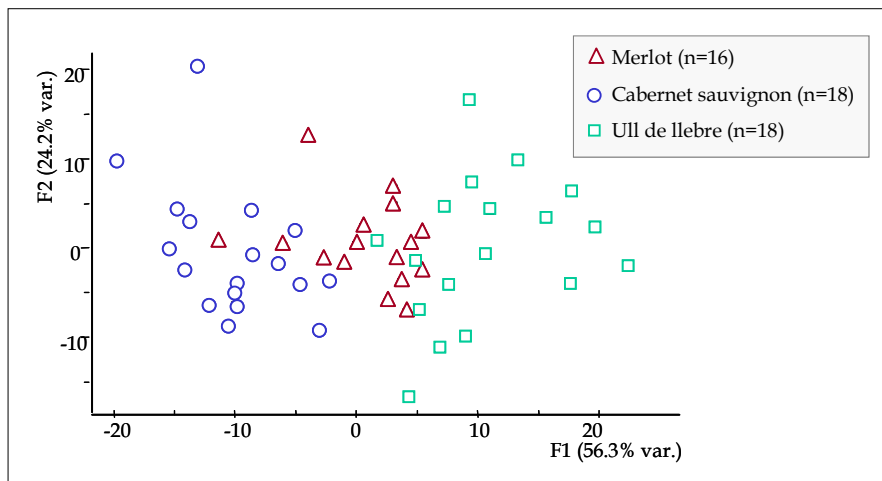


Figura IV.27. Gràfic d'scores del PCA de vin negres de les varietats Merlot, Ull de llebre i Cabernet sauvignon de la collita de 2001.

En la diferenciació dels vins de Cabernet sauvignon dels d'Ull de llebre, en aquest cas, no es va trobar un grup de variables amb una influència clarament més important que permetés eliminar la resta. Tot i això, tal com es pot observar en la figura IV.28, es va obtenir una bona diferenciació d'aquestes dues varietats.

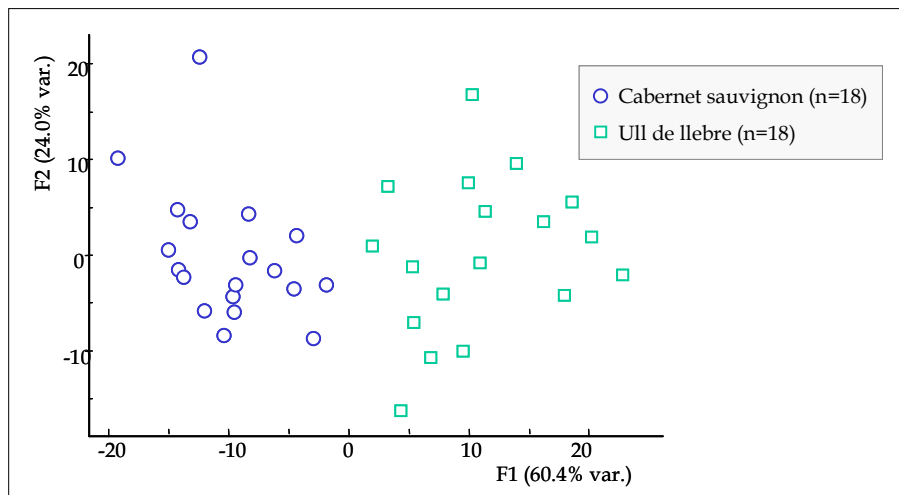


Figura IV.28. Gràfic d'scores del PCA de vins negres de les varietats Ull de llebre i Cabernet sauvignon de la collita de 2001.

Els resultats obtinguts en la diferenciació de vins segons la varietat del raïm en que han estat elaborats varien en funció de les anyades. Com ja s'ha comentat en el capítol II, a part de la varietat del raïm existeixen molts altres factors que poden afectar a la composició volàtil del vi. Un d'ells és la climatologia, la qual podria ser la responsable dels diferents resultats obtinguts amb les anyades.

Per tant, per a obtenir, segons la varietat, models de classificació de vins prou robustos, caldria construir-los amb dades obtingudes en l'anàlisi de mostres de diferents anyades. En el nostre cas, no es va poder construir un model amb les dades obtingudes en els tres anys a causa del problema comentat anteriorment de la inestabilitat del senyal amb el temps que presenten els nassos electrònics basats en l'MS. Aquest fet provoca que els espectres de masses obtinguts en diferents anys no siguin comparables. Un PCA de tots els vins monovarietals analitzats en aquest estudi mostraria tres grups de mostres ben diferenciats que correspondrien a cadascun dels tres anys en què s'ha realitzat l'estudi.

Malgrat les diferències observades entre anyades, en aquest estudi s'ha demostrat el potencial del nas electrònic HS-MS en diferenciar vins segons la varietat de raïm a partir de la qual han estat elaborats. No obstant això, per a poder construir models de classificació robustos, utilitzant dades obtingudes en l'anàlisi de vins de diferents anyades, caldria primer trobar una solució al problema de la inestabilitat del senyal que, com ja s'ha comentat (apartat IV.1.1.2), segurament passaria per l'aplicació de tècniques de transferència de calibratge.

IV.2.3.3 Diferenciació de vins i brandies segons el temps d'envelliment

La manera com evoluciona l'aroma d'un vi, un cop acabada la fermentació, depèn de les condicions de vinificació, dels llevats, de les tècniques que s'hagin utilitzat en l'elaboració i, sobretot, de les condicions de conservació durant el seu envelliment, les quals converteixen l'aroma del vi en l'anomenat bouquet. Aquestes condicions de conservació poden ser molt variades ja que l'envelliment es pot dur a terme en ampolla i/o en bóta de fusta i, a més, factors com el temps que dura l'envelliment, el tipus de fusta que s'utilitza, etc. poden incidir de manera important en l'aroma del vi final.

El temps d'envelliment en ampolla i/o en bóta, és un dels paràmetres més regulats per les Denominacions d'Origen de vins, tot i que també ho és d'altres begudes alcohòliques, com per exemple els brandies. Fins i tot, molt sovint, les begudes alcohòliques es classifiquen en funció del temps d'envelliment. Aquest és el cas dels vins de la D.O. Ribera del Duero i dels Brandies de Jerez, que són els que s'han analitzat en aquest treball per tal d'estudiar el potencial del nas electrònic HS-MS en la diferenciació de vins i brandies segons el seu temps d'envelliment.

Vins de la D.O. Ribera del Duero

A la D.O. Ribera del Duero, els vins són classificats en 4 categories administratives segons el temps durant el qual s'ha dut a terme l'envelliment, tant en bóta com en ampolla. Així doncs, els vins poden sortir al mercat com a Joves, Criances, Reserves o Grans reserva segons la següent classificació [69]:

Joves: Vins negres que no han estat en bóta o que hi han estat durant un temps inferior a 12 mesos. Aquests vins arriben al mercat pocs mesos després de la verema.

Criances: Vins negres que han estat un temps mínim de 12 mesos en bótes de roure i que es comercialitzen posteriorment a l'1 d'octubre del segon any després de la verema.

Reserves: Vins negres amb 36 mesos d'envelliment entre bóta i ampolla, però que han estat un mínim de 12 mesos en bóta. Arriben al mercat amb posterioritat a l'1 de desembre del tercer any després de la verema.

Grans reserva: Vins negres de qualitat excepcional que compleixen un envelliment mínim de 60 mesos en total, dels quals, al menys 24 han de ser en bóta seguits de 36 mesos en ampolla. Aquests vins no poden arribar al mercat abans de l'1 de desembre del cinquè any després de la verema.

En aquest estudi s'han analitzat 54 vins Joves, 34 Criances, 33 Reserves i 10 Grans reserva, tots ells subministrats pel Consell Regulador de la D.O. Ribera del Duero. La figura IV.29 mostra el gràfic d'*scores* del PCA realitzat a les dades obtingudes en l'anàlisi d'aquest gran conjunt de vins. En el PCA no es van utilitzar totes les variables analitzades (50-200 m/z) sinó que es van seleccionar les més importants en la diferenciació d'aquests quatre tipus de vins (69, 75, 87, 89, 97, 102, 103, 116 i 129 m/z), les quals es van determinar en una anàlisi exploratòria de les dades que es va dur a terme prèviament. Tal i com es pot observar en el gràfic, es diferencien

els vins de les quatre categories, tot i que hi ha un solapament parcial entre algunes d'elles.

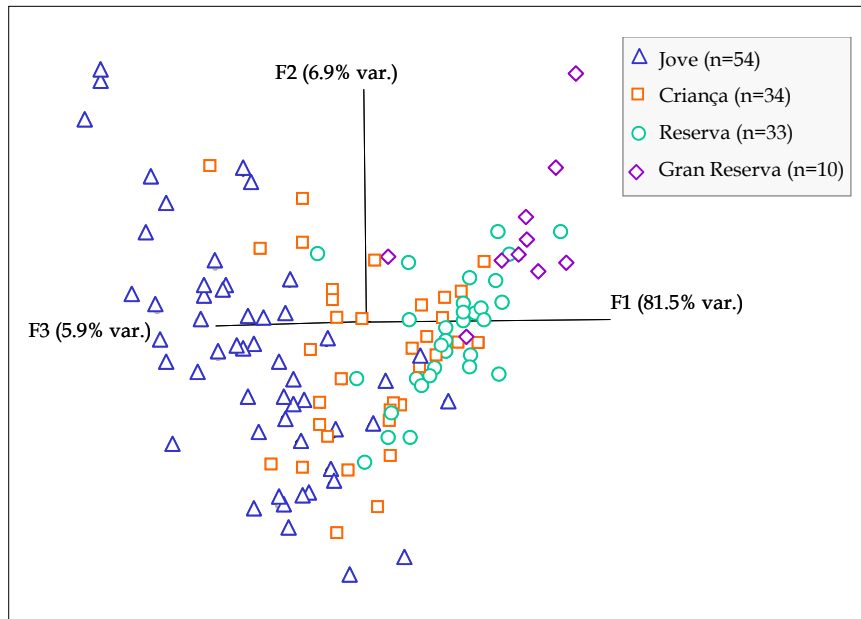


Figura IV.29. Gràfic d'scores del PCA de vins Joves, Crianças, Reserves i Grans Reserva de la D.O. Ribera del Duero.

Aquest solapament podria ser degut a les petites diferències que existeixen, en alguns casos, entre vins que pertanyen a categories diferents però que tenen un temps d'envelliment semblant. Per exemple, un vi Jove que ha estat 11 mesos en bóta de roure i un Criança que n'ha estat 12, segurament seran molt similars. No obstant això, pertanyen a categories diferents. Aquest fet el constata el gràfic d'scores que es mostra a la figura IV.30, el qual correspon al PCA realitzat tan sols amb els vins Joves i els Crianças. En el gràfic s'indica, mitjançant un codi de colors, l'anyada de cada vi ja que hi havia vins Joves de les collites 1998, 1999 i 2000 i Crianças de les collites de 1997 i 1998. Com es pot observar, les mostres es diferencien en funció de l'anyada més que no pas en funció de la categoria a la qual

pertanyen. Els vins Joves de l'any 2000 són els que millor es diferencien dels Criances, mentre que els vins Joves del 1998 es troben mesclats amb els Criances de la mateixa anyada.

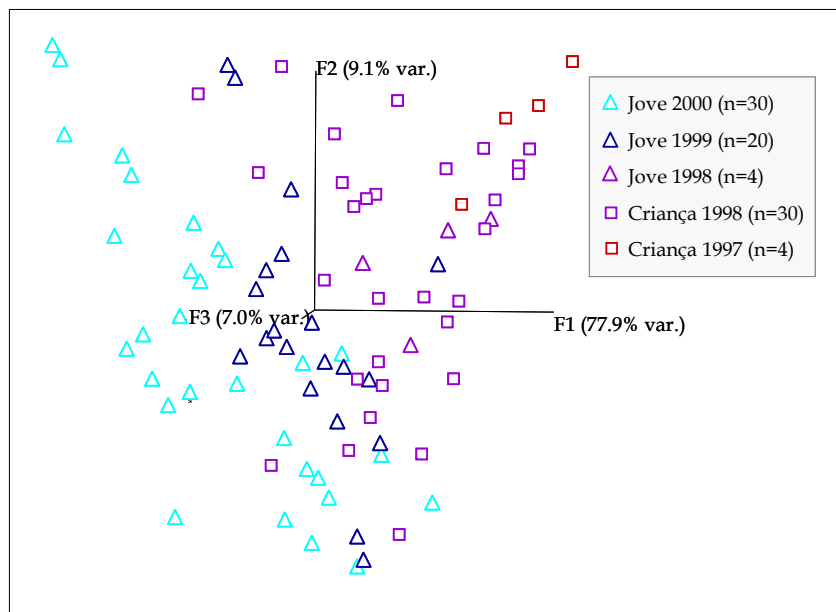


Figura IV.30. Gràfic d'scores del PCA de vins Joves i Criances de la D.O. Ribera del Duero.

En el cas dels Criances i els Reserves, en ambdós tipus de vi se'ls hi exigeix un temps mínim de 12 mesos en bóta de roure, per tant, la similitud que hi ha entre alguns vins d'aquestes dues classes podria ser deguda a que han estat en bóta durant un període de temps molt semblant. Aquest raonament, però, suposa establir la hipòtesi que el que té més pes en la diferenciació dels vins és la seva permanència en bóta, més que no pas en ampolla. Per poder treure'n conclusions definitives caldria dur a terme un altre estudi amb mostres de vi de les quals es conegués, exactament, el temps que han estat en bóta i el temps en ampolla.

El solapament que existeix entre algunes de les categories, el mostren també els resultats obtinguts en l'aplicació del mètode de classificació SIMCA a les dades per tal d'obtenir un model que permeti classificar els vins de la Ribera del Duero en una de les quatre categories definides (Jove, Criança, Reserva i Gran reserva). A la taula IV.3, on s'indiquen les distàncies que hi ha entre les quatre categories, es pot observar que les distàncies més curtes són entre els vins Joves i els Criances i, entre els Criances i els Reserves.

Classes	Distància entre classes
Joves/Criances	1.0
Joves/Reserves	1.7
Joves/Grans reserva	5.7
Criances/Reserves	0.3
Criances/Grans reserva	3.8
Reserva/Grans reserva	1.8

Taula IV.3. Distàncies entre les diferents classes obtingudes amb l'aplicació del mètode SIMCA als vins de la D.O. Ribera del Duero.

Amb l'objectiu d'estudiar la capacitat d'un model SIMCA de predir la categoria administrativa de vins de la D.O. Ribera del Duero, el conjunt de mostres del que es disposava es va dividir en dues parts: un conjunt d'entrenament compost de 89 vins per a construir el model i un conjunt de validació compost de 42 vins per tal d'estudiar l'habilitat de classificació del model.

La taula IV.4 mostra els resultats obtinguts en la validació del model. En aquesta es detallen, per cadascuna de les categories, el nombre de vins que van ser classificats correctament pel model, els que van ser classificats de manera incorrecta i els que

no van ser classificats en cap categoria. En el conjunt de validació no s'hi van incloure vins Grans reserva ja que es disposava d'un nombre limitat de mostres que es va decidir incloure al conjunt d'entrenament per a construir el model.

Tot i el solapament que s'ha vist que existia entre algunes classes, els resultats obtinguts van ser prou satisfactoris, ja que dels 29 vins que el model va classificar en alguna de les 4 categories, 23 els va classificar correctament i tan sols 6 van ser classificats de manera incorrecta. Cal destacar que 4 dels 6 vins classificats erròniament pertanyien a la categoria dels vins Criança, dels quals dos els va classificar com a vins Joves i la resta com a vins Reserva. Probablement, el major error de classificació detectat en els Criances és degut a la curta distància que havíem observat entre el model d'aquests vins i els models dels Joves i Reserves respectivament.

<i>Mostres de validació</i>		<i>Resultats de predicció</i>		
Classe	Nombre	Correctes	Incorrectes	No classificades
Joves	22	15 (68%)	1 (5%)	6 (27%)
Criances	15	6 (40%)	4 (27%)	5 (33%)
Reserves	5	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)
TOTAL	42	23 (55%)	6 (14%)	13 (31%)

Taula IV.4. Resultats de la validació del model SIMCA.

Brandies de Jerez

Un altre estudi de característiques semblants va ser la diferenciació de Brandies de Jerez segons els seu temps d'envelliment en botes de roure. Aquesta és una beguda espirituosa amb un elevat contingut en etanol (36-45%) que s'obté a partir d'aiguardents provinents de la destil·lació de vi, als quals se'ls sotmet a un procés

d'envelliment en bótes de roure que prèviament han contingut vi d'algun dels tipus de vi de Jerez (Fino, Oloroso, Pedro Ximénez, Amontillado, etc.). En la D.O. Brandy de Jerez es poden comercialitzar tres tipus de Brandies que es diferencien principalment pel temps d'envelliment en bótes de roure [70]. Aquests són:

Solera: El seu temps d'envelliment ha de ser superior a sis mesos i el contingut en components volàtils ha de ser superior a 200 mg per cada 100 cc.

Solera Reserva: El seu temps d'envelliment ha de ser superior a un any i el contingut total en components volàtils ha de ser superior a 250 mg per cada 100 cc.

Solera Gran Reserva: El temps d'envelliment ha de ser d'un mínim de tres anys i el contingut en components volàtils ha de ser superior a 300 mg per cada 100 cc.

Les mostres analitzades en aquest estudi van ser 6 Solera, 8 Solera Reserva i 10 Solera Gran Reserva que van ser subministrades pel grup de recerca en enologia del Departament de Química Analítica de la Universitat de Cádiz.

L'anàlisi exploratòria que es va dur a terme amb les dades mostrava que les mostres es diferenciaven clarament segons el tipus de brandy. La figura IV.31 mostra el dendograma resultant de l'anàlisi d'agrupacions. En aquest es pot observar que els brandies Solera presenten entre ells una similitud superior a 0.7 (70%) i que es diferencien de tota la resta de mostres ja que la branca del dendograma que uneix tots els Solera té una similitud zero amb l'altra branca que agrupa la resta de mostres. Pel que fa als Solera Reserva, aquests s'agrupen entre ells amb una similitud superior al 75%. Un grup de Solera Gran Reserva, però, són més semblants als Solera Reserva (similitud del 50% aproximadament), que no pas a la resta de Solera Gran Reserva amb els quals presenten una similitud al voltant del 25%.

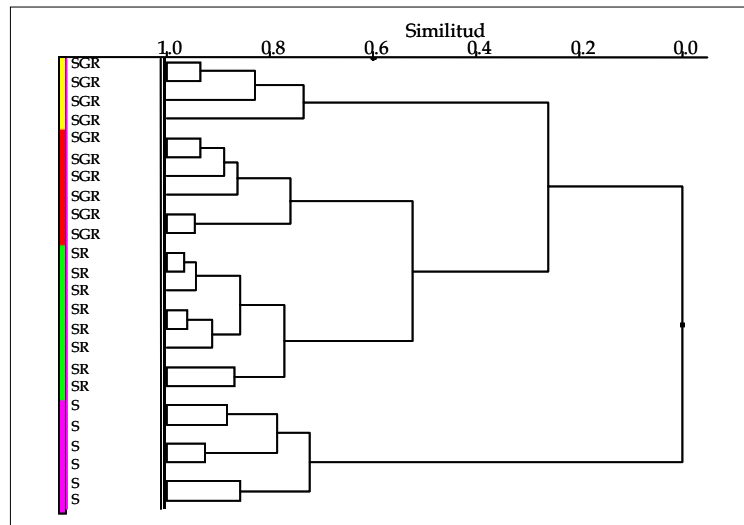


Figura IV.31. Anàlisi d'agrupacions de Brandies de Jerez Solera (S), Solera Reserva (SR) i Solera Gran Reserva (SGR).

Resultats semblants són els que presenta el gràfic d'*scores* del PCA que mostra la figura IV.32. En aquesta altra anàlisi, però, el primer component principal diferencia clarament els tres tipus de brandies, tot i que els Solera Gran Reserva estan molt dispersos.

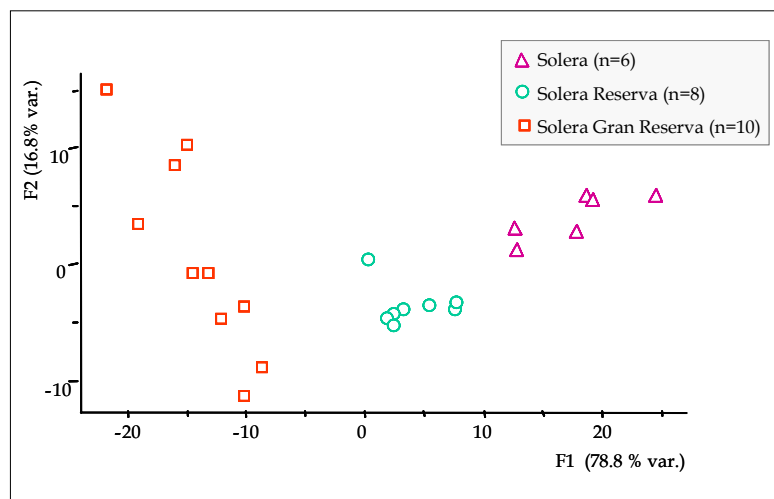


Figura IV.32. Gràfic d'*scores* del PCA de Brandies de Jerez.

Amb l'aplicació del mètode de classificació SIMCA, es va construir un model amb l'objectiu de predir el tipus de Brandies en mostres futures. La taula IV.5 mostra les distàncies obtingudes entre les diferents classes que, en tots els casos, són superiors a 3, la qual cosa vol dir que les classes són significativament diferents entre elles.

Classes	Distància entre classes
Solera/Solera Reserva	3.4
Solera/Solera Gran Reserva	11.5
Solera Reserva/Solera Gran Reserva	6.0

Taula IV.5. Distàncies entre les diferents classes obtingudes amb l'aplicació del mètode SIMCA en els Brandies de Jerez.

La validació del model SIMCA es va dur a terme mitjançant l'anàlisi de 19 Brandies diferents als utilitzats en la construcció del model. D'aquests, tres els va classificar com a Solera, quatre com a Solera Reserva i cinc com a Solera Gran Reserva. Exceptuant dues mostres d'aquest últim grup, totes les altres van ser classificades correctament, la qual cosa suposa un 53% d'encerts en la classificació. Set dels Brandies, però, no van ser classificats pel model en cap de les tres classes, la qual cosa suposa que un 37% de les mostres no van ser classificades en cap grup.

Tot i el petit nombre de brandies utilitzats en aquest estudi preliminar, els resultats són molt satisfactoris ja que mostren la utilitat del nas electrònic HS-MS en el control de qualitat de Brandies de Jerez, tot i l'elevat contingut en etanol d'aquest tipus de mostres. Tant en l'estudi realitzat amb els vins de la Ribera del Duero com en aquest últim dels brandies de Jerez, s'ha demostrat que el nas electrònic pot diferenciar begudes alcohòliques segons el tipus d'envelliment a les que han estat sotmeses, i que ve determinat principalment pel temps. Així doncs, amb l'anàlisi d'un conjunt significatiu de mostres representatives de cada tipus d'envelliment, es

podrien construir models de classificació robustos que permetessin conèixer el temps d'envelliment de mostres futures.

IV.2.4 Aplicació al control de la vinificació i la maduració del raïm

La senzillesa i rapidesa (10 min/mostra) de les anàlisis, són dues característiques importants del mètode desenvolupat amb el nas electrònic HS-MS que augmenten el potencial de la tècnica en aplicacions on el temps és un factor limitant, com és el cas de la monitorització i el control de processos. En aquesta línia, un altre treball realitzat ha estat l'estudi de la capacitat d'aquest instrument en el control del procés d'elaboració del vi, així com també en el control de la maduració del raïm, a partir de l'evolució de la composició volàtil.

IV.2.4.1 Control del procés de vinificació

En aquest estudi es va dur a terme el seguiment del procés de vinificació de 20 tines de fermentació del celler "Granja de Nuestra Señora de Remelluri", ubicat a la D.O.Q. Rioja, totes elles de la varietat Ull de llebre, coneguda en aquella zona com a Tempranillo.

La presa de mostra en cadascuna de les tines es va dur a terme abans de començar la vinificació, és a dir quan la mostra era encara most, en quatre estadis diferents de la fermentació alcohòlica caracteritzats per la densitat de la mostra, al final de la fermentació alcohòlica (vi en rama) i al final de la fermentació malolàctica.

A la figura IV.33, on es mostra el gràfic d'*scores* del PCA realitzat amb totes les mostres, es pot observar una continuïtat de les diferents etapes del procés, des de l'inici (el most) fins al final de la fermentació malolàctica. Les mostres de most i les de la primera etapa de la fermentació (densitat 1070 mg/l) formen dos grups que

es diferencien clarament de la resta. Però, a mesura que va transcorrent la fermentació, la diferència d'una etapa amb la següent ja no és tan evident.

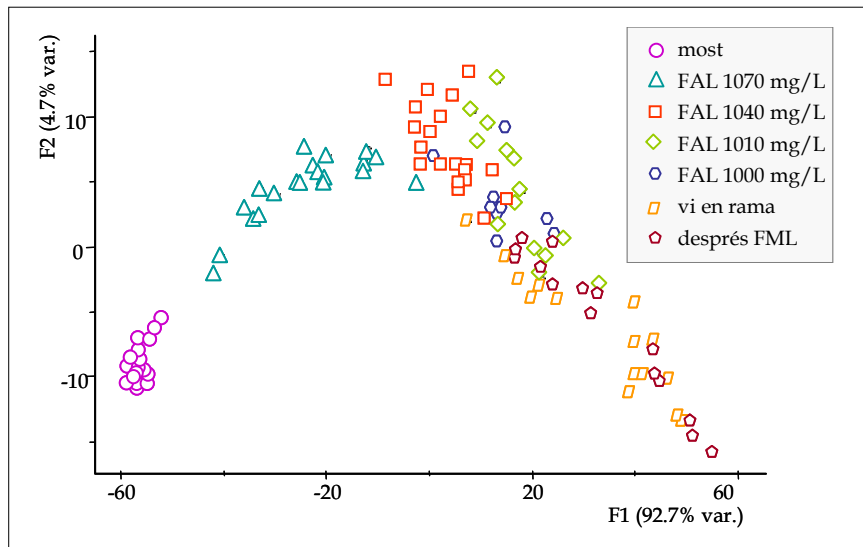


Figura IV.33. Gràfic d'scores del PCA de mostres recollides durant el procés de vinificació. FAL: fermentació alcohòlica; FML: fermentació malolàctica.

En aquests cas, el rang d'ions analitzats va ser de 35 a 200 m/z, el qual inclou els fragments de l'etanol. Per tant, la formació d'aquest compost majoritari del vi durant la fermentació alcohòlica, és la principal responsable de la diferenciació que s'observa de les diferents etapes del procés. Aquest fet el mostra el gràfic de *loadings* que es presenta a la figura IV.34. En aquest es pot observar que l'ió 45, que és l'ió majoritari que es forma en la fragmentació de l'etanol, té una contribució important en el primer component principal que, tal i com mostra el gràfic d'scores de la figura IV.33, és el que més diferencia les etapes de la vinificació. A més, si es superposa aquest gràfic amb el d'scores, es pot observar que aquesta variable (l'ió 45) augmenta amb el transcurs de la vinificació, és a dir, amb l'augment de la concentració d'etanol de les mostres.

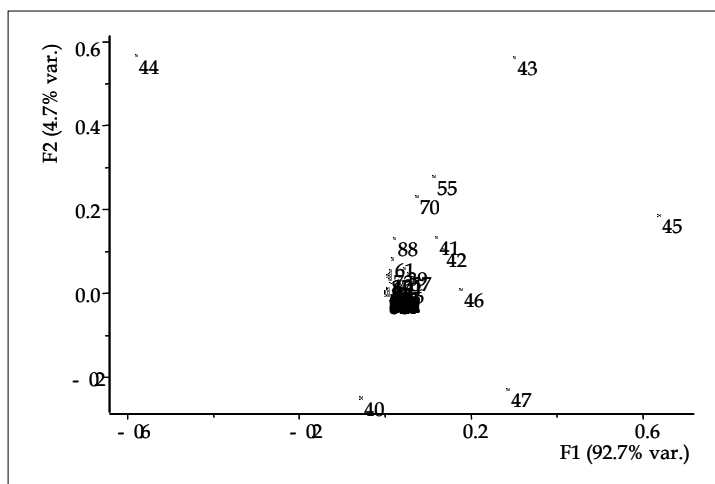


Figura IV.34. Gràfic de *loadings* del PCA de mostres recollides durant el procés de vinificació.

En el gràfic d'*scores* del PCA dut a terme sense tenir en compte les variables amb un m/z inferior a 50, és a dir, sense tenir en compte els fragments de l'etanol, es poden distingir també les diferents etapes de la fermentació alcohòlica, tot i que d'una manera no tan clara (figura IV.35). En aquest cas, la diferenciació és deguda a tota la resta de compostos volàtils que es van formant durant la fermentació i que, en definitiva, són els que realment tenen a veure amb l'aroma del vi resultant.

Tant en la figura IV.33 com en la IV.35, es pot observar que a mesura que transcorre la vinificació hi ha una menor diferenciació entre les mostres recollides en diferents estadis, fins al punt que les mostres de vi en rama i les de després de la fermentació malolàctica apareixen totes mesclades en el gràfic d'*scores* de la figura IV.33. Això no deixa de ser sorprenent ja que l'aroma del vi es modifica substancialment durant la fermentació malolàctica. A l'estudiar aquest solapament, però, es va observar que el nas electrònic diferenciava aquestes mostres en funció del tipus de tina on havia tingut lloc la seva fermentació.

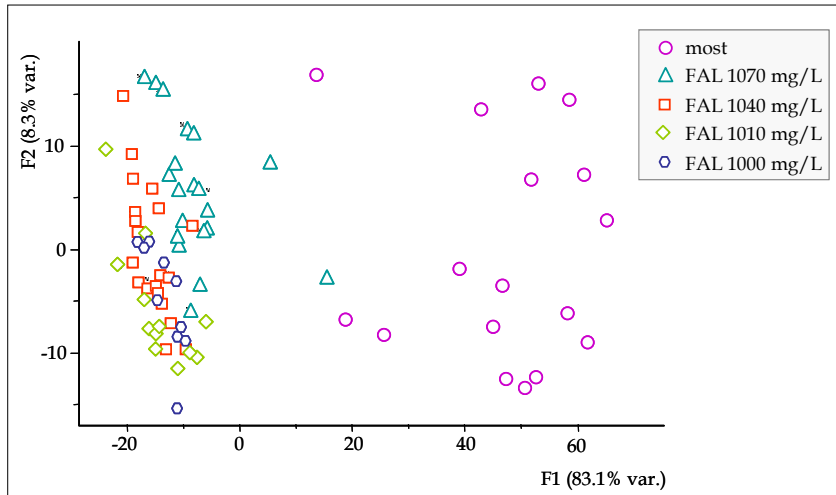


Figura IV.35. Gràfic d'scores del PCA realitzat amb el rang de variables 50-200 m/z de mostres recollides durant la fermentació alcohòlica (FAL).

En el gràfic de la figura IV.36 es mostra el resultat del PCA dut a terme amb les mostres de vi en rama, és a dir, recollides un cop acabada la fermentació alcohòlica i abans de començar la malolàctica. En aquest es pot observar que, exceptuant dues mostres, el primer component principal diferencia clarament els vins que han fermentat en tines d'acer inoxidable dels que ho han fet en tines de fusta.

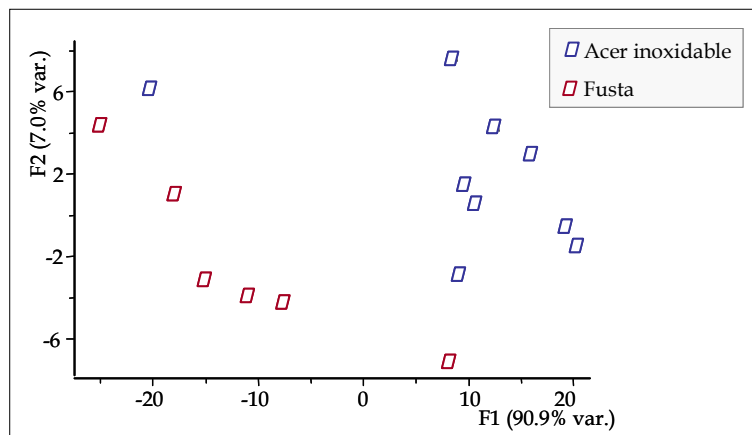


Figura IV.36. Gràfic d'scores del PCA de les mostres recollides al final de la FAL.

Abans de que els vins comencessin la fermentació malolàctica, alguns es van transvasar a altres recipients. Els resultats obtinguts en l'anàlisi exploratòria de les mostres recollides un cop acabada la fermentació malolàctica, mostren que els vins s'agrupen segons el tipus de recipient on ha tingut lloc aquesta segona fermentació. Aquest fet es pot observar en el gràfic d'*scores* de la figura IV.37 on el primer component principal, que explica un 97% de la variabilitat total de les mostres, diferencia els vins que han dut a terme la fermentació malolàctica en bótes de fusta vella, en les tines d'acer inoxidable o en bótes de fusta de roure. Cal destacar que el segon component principal diferencia els vins de les bótes de roure francès del vi de la bóta de roure americana, tot i que caldria disposar d'un nombre més gran de mostres de les que han dut a terme la fermentació malolàctica en bótes de roure americana per tal de poder treure resultats conclusius.

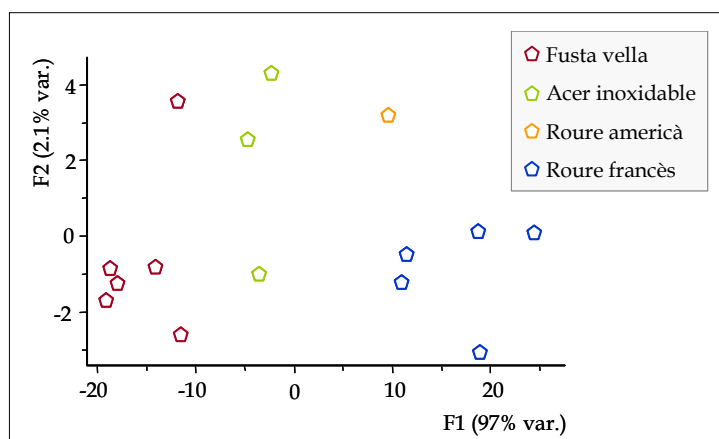


Figura IV.37. Gràfic d'*scores* del PCA de les mostres recollides després de la fermentació malolàctica.

Aquests resultats deixen entreveure l'aplicabilitat del nas electrònic HS-MS en el control del procés de vinificació. Tot i que durant la fermentació alcohòlica les diferències que s'observen en les mostres són degudes, bàsicament, a la formació d'etanol, eliminant de la matriu de dades les abundàncies dels ions d'aquest compost volàtil majoritari, es pot detectar, en el transcurs de la fermentació, les

diferències degudes a la formació dels altres compostos volàtils que són els que realment poden influir en l'aroma del vi. Un cop acabada la fermentació també es pot dur a terme un control del seu envelliment ja que, com s'ha demostrat, el nas electrònic pot detectar diferències en la composició aromàtica de les mostres degudes a factors com, per exemple, el tipus de tina on s'han dut a terme la fermentació alcohòlica i/o malolàctica.

Per tant, el nas electrònic pot ser una eina útil per als cellers en el seguiment, a temps real, de l'evolució de l'aroma durant la vinificació per tal de detectar si en alguna de les tines o bótes succeeix quelcom que faci variar de manera anòmala la composició aromàtica de la mostra.

IV.2.4.2 Control de la maduració dels raïms

Una altra aplicació interessant del nas electrònic és el seguiment del procés de maduració dels raïms a partir de l'evolució de la seva composició aromàtica. El grau de maduresa que té el raïm en el moment de la verema té una incidència important en l'aroma del vi resultant, fins al punt que en molts estudis s'ha demostrat que la qualitat aromàtica del vi final varia molt en funció de la data de la verema.

L'elecció de la data de la verema es fa tenint en compte el punt òptim de maduració. Aquest punt òptim, però, no és un òptim absolut ja que existeixen diferents tipus de maduresa: fisiològica, aromàtica, fenòlica, tecnològica... [71]. Depenent del tipus de vi que es vulgui elaborar o de les qualitats que s'hi vulguin aconseguir (frescor, equilibri, riquesa, aroma varietal, màxim color), es tindrà en compte un tipus de maduresa o un altre a l'hora d'escollir la data òptima de la verema.

Pel que fa a la maduresa aromàtica, generalment la seva estimació es duu a terme mitjançant una anàlisi sensorial d'uns grans de raïm. Aquests es tasten, d'un en un,

mastegant bé les pells durant uns segons i intentant apreciar la quantitat i la qualitat de l'aroma del raïm. Aquesta anàlisi, però, té una component subjectiva molt important. El seguiment de l'evolució dels compostos aromàtics durant la maduració del raïm mitjançant una tècnica objectiva, ràpida i senzilla com és el nas electrònic, podria permetre determinar quin seria el moment òptim pel que fa a la maduració aromàtica del raïm, el qual seria un altre criteri objectiu a tenir en compte a l'hora d'establir el moment de la verema.

Amb l'objectiu d'estudiar el potencial del nas electrònic HS-MS en el control de la maduració aromàtica, es va fer un seguiment del procés de maduració de raïms de la finca experimental "Mas dels Frares" que disposa la Facultat d'Enologia de Tarragona de la Universitat Rovira i Virgili al terme municipal de Constantí.

En aquest estudi es van recollir mostres de raïm de sis varietats blanques (Macabeu, Xarel·lo, Garnatxa blanca, Parellada, Malvasia i Chenin) i sis de negres (Ull de llebre, Cabernet sauvignon, Garnatxa, Syrah, Merlot i Carinyena) en diferents estadis de la maduració, des del verolament del raïm fins que aquest es va veremar.

A l'inici de l'estudi, per a cadascuna de les varietats es van marcar els ceps dels quals s'agafarien cada vegada les mostres, tenint en compte que fossin representatius de la parcel·la de terreny on estaven plantats. Per tal de que el mostreig fos el més representatiu possible, s'agafaven grans de les dues bandes del cep i de diferents llocs del raïm. En cada mostreig es collien aproximadament 100 grans de raïm de cadascuna de les varietats.

Al laboratori, i amb l'ajuda d'un colador xinès, s'extreia el suc dels grans de raïm i s'obtenia el most de cada varietat. A aquest se li afegia fluorur sòdic, en una concentració d'1 g/L, per tal d'impedir la seva fermentació. El most es guardava dins d'una ampolla a la nevera i sota atmosfera de nitrogen, fins al moment de la seva anàlisi. El mètode d'anàlisi utilitzat va ser el mateix que el dels vins. L'únic paràmetre que es va modificar va ser el rang d'ions monitoritzats pel detector que,

en aquest cas, va ser de 35 a 200 m/z ja que els mostos no contenen etanol i, per tant, no era necessari eliminar els ions per sota de 50.

En la primera anàlisi exploratòria de les dades es va observar que l'ió 40 i el 44 eren molt majoritaris en totes les mostres. Es va detectar que l'ió 40 apareixia ja a les mostres en blanc que es feien abans de cada anàlisi, en les quals s'analitzava l'espai de cap del vial buit. Era probable, doncs, que aquest ió provingués de l'ambient o del mateix instrument i no de la mostra. Per tant, es van eliminar les abundàncies de l'ió 40 de la matriu de dades. Pel que fa a l'ió 44, es va fer una anàlisi cromatogràfica d'una de les mostres mitjançant GC-MS amb l'objectiu d'identificar el compost que en la seva fragmentació originava l'ió 44. El resultat de l'anàlisi mostrava un pic considerable que era identificat per la llibreria d'espectres com a diòxid de carboni. Si aquesta identificació és correcta, desconeixem la causa de la formació d'aquest gas en les mostres. La probabilitat de que els mostos fermentessin és molt baixa ja que s'hi havia afegit fluorur sòdic com antisèptic.

La figura IV.38 mostra el gràfic d'*scores* del PCA realitzat a les dades obtingudes en l'anàlisi del mostos de raïm de les varietats blanques sense la variable corresponent a l'ió 40. Tal i com indica la gradació de colors del gràfic de menys intens a més intens, existeix una tendència marcada pel grau de maduresa dels raïms que és captada, principalment, pel primer component principal, el qual explica un 73.4% de la variabilitat de les mostres. Aquest component principal diferencia els mostos obtinguts amb els grans de raïm madurs, collits els últims dies abans de la verema, dels mostos obtinguts amb grans collits en estadis, més inicials, en els que els raïms estaven més verds.

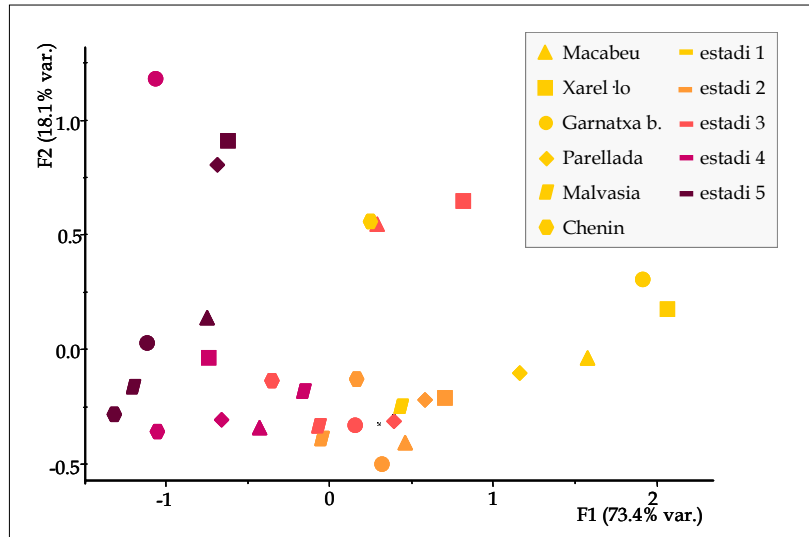


Figura IV.38. Gràfic d'scores del PCA de raïms de diferents varietats blanques en diferents estadis de maduració.

Resultats semblants es van obtenir amb les varietats de raïm negre, els quals es mostren al gràfic de la figura IV.39. En aquest cas es pot observar també la tendència que segueixen les mostres en funció del grau de maduresa.

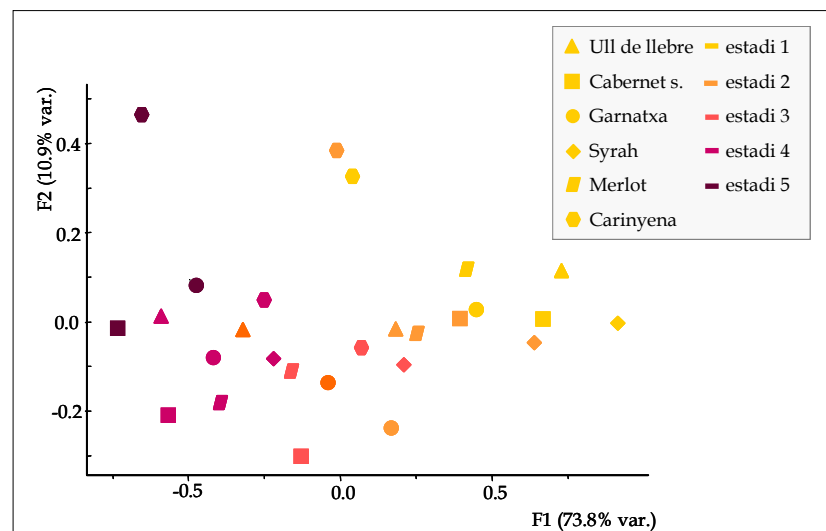


Figura IV.39. Gràfic d'scores del PCA de raïms de diferents varietats negres en diferents estadis de maduració.

La figura IV.40 mostra la representació de les variables sobre els dos primers components principals del PCA realitzat amb les mostres de les varietats blanques. Si es superposa aquest gràfic amb el gràfic d'*scores* corresponent (figura IV.38), es pot observar que els ions 45 i 42 són els que tenen una contribució més gran al primer component principal que és el que diferencia els mostos segons el grau de maduresa del raïm. També es pot observar que l'ió 44, que tot i tenir una abundància molt més gran que la resta de compostos, contribueix poc als 2 components principals que es representen en el gràfic de la figura IV.40. El gràfic de *loadings* del PCA realitzat a les mostres de les varietats negres era molt semblant.

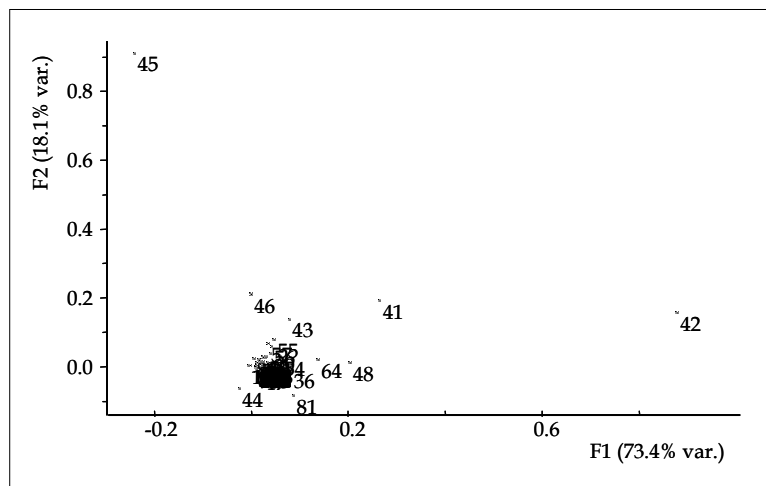


Figura IV.40. Gràfic de *loadings* del PCA de raïms de diferents varietats blanques en diferents estadis de maduració.

Per altra banda es va constatar que el senyal que s'obtenia en l'anàlisi d'aquests mostos era molt feble. La figura IV.41 mostra el senyal del detector en funció del temps que s'obtenia en l'anàlisi d'un most i en l'anàlisi d'un vi. Com es pot observar la diferència és considerable i més tenint en compte que l'abundància del

pic gran que apareix en l'anàlisi del most és deguda principalment a la suma de les abundàncies dels ions 40 i 44. No es coneix amb certesa la procedència d'aquests dos ions però, segurament, cap dels dos prové de la fragmentació de compostos implicats en l'aroma dels raïms, que són els que poden aportar informació útil pel que fa a l'evolució de l'aroma respecte a la maduració del raïm.

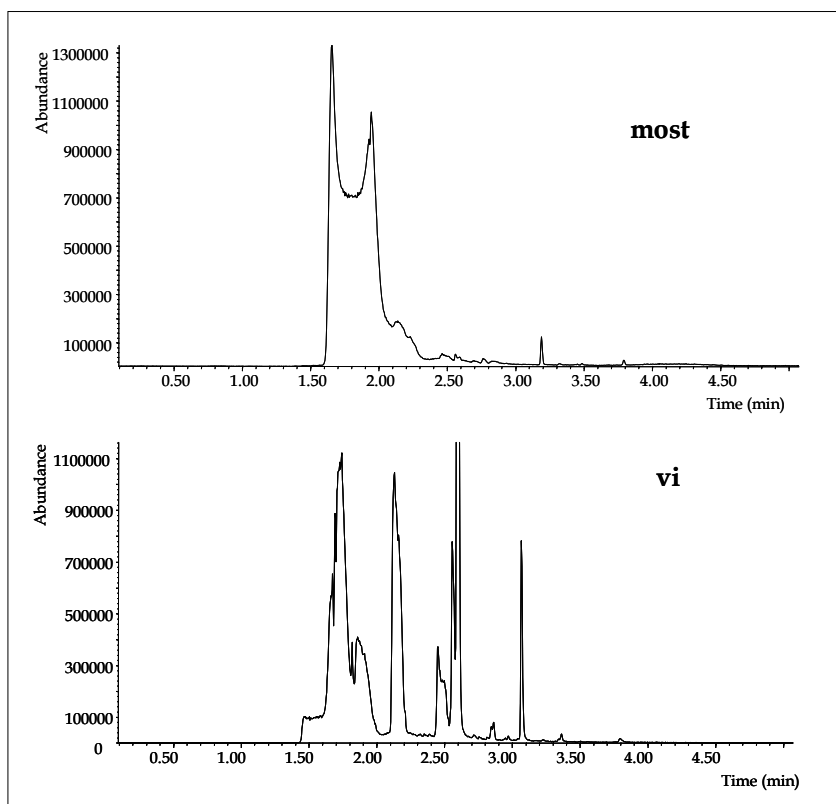


Figura IV.41. Senyals obtinguts amb el nas electrònic HS-MS en l'anàlisi d'un most i en l'anàlisi d'un vi.

Un dels inconvenients d'aquest mètode en la seva aplicació als mostos és, doncs, la baixa sensibilitat que presenta pels compostos responsables de la seva aroma. Cal tenir en compte que aquests compostos es troben en el raïm a nivells de $\mu\text{g/l}$ o

inferiors. Una manera d'augmentar la sensibilitat del mètode seria utilitzant com a sistema de pretractament de la mostra una tècnica que permetés concentrar els compostos. Com ja s'ha comentat en la primera part d'aquest capítol, l'inconvenient que presenta la tècnica de l'espai de cap estàtic és la seva baixa sensibilitat pel fet que no es duu a terme cap tipus de concentració dels analits. Per altra banda, potser també es podria augmentar la sensibilitat del mètode millorant el sistema d'obtenció del most. Tenint en compte que la major concentració de compostos volàtils es troben a la pell i no pas a la polpa, potser utilitzant alguna tècnica més agressiva que el colador xinès per a l'obtenció del most o duent a terme maceracions de les pells, s'aconseguiria una major concentració de compostos volàtils al most.

Recentment, en el Grup de Química Analítica Enològica i dels Aliments on s'ha desenvolupat aquesta tesi, s'ha obert una nova línia d'investigació en el marc d'un projecte que versa sobre el control de la maduració dels raïms mitjançant tècniques ràpides d'anàlisi. Concretament, les tècniques que es preveuen estudiar són l'espectrometria d'infraroig (FTIR) per a l'avaluació de la maduració fenòlica i el nas electrònic per a l'avaluació de la maduració aromàtica. És en aquest projecte doncs, on es profunditzarà en l'estudi del nas electrònic en el control de la maduració aromàtica dels raïms. Els estudis preliminars realitzats en aquesta tesi serviran de punt de partida.

A continuació es presenta l'article que porta per títol "*Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing*" on s'hi troben recollits els resultats més rellevants obtinguts en aquest estudi de l'aplicació del nas electrònic HS-MS al control de qualitat del vi.

*APPLICATION OF A HEADSPACE MASS SPECTROMETRY SYSTEM TO THE
DIFFERENTIATION AND CLASSIFICATION OF WINES ACCORDING TO THEIR
ORIGIN, VARIETY AND AGEING*

Journal of Chromatography A, 1057 (2004) 211-217



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Chromatography A, 1057 (2004) 211–217

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing

M. Pilar Martí, Olga Busto, Josep Guasch*

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

Received 24 March 2004; received in revised form 30 August 2004; accepted 30 August 2004

Abstract

The system based on coupling a headspace sampler to a mass spectrometer (HS-MS), considered a kind of electronic nose (e-nose), is an emerging technique in the field of food aroma analysis. The global mass spectrum this system provides is a fingerprint of each sample analysed that contains the information related to volatile composition of the sample. The use of chemometric techniques allows to compare the spectra of the samples and then, to classify them according to different properties. In this paper, we present the development of a method for wine analysis using a HS-MS system and multivariate analysis techniques. The method was successfully applied to differentiate and classify wines according to its origin, variety and ageing. The main advantages of the proposed methodology are the minimum sample preparation required and the speed of analysis (10 min/sample).

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Wine; Aroma; Electronic nose; Chemometric techniques; Classification; Differentiation

1. Introduction

Aroma is an important factor in quality control and quality assurance of foods, but in wines, this factor is possibly the most important. Sensory analysis by a panel of trained judges is the most common technique for controlling the quality of wines. However, this technique requires a group of trained people that can only carry out a little number of analyses every day. Moreover, the subjectivity of the panellists affects the analysis in great measure.

In the last 20 years, there has been an increasing research in order to achieve a faster and more objective system for evaluating aromas, which has led to the development of the e-nose technology [1–5]. Most of the systems available in the market are based on the interaction of the volatile compounds in the headspace above the sample with a gas sen-

sor array. The sensor responses generated by these physical and/or chemical interactions are treated with chemometric techniques to differentiate and classify these complex mixtures of volatile compounds. Although a lot of food analysis applications have been made using this type of instrument, in wine research only a few studies have been done [6–9]. Furthermore, the small number of samples analysed in these studies, is not enough to prove the suitability of the technique for the differentiation and classification of wines. The poor results obtained by these instruments in wine analysis are because ethanol, the major component of the headspace of the sample, causes interference in gas sensors. To solve this problem, some research groups have tried to eliminate the ethanol of the samples, for instance, by using the pervaporation technique or a purge and trap system [10–12]. Even though these strategies enable to improve the results, the speed and the simplicity of the technique, two of the main advantages of the e-nose systems, are compromised.

* Corresponding author. Fax: +34 977250347.
E-mail address: qaenol@fe.urv.es (J. Guasch).

A few years ago, a new type of e-nose based on mass spectrometry (MS) was developed [13]. It involves injecting the headspace of the sample into the ionisation chamber of the mass spectrometer in which the analytes are fragmented. The result is a global mass spectrum for each sample analysed that is obtained from the time integral of all spectra. When several samples are analysed, a data matrix composed by the abundance of all mass-to-charge ratio (m/z) monitored, is generated. The matrix is treated with multivariate analysis techniques to compare and classify the substances from their volatile composition. Chemical information about the kind of compounds responsible for the differences between samples can be obtained from the ion-fragmentation patterns and the results can be compared directly with the results from conventional GC–MS instruments. The MS-based electronic nose has already given good results in foodstuffs analysis [14–18]. In the field of alcoholic beverages, the suitability of the HS-MS e-nose has been proved for quantitative purposes using multivariate calibration techniques for determining 2,4,6-trichloroanisole in wines [19] and, also, for determining the ageing time of spirits in oak barrels [20]. The good results obtained in these studies are due to the fact that ethanol is not a problem in the analysis of alcoholic beverages with this instrument, because the ethanol interference can be easily avoided if the fragment ions corresponding to ethanol fragmentation are not selected in the mass spectrometric analysis. This fact is an important advantage of the instruments based on MS versus the instruments based on gas sensors.

In this study, we develop a simple, quick and automatable method for the differentiation and classification of wines according to different oenological parameters using an HS-MS electronic nose and multivariate analysis techniques.

2. Experimental

2.1. Samples

In the present work, three different studies related to differentiation and classification of wines according to their variety, origin and ageing have been carried out, by choosing suitable representative samples.

Samples from different Catalan wine growing zones were chosen for the study of varietal wines. This study was carried out over three vintages (1999–2001), being the total amount of wines analyzed for the 3 years: 82 Cabernet sauvignon, 66 Tempranillo and 61 Merlot wines. The samples chosen in the study of wine origin differentiation were from Priorat and Terra Alta, two very close Catalan growing zones with very similar climatology. Most of the wines from both zones are blends of Gamatsa and Cariñena varieties. Samples of 12 red wines from Priorat and 13 red wines from Terra Alta were analyzed.

In the study of ageing differentiation, the wines chosen were from Ribera del Duero, a very important Spanish wine

growing zone where the commercial wines are classified according to their ageing process, by a regulatory council, into four different administrative categories: *Young* wines (red wines with an ageing time less than 12 months in casks), *Crianza* wines (red wines with an ageing of 12 months in casks), *Reserva* wines (red wines with an ageing time of 36 months between cask and bottle but with a minimum of 12 months in casks) and *Gran Reserva* wines (exceptional quality red wines with an ageing higher than 60 months and with at least 24 month ageing in casks followed by 36 month ageing in bottles). The total amount of samples analyzed in this study were: 54 *Young* wines, 34 *Crianza* wines, 33 *Reserva* wines and 10 *Gran reserva* wines.

The HS-MS analysis of the samples was always made in triplicate. However, the multivariate analysis was carried out with the average of the three mass spectra obtained with the triplicates of each sample. Before carrying out the chemometric analysis we examined the raw data and we removed some samples that we considered non-representatives because they were very clear outliers.

2.2. Apparatus

Wine analyses were carried out on a HS-MS electronic nose composed of a HP 7694 headspace sampler, a HP 6890 gas chromatograph and a HP 5973 quadrupole mass spectrometer with a diffusion pump from Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany). The chromatographic column was only used to transfer the volatile compounds to the MS, not to resolve chromatographic peaks.

2.3. Procedure

In the optimised conditions, 5 mL of wine and 0.58 g of NaCl were placed in a 10 mL vial that was hermetically capped with a PTFE/silicone septum. To obtain the equilibrium of the volatile compounds between the liquid and the headspace, the sample was thermostated at 65 °C for 1 h under constant stirring. Afterwards, the headspace of the sample was introduced into the gas chromatograph injection port. The loop and transfer line temperatures were 90 and 105 °C, respectively, and the pressurisation and injection times were 0.30 and 0.60, respectively. Chromatographic injection was made in splitless mode for 1.6 min at 200 °C using an inlet of 1.5 mm i.d. We used a HP-5MS chromatographic column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) with an oven temperature program of 70 °C (1 min), 70 °C/min, 180 °C (2.5 min). The carrier gas was helium with a flow-rate of 1.8 mL/min. The purpose of using these chromatographic conditions (oven temperature program and flow) was to transfer the volatile compounds to the MS in the shortest time (5 min). Mass spectra were recorded by electronic impact (EI) ionisation at 70 eV. The mass-to-charge ratio range (m/z) used was 50–200. The ion source and mass quadrupole temperatures were 230 and 150 °C, respectively.

2.4. Chemometric treatment

The software we used for multivariate analysis was Pirouette 2.6 from Infometrix (Woodinville, WA, USA). The chemometric treatments carried out include the principal component analysis (PCA), that it is an unsupervised technique used to recognize natural groups of the samples, and soft independent modeling of class analogy (SIMCA) that is a supervised pattern recognition technique used to classify the samples. Before applying the chemometric treatments mass spectra were normalized to 100 and data matrix was mean-centered.

3. Results and discussion

The first part of the study was the optimisation of the parameters that could affect the response obtained in the HS-MS analysis of wines in order to achieve the highest response as well as to detect the parameters that are responsible of the transfer of the volatile compounds to MS system detector, to obtain the shortest analysis time. Once the optimal conditions were found, we carried out different studies related to differentiation and classification of wines according to different oenological parameters.

3.1. Optimisation

We performed the experiments using a commercial wine. Our criterion for obtaining the optimal conditions was to achieve the highest overall abundance of the mass range 50–200 m/z . We selected this range because above 200 m/z there are not ion fragments with a significant abundance. On the other hand, below 50 m/z there are fragment ions corresponding to the ethanol fragmentation (MW 46) that could interfere in chemometric analysis, due to their high abundance (ethanol is a major compound of the headspace) in comparison with the rest of fragment ions. Moreover, in the signal below 50 m/z the noise is higher.

The initial parameters studied were extraction time and extraction temperature because, as it is well-known, they affect the headspace composition. As these are closely related, we studied them simultaneously achieving a two-factor two-level factorial design with a central point [21]. We analysed three replicates of the sample in each experimental point studied. According to our experience in previous works [19], the temperature and time levels tested were 50 and 80 °C and 20 and 60 min, respectively. The best results were obtained at 65 °C for 40 min (the central point). By verifying more experimental points around the best one, we found that the 60 min response was slightly better than the 40 min one. Therefore, we chose 60 min as the extraction time.

Other important parameter that modifies the headspace composition is the ionic strength. Different amounts of sodium chloride were added to 5 mL of sample placed in 10 mL vials, which were shaken for 60 min at 65 °C. The

best results were obtained when the sodium chloride concentration was 2 M.

The criterion for optimising the transfer conditions was to achieve the shortest time in the transfer of the volatile compounds to the MS system because this step determines, in great measure, the run time analysis of the method. With the temperature program used, we were able to transfer all the compounds to the detector in only 5 min. However, the total run time analysis was 10 min because the gas chromatograph oven needs additional time to come back to the initial temperature conditions before injecting another sample. Therefore, the analysis time would be shorter if the transference of the volatiles to the MS detector was using an isotherm at high temperature. But this was not possible because we experimentally found that the signal obtained was very low at initial chromatographic temperatures higher than 80 °C. We cannot explain this fact, but we think that ethanol, that is a major component of the wine headspace, causes this upshot when it is introduced to the column at temperatures higher than its boiling point. Perhaps, when the initial oven temperature is below the ethanol boiling point, the response obtained is better due to the solvent effect. On the other hand, if we had used an uncoated deactivated retention gap as transfer line between the headspace autosampler and the detector, probably we would have shortened the run time analysis. However, we used an analytical capillary column because this configuration allows an easier change to switch from a HS-(GC)-MS e-nose to a conventional GC-MS.

3.2. Differentiation of wine varieties

One of the numerous factors that may affect the composition of wine aroma is grape variety, so wines made with Cabernet sauvignon, Merlot or Tempranillo grape varieties were analysed. The study was carried out over three vintages (1999–2001).

In 1999 vintage, 35 Cabernet sauvignon, 28 Tempranillo and 17 Merlot wines were analysed. The PCA was done on the covariance matrix because the differences between wines are caused by major components of wine aroma due to the low sensitivity of the static headspace technique to extract the minor components. Therefore, the results of the PCA on the correlation matrix were not better. In the first exploratory analysis carried out with all variables, we observed a slight differentiation among varieties. The cluster analysis carried out on the raw spectra and also on the PCs did not improve the results. However, a new PCA carried out with a selected group of variables (51–53, 57, 58, 67, 73–75, 77 and 108 m/z) allowed to find higher differentiation. In Fig. 1, where the scores' graphic is shown, a partial overlapping among groups can be observed. These overlapping can also be observed in the interclass distances obtained with the SIMCA classification method (Table 1). This parameter is a useful measure of class separation. The higher the interclass distance between two groups, the higher the difference between them. The small distances between Cabernet sauvignon and

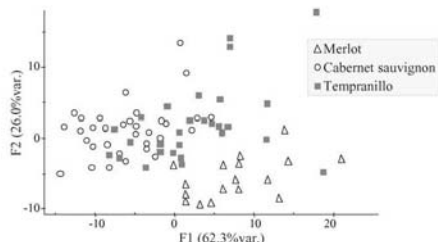


Fig. 1. Scores plot of PCA of Cabernet sauvignon, Merlot and Tempranillo wines of 1999 vintage.

Tempranillo wines as well as the distances between Merlot and Tempranillo wines, showed that each pair of these varietal wines are insufficiently distinguished from the aroma point of view. On the other hand, Cabernet sauvignon and Merlot wines are well-differentiated. The distance between this pair of varietal wines is larger than the distances between Cabernet sauvignon and Tempranillo wines or between Merlot and Tempranillo wines. These results are successful because by using an electronic nose, the differentiation of a significant number of wines according to an oenological parameter, such as variety, has been possible for the first time. In Fig. 2a and b are shown the scores and loadings graphics obtained considering only Merlot and Cabernet sauvignon wines. The loadings associated with each factor showed that fragment ions 58 and 73 are the variables which most contribute to factor 1. This factor, which accounts for 72.9% of the total variability of the samples, seems to be the most important for distinguishing Merlot from Cabernet sauvignon wines. This information can be useful for obtaining chemical information about the volatile compounds responsible of the differentiation between these two varieties of wines. For instance, the fragment ion 73 is characteristic of several organic acids present in wine aroma such as isobutyric, butyric, hexanoic and octanoic. As a conclusion, Merlot wines are richer than Cabernet sauvignon wines in some of these compounds. On the other hand, the origin of the fragment ion 58, whose abundance is higher in Cabernet sauvignon wines, may be caused by the fragmentation of 3-methylthio-1-propanol, a sulphur compound usually found in these kind of wines [22]. The possibility of obtaining additional chemical information is an important advantage of the e-nose based on MS versus the e-nose based on gas sensors.

Table 1
SIMCA models of varietal wines

	Vintage 1999	Vintage 2000	Vintage 2001
Cabernet sauvignon/Merlot	2.3	0.9	1.5
Merlot/Tempranillo	0.9	0.0	1.0
Cabernet sauvignon/Tempranillo	0.4	0.0	2.1

Interclass distances.

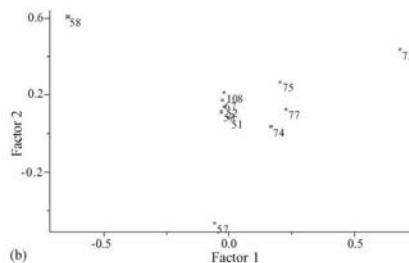
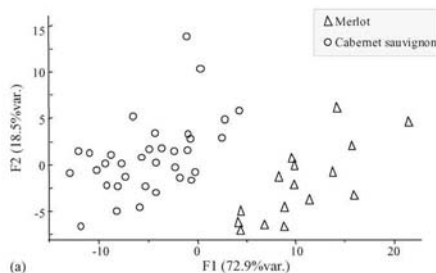


Fig. 2. PCA of Cabernet sauvignon and Merlot wines of 1999 vintage. (a) Scores plot and (b) loadings plot.

The results obtained in the analysis of 28 Merlot, 20 Tempranillo and 29 Cabernet sauvignon wines of the 2000 vintage were not as good as the 1999 vintage ones. The projection of the samples on different factors showed strong overlap of the three groups of wines. The selection of a set of variables (67–69, 71, 81–84 *m/z*) allowed a slight differentiation between Merlot and Cabernet sauvignon wines. These results are shown in Fig. 3 where it can be observed that the second

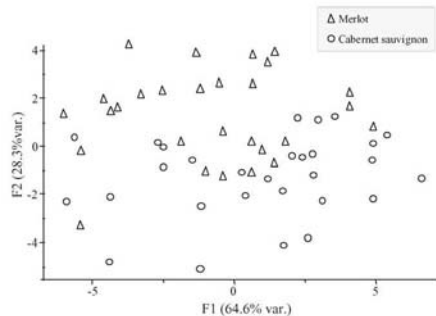


Fig. 3. Scores plot of PCA of Cabernet sauvignon and Merlot wines of 2000 vintage.

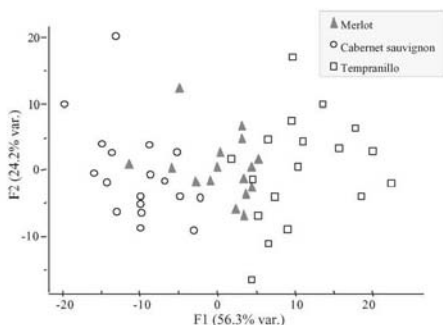


Fig. 4. Scores plot of PCA of Cabernet sauvignon, Merlot and Tempranillo wines of 2001 vintage.

factor is the most important for distinguishing both groups. Nevertheless, it only accounts for 28.3% of the total variance. The distance between Cabernet sauvignon and Merlot wines of vintage 2000 obtained with the SIMCA method (Table 1) also showed a very slight differentiation which was not sufficient for obtaining a clear classification of these varietal wines.

Although it was observed a partial overlap among the different varieties, in the 2001 vintage the differentiation of 16 Merlot, 18 Tempranillo and 18 Cabernet sauvignon wines was clearer than in the 2000 vintage. If we compare the graphic of scores showed in Fig. 4 with the same graphic obtained in the PCA of the 1999 vintage wines (Fig. 1), it can be observed that both plots are very similar but in 2001, the group in the middle is Merlot wines instead of Tempranillo wines. Therefore, as it can be observed in Fig. 4, the best differentiation obtained with 2001 vintage wines was between the Cabernet sauvignon and Tempranillo wines. The interclass distances detailed in Table 1, show that the three groups of wines are more differentiated in 2001 vintage than in 1999 vintage.

Although the results obtained in different vintages were different, the suitability of the method developed using the HS-MS technique to differentiate and classify wines according to their variety has been proved. Moreover, the high number of samples analysed ratify the results obtained because they are statistically representative. Besides grape variety, there are many other factors that may affect wine aroma composition and, some of them—for instance climatology—may be responsible of the aromatic differences among vintages.

3.3. Differentiation of wine origin

In the PCA carried out with the data matrix obtained in the HS-MS analysis of wines from Priorat and Terra Alta, we observed a slight differentiation between wines of different origin. In this first exploratory analysis, we found a group of

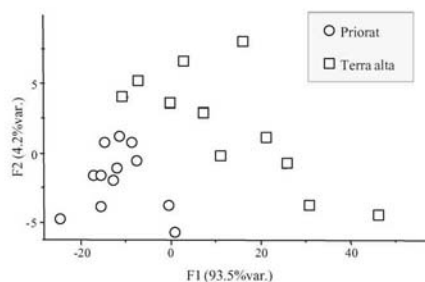


Fig. 5. Scores plot of PCA of red wines from different origin: Priorat and Terra Alta.

variables with an important influence on the differentiation (70, 73, 88, 101 and 115 m/z). Therefore, in order to achieve a better differentiation, we carried out another PCA but only using these fragment ions as independent variables. The projection of the samples on the first and second factors that, collectively account for 97.7% of the total variability of the samples, is shown in Fig. 5. As it can be observed, wines cluster according to their origin. The interclass distance obtained between Priorat and Terra Alta wines by applying the SIMCA classification method to the data matrix was 14.5. This high value corroborates the results observed in the PCA analysis since it indicates that the two classes are significantly different. These results are very promising because, as it has been previously explained, the zones studied are geographically very close and their wines are blends of the same varieties.

3.4. Differentiation of ageing

In Fig. 6 we show the scores' graphic of the PCA obtained in the analysis of 54 *Young* wines, 34 *Crianza* wines, 33 *Reserva* wines and 10 *Gran Reserva* wines from Ribera

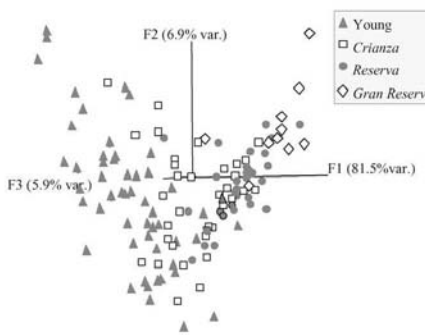


Fig. 6. Scores plot of PCA of wines with different ageing time from Ribera del Duero.

Table 2
SIMCA model of Ribera del Duero wines

Classes	Interclass distance
<i>Young/Crianza</i>	1.0
<i>Young/Reserva</i>	1.7
<i>Young/Gran Reserva</i>	5.7
<i>Crianza/Reserva</i>	0.3
<i>Crianza/Gran Reserva</i>	3.8
<i>Reserva/Gran Reserva</i>	1.8

del Duero. The variables used in the multivariate analysis were the most important fragment ions in the differentiation of the four categories (69, 75, 87, 89, 97, 102, 103, 116 and 129 *m/z*). These fragment ions were found in a previous exploratory analysis. As it can be observed, although the four categories of wines are partially overlapped, there is a differentiation among them. This overlapping could be due to the small differences that exist between wines of different categories but similar ageing. For instance, a young wine and a *crianza* wine that have spent 11 and 12 months in cask, respectively, are very similar. However, they belong to different administrative wine categories. This fact is also shown in the results of the SIMCA classification method applied to the data matrix. In Table 2, where the interclass distances are shown, it can be observed that in most cases the distances are large, with the exception of the distances between *Young* and *Crianza* wines and between *Crianza* and *Reserva* wines. They are shorter because of the similar ageing of samples placed on the frontier ageing of these categories.

In order to know the suitability of a SIMCA model to classify Ribera del Duero wines in the different administrative categories, we divided the group of samples into two sets: the training set (composed of 89 wines to build the model) and the validation set (composed of 42 wines to study the prediction capacity of the model). The number of validation samples analysed belonging to each class and the prediction results obtained with the SIMCA model built are indicated in Table 3. We did not include any *Gran Reserva* wine because the number of samples of this class was small and we used all of them to build the model. Despite the fact that 13 wines were non-classified, the results were successful because 23 wines were correctly classified and only six wines were not. Four of these wrong classified samples corresponded to *Crianza* wines. Two of them were classified as young wines and the rest as *Reserva* wines. The prediction errors of the *Crianza* wines could be explained by the small interclass distances

Table 3
Results of SIMCA model validation

Validation samples	Number	Results of prediction		
		Correct	Wrong	Non classified
<i>Young wines</i>	22	15	1	6
<i>Crianza wines</i>	15	6	4	5
<i>Reserva wines</i>	5	2	1	2
Total	42	23	6	13

between *Young* and *Crianza* wines and between *Crianza* and *Reserva* wines. In the evaluation of this results should be taken into account that, as it has been commented above, the differences among wines of different administrative categories, in some cases, are very small.

4. Conclusions

The HS-MS electronic nose was successfully applied to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing. The simplicity and speed in the sample preparation step and the speed of the HS-MS analysis (10 min/sample) of the method developed, offer a great number of advantages over sensory analysis in the authentication and in the quality control of wines. Moreover, as it was shown, it is also possible to achieve information about chemical composition of the responsible compounds of the differentiation, which may be of interest in wine aroma research.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología (project AL197-0765) for providing Mrs. Martí's doctoral fellowship, the Ministerio de Ciencia y Tecnología/INIA (project VIN00-045) for their financial support and to the Consejos Reguladores de las Denominaciones de Origen Penedès, Priorat, Terra Alta, Conca de Barberà, Tarragona, Costers de Segre, Pla de Bages, vins de Catalunya and Ribera del Duero for the samples supplied.

References

- [1] A.R. Newman, *Anal. Chem.* 63 (1991) 585.
- [2] J.W. Gardner, P.N. Bartlett, *Sens. Actuators B* 18/19 (1994) 211.
- [3] D.J. Strike, M.G.H. Meijerink, M. Koudelka-Hep, *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999) 499.
- [4] E. Zubritsky, *Anal. Chem.* 72 (2000) 421A.
- [5] C. Garcia, M.E. Fernández, J.L. Pérez, B. Moreno, *Quim. Anal.* 20 (2001) 3.
- [6] C. Di Natale, F. Davide, A. D'Amico, G. Sberveglieri, P. Nelli, G. Faglia, C. Perego, *Sens. Actuators B* 24/25 (1995) 801.
- [7] C. Di Natale, F. Davide, A. D'Amico, P. Nelli, S. Groppelli, G. Sberveglieri, *Sens. Actuators B* 33 (1996) 83.
- [8] C. Di Natale, A. Macagnano, F. Davide, A. D'Amico, P. Nelli, S. Groppelli, G. Sberveglieri, *Sens. Actuators B* 44 (1997) 521.
- [9] M. Penza, G. Cassano, *Food Chem.* 86 (2004) 283.
- [10] A. Guadarrama, J.A. Fernández, M. Íñiguez, J. Souto, J.A. de Saja, *Anal. Chim. Acta* 411 (2000) 193.
- [11] A. Fort, M. Gregorkiewicz, N. Machetti, S. Rocchi, B. Serrano, L. Tondi, N. Ulivieri, V. Vignoli, G. Faglia, E. Comini, *Thin Solid Films* 418 (2002) 2.
- [12] C. Pinheiro, C.M. Rodrigues, T. Schäfer, J.G. Crespo, *Biotechnol. Bioeng.* 77 (2002) 632.
- [13] B. Dittmann, S. Nitz, G. Homer, *Adv. Food Sci.* 20 (1998) 115.
- [14] R.T. Marsili, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 648.
- [15] C. Pèrs, C. Viallon, J.L. Berdagüé, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1030.

- [16] I. Marcos, J.L. Pérez, M.E. Fernández, C. García, B. Moreno, J. Chromatogr. A 945 (2002) 221.
- [17] F. Fenaille, P. Visani, R. Fumeaux, C. Milo, P.A. Guy, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 2790.
- [18] C. Pérès, F. Begnaud, L. Eveleigh, J.L. Berdagué, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 858.
- [19] M.P. Martí, R. Boqué, M. Riu, O. Busto, J. Guasch, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 497.
- [20] M.P. Martí, J. Pino, O. Busto, J. Guasch, 10th Jornades de Anàlisi Instrumental, International Symposium, Barcelona, Spain, 2002, p. 107.
- [21] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke (Eds.), Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [22] M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, J. Chromatogr. A 881 (2000) 569.

IV.3 APLICACIÓ DEL NAS ELECTRÒNIC A LA DETERMINACIÓ DEL 2,4,6-TRICLOROANISOLE (TCA) EN EL VI

Les aplicacions desenvolupades amb els nassos electrònics han estat, majoritàriament, de caràcter qualitatiu. Tanmateix, amb la utilització de les tècniques de calibratge multivariant, és possible obtenir informació quantitativa de les mostres. En el camp de l'anàlisi dels aliments, algunes aplicacions quantitatives que s'han desenvolupat amb el nas electrònic basat en l'MS són la predicció dels dies que la llet [18] o les pomes [72] es poden conservar en condicions òptimes.

En aquesta línia, una altra aplicació interessant del nas electrònic en el camp de l'enologia podria ser la detecció i fins i tot quantificació de compostos concrets com, per exemple, els compostos considerats defectes aromàtics. Aquesta aplicació, tot i estar relacionada també amb el control de qualitat del vi, és de caire diferent a les aplicacions presentades en l'apartat anterior.

Un d'aquests defectes aromàtics que en els últims anys ha estat el responsable de nombroses pèrdues econòmiques en la indústria vinícola, és el que es coneix com a "gust de suro" [73-75]. Els vins amb aquest defecte aromàtic presenten una olor característica que es descriu com humitat, florit i cartró mullat, la qual s'associa a l'ús de taps de suro contaminats per alguns compostos que, al passar al vi, li confereixen aquestes olors desagradables.

S'ha demostrat, però, que els taps de suro no són sempre els responsables directes de la contaminació. Pot ser que els taps, exemptes de contaminació després de la seva fabricació, es contaminin durant el transport o l'emmagatzematge a causa del seu contacte amb palets de fusta, l'embalatge amb cartró o el propi ambient del celler. Una altra possibilitat és que els vins es contaminin abans de ser embotellats i, per tant, abans d'haver estat en contacte amb el tap de suro, a causa d'utilitzar bótes, dipòsits o canonades en males condicions higièniques [75].

Són diversos els compostos que s'han identificat com a responsables del defecte "gust de suro". Alguns d'ells es mostren a la taula IV.6 juntament amb els seus lliminars de percepció sensorial i la descripció de l'olor que presenten. La majoria d'aquests compostos presenten lliminars de percepció sensorial extremadament baixos, a nivells de ng/L, la qual cosa vol dir que el nas humà pot detectar en el vi concentracions molt petites dels mateixos. L'enorme repercussió econòmica que aquest defecte aromàtic té en el sector enològic és deguda, en gran part, a aquest fet, ja que petites contaminacions d'alguns d'aquests compostos en el vi provoquen que aquest no es pugui comercialitzar.

Compost	Descriptor	LPS (ng/L)
1-Octen-3-ona	Xampinyó, metàl·lica	20
1-Octen-3-ol	Xampinyó, metàl·lica	20000
2-Metilisoborneol	Terrosa, humitat, brutícia	30
2,4,6-Tricloroanisole (TCA)	Humitat, cartró mullat	10
2,3,4,6-Tetracloroanisole (TeCA)	Humitat	25
Geosmina	Terrosa, humitat, brutícia	25
Guaiacol	Fumat	20000

Taula IV.6. Compostos responsables del "gust de suro". Descriptors i lliminars de percepció sensorial (LPS) en el vi [75].

Tot i que tots els compostos que es mostren a la taula s'associen amb el "gust de suro", el 2,4,6-tricloroanisole (TCA) és el que es considera el principal responsable d'aquest defecte [76]. Tal i com es pot observar a la taula, el lliminar de percepció sensorial d'aquest compost en el vi és molt baix, 10 ng/L [75], tot i que altres autors determinen valors encara més baixos, al voltant de 2 ng/L [77, 78]. En alguns treballs s'ha constatat que el lliminar de percepció sensorial varia depenent de si és

un vi blanc o un vi negre, i determinen que és aproximadament de 10 ng/L en els blancs i de 50 ng/L en els negres [79].

La cromatografia de gasos és la tècnica utilitzada en la gran majoria dels mètodes desenvolupats per a la determinació del TCA [77, 79-84]. En el control de qualitat, però, el nas electrònic pot ser una bona alternativa a aquesta tècnica de separació a causa de les seves característiques de rapidesa i senzillesa en les anàlisis.

És per això que, motivats per la preocupació que genera en el sector enològic el defecte aromàtic "gust de suro", es va plantejar el desenvolupament d'un mètode amb el nas electrònic per a la determinació del TCA, el principal compost responsable d'aquest defecte.

IV.3.1 Determinació de TCA mitjançant HS-MS

Com ja s'ha comentat, les grans dimensions que ha adquirit el problema del defecte aromàtic del "gust de suro", són degudes en bona part als baixos llindars de percepció sensorial que presenten els compostos causants d'aquest defecte, que fan que una contaminació molt petita (a nivells de ng/L) en el vi, ja pugui ser detectada pel nas humà.

Aquest fet també dificulta la posta a punt de les metodologies d'anàlisi d'aquests compostos, ja que aquestes cal que tinguin límits de detecció molt baixos, per sota del llindar de percepció sensorial del compost en qüestió. Aquest va ser un dels handicaps més importants del treball que es presenta en aquest apartat i en el que es va desenvolupar un mètode ràpid per a la determinació de TCA en vins blancs mitjançant el nas electrònic HS-MS, aplicable al control de qualitat del vi. L'estudi es va fer amb vins blancs per tal de començar pel cas més senzill, ja que aquests tenen una matriu molt menys complexa que la dels vins negres.

Així doncs, el primer pas en el desenvolupament del mètode va ser l'optimització de totes les variables que afecten a la resposta per tal d'aconseguir la màxima sensibilitat possible. Una vegada establertes les condicions òptimes d'anàlisi, es va analitzar un conjunt de vins addicionats amb TCA per tal de construir un model de calibratge multivariant que permetés relacionar els espectres obtinguts en l'anàlisi de les mostres amb la concentració de TCA de les mateixes. Posteriorment, es va validar externament el model amb un altre conjunt de vins diferents als utilitzats en la seva construcció.

A continuació es descriu tot el treball realitzat així com també es fa una discussió dels resultats obtinguts. Al final d'aquest apartat s'inclou l'article que porta per títol "*Fast screening method for determining 2,4,6-trichloroanisole in wines using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) system and multivariate calibration*" publicat a la revista científica *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376 (2003) 497-501, en què

s'hi troba explicat de manera més detallada l'experimental dut a terme i els resultats obtinguts.

Optimització de variables

Un fet conegut és que la sensibilitat del detector d'MS quan es treballa en mode SIM, és a dir analitzant un nombre reduït d'ions, és molt més gran que analitzant, en mode *scan*, un rang ampli d'ions. És per aquest motiu que en el plantejament del treball es van seleccionar els ions del TCA que s'analitzarien. Els ions escollits foren els de m/z 195, 197 i 210 que són els ions de l'espectre de masses del TCA que presenten una major abundància (figura IV.42).

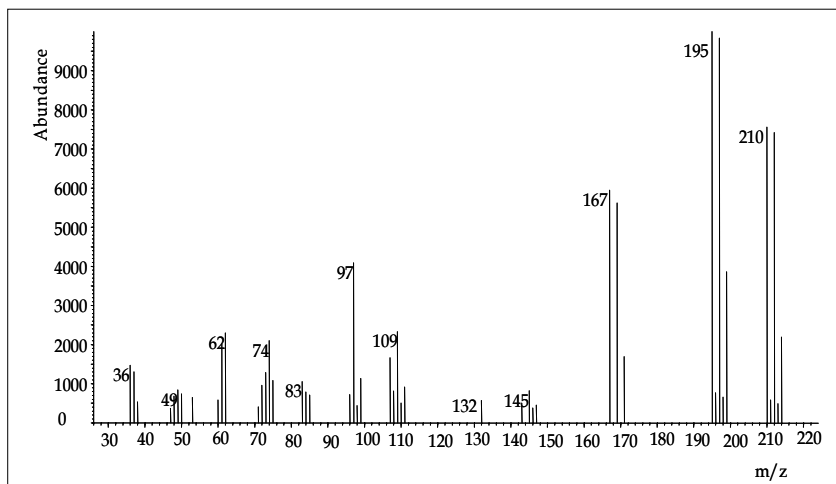


Figura IV.42. Espectre de masses del TCA.

Les condicions de formació de l'espai de cap van ser les primeres que es van optimitzar. Els paràmetres que es van considerar van ser la força iònica, el volum de mostra, la relació entre el volum de mostra i el de l'espai de cap, la temperatura i el temps d'extracció. El criteri que es va adoptar a l'hora d'escollir les condicions

òptimes, va ser obtenir la màxima abundància dels ions seleccionats. Tots els experiments duts a terme en l'optimització de les diferents variables es van fer amb un vi blanc comercial addicionat amb 500 ng/L de TCA.

En l'optimització del volum de mostra i la força iònica es va partir de les condicions òptimes trobades en el treball anterior de diferenciació de vins (apartat IV.2.2), a les que s'hi van anar variant aquests dos paràmetres. Aquestes condicions consistien en analitzar 5 mL de vi addicionats amb 0.58 g de NaCl en un vial de 10 mL tancat hermèticament amb un *septum* de silicona/PTFE. El vial es mantenia amb agitació durant 60 minuts a 65 °C per tal de que s'establís l'equilibri dels compostos volàtils de la mostra entre el líquid i l'espai de cap. Pel que fa a la força iònica, es van dur a terme diversos experiments amb diferents concentracions de NaCl. Els ions del TCA seleccionats presentaven la màxima abundància quan es saturava la mostra amb sal. En el cas del volum de mostra es van realitzar experiments amb vials de 10 i 20 mL que són els que permetia utilitzar el sistema de mostreig automàtic d'espai de cap de l'instrument utilitzat. De la mateixa manera que en el treball anterior de diferenciació de vins, els millors resultats es van obtenir analitzant 5 mL de mostra en el vial de 10 mL.

Pel fet que el temps i la temperatura d'extracció són dos paràmetres molt relacionats entre ells, es va procedir de la mateixa manera que en treballs anteriors optimitzant-los a la vegada mitjançant un disseny factorial de dos factors, a dos nivells i amb un punt central. El gràfic de la figura IV.43 mostra els cinc punts experimentals assajats.

L'abundància més gran dels tres ions del TCA es va obtenir en els experiments duts a terme a 80 °C durant 120 minuts. Amb l'objectiu de reduir el temps d'anàlisi de les mostres, es van assajar més punts experimentals entre 15 i 120 minuts però mantenint la temperatura a 80 °C. Els resultats mostraven que l'abundància dels ions augmentava amb el temps però que, a partir de 30 minuts, aquesta ja no augmentava de manera significativa. Per tant, es va escollir 30 minuts com a temps

òptim d'extracció. Cal remarcar, però, que el sistema de mostreig automàtic del nas electrònic utilitzat, permetia dur a terme una seqüenciació en l'anàlisi de les mostres, de manera que el temps real que tardava l'instrument en analitzar cada mostra era tan sols de 10 minuts.

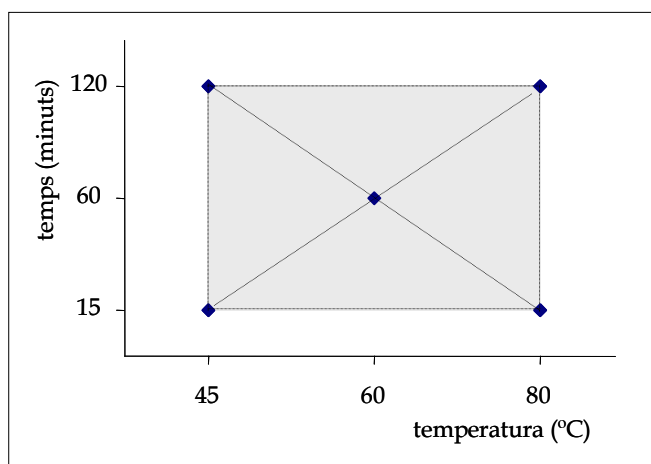


Figura IV.43. Disseny experimental dut a terme en l'optimització del temps i la temperatura d'extracció.

De la mateixa manera que en estudis anteriors, la transferència dels analits del sistema d'espai de cap estàtic al detector d'MS es va dur a terme mitjançant una columna cromatogràfica. En el present treball, es va utilitzar la mateixa columna analítica (HP-5MS) i les mateixes condicions de flux i temperatura que en l'estudi anterior de diferenciació de vins, en què s'havien optimitzat aquestes condicions per tal de que el temps de transferència dels analits des del sistema d'espai de cap a l'MS fos el mínim.

Es va detectar, però, que en els 5 minuts que durava la transferència, hi havia una certa separació dels compostos menys volàtils, com el TCA, de la resta de compostos de més volatilitat entre els quals hi havia l'etanol. La figura IV.44 mostra el cromatograma obtingut, en mode *scan* i amb les condicions de transferència utilitzades, en l'anàlisi d'un vi blanc addicionat amb TCA. En aquest

s'indica, mitjançant línies discontinües, la regió cromatogràfica en què elueix el TCA, tot i que juntament amb altres compostos a causa de la baixa eficàcia de la separació que té lloc durant la transferència dels analits de l'HS a l'MS.

Es va comprovar que restringint el temps d'anàlisi dels tres ions seleccionats en l'interval de 3 a 5 minuts, l'abundància d'aquests ions augmentava un 20% respecte l'abundància obtinguda analitzant els tres ions durant els 5 minuts que durava la transferència de tots els compostos. A més a més, el fet de no analitzar l'etanol, augmenta el temps de vida del detector ja que els dissolvents, en general, danyen els filaments de la font d'ionització.

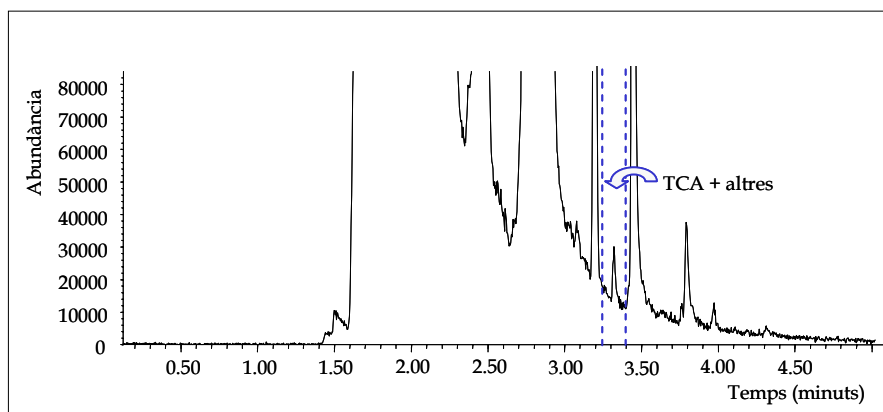


Figura IV.44. Senyal obtingut en les condicions de transferència utilitzades i amb el detector d'MS operant en mode *scan*.

Estudi de l'efecte de l'etanol

Tot i que l'efecte de l'etanol en la mesura de l'abundància dels ions del TCA s'havia eliminat restringint el temps d'anàlisi a l'interval de 3 a 5 minuts, aquest compost volàtil majoritari podia tenir un efecte també en el procés d'extracció a causa de la seva gran concentració en l'espai de cap de la mostra, respecte a la

concentració de TCA. És per aquest motiu que es va dur a terme un estudi per tal d'avaluar l'efecte de la concentració d'etanol en la determinació del TCA.

En aquest estudi es va utilitzar un vi blanc amb un contingut en etanol del 10.5% v/v al que se li van addicionar diferents quantitats d'etanol per tal d'obtenir mostres amb diferents graus alcohòlics (10.5-14.0%) Aquestes mostres es van addicionar també amb diferents quantitats de TCA (0.01-10 µg/L). En el gràfic de la figura IV.45, on es representa, per a cadascun dels ions monitoritzats, la seva abundància front la concentració de TCA, es pot observar que, en tots els casos, a l'augmentar la concentració d'etanol disminueix el pendent de la recta. Fet que demostra la influència de la concentració d'etanol de la mostra en la determinació de TCA.

Una possible solució a aquest problema podria ser construir un model de calibratge multivariant per a la determinació de TCA on estigués modelada també la concentració d'etanol. És per això que es va repetir l'experiment anterior però, aquesta vegada, monitoritzant també dos ions de l'etanol (m/z 45 i 46). Tot i que en els resultats obtinguts s'observava una disminució de l'efecte de l'etanol, la monitorització dels dos ions d'aquest compost volàtil majoritari implicava una pèrdua de sensibilitat, aproximadament del 50%, del senyal dels ions del TCA. Pel fet que no es podia assumir aquesta pèrdua de sensibilitat tan gran ja que implicava un augment considerable del límit de detecció del mètode, es va optar per incloure en el model la variabilitat produïda pels diferents continguts d'etanol que podien tenir els vins, utilitzant per a la seva construcció vins de diferent grau alcohòlic.

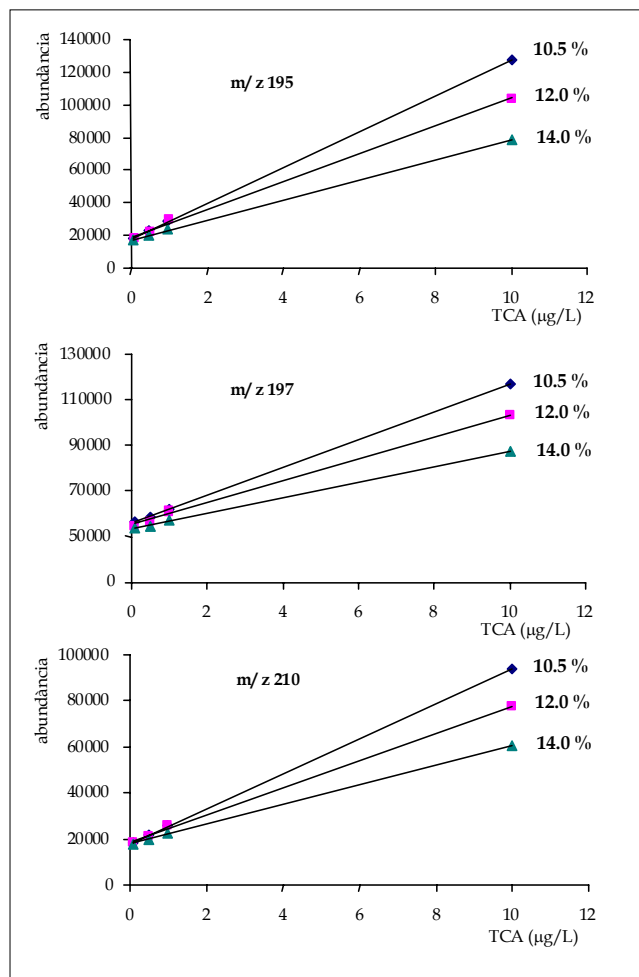


Figura IV.45. Efecte de la concentració d'etanol en la resposta dels ions del TCA.

Construcció del model de calibratge

En la construcció del model de calibratge per a la determinació de TCA en vins, es van escollir vuit vins blancs de diferents orígens i amb uns continguts en etanol entre el 10.5 i el 12.0% v/v, que és el rang en que es troba el grau alcohòlic de la majoria de vins blancs comercials.

En els diferents experiments que s'havien anat fent, s'observava en les anàlisis exploratòries de les dades que per sota de 0.1 µg/L no es distingien les mostres de vi addicionades amb diferents quantitats de TCA. Aquest fet es pot observar en el gràfic d'*scores* de la figura IV.46 que correspon al PCA realitzat a les dades obtingudes en l'anàlisi de mostres d'un mateix vi blanc addicionat amb diferents concentracions de TCA en un interval entre 0.01 i 10 µg/L. El gràfic mostra que el primer component principal, que explica gairebé el 100% de la variabilitat total de les mostres, no les diferencia segons el contingut de TCA quan aquest és inferior a 0.1 µg/L.

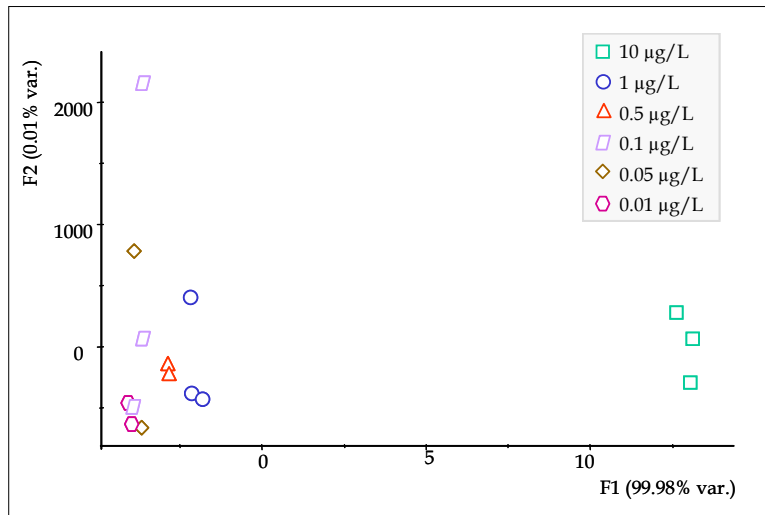


Figura IV.46. Gràfic d'*scores* del PCA de mostres de vi blanc amb diferents concentracions de TCA.

Conclusions semblants es van extreure dels resultats obtinguts en la validació interna (*cross-validation*) del model PLS de calibratge multivariant construït amb aquestes mateixes dades. Aquests resultats mostraven que per sota de 0.1 µg/L no hi havia una correlació entre els valors de concentració de TCA addicionats a les mostres i els valors predits pel model.

Per tant, es va construir el conjunt de calibratge amb mostres de vi blanc addicionades amb TCA en un interval de concentracions entre 0.1 i 10 µg/L. Abans de preparar les mostres, però, es va comprovar mitjançant un mètode cromatogràfic (HS-SPME-GC-ECD) posat a punt al nostre laboratori [81], que els vins escollits no contenen TCA per sota del límit de detecció d'aquest mètode, que era de 0.9 ng/L.

Amb les dades obtingudes en l'anàlisi de les mostres del conjunt de calibratge, es va construir un model PLS. El gràfic de la figura IV.47 mostra la representació dels valors de concentració de TCA predits pel model en una validació creuada del mateix front els valors reals, que en aquest cas corresponien a les concentracions de TCA addicionades a les mostres. Es pot observar en el gràfic que existeix una bona correlació entre aquests dos valors per cadascuna de les mostres, ja que els punts s'ajusten a una recta de pendent la unitat i ordenada a l'origen zero. La bona concordança entre els valors reals i els predits pel model, la confirma també el coeficient de correlació (r) obtingut que va ser de 0.98.

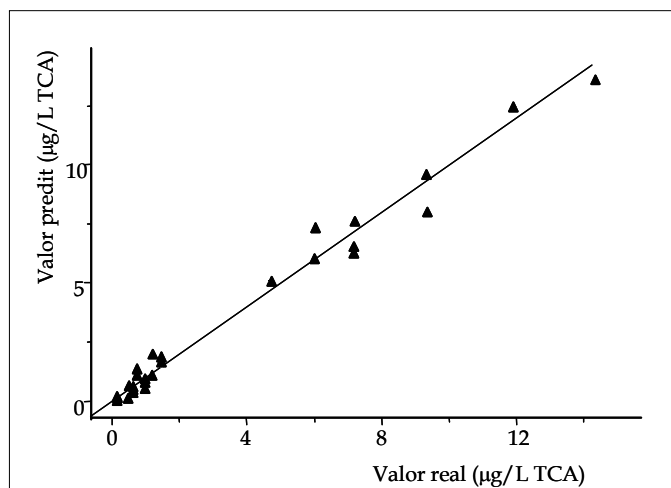


Figura IV.47. Concentracions de TCA predites pel model front concentracions de TCA de les mostres de calibratge.

L'exactitud del model, expressada com l'arrel quadrada de l'error mitjà de validació creuada (RMSECV), va ser de 0.48 µg/L (16% en termes relatius), la qual es pot considerar acceptable als baixos nivells de concentració que es determinen amb el mètode desenvolupat. La precisió intermitja del mètode, expressada com l'error estàndard de validació creuada (SECV), va ser també de 0.48 µg/L ja que el biaix era pràcticament zero.

L'estimació del límit de detecció del mètode es va fer mitjançant l'anàlisi de 10 mostres en blanc, que consistien en mostres de vi amb un contingut en TCA per sota del límit de detecció del mètode cromatogràfic (0.9 ng/L). La desviació estàndard dels valors de concentració de TCA predits pel model d'aquestes mostres en blanc, es va multiplicar per un factor que tenia en compte una probabilitat de cometre un error α o un error β del 10%. El límit de detecció resultant va ser de 0.2 µg/L.

Validació del model de calibratge

El model es va validar externament mitjançant un conjunt de mostres diferents a les utilitzades per a la construcció del mateix. A causa de que no es disposaven de mostres reals de vi blanc contaminades amb TCA, es van preparar les mostres per a la validació del model addicionant diferents quantitats de TCA a vins blancs. Les mostres del conjunt de validació es van analitzar mitjançant el mètode cromatogràfic (HS-SPME-GC-ECD) [81] per tal de determinar exactament la seva concentració de TCA. La taula IV.7 mostra els valors de concentració obtinguts amb el mètode de referència i els predits pel model PLS. La mostra E es va excloure del conjunt de validació perquè es va detectar que era un *outlier*.

Mostra	Valor de referència (µg/L)	Valor predit (µg/L)
A	0.31 (0.04)	0.31 (0.32)
B	0.61 (0.06)	0.71 (0.34)
C	0.83 (0.08)	1.20 (0.53)
D	1.34 (0.14)	1.40 (0.51)
E	7.73 (0.85)	5.38 (0.18)
F	2.98 (0.32)	4.23 (0.26)
G	5.45 (0.59)	5.04 (0.24)
H	6.60 (0.72)	8.06 (0.73)
I	5.32 (0.58)	4.42 (0.12)
J	2.03 (0.21)	2.41 (0.42)

Taula IV.7. Resultats de la validació externa (incerteses entre parèntesis).

En aquest cas, l'exactitud de les prediccions (RMSEP) dutes a terme amb el model va ser de 0.74 µg/L (25% en termes relatius). Tot i que aquest valor és una mica més elevat que el valor obtingut amb la validació creuada, es pot considerar acceptable ja que és inferior al valor teòric predit per l'equació de Horwitz a aquest nivell de concentració, que és del 38%.

A partir de la desviació estàndard de les anàlisis per duplicat que es van fer de les mostres del conjunt de validació, es va calcular la repetitivitat del mètode. Aquesta va ser de 0.31 µg/L, que correspon a una desviació estàndard relativa del 9.4%.

Utilitzant l'expressió proposada per Faber i Bro [85], es va calcular, per a cadascuna de les mostres del conjunt de validació, la incertesa del valor de concentració de TCA predit pel model (taula IV.7). En la majoria dels casos, els

valors de referència (concentració determinada amb el mètode cromatogràfic) es trobaven dins de l'interval marcat pel valor predit pel model PLS i la seva incertesa. Com era d'esperar, els valors d'incertesa més grans els presentaven les mostres que tenien un contingut en TCA proper al límit de detecció del mètode.

En aquest treball s'ha demostrat que amb el nas electrònic HS-MS, mitjançant les tècniques de calibratge multivariant, es poden desenvolupar mètodes per a la quantificació de compostos d'interès, tot i que estiguin a nivells de concentració baixos. Si es comparen els paràmetres de qualitat del mètode obtingut amb el nas electrònic amb els de mètodes cromatogràfics [77, 79-81], els d'aquests últims són millors pel que fa a l'exactitud, la repetitivitat i també els límits de detecció. No obstant això, els mètodes cromatogràfics clàssics no poden competir amb el nas electrònic en termes de rapidesa i senzillesa de les anàlisis, dues característiques molt valorades en el control de qualitat. Mentre que el temps d'anàlisi dels mètodes cromatogràfics és com a mínim de 30 minuts, el temps d'anàlisi del mètode desenvolupat en aquest estudi és de 10 minuts. A més, la preparació de mostra consisteix tan sols en l'addició de sal.

El mètode desenvolupat, però, presenta una limitació important pel que fa a la seva aplicació al control de qualitat de vins: el límit de detecció. Tot i que el valor del límit de detecció aconseguit és molt baix (0.2 µg/L), aquest no és suficient ja que és superior al llindar de percepció sensorial del TCA en el vi. Per tant, un nou repte en aquesta mateixa línia de treball, era aconseguir un mètode amb un límit de detecció inferior al llindar de percepció sensorial del TCA.

A continuació s'inclou l'article científic que porta per títol "*Fast screening method for determining 2,4,6-trichloroanisole in wines using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) system and multivariate calibration*" en el qual s'hi troba, de manera detallada, l'experimentació duta a terme en el desenvolupament d'aquest mètode de determinació del TCA mitjançant el nas electrònic, així com també els resultats obtinguts.

*FAST SCREENING METHOD FOR DETERMINING 2,4,6-TRICHLOROANISOLE
IN WINES USING A HEADSPACE MASS-SPECTROMETRY (HS-MS) SYSTEM
AND MULTIVARIATE CALIBRATION*

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 376 (2003) 497-501

Anal Bioanal Chem (2003) 376:497–501
DOI 10.1007/s00216-003-1940-z

ORIGINAL PAPER

M. P. Martí · R. Boqué · M. Riu · O. Busto · J. Guasch

Fast screening method for determining 2,4,6-trichloroanisole in wines using a headspace–mass spectrometry (HS–MS) system and multivariate calibration

Received: 22 November 2002 / Revised: 14 February 2003 / Accepted: 24 March 2003 / Published online: 24 May 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract The system based on coupling a headspace sampler to a mass spectrometer (HS–MS), which is considered one kind of electronic nose, is an emergent technique for ensuring and controlling quality in industry. It involves injecting the headspace of the sample into the ionization chamber of the mass spectrometer where the analytes are fragmented. The result is a complex mass spectrum for each sample analyzed. When several samples are analyzed the data matrix generated is processed with chemometric techniques to compare and classify the substances from their volatile composition, in other words, to compare and classify their flavor. So far, information from electronic nose applications has mainly been qualitative. In this paper we present a quantitative study that uses a multivariate calibration. We analyzed several white wines using HS–MS to determine 2,4,6-trichloroanisole (TCA). This is an off-flavor that is a serious problem for the wine industry. The method is simple because it does not require sample preparation, only addition of sodium chloride being necessary for sample conditioning. Also, it provides a fast screening (10 min/sample) of the quantity of TCA in wines at ultratrace (sub $\mu\text{g L}^{-1}$) levels.

Keywords Wine · Off-flavour · 2,4,6-Trichloroanisole · HS–MS · Multivariate calibration · Electronic nose

Introduction

Since the first articles about electronic noses were published in the 1980s [1], there has been much more research into achieving a fast, objective system for evaluating aromas. Many companies are becoming increasingly interested because of the limitations of the techniques that are currently available. Sensory analysis by a panel of trained judges, which is the most common aroma-evaluation technique, has a number of disadvantages. For example, it is subjective and repeatability of the panelists is poor.

Today, several electronic nose systems are available. Most are based on gas-sensor technology [2, 3, 4, 5]. A few years ago, a new type of electronic nose based on mass spectrometry (MS) was developed [6]. With this instrument, the volatile compounds of the sample are introduced into the mass spectrometer with no prior separation, so that a complex mass spectrum is obtained. The data matrix generated after analyzing several samples is treated with multivariate analysis techniques.

In wine research, only a few studies have been done with electronic noses [7, 8, 9, 10, 11]. This is mainly because major compounds of the headspace of the sample, e.g. ethanol in alcoholic beverages, cause interference in the gas sensor. This limitation does not exist with HS–MS electronic noses. HS–MS therefore seems to have great potential for controlling the quality of wines and other alcoholic beverages.

In the wine industry, a serious off-odor problem that causes huge financial losses every year is cork taint [12, 13]. This off-flavor, generally perceived as a musty, earthy and moldy aroma, is mainly associated with the use of cork stoppers. Several compounds have been identified as possible contributors to cork taint, but 2,4,6-trichloroanisole (TCA) is the major impact component [14]. In fact, the problem is so great mainly because of the extraordinarily low sensory threshold of this compound – around 50 ng L^{-1} in red wines and 10 ng L^{-1} in white wines [15]. Gas chromatography, after extraction and preconcentration of the sample, is the most common technique for determining TCA [15,

M. P. Martí · M. Riu · O. Busto · J. Guasch (✉)
Departament de Química Analítica i Química Orgànica,
Unitat d'Enologia (CeRTA), Facultat d'Enologia,
Universitat Rovira i Virgili,
Av. Ramón y Cajal 70, 43005 Tarragona, Spain
e-mail: qanolo@fe.urv.es

R. Boqué
Departament de Química Analítica i Química Orgànica,
Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili,
Pl. Imperial Tàrraco 1, 43005 Tarragona, Spain

16, 17, 18, 19, 20, 21]. In quality control, however, electronic nose systems are a good alternative to chromatographic analysis because the analysis is quick and simple. This technology has already been used to qualitatively discriminate between acceptable aroma and unacceptable taint in cork stoppers [22].

In this study we developed a simple, quick, and automatable method for determining TCA in white wines using an HS-MS electronic nose and multivariate calibration.

Experimental

2,4,6-Trichloroanisole (CAS number: [87-40-1]) was supplied by Aldrich (Beerse, Belgium) with a purity of over 99%. HPLC-grade ethanol absolute and reagent-grade sodium chloride were used.

We prepared three stock solutions of about 1000 mg L^{-1} (932, 1192 and 1432 mg L^{-1} were the exact concentrations) of TCA in ethanol and stored them at 5°C . We also prepared three standard solutions of around 1 mg L^{-1} (A1, A2 and A3) and three standard solutions of around $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (B1, B2 and B3) by diluting the stock solutions in ethanol. We prepared calibration samples by adding different amounts of the corresponding standard solutions in a concentration range between 0.09 and $14.32 \mu\text{g L}^{-1}$ of TCA to eight commercial white wines of different origin and different ethanol content (10.5, 11.0, 11.5 and 12.0% v/v). We chose solutions A1–A3 and B1–B3 alternately to detect systematic errors in sample preparation. Before preparing the calibration samples, we analyzed wines by a chromatographic method (HS-SPME-GC-ECD) that we developed and validated in-house [18]. Our results showed the absence of TCA above the detection limit of this method (0.9 ng L^{-1}). We built a validation set using ten more commercial white wines, which were also spiked with TCA in the same interval as the calibration samples.

All analyses were carried out on a HS-MS electronic nose composed of a Hewlett-Packard 7694 headspace sampler, a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph and a Hewlett-Packard 5973 quadrupole mass spectrometer. The chromatographic column was basically to transfer the volatiles to the MS, not to resolve chromatographic peaks.

In the optimized conditions, 5 mL of sample and 1.46 g of NaCl were placed in a 10-mL vial that was hermetically sealed with a PTFE/silicone septum. The sample was thermostatted for 30 min at 80°C under constant stirring.

Afterwards, the headspace of the sample was introduced into the injection port of the gas chromatograph. The loop and transfer line temperatures were 95°C and 110°C , respectively, and the pressurization and injection times were 0.30 and 0.60 min, respectively. Chromatographic injection was made in splitless mode for 1.6 min

at 200°C using an inlet of 1.5 mm i.d. We used an HP-5MS chromatographic column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) with an oven temperature program of 70°C (1 min) at 70° min^{-1} to 180°C (2.5 min). The carrier gas was helium with a flow-rate of 1.8 mL min^{-1} .

Mass spectra were recorded by electronic impact (EI) ionization at 70 eV and with an electron multiplier voltage of 2694 V. The analyses were done in selected-ion monitoring (SIM) mode and the fragment ions 195, 197 and 210 were monitored. The measurements were taken with a dwell time of 100 ms per ion. The ion source and mass quadrupole temperatures were 230°C and 150°C , respectively. The software we used for multivariate analysis was Pirouette 2.6 from Infometrix (Woodinville, WA, USA).

Results and discussion

As the sensory threshold of TCA is very low (ng L^{-1} level), we studied several experimental parameters to achieve the highest sensitivity. We performed the experiments with a commercial white wine spiked with 500 ng L^{-1} of the target analyte. Our criterion for obtaining the optimal conditions was the abundance of the TCA ions monitored.

Adding a salt to the sample can modify the headspace composition. The first parameter we examined, therefore, was ionic strength. Different amounts of sodium chloride were added to 5 mL of sample and then, in the extraction process, the vials were shaken for 60 min at 65°C . The results were best when the sample was saturated with salt.

Other important parameters that affect the headspace composition are the extraction time and the extraction temperature. As these are closely related, we studied them simultaneously. We therefore carried out a two-factor two-level factorial design with a central point [23]. The temperature and time levels tested were 45°C and 80°C and 15 and 120 min. The optimal conditions were 80°C and 120 min. We could not check more experimental points at higher temperatures because of wine degradation, but we performed other experiments to reduce the time of analysis. The new set of experiments was carried out in the time interval of 15–120 min, while the temperature was kept at 80°C . Results at extraction times of 30 and 120 min were the same, so we chose the shortest time.

As we have explained in the experimental section, the function of the chromatographic column was only the trans-

Fig. 1 Chromatogram obtained in scan mode

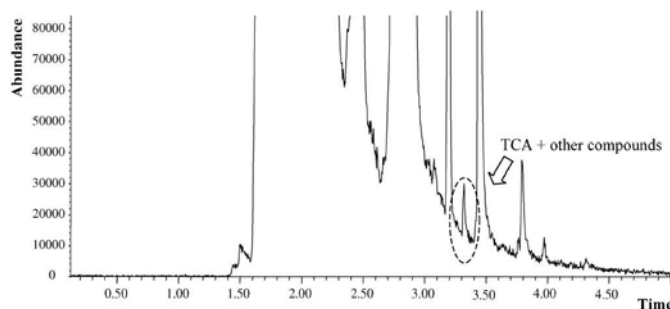
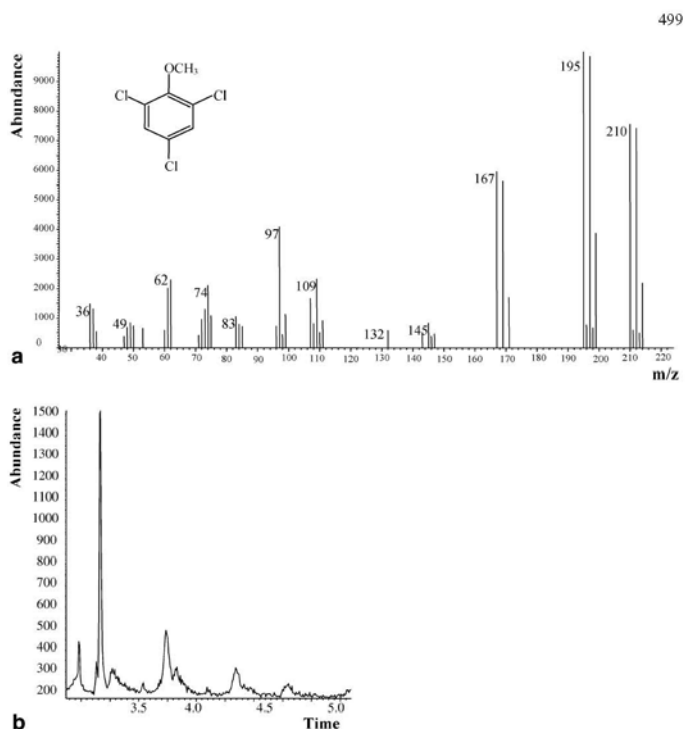


Fig. 2 (a) Mass spectrum of 2,4,6-trichloroanisole. (b) Chromatographic response of a real sample of wine analyzed using the proposed procedure



fer of the volatile compounds to the mass detector, not to resolve chromatographic peaks. With the chromatographic temperature program used, in only 5 min we were able to transfer all the compounds to the detector, with minimum separation. If this approach is compared with classical determination methods, where a good resolution of the chromatographic peaks is required, the time saving that it offers is very important. Also, and because TCA is less volatile than other compounds in the sample headspace, this minimum separation was enough to separate the TCA and the other low volatility compounds from the high volatility compounds such as ethanol. Figure 1 shows the region of the chromatogram where TCA elutes together with other compounds. The mass spectra were recorded in a chromatographic time range between 3 and 5 min. In this way, the MS signal increased by 20% and the detection limit of the method improved significantly. Furthermore, if the acquisition of spectra starts when the ethanol has eluted, the detector life increases because it is well-known that the solvents damage the filament.

Another strategy for achieving a better sensitivity was the use of the mass spectrometer in SIM mode. We chose three ions of TCA with high abundance (m/z 195, 197 and 210). Figure 2a shows the mass spectrum of TCA. How-

ever, wine has other compounds that can also give the same fragment ions as those selected. This can be observed in Fig. 2b where the chromatogram of a real wine in SIM mode is shown. Multivariate calibration can handle these interferences avoiding the use of conventional time-consuming chromatographic analysis.

Ethanol is the major volatile component in wine, so it is reasonable to think that it may interfere in the extraction process. To evaluate how the content of ethanol affects the analysis, we used the optimized method to analyze a white wine (10.5% v/v) spiked with different amounts of ethanol and different amounts of TCA. Figure 3 shows the abundance of fragment ion 195 vs TCA concentration. Clearly, when the ethanol content increases, the slope of the graph decreases. The same behavior was found for the other two ions monitored. We can conclude, therefore, that ethanol interferes in the determination. In a second experiment, as well as the three ions of TCA, we monitored two ions of ethanol (m/z 45 and 46) in order to model the alcoholic content. The results from multivariate calibration using partial least squares (PLS) were slightly better in terms of average precision, but sensitivity decreased by 50%. As interference by ethanol could not be avoided without a loss of sensitivity, to prepare the calibration samples

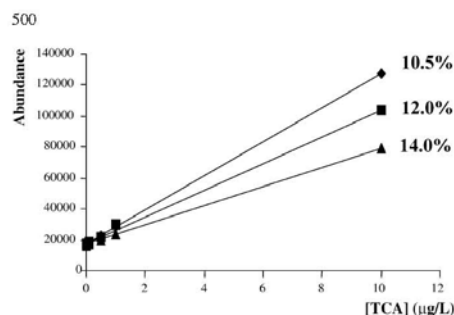


Fig. 3 Abundance of fragment ion 195 vs TCA concentration for various amounts of ethanol (v/v)

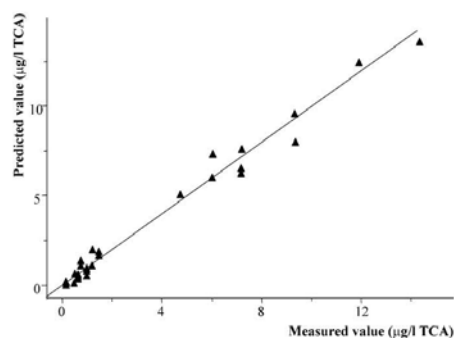


Fig. 4 TCA concentrations predicted by the PLS model vs TCA concentrations present in the calibration samples

we chose wines whose alcohol content ranged from 10.5 to 12.0% v/v. In this way, all the variability was included in the model because these values are typical for most commercial white wines.

We built a PLS model using the three ions of TCA monitored as independent variables and TCA concentration as dependent variable. Calibration data comprised a matrix of spectra (40 samples × 3 variables) and a vector of 40 TCA concentrations. Original data were mean-centered before we ran the PLS algorithm. In the preliminary models, four samples were detected as outliers and were therefore removed. The final PLS model was cross-validated by the classic leave-one-out procedure [24]. Figure 4 shows that there was a good fit between the concentrations predicted by the final one-factor PLS model and the concentrations of TCA in the calibration samples.

Table 1 shows the parameters of the PLS model. The accuracy of the model, expressed in terms of root mean squared error of cross-validation (RMSECV) was $0.48 \mu\text{g L}^{-1}$ (16% in relative average terms), which is quite acceptable at these concentration levels. We checked bias by building a joint confidence interval of the slope and the intercept of

Table 1 Parameters of the PLS model

	Calibration	Validation
Slope	0.99	0.98
Intercept	0.04	0.05
r	0.993	0.992
RMSEC	$0.44 \mu\text{g L}^{-1}$	–
RMSECV	–	$0.48 \mu\text{g L}^{-1}$
SECV	–	$0.48 \mu\text{g L}^{-1}$
Bias	Non-significant	Non-significant

Table 2 Results of external validation (uncertainties given in brackets)

Sample	Reference value ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Predicted value ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
A	0.31	(0.04)	0.31	(0.32)
B	0.61	(0.06)	0.71	(0.34)
C	0.83	(0.08)	1.20	(0.53)
D	1.34	(0.14)	1.40	(0.51)
E	7.73	(0.85)	5.38	(0.18)
F	2.98	(0.32)	4.23	(0.26)
G	5.45	(0.59)	5.04	(0.24)
H	6.60	(0.72)	8.06	(0.73)
I	5.32	(0.58)	4.42	(0.12)
J	2.03	(0.21)	2.41	(0.42)

the concentration found vs concentration added regression line [25]. The bias was not statistically significant at a 95% confidence level either for the calibration set or for the validation set. The intermediate precision of the method, estimated as the standard error of cross-validation (SECV) was $0.48 \mu\text{g L}^{-1}$ (equal to RMSECV because the bias was practically zero). We calculated repeatability – $0.31 \mu\text{g L}^{-1}$ (9.4% in relative average terms) – from duplicate analysis of the samples of the external validation set. Finally, we calculated the limit of detection (LOD) by analyzing 10 blank samples – i.e. samples with a TCA content below the detection limit of the chromatographic method [18] – with the final PLS model. The standard deviation of the predicted TCA concentrations was multiplied, in accordance with IUPAC recommendations [26], by a coverage factor that took into account α and β probabilities of error. The LOD for $\alpha=\beta=10\%$ was $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$.

The calibration model was also externally validated using a new set of samples. The TCA concentration of these samples was determined by the chromatographic method (HS-SPME-GC-ECD), which was considered as an internal reference method [18]. Table 2 shows the concentration values found with the reference chromatographic method and the concentration values predicted by the model. We excluded sample E from the prediction set because it was detected as an outlier. The accuracy of the predictions, evaluated as the root mean square error of prediction (RMSEP), was $0.74 \mu\text{g L}^{-1}$ (25% in relative average terms). This value may be considered acceptable at the average concentration level of the predicted samples and is appreciably lower than the theoretical precision predicted by the Horwitz equation (38%) for the same concentration

level. Table 2 shows the individual predicted concentrations of the external validation set, together with their uncertainties, which were determined using the expression proposed by Faber [27]. We can see that the predictions were fairly good and in most cases the predicted values lie within the interval of the reference value \pm uncertainty. As expected, the predictions of samples whose TCA content was close to the limit of detection have the largest relative uncertainties. However, the cross-validation results (Fig. 4) are slightly better than the external validation results. This could be attributed to the higher number of samples used in the cross-validation.

The performance parameters of the classical chromatographic methods [15, 16, 17, 18] are slightly better than the ones for the method developed. The accuracy and repeatability of chromatographic methods found in the literature are around 10% and 5%, in relative average terms, respectively. However, an important improvement provided by the proposed method is the speed of the analysis. Whereas the mass spectrum of each sample is obtained in only 5 min, the chromatographic time of the classical methods is more than 30 min, despite use of a selective detector. On the other hand, the analytical method developed is very simple since it is only necessary to add sodium chloride to the sample. So, because of the speed and the simplicity of the technique, this method can be very useful in quality control of wines. The limit of detection of the proposed method is higher than the sensory threshold of TCA. However, this limitation could be solved by using extraction techniques with a larger capacity of concentration.

Conclusions

We have shown that the HS-MS electronic nose can be used satisfactorily in quantitative analysis, even at very low levels of concentration. Although the limit of detection is higher than the sensory threshold of TCA, this can be a very useful method for screening wines whose TCA content is above 100 ng L⁻¹. Moreover, as it is quick and simple, it is also suitable for controlling wine quality.

We are currently studying whether solid-phase microextraction (SPME) can be used instead of the static headspace as the extraction and preconcentration technique. Our aim is to reach a lower limit of detection than the sensory threshold of TCA. SPME may be suitable for this application because it has a large capacity of concentration and because it requires little sample preparation.

Acknowledgments The authors wish to thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología (project AL197-0765) for providing Mrs Martí's doctoral fellowship, the Universitat Rovira i Virgili for providing Mr Riu's doctoral fellowship and the Ministerio de Ciencia y Tecnología/INIA (project VIN00-045) for their financial support.

References

- Gardner JW, Bartlett PN (1994) *Sens Actuators B* 18/19:211–220
- Newman AR (1991) *Anal Chem* 63:585–588
- Strike DJ, Meijerink MGH, Koudelka-Hep M (1999) *Fresenius J Anal Chem* 364:499–505
- Zubritsky E (2000) *Anal Chem* 72:421A–426A
- García C, Fernández ME, Pérez JL, Moreno B (2001) *Quím Anal* 20:3–11
- Dittmann B, Nitz S, Horner G (1998) *Adv Food Sci* 20:115–121
- Di Natale C, Davide F, D'Amico A, Sberveglieri G, Nelli P, Faglia G, Perego C (1995) *Sens Actuators B* 24/25:801–804
- Di Natale C, Davide F, D'Amico A, Nelli P, Groppelli S, Sberveglieri G (1996) *Sens Actuators B* 33:83–88
- Guadarrama A, Fernández JA, Íñiguez M, Souto J, de Saja JA (2000) *Anal Chim Acta* 411:193–200
- Heberle I, Liebming A, Weimar U, Göpel W (2000) *Sens Actuators B* 68:53–57
- Guadarrama A, Fernández JA, Íñiguez M, Souto J, de Saja JA (2001) *Sens Actuators B* 3894:1–8
- Cassey JA (1999) *Aust NZ Wine Ind J* 14:49–56
- Silva C, Figueiredo J, San Romao MV (2000) *Crit Rev Microb* 26:147–162
- Buser HR, Zanier C, Tanner H (1982) *J Agric Food Chem* 30:359–362
- Fischer C, Fischer U (1997) *J Agric Food Chem* 45:1995–1997
- Evans TJ, Butzke CE, Ebeler SE (1997) *J Chromatogr A* 786:293–298
- Michel G (1996) *Rev Oenol* 8:24–26
- Riu M, Mestres M, Busto O, Guasch J (2002) *J Chromatogr A* 977:1–8
- Aung LH, Smilanick PV, Vail PV, Preston LH, Gómez E (1996) *J Agric Food Chem* 44:3294–3296
- Pollnitz AP, Pardon KH, Liacopoulos D, Skouroumounis GK, Sefton MA (1996) *Aust J Grape Wine Res* 2:184–190
- Hoffmann A, Sponholz WR, David F, Sandra P (2000) *App Note* 3/2000. Gerstel, Mülheim an der Ruhr
- Rocha S, Delgado I, Ferrer Correia AJ, Barros A, Wells P (1998) *J Agric Food Chem* 46:145–151
- Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, de Jong S, Lewi P J, Smeyers-Verbeke J (1997) (eds) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Elsevier, Amsterdam
- Osten DW (1988) *J Chemom* 2:39–48
- Mandel J, Linning FJ (1957) *Anal Chem* 29:743–749
- Currie LA (1995) *Pure Appl Chem* 67:1699–1723
- Faber NM (2000) *Chemom Intell Lab Syst* 52:123–134

IV.3.2 Determinació de TCA mitjançant HS-SPME-MS

El baix llindar de percepció sensorial del TCA comporta establir metodologies per a la seva anàlisi que tinguin límits de detecció molt baixos. En el mètode que es va posar a punt amb el nas electrònic HS-MS, tot i que es van optimitzar totes les variables per tal d'obtenir la màxima sensibilitat possible, no es va aconseguir un límit de detecció inferior, o del mateix ordre, que el llindar de percepció sensorial d'aquest compost (10-50 ng/L).

Una manera d'obtenir amb el nas electrònic un mètode amb una major sensibilitat, és utilitzant com a sistema de mostreig una tècnica de pretractament que, a més a més d'extreure els analits d'interès de la matriu de la mostra, dugui a terme també una concentració dels mateixos. Com ja s'ha comentat reiteradament, un dels inconvenients de la tècnica de l'espai de cap estàtic, que és la que s'utilitza en el nas electrònic HS-MS com a sistema de mostreig, és que amb aquesta no es duu a terme una concentració dels analits de la mostra, la qual cosa suposa una limitació important quan els analits es troben a concentracions molt baixes, com és el cas del TCA.

La microextracció en fase sòlida (SPME) és una tècnica de pretractament que permet dur a terme tant l'extracció com la concentració dels analits presents a l'espai de cap de la mostra i, a més a més, de manera simultània, tal i com s'ha comentat anteriorment. Aquesta característica, que fa que sigui una tècnica senzilla i ràpida, juntament amb el fet que és fàcilment automatitzable, la converteixen en una tècnica idònia per a ser utilitzada com a sistema de mostreig d'un nas electrònic. Aquesta tècnica d'extracció, que ha estat àmpliament descrita en el primer apartat del capítol III, ja s'havia utilitzat en diverses aplicacions com a sistema de mostreig d'un nas electrònic i amb resultats força satisfactoris [17-19, 43, 67].

En aquest treball es presenta el desenvolupament d'un mètode per a la determinació del TCA amb el nas electrònic però utilitzant l'SPME com a tècnica

de pretractament (HS-SPME-MS), enlloc de la tècnica de l'espai de cap estàtic, amb l'objectiu d'aconseguir un mètode amb un límit de detecció inferior al llindar de percepció sensorial del TCA.

Materials i mètodes

En aquest estudi es van utilitzar 8 vins negres comercials, 5 pel conjunt de calibratge i 3 pel conjunt de validació, cadascun dels quals es va addicionar amb diferents concentracions de TCA, entre 5 i 100 ng/L. Els vins es van escollir amb diferent grau alcohòlic per tal d'incloure en el model la variabilitat produïda per aquest compost volàtil majoritari, ja que, en un mètode cromatogràfic desenvolupat al nostre laboratori en el que s'utilitzava l'SPME com a tècnica d'extracció [81], s'havia constatat que el contingut d'etanol del vi influïa en l'eficiència d'extracció del TCA.

Abans de preparar les mostres, però, es van analitzar els 8 vins mitjançant aquest mètode cromatogràfic (HS-SPME-GC-ECD) [81], el qual ja s'havia utilitzat en l'estudi anterior, per tal de determinar si els vins contenien TCA. En cap cas, el contingut de TCA d'aquest conjunt de vins va ser superior al límit de detecció del mètode cromatogràfic (0.9 ng/L).

Per a la preparació de les mostres de vi addicionades amb TCA, es van elaborar tres solucions mare en etanol de 932, 1140 i 988 mg/L de TCA. El motiu de treballar amb aquestes tres solucions mare de TCA independents, va ser per detectar possibles errors sistemàtics en la preparació de les mostres de calibratge. Per dilució d'aquestes solucions en etanol, es van obtenir solucions d'aproximadament 1 mg/L a partir de les quals es van obtenir solucions de 10 µg/L i 1 µg/L. Aquestes últimes van ser les utilitzades en la preparació de les mostres, tant de calibratge com de validació, que va consistir en l'addició de

diferents quantitats d'aquestes solucions als diferents vins i utilitzant, de manera alterna, cadascuna de les tres solucions.

Les anàlisis es van dur a terme amb el nas electrònic basat en l'MS però, a diferència de tots els treballs duts a terme fins al moment, es va utilitzar l'SPME com a sistema de mostreig. La transferència dels compostos des del sistema de mostreig fins al detector, igual que en altres ocasions, es va fer mitjançant una columna cromatogràfica.

L'extracció del TCA amb l'SPME es va dur a terme utilitzant un mètode que ja havia estat posat a punt al nostre laboratori [81] i en el que s'havien optimitzat les condicions d'anàlisi per tal d'obtenir la màxima eficiència en l'extracció d'aquest compost. Segons aquest mètode d'extracció, 20 mL de vi i 5.8 g de NaCl s'introduïen en un vial de 50 mL de capacitat el qual es tancava hermèticament amb un *septum*. El vial es deixava dins d'un bany termostatitzat a 25 °C durant 15 minuts i amb agitació magnètica de la mostra per tal de que s'establís l'equilibri del compost entre el líquid i l'espai de cap. Un cop passat aquest temps, s'exposava una fibra de pòlidimetilsiloxà (PDMS) a l'espai de cap de la mostra durant 30 minuts per tal que es produís l'absorció de l'analit a la fase estacionària de la fibra. Després del temps establert, es retirava la fibra del vial i s'exposava durant un minut a l'injector del cromatògraf de gasos on hi tenia lloc la desorció tèrmica dels analits retinguts per la fibra a una temperatura de 250 °C.

La transferència dels analits des de l'injector fins al detector es va dur a terme amb una columna analítica HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) de Hewlett-Packard i aplicant la següent programació de temperatura: 70 °C (1 min), 70 °C/min fins a 180 °C (2.5 min). El gas portador era Heli amb un flux de 1.8 mL/min.

La fragmentació dels analits a l'espectròmetre de masses es va dur a terme per impacte electrònic a 70 eV. Les anàlisis es van fer en mode SIM i seleccionant els següents ions: 62, 97, 109, 167, 169, 195, 197, 210 i 212 m/z. Les temperatures de la font d'ionització i del quadrupol van ser de 230 °C i 150 °C, respectivament.

Per a l'anàlisi multivariant de les dades es va utilitzar el *software* informàtic Pirouette 2.6 d'Infometrix (Woodinville, WA, USA) i el Unscrambler 9.0 de CAMO (Oslo, Noruega). La tècnica de calibratge multivariant utilitzada va ser el PLS, després de dur a terme un centrat de les dades.

Optimització del nombre de variables independents

Abans de construir el model de calibratge definitiu, es van dur a terme uns estudis preliminars amb un vi negre addicionat entre 10 i 100 ng/L de TCA, per tal d'estudiar la capacitat de l'instrument HS-SPME-MS en modelar la concentració de TCA a aquest nivell de concentracions. En un primer estudi, en el que es van analitzar els mateixos ions del TCA que en el treball anterior, es va observar que l'error mitjà de predicció del model PLS era molt elevat (del 50% en termes relatius). No obstant això, el senyal de l'instrument (abundància dels ions) era molt més gran que el que s'obtenia amb l'instrument HS-MS. Aquest fet feia pensar que la baixa capacitat de predicció del model potser era deguda a que tres ions no era un nombre suficient per a modelar la concentració de TCA. Cal tenir en compte que amb l'SPME, a la vegada que s'obté una major extracció del TCA, també pot augmentar l'extracció de compostos interferents, és a dir, compostos que en la seva fragmentació produeixin algun dels ions del TCA.

Amb l'objectiu de trobar el nombre d'ions que millor modelaven la concentració de TCA, es van fer un seguit d'experiments en els que s'analitzaven un nombre diferent d'ions d'aquest compost (3, 6, 9 i 12 ions). Amb les dades obtingudes en cadascun dels experiments, es va construir un model PLS. La taula IV.8 mostra, per a cadascun dels models, el coeficient de correlació obtingut entre els valors de concentració de TCA reals de les mostres i els valors predits pel model PLS en una validació creuada del mateix. Tal i com es pot observar, el coeficient de correlació del model que es va construir amb tres ions era molt baix, la qual cosa indicava que aquest model tenia molt poca capacitat de predicció del contingut de TCA de les

mostres. Al augmentar el nombre d'ions augmentava la correlació entre els valors reals i els predits pel model. A partir de 9 ions, però, el valor que s'obtenia d'aquest coeficient era del mateix ordre i, a més, ja es podia considerar adequat. Per tant, en la metodologia a seguir, es va determinar analitzar els 9 ions del TCA que apareixen a la taula.

Nº d'ions	Ions del TCA analitzats	r
3	195, 197, 210	0.4
6	167, 169, 195, 197, 210, 212	0.6
9	62, 97, 109, 167, 169, 195, 197, 210, 212	0.9
12	62, 97, 109, 167, 169, 171, 195, 197, 199, 210, 212, 214	0.9

Taula IV.8. Coeficient de correlació entre els valors reals i els predits pels models PLS construïts amb diferent nombre d'ions.

Construcció del model de calibratge

Per a la construcció del model es van analitzar un conjunt de 47 mostres que corresponien a 5 vins negres addicionats a diferents concentracions de TCA (entre 5 i 100 ng/L). En el primer model PLS que es va construir es va detectar que els valors de predicció de les mostres addicionades amb 5 ng/L de TCA presentaven un error molt gran i, per tant, es van eliminar del conjunt de calibratge. A més, també van ser excloses 8 mostres que es van detectar com a discrepants. La taula IV.9 mostra els paràmetres de calibratge i de validació creuada del model PLS final, que va ser construït amb 5 factors.

	Calibratge	Validació creuada
Pendent	0.9	0.8
Ordenada a l'origen	7.6	8.9
r	0.93	0.90
RMSE	11 ng/L (19%)	13 ng/L (23%)
SE	11 ng/L	13 ng/L

Taula IV.9. Paràmetres del calibratge i de la validació creuada del model PLS òptim. RMSE: arrel quadrada de l'error mitjà; SE: error estàndard.

El nombre òptim de factors va ser determinat a partir dels resultats de validació creuada de models construïts amb un nombre diferent de factors, escollint aquell que proporcionava un model amb un menor error mitjà de predicció (RMSECV).

Els valors dels coeficients de correlació (r), tant de calibratge com de validació creuada, indicaven un bon ajust entre les concentracions de TCA reals de les mostres i les predites pel model. Aquesta correlació es pot observar en el gràfic de la figura IV.48 on es mostra la concentració de TCA predita pel model en una validació creuada del mateix, front la concentració de TCA addicionada a les mostres, és a dir, la real.

Tot i que el núvol de punts s'ajustava a una recta de pendent la unitat i ordenada a l'origen zero, la qual s'indica en el gràfic mitjançant punts discontinus, la dispersió de les mostres era força important. L'exactitud obtinguda, expressada com l'arrel quadrada de l'error mitjà de validació creuada (RMSECV), va ser de 13 ng/L, que en termes relatius corresponia a un 23%. Tot i ser un valor elevat, es pot considerar acceptable als nivells de concentració tan baixos (ng/L) en què s'estava treballant.

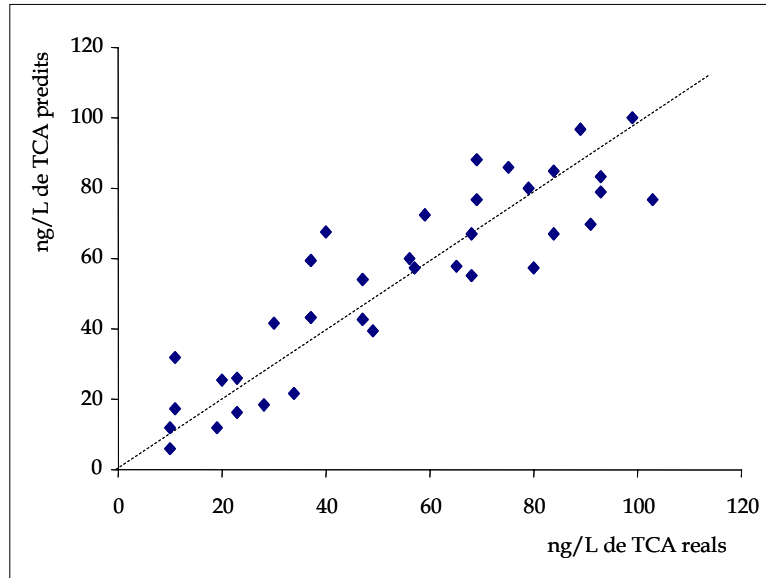


Figura IV.48. Concentració de TCA predita pel model en la validació creuada front concentració de TCA addicionada a les mostres.

Es va comprovar l'absència de biaix mitjançant un test conjunt del pendent i l'ordenada a l'origen. Tant pels valors predits en el calibratge com en la validació creuada, es va obtenir que el biaix no era estadísticament significatiu a un nivell de confiança del 95%.

El límit de detecció del mètode es va calcular a partir de les mostres del conjunt de calibratge amb l'addició més petita de TCA (10 ng/L) i aplicant la següent expressió matemàtica [86]:

$$LD = k \cdot RMSEC \cdot \sqrt{1+h_i}$$

On k és l'estadístic que té en compte l'error α i l'error β , l'RMSEC és l'error mitjà de calibratge i h_i és el valor mitjà del *leverage* de les mostres de 10 ng/L, és a dir, la distància d'aquestes mostres al centre del model.

El límit de detecció que es va obtenir, tenint en compte una probabilitat del 10% tant d'error α com d'error β , va ser de 30 ng/L. Aquest valor, tot i estar dins del

rang de concentracions escollit per a construir el model, és inferior al llindar de percepció sensorial del TCA en vins negres, el qual s'estima que es troba al voltant de 50 ng/L.

Validació del model de calibratge

Una vegada construït el model, aquest es va validar externament mitjançant un conjunt de mostres diferents a les utilitzades per construir-lo. Aquestes mostres, les quals es van analitzar per triplicat, eren vins negres addicionats amb diferents concentracions de TCA entre 30 i 100 ng/L. Abans, però, de la seva anàlisi amb el nas electrònic, les mostres del conjunt de validació van ser analitzades mitjançant el mètode cromatogràfic de referència (HS-SPME-GC-ECD) [81] per tal de determinar exactament la seva concentració.

La taula IV.10 mostra, per a cadascuna de les mostres del conjunt de validació, la concentració de TCA determinada pel mètode de referència i la predita pel model PLS. En aquest cas, l'exactitud obtinguda, expressada com a RMSEP, va ser de 13 ng/L (22.3% en termes relatius), valor molt semblant a l'obtingut amb la validació creuada.

Cal tenir en compte, però, que en aquest cas les mostres s'havien analitzat per triplicat i, per tant, els valors de predicció que es mostren a la taula IV.10 corresponien a les prediccions obtingudes amb la mitjana dels tres espectres. Si enlloc de fer les prediccions amb la mitjana dels espectres dels triplicats es predeien les rèpliques individualment, l'RMSEP augmentava de manera considerable fins a 17 ng/L (27% en termes relatius). Aquest fet indicava una important variabilitat en les mesures, la qual ja s'havia constatat en la construcció del model. La repetitivitat obtinguda del mètode, calculada a partir de la desviació estàndard de les prediccions dels triplicats de les mostres de validació, va ser del 16%. Per tant, una bona part de l'error mitjà de predicció del model era deguda a la

repetitivitat de l'instrument. Probablement, analitzant les mostres del conjunt de calibratge per triplicat i fent la mitjana dels tres espectres, es reduiria de manera considerable l'error de predicció del model i, per tant, l'exactitud i la precisió del mètode augmentarien.

Mostra	Valor de referència (ng/L)	Valor predit (ng/L)
A	26	33
B	30	57
C	45	43
D	57	42
E	59	61
F	65	60
G	87	82
H	103	80
I	99	88
J	57	60
K	75	65

Taula IV.10. Resultats de la validació externa.

Per altra banda, un treball interessant que potser permetria millorar el model, seria estudiar quins ions de l'espectre del TCA modelen millor la concentració d'aquest compost en mostres de vi. En aquest treball el criteri que es va seguir en l'elecció dels ions a analitzar, va ser aquells de l'espectre del TCA que presentaven una

abundància més gran que, a priori, no tenen per que ser els més selectius a l'hora de modelar la concentració de TCA.

La utilització de l'SPME com a sistema de mostreig del nas electrònic, ha permès obtenir un mètode amb un límit de detecció molt més baix que el del mètode desenvolupat utilitzant la tècnica de l'espai de cap estàtic. L'SPME és, doncs, una tècnica adequada quan els analits d'interès es troben a concentracions extremadament baixes, com és el cas del TCA. El mètode obtingut permet de manera senzilla i ràpida determinar el contingut de TCA en els vins negres als nivells de concentració en què es troba el llindar de percepció sensorial d'aquest compost.

Actualment, està en fase de redacció un article científic que recollirà tot l'experimental dut a terme i els resultats obtinguts en el desenvolupament d'aquest mètode per a la determinació del TCA mitjançant el nas electrònic HS-SPME-MS.

IV.4 APLICACIÓ DEL NAS ELECTRÒNIC A L'ANÀLISI D'AIGUARDENTS DE CANYA DE SUCRE

Els aiguardents obtinguts dels productes de la canya de sucre són la base a partir de la qual s'elaboren els roms, una beguda alcohòlica originària dels països del Carib que es consumeix a tot el món.

L'aroma d'aquests aiguardents ve determinat en gran part pels compostos que es formen durant la fermentació del sucre, així com també pels canvis que tenen lloc en la composició volàtil durant la destil·lació que es duu a terme posteriorment. Un altre procés, però, que afecta de manera important a l'aroma final de l'aiguardent, és el seu envelliment en bótes de fusta, el qual millora les qualitats sensorials, tan olfactivas com gustatives, d'aquest producte.

Els roms s'obtenen a partir de la dilució dels aiguardents envellits, els quals contenen originàriament un 70% v/v d'etanol, però que es dilueixen fins al 40 %. El producte diluït es sotmet a un segon procés d'envelliment també en bótes de fusta. La qualitat dels roms depèn doncs, de la qualitat dels aiguardents de partida així com també del temps durant el qual s'hagi dut a terme el seu envelliment.

En el marc d'un programa de col·laboració científica amb el *Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia* (IIIA) de Cuba, es va realitzar un estudi de l'aplicació del nas electrònic HS-MS al control de qualitat dels aiguardents de canya de sucre.

En aquest estudi es va desenvolupar un mètode per a la determinació del temps d'envelliment dels aiguardents en bótes de roure. En un segon treball es va estudiar la correlació entre les dades obtingudes en l'anàlisi dels aiguardents amb el nas electrònic i les intensitats de diferents descriptors aromàtics avaluades per un panel de tastadors.

IV.4.1. Determinació del temps d'envelliment dels aiguardents en bótes de fusta de roure

El temps d'envelliment és un paràmetre important a determinar en el control de qualitat dels aiguardents per a la detecció de possibles frauds, ja que aquest paràmetre es considera un indicador de la qualitat d'aquest producte. Un aiguardent es considera de més qualitat com més temps hagi estat envellint-se en bótes de fusta. No obstant això, fins al moment, no s'havia desenvolupat cap mètode analític que permetés el control d'aquest paràmetre.

Com ja s'ha comentat, l'aroma dels aiguardents va evolucionant durant el procés d'envelliment. Encara que aquesta evolució sigui lenta, es pot pensar que existeix una correlació entre la composició volàtil dels aiguardents i el temps que hagin romàs en bótes de roure. Aquesta correlació, però, no es pot establir amb tan sols una variable, com pot ser la concentració d'un compost, ja que l'envelliment, des del punt de vista de la composició aromàtica, és un procés complex en què molts compostos van variant la seva concentració, mentre que altres es formen.

Ja que amb el nas electrònic s'analitza l'aroma d'una manera global, es va pensar que amb l'ús d'aquest instrument i les tècniques de calibratge multivariant es podria establir aquesta correlació entre la composició volàtil dels aiguardents i el seu temps d'envelliment. Amb aquest objectiu es va desenvolupar un mètode per a la determinació d'aquest paràmetre que té una gran incidència en la qualitat dels aiguardents de canya de sucre.

Al final d'aquest apartat s'inclou l'article científic en què es van recollir totes les dades obtingudes en la posta a punt d'aquest mètode. L'article porta per títol "*Determination of ageing time of spirits in oak barrels using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) electronic nose system and multivariate calibration*" i ha estat acceptat per a la seva publicació a la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Tot i que en el moment de la redacció d'aquesta memòria no s'ha

publicat encara la versió impresa de l'article, la versió electrònica (DOI 10.1007/s00216-004-2969-3) es pot consultar *on-line*.

En aquest estudi es van analitzar 20 aiguardents amb diferents temps d'envelliment, entre 2 i 23 mesos, en bótes de fusta de roure. Les mostres van ser subministrades per una destil·leria de Cuba. Els aiguardents, que tenien un contingut en etanol al voltant del 70% v/v, abans de la seva anàlisi es van diluir fins al 40% v/v, que és el contingut en etanol que tenen la majoria de les begudes alcohòliques. Es va considerar que una concentració tan elevada d'aquest alcohol podia afectar de manera important al sistema de detecció de l'instrument ja que, com és conegut, els dissolvents danyen els filaments de la font d'ionització de l'MS. A més, d'aquesta manera, el mètode podria ser aplicable a l'estudi de roms comercials i altres begudes alcohòliques.

Les mostres diluïdes es van analitzar per triplicat amb el nas electrònic HS-MS utilitzant, de la mateixa manera que en treballs anteriors, una columna cromatogràfica com a línia de transferència entre el sistema de mostreig i el detector. El mètode d'anàlisi utilitzat va ser el mateix que s'havia posat a punt per a l'estudi de l'aplicació del nas electrònic HS-MS a l'anàlisi de vins (apartat IV.2). En aquest cas, interessava també obtenir la màxima resposta de tots els ions ja que l'objectiu era buscar la correlació amb tot l'aroma i no pas en un compost en concret, com en l'estudi del TCA. Per tant, tenint en compte que els compostos majoritaris de la fracció volàtil dels aiguardents, que són els que s'extreuen amb la tècnica de l'espai de cap estàtic, són molt semblants als del vi perquè, majoritàriament, són també productes de la fermentació (èsters, alcohols i àcids), vam considerar oportú utilitzar les mateixes condicions d'anàlisi.

Amb la matriu de dades obtinguda en l'anàlisi de les 60 mostres (20 aiguardents analitzats per triplicat) es va construir, mitjançant el mètode PLS, un model de calibratge multivariant utilitzant els mesos d'envelliment de cadascuna de les mostres com a variable dependent. En aquest primer model es va observar una

correlació entre els mesos predits pel model i els mesos reals de les mostres, no obstant això, es requeria d'un nombre bastant gran de components principals per a modelar la variable dependent.

En una exploració de les dades, es va observar que els histogrames de freqüència dels diferents ions, és a dir, la distribució de la resposta (abundància) en tot el conjunt de mostres, no s'aproximava a una distribució normal sinó que estava esbiaixada. Aquest comportament es pot observar en l'histograma de l'ió de m/z 91 que es mostra com a exemple a la figura IV.49.

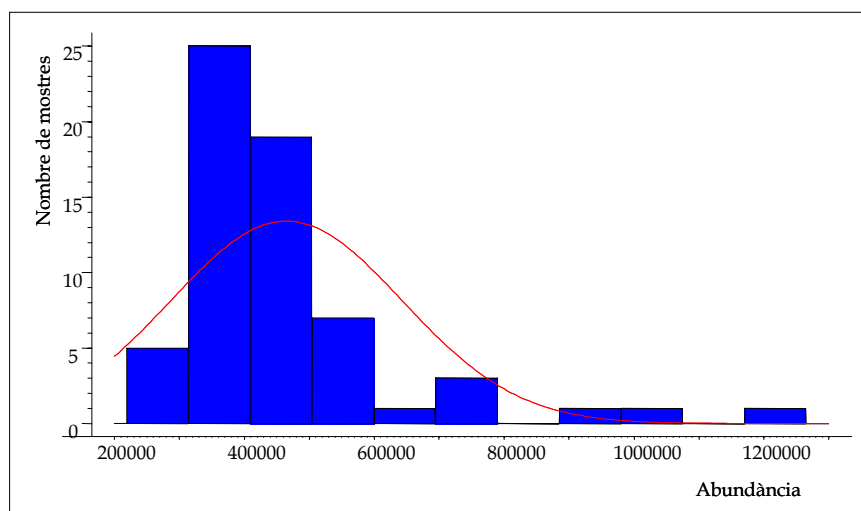


Figura IV.49. Histograma de l'ió 91 m/z .

Es va aplicar una transformació logarítmica a les dades d'abundància ja que, en algunes ocasions, aquesta estratègia matemàtica redueix aquest biaix de la freqüència de distribució. En el gràfic de la figura IV.50, on es mostra l'histograma de l'ió 91 després d'aplicar la transformació matemàtica a les dades, es pot observar que la distribució del logaritme de les abundàncies s'aproxima més a una distribució normal.

En el nou model PLS construït amb les dades d'abundància transformades, es va detectar que una de les rèpliques d'una mostra d'aiguardent envellida 8 mesos era un *outlier* i, per tant, es va eliminar del conjunt de calibratge. També es va observar que, si s'eliminaven les variables independents, és a dir els ions que tenien una menor contribució al model, l'exactitud del nou model construït sense aquestes variables millorava. Així doncs, es van eliminar aquelles variables que tenien un coeficient inferior al 20% del coeficient més gran del model.

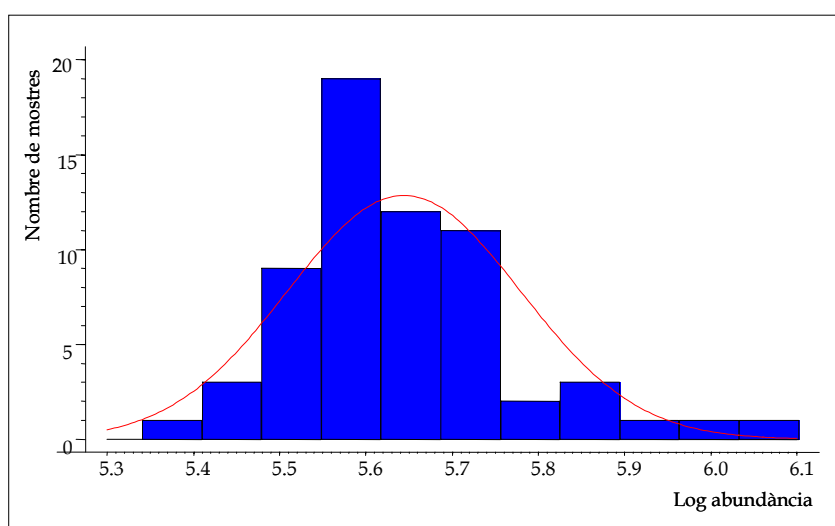


Figura IV.50. Histograma de l'ió 91 m/z després de la transformació logarítmica.

El model PLS final es va construir amb tres components principals que explicaven un 44% de la variabilitat de les dades de les variables independents (abundàncies dels ions en les diferents mostres) i un 94% de la variabilitat de la variable dependent (mesos d'envelliment de les mostres), la qual cosa indicava que el model utilitzava menys de la meitat de la informació aportada pels espectres de masses per a modelar els mesos d'envelliment dels aiguardents.

La figura IV.51 mostra la representació dels mesos d'envelliment predits pel model PLS en una validació creuada del mateix, front els mesos reals de les

mostres. El coeficient de correlació (r) obtingut entre aquests dos valors va ser de 0.96. La línia de punts discontinua del gràfic indica la recta d'ordenada a l'origen zero i pendent la unitat a la qual s'haurien d'ajustar els punts en el cas ideal que els valors predits pel model fossin exactament igual als reals. En el gràfic es pot observar, però, que la dispersió de les prediccions dels triplicats de cadascuna de les mostres era bastant elevada. A partir d'aquests resultats de predicció obtinguts en la validació creuada, es va calcular la repetitivitat del mètode obtenint-se un valor de 1.4 mesos, que corresponia a un 16.2% en termes de desviació estàndard relativa. Tenint en compte que l'exactitud del model, expressada com a RMSECV, era de 1.8 mesos, es podia concloure que gran part de l'error del mètode en la predicció dels mesos d'envelliment era deguda a la repetitivitat de les mesures.

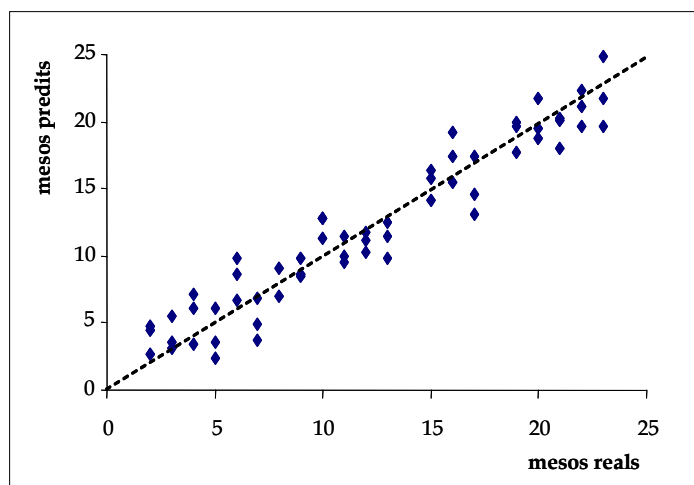


Figura IV.51. Mesos predits pel model PLS construït amb les rèpliques de les mostres front els mesos reals.

Una manera de reduir aquest error podria ser construïnt el model PLS amb la mitjana de les dades obtingudes en l'anàlisi dels triplicats. La figura IV.52 mostra els valors de predicció que es van obtenir en la validació creuada d'aquest nou model PLS construït amb les mitjanes dels triplicats, front els valors reals de les

mostres. En aquest cas, la correlació entre aquests dos valors ($r = 0.98$) va ser una mica més elevada que la obtinguda amb el model fet amb els triplicats. Per altra banda, l'exactitud del mètode es va reduir a 1.2 mesos.

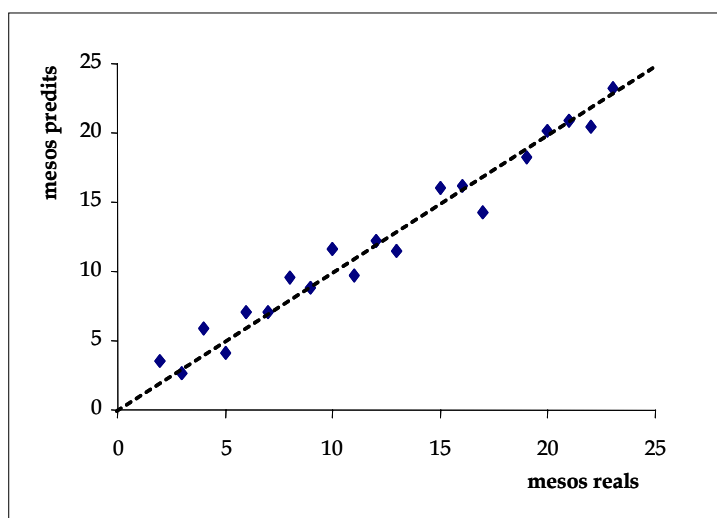


Figura IV.52. Mesos predits pel model PLS construït amb la mitjana de les rèpliques de les mostres front els mesos reals.

Els resultats obtinguts van ser molt satisfactoris ja que la validació creuada de cadascun dels models (el construït amb els triplicats i el construït amb la mitjana dels triplicats), mostraven que el mètode desenvolupat amb el nas electrònic HS-MS permetia predir els mesos d'envelliment d'aiguards de canya de sucre en bótes de roure amb una exactitud aproximadament d'un mes, si s'analitzaven les mostres per triplicat, o de dos mesos, si només es feia una anàlisi de cada mostra.

Els models no es van poder validar externament amb un segon conjunt de mostres, perquè els 20 aiguards de què es disposava es van utilitzar tots per a construir el model. Aquest nombre de mostres no era suficient per a poder dividir-les en dos conjunts: un de calibratge i l'altre de validació.

Un fet a remarcar és la senzillesa i rapidesa del mètode desenvolupat. La preparació de la mostra consisteix en diluir-la i addicionar-hi sal i, amb un temps d'anàlisi de tan sols 10 minuts, es pot conèixer amb una exactitud acceptable el temps que ha durat el seu envelliment. Aquestes característiques el fan un mètode molt adequat per al control de qualitat d'aquest tipus de begudes.

A continuació s'inclou l'article científic que porta per títol "*Determination of ageing time of spirits in oak barrels using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) electronic nose system and multivariate calibration*" en què es van presentar els resultats obtinguts en el desenvolupament d'aquest mètode.

*DETERMINATION OF AGEING TIME OF SPIRITS IN OAK BARRELS USING A
HEADSPACE-MASS SPECTROMETRY (HS-MS) ELECTRONIC NOSE SYSTEM
AND MULTIVARIATE CALIBRATION*

Analytical and Bioanalytical Chemistry, DOI 10.1007/s00216-004-2969-3

Analytical and Bioanalytical Chemistry

© Springer-Verlag 2005

10.1007/s00216-004-2969-3

Special Issue Paper

Determination of ageing time of spirits in oak barrels using a headspace–mass spectrometry (HS-MS) electronic nose system and multivariate calibration

M Pilar Martí¹, Jorge Pino², Ricard Boqué³, Olga Busto¹ and Josep Guasch¹

- (1) Departament de Química Analítica i Química Orgànica, Unitat d'Enologia (CeRTA), Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, C/Marcel·lí Domingo, 43007 Tarragona, Catalunya, Spain
- (2) Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, Crta, Del Guatao, Km 3 1/2, 19200 La Habana, Cuba
- (3) Departament de Química Analítica i Química Orgànica, Facultat de Química (Campus Sescelades), Universitat Rovira i Virgili, C/Marcel·lí Domingo, 43007 Tarragona, Catalunya, Spain

Received: 17 September 2004 Revised: 16 November 2004 Accepted: 17 November 2004 Published online: 26 January 2005

Abstract The aromatic composition of sugar cane spirits and, in general, of alcoholic beverages, is mainly influenced by the ageing process in wood barrels. There are several factors that affect the quality of the final aged product, but the time of the storage in the barrel is perhaps the most important one. Ageing time must therefore be controlled in order to detect counterfeits; however, this parameter is very difficult to control and, at present, there is no analytical method available to determine it. We propose a quantitative method for determining the ageing time of sugar cane spirits in oak barrels by using an electronic nose based on coupling directly a headspace sampler to a mass spectrometer (HS-MS), and multivariate calibration. The method developed is simple and provides, in 5 min, the ageing time of spirits with an accuracy of about 1 month.

Keywords Electronic nose - HS-MS - Alcoholic beverages - Multivariate calibration - Ageing

Introduction

The aromatic composition of alcoholic beverages such as rum, whiskey, brandy or spirits is mainly influenced by the ageing step. In this process, the alcoholic beverages are stored in wood barrels for a long time to improve the sensory qualities of the product. The distillation products are colourless and their flavour is sour. However, the ageing in oak wood barrels causes colouration changes, smooths the taste and gives a more pleasant flavour. All these changes depend on factors including the type of wood, the type of alcoholic beverage and its ethanol content, the size and age of the barrel and, perhaps most importantly, the time of storage in the barrel.

Cuban rums are made from sugar cane spirits. In the rum-making process, the spirits having an ethanol content around 70% v/v are aged in oak barrels for some time (between 6 months and 2 years). After a separation process to eliminate off-flavours, the spirits are diluted to around 40% v/v and they are aged in oak wood barrels again. The quality of the rums depends then on the quality of the spirits to a great measure, and ageing time is a parameter that must be controlled in order to detect counterfeits. So far, however, no analytical method capable of determining this parameter has been developed.

“Electronic nose” (e-nose) is the most commonly used term in the literature to refer to the instruments developed in recent years to differentiate samples according to their volatile composition, quickly and objectively, for quality control purposes [1–4]. The general principle of this technique consists of introducing the volatile compounds of the sample into a detection system, which generates a set of signals that contains the information about the volatile composition of the sample. This set of signals is like a “fingerprint” of the sample analysed. When several samples are analysed, a data matrix is generated that is subsequently treated with chemometric techniques in order to compare the samples on the basis of their volatile composition, and classify or discriminate them depending on their origin, variety, purity, ripeness or any other property [5–7].

Although e-noses are mainly used to provide qualitative information, they can also be used for quantitative purposes: this is possible by using multivariate calibration techniques. Successful results were obtained in the shelf-life prediction of processed milk [8], in the assessment of firmness and shelf-life of apples [9] and in the determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines [10].

The volatile composition of the spirits is influenced, among other parameters, by the time of the storage in the barrel. Therefore, it may be possible to correlate the composition of the headspace of the spirits with their ageing time. Here we propose a method for determining the ageing time of sugar cane spirits in oak barrels by using a headspace–mass spectrometry system (HS-MS) e-nose and multivariate calibration.

Experimental

Twenty sugar cane spirits with different ageing times in oak barrels (between 2 and 23 months) were obtained from a Cuban distillery. The spirits had an ethanol content of around 70% v/v and they were diluted to 40% v/v, which is the usual alcoholic grade of most commercial alcoholic beverages.

Diluted samples were analysed in triplicate by an HS-MS e-nose comprising an HP 7694 static headspace sampler, an HP 6890 gas chromatograph and an HP 5973 quadrupole mass spectrometer from Hewlett–Packard (Waldbronn, Germany). With this setup, the function of the gas chromatograph was to transfer the volatiles to the MS and not to chromatographically resolve the peaks.

In the HS-MS analysis, 5 mL of the diluted spirit and 0.6 g of NaCl were placed in a 10-mL vial that was hermetically capped with a PTFE/silicone septum. The sample was thermostated at 65°C for 1 h under constant stirring. Afterwards, the headspace of the sample was introduced into the gas chromatograph injection port. The loop and transfer line temperatures were 90 and 105°C, respectively; the pressurisation and injection times were 0.30 and 0.60 min, respectively. Chromatographic injection was made in splitless mode for 1.6 min at 200°C using an inlet of 1.5-mm i.d. To transfer the volatile compounds to the MS we used an HP-5MS chromatographic column (30 m×0.25-mm i.d., 0.25-µm film thickness) with an oven temperature program of 70°C (1 min), 70°C min⁻¹, 180°C (2.5 min). The carrier gas was helium with a flow rate of 1.8 mL min⁻¹. With these strong temperature and flow conditions, the transfer of the volatile compounds to the MS detector was achieved in only 5 min. The mass spectrum obtained resulted from the fragmentation of the overall compounds that were introduced into the ionisation chamber of the mass spectrometer for these 5 min. Mass spectra were recorded by electronic impact (EI) ionisation at 70 eV. The mass-to-charge ratio (m/z) range used was 50–250 amu. The ion source and mass quadrupole temperatures were 230 and 150°C, respectively.

The final response data matrix of x variables was then composed of the abundances of 60 objects (20 spirits analysed in triplicate) at 201 variables (m/z ratios). The predicted variable y was composed of the ageing times (in months) supplied by the distillery.

The software we used for multivariate analysis was Pirouette 2.6 from Infometrix, Inc. (Woodinville, WA, USA). We used the partial least-squares (PLS) method to build the regression models.

Results and discussion

Figure 1 shows the mass spectra (drawn as line plots) of the 20 spirits (average of three replicates). The most intense peaks are observed at m/z : 55, 56, 57, 70, 75 and 88. These mass fragments can be attributed to esters and alcohols, which are the major volatile compounds of the spirits [11]; however, they may not be the most important for modelling ageing time, which is a complex variable to be modelled. We attempted to do this by using the whole mass spectral information of the headspace. This volatile fraction can be related to the aroma of the spirits, which in turn is also a complex variable.

Several descriptors, such as fruitiness, alcohol, phenol and wood, among others, are used to characterise the aroma of Cuban spirits. Ageing is then a complex process that cannot be modelled using a single m/z ratio and this is the reason we need a multivariate approach. We chose the partial least-squares (PLS) method to build the regression models because it has become the de facto standard in chemometrics owing to the availability of software and the ease of its implementation. PLS regression is a “full-spectrum” algorithm intended to extract most of the information present in the predictor variables (x) which are related to the predictable variables (y). A linear model is assumed to relate the score vectors of the x -block with those from the y -block. More detailed information on PLS can be found elsewhere [12].

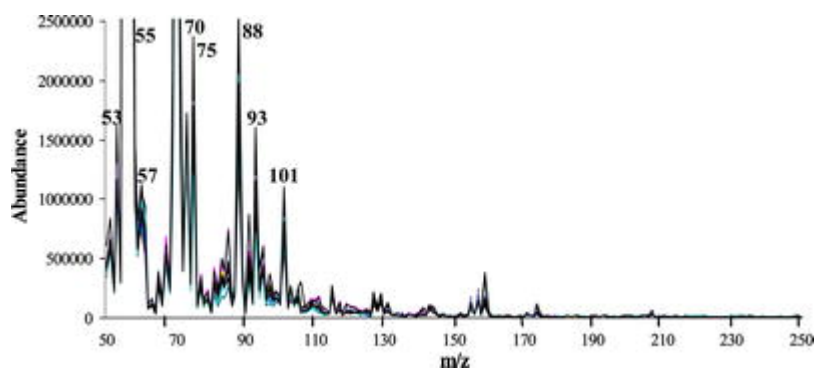


Fig. 1 Mass spectra (drawn as line plots) of the 20 spirits

Histograms of the x variables showed that the frequency distributions were very skewed. We applied a logarithmic transformation to the data in order to reduce the skewness. In the preliminary PLS models one replicate of a spirit sample aged 8 months was detected as outlier and was therefore removed. Finally, the variables (m/z ratios) having coefficients in the PLS model lower than a certain threshold (20% of the highest coefficient) were also removed.

The optimal PLS model was built with three factors which are the new variables, linear combinations of the original ones (m/z ratios), that reflect independent sources of variation in the data. The three factors explained 44 and 94% of the information (in terms of variance) contained in x and y , respectively. This means that less than half of the information in the spectra is used to model almost completely the ageing time. The optimal number of factors was found by cross-validation [13] using the leave-three-out procedure to account for the triplicates of each sample. Figure 2a shows the scores plot for the first two factors of the optimal PLS model. The scores are the projections of the samples in the new system of coordinates, defined by the PLS factors. A certain pattern can be observed with samples grouping in two main clusters, one from samples 2 to 9 and the other one from samples 10 to 23. We do not know the reason for this grouping; however, the important fact is that it shows a differentiation of the samples according to their ageing time. Figure 2b shows the loading weights of the x variables (fragment ions) for the first two factors of the PLS model. These can be interpreted as the contribution of each m/z ratio to the prediction of the y variable (months) and, therefore, they are useful in describing the pattern followed by the samples in Fig. 2a. If both figures are superposed, we can observe, for example, that the fragment ions 107, 159, 174, 131, 119, 142 and 120 are important variables in the differentiation of the samples aged for less time. In the same way, the group of fragment ions that have positive values in factor 1 and factor 2 are important variables in the differentiation of the samples aged for longer. From these results and an additional chromatographic study, it could be possible to obtain information about the chemical compounds responsible for this differentiation.

It can also be observed in Fig. 2a that variation between replicates is, in some cases, higher than the variation between different samples. The repeatability was calculated from the cross-validation results of the triplicate analysis of the samples, and was found to be 1.4 months (16.2% in relative average terms). This value indicates that repeatability of the HS-MS measurement is an important source of error of the method and that to reduce uncertainty in future predictions samples should to be analysed in replicate.

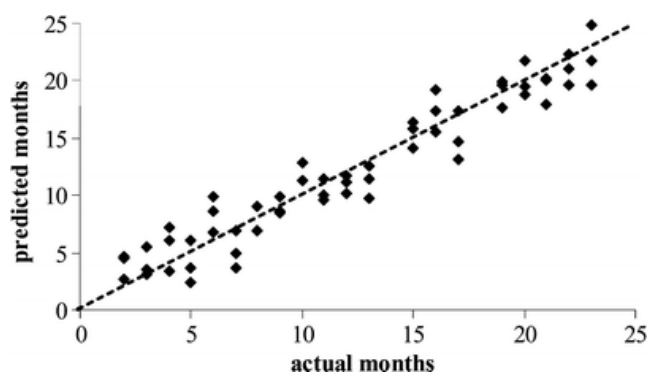


Fig. 3 Ageing months predicted by the PLS model versus actual aging months of the validation samples (model built with the replicate samples)

Table 1 Parameters of the optimal PLS model (predicted versus actual values) built with the replicate samples

	Calibration	Cross-validation
Slope	0.96±0.05	0.90±0.07
Intercept	0.43±0.68 months	1.18±0.97 months
Correlation	0.98	0.96
RMSE	1.2 months	1.8 months
Bias	Non-significant	Non-significant

RMSE root mean squared error

An RMSECV value of 1.8 months indicates the average prediction error we can expect for a future sample measured once. We have said above that much of this RMSECV is due to the repeatability of the HS-MS. One way to reduce this prediction error is by averaging the replicates. By doing this, an optimal PLS model with three factors was obtained with an RMSECV value of 1.2 months (keeping out the same variables as above). Table 2 shows the parameters of the PLS model built with the average samples. In Fig. 4 one can observe that there is a good fit between the ageing time (in months) predicted by the PLS model built with the average samples and the actual ageing time of the spirits.

Table 2 Parameters of the optimal PLS model (predicted versus actual values) built with the average samples

	Calibration	Cross-validation
Slope	0.99±0.04	0.93±0.02
Intercept	0.09±0.59 months	0.89±1.24 months
Correlation	0.99	0.98
RMSE	0.6 months	1.2 months
Bias	Non-significant	Non-significant

RMSE root mean squared error

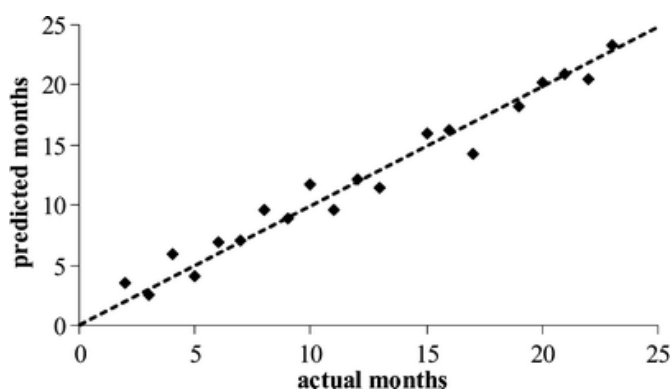


Fig. 4 Ageing time (months) predicted by the PLS model versus actual aging time (months) of the validation samples (model built with the average samples)

Conclusions

We have shown that the ageing time of spirits, an important quality parameter that is very difficult to assess by instrumental techniques, can be determined with suitable accuracy by using an HS-MS e-nose. The simplicity and speed of the sample preparation step—since it is only necessary to dilute the sample and to add sodium chloride—and the speed of the HS-MS analysis (5 min/sample) are important advantages of the method developed that make it very useful for use in the quality control of spirits.

Acknowledgments The authors wish to thank the AECI (Scientific Co-operation Program with Latin America) and the Ministerio de Ciencia y Tecnología/INIA (project VIN00-045) for their financial support.

References

1. Dickinson TA, White J, Kauer JS, Walt DR (1998) *Tibtech* 16:250–258
2. Strike DJ, Meijerink MJH, Koudelka-Hep M (1999) *Fresenius J Anal Chem* 364:499–505
3. Zubritsky E (2000) *Anal Chem* 72:421A–426A
4. Dittmann B, Nitz S, Horner G (1998) *Adv Food Sci* 20:115–121
5. García C, Fernández ME, Pérez JL, Moreno B (2001) *Quím Anal* 20:3–11
6. Martí MP, Boqué R, Busto O, Guasch J (2004) *Trends Anal Chem* (In press)
7. Martí MP, Busto O, Guasch J (2004) *J Chromatogr A* (In press)
8. Marsili RT (2000) *J Agric Food Chem* 48:3470–3475
9. Saevels S, Lammertyn J, Berna AZ, Veraverbeke EA, Di Natale C, Nicolai BM (2004) *Postharvest Biol Technol* 31:9–19
10. Martí MP, Boqué R, Riu M, Busto O, Guasch J (2003) *Anal Bioanal Chem* 376:497–501
11. Morton ID, Macleod AJ (eds) (1996) *Food flavours part B: the flavour of beverages*. Elsevier, Amsterdam
12. Wold S, Kettaneh-Wold M, Skagerberg B (1989) *Chemom Intell Lab Sys* 7:53–65
13. Osten DW (1988) *J Chemom* 2:39–48
14. Mandel J, Linning FJ (1957) *Anal Chem* 29:743–749

IV.4.2 Predicció de les intensitats aromàtiques avaluades per un panel de tastadors en l'anàlisi dels aiguardents

El desenvolupament dels nassos electrònics, a començaments dels anys vuitanta, va venir motivat per la necessitat d'algunes indústries, principalment l'agroalimentària, de disposar d'un instrument que, de manera ràpida i objectiva, proporcionés informació sensorial de les mostres, és a dir, que d'alguna manera dugués a terme el mateix treball que un panel de tastadors en una anàlisi sensorial. Els problemes de subjectivitat i variabilitat dels tastadors, així com també el llarg temps que suposa dur a terme aquest tipus d'anàlisi, van ser les principals causes de la important recerca que es va iniciar per al desenvolupament d'aquests instruments.

Actualment, existeixen nombroses aplicacions dels nassos electrònics a la diferenciació i classificació de mostres segons diversos paràmetres que, tradicionalment, s'avaluaven mitjançant l'anàlisi sensorial, com poden ser la frescor d'alguns aliments, l'origen, la presència de defectes aromàtics, etc. [1, 2, 4, 5, 21, 87]. Són molts pocs, però, els treballs que s'han dut a terme amb aquest instrument enfocats a l'estudi de la correlació que existeix entre les dades que proporciona un nas electrònic i les dades purament sensorials, com les intensitats d'olor que s'avaluen en el control de qualitat de nombrosos aliments. Per exemple, en el tast de vins és habitual que els tastadors descriguin les olors que perceben (fruites del bosc, herba, espècies, etc.) i, en algunes ocasions, fins i tot les puntuïn amb una escala d'intensitats.

En aquesta línia, Hudon *et al.* [88] van realitzar un estudi amb mostres sintètiques composades per mesclades de dos compostos olorosos, en el que van demostrar que existia una correlació entre les intensitats de les olors avaluades per un panel de tastadors i les respostes d'un nas electrònic basat en sensors de gasos de tipus polimèric. Un altre treball és el que van realitzar Shen *et al.* [89] amb un nas electrònic compost també per sensors de polímers conductors, en el

que van mostrar una bona correlació de la resposta dels sensors amb el nivell de ranciessa d'olis vegetals avaluat mitjançant anàlisi sensorial. Recentment, Di Natale *et al.* [50] han estudiat l'aplicació d'un nas electrònic basat en sensors de gasos de microbalances de cristall de quars (QMB) a l'estimació de la intensitat de diferents descriptors aromàtics que s'avaluen en l'anàlisi sensorial del vi.

En aquesta tesi s'ha estudiat la capacitat del nas electrònic basat en l'MS, d'imitar el sentit de l'olfacte humà en l'anàlisi sensorial. Amb aquest objectiu, s'ha desenvolupat una aplicació d'aquest instrument a la determinació d'intensitats aromàtiques de diferents descriptors que es defineixen en l'anàlisi sensorial d'aiguardents de canya de sucre.

Tot el treball realitzat i els resultats obtinguts es troben recollits en un article que s'adjunta al final d'aquest apartat i que porta per títol "*Modeling human sensory panels with an electronic nose. Application to sensory analysis of sugar cane spirits*". Aquest estudi s'ha enviat per a la seva publicació a la revista científica *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Les mostres d'aiguardent de canya de sucre analitzades en aquest estudi van ser proporcionades per una destil·leria de Cuba, la mateixa que va proporcionar les mostres del treball anterior. La presa de mostra es va fer en dos anys diferents, però consecutius.

Els aiguardents van ser analitzats sensorialment per un panel entrenat de set tastadors de la destil·leria. En l'anàlisi sensorial es van avaluar les intensitats d'olor de set descriptors aromàtics, que són els que habitualment s'avaluen en el control de qualitat que es duu a terme a la mateixa destil·leria. Aquests descriptors van ser: afruïtat, aiguardent envellit (*añejo*), vainilla, alcohol, fenol, fusta i fusel. Els tastadors, en l'anàlisi sensorial de cada mostra, puntuaven la intensitat de cadascun d'aquests descriptors en una escala de 0 a 10.

Des d'un punt de vista sensorial, les mostres d'aiguardents eren bastant diferents entre elles ja que presentaven diferents temps d'envelliment. Com s'ha comentat en l'apartat anterior, aquest és un factor que té una influència important en l'aroma d'aquest tipus de begudes. Aquesta diferenciació de l'aroma de les mostres segons el temps d'envelliment es pot observar a la figura IV.53 on es mostra el gràfic d'*scores* del PCA dut a terme a la matriu de dades obtinguda en l'anàlisi sensorial de les mostres. Aquesta matriu de dades estava composta per la mitjana de les intensitats avaluades per tots els tastadors, on les files eren les mostres i les columnes les variables, en aquest cas els set descriptors aromàtics. En el gràfic, on s'indica entre parèntesis els mesos d'envelliment de cada mostra, es pot observar que les mostres segueixen una tendència segons el temps que han romàs en bótes de roure. Aquesta tendència és captada pel primer component principal el qual explica el 93% de la variabilitat total de les mostres.

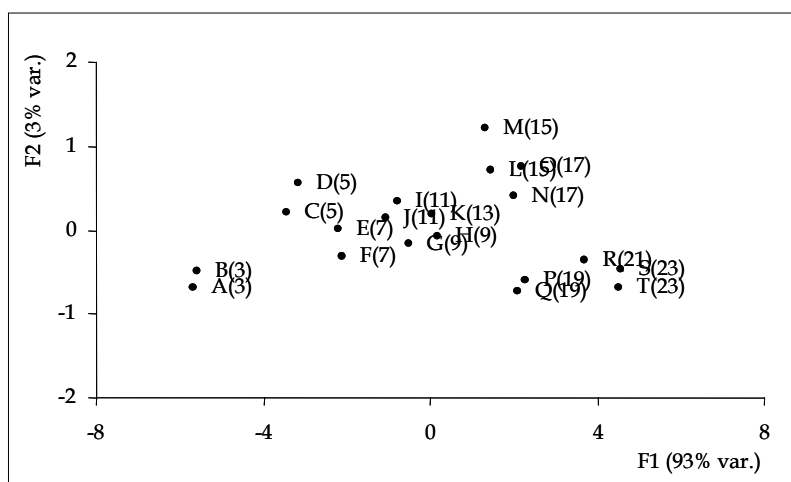


Figura IV.53. Gràfic d'*scores* del PCA realitzat a les dades obtingudes en l'anàlisi sensorial.

Aquesta tendència es pot explicar per la correlació que existeix entre el temps d'envelliment i els descriptors avaluats pels tastadors. El gràfic de la figura IV.54 mostra la projecció de les variables, és a dir els descriptors, sobre els dos primers

components principals (gràfic de *loadings*). Si es superposa aquest gràfic amb el de la figura IV.53, es pot concloure que la tendència que s'observa en el gràfic d'*scores* és deguda a que les intensitats dels descriptors aiguardent envellit, fusta, vainilla i fenol augmenten amb el temps d'envelliment ja que els seus coeficients presenten valors positius en el primer component principal, mentre que les dels descriptors fusel, afrutada i alcohol, que presenten coeficients negatius en el primer component principal, disminueixen.

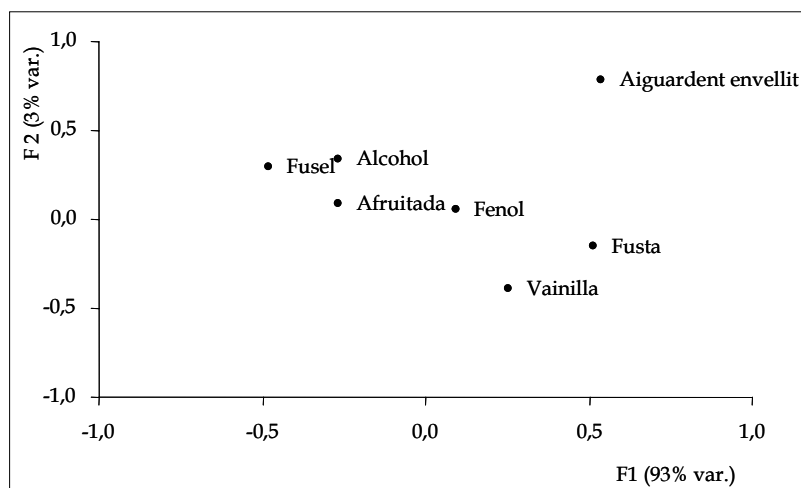


Figura IV.54. Gràfic de *loadings* del PCA realitzat a les dades obtingudes en l'anàlisi sensorial.

Les anàlisis dels aiguardents amb el nas electrònic HS-MS es van dur a terme seguint el mateix procediment que en el treball anterior de determinació dels mesos d'envelliment. Els aiguardents, amb un contingut en etanol del 70% v/v, es van diluir al 40% v/v abans d'analitzar-los. Les mostres diluïdes es van analitzar per triplicat. El mètode d'anàlisi, al igual que en el treball anterior, va ser el mateix que s'havia posat a punt per a l'anàlisi de vins.

Tot i que la presa de mostra s'havia fet en dos anys diferents, les anàlisis de les mostres amb el nas electrònic es van fer totes al mateix temps per tal d'evitar els

problemes d'inestabilitat del senyal que tenen lloc en aquests instruments quan s'analitzen mostres amb una gran diferència de temps.

L'objectiu del treball era estudiar la correlació entre les dades instrumentals obtingudes amb l'anàlisi de les mostres mitjançant el nas electrònic (abundàncies dels ions analitzats) i les dades sensorials avaluades pels tastadors (intensitats dels diferents descriptors). O, dit d'una altra manera, avaluar la capacitat del nas electrònic en la predicció de les intensitats dels descriptors aromàtics definits pels tastadors en l'anàlisi sensorial dels aiguardents. En aquest cas, doncs, la variable a predir no era una sola, sinó que eren set (els set descriptors avaluats pels tastadors). Per tant, calia establir un model de calibratge multivariant per a cadascun dels descriptors.

En l'anàlisi exploratòria de les dades obtingudes amb el nas electrònic, es va observar que la freqüència de distribució de les abundàncies de cada ió estaven esbiaixades. De la mateixa manera que en el treball anterior, es va aplicar una transformació logarítmica a les dades per tal de que la freqüència de distribució s'aproximés més a una distribució normal.

En els models PLS construïts amb les dades transformades algunes mostres van ser detectades com a *outliers*. Però, curiosament, no van ser les mateixes en tots els models. Per exemple, la mostra de 17 mesos d'envelliment, que en el gràfic de la figura IV.53 s'anomena "O", en tots els models es va detectar com una mostra discrepant i, per tant, es va eliminar de la matriu de dades. La mostra "K" tan sols es va detectar com a discrepant en els models dels descriptors aiguardent envellit i vainilla. En aquest últim també es van eliminar les mostres "M" i "Q".

Per altra banda, també es van eliminar aquelles variables que tenien coeficients baixos (entre un 10 i un 20% del coeficient més gran) i que, per tant, contribuïen poc als models. Les variables eliminades no van ser les mateixes en tots els casos ja que no tots els descriptors eren modelats amb les mateixes variables o, al menys, no totes tenien la mateixa importància.

La taula IV.11 mostra alguns dels paràmetres dels models PLS finals. Es pot observar que, en tots els casos, la correlació entre les intensitats predites pel model en una validació creuada del mateix i les intensitats avaluades pels tastadors presentaven una bona correlació ($r > 0.9$). L'exactitud del mètode (RMSECV) variava segons el descriptor però, en general, es podia considerar acceptable ja que els valors més grans de l'error mitjà de predicció es trobaven al voltant del 10%.

Descriptor	r	RMSECV
Afruitat	0.90	0.33 (11.4%)
Aiguardent envellit	0.93	0.55 (9.8%)
Vainilla	0.96	0.28 (8.2%)
Alcohol	0.97	0.22 (4.9%)
Fenol	0.94	0.14 (5.0%)
Fusta	0.93	0.54 (9.8%)
Fusel	0.95	0.47 (9.8%)

Taula IV.11. Resultats de la validació creuada realitzada als models PLS dels diferents descriptors.

Els valors relatius de l'RMSECV es van calcular dividint aquest valor per la diferència entre el valor d'intensitat mínim i màxim avaluats pels tastadors. Es va considerar oportú calcular-ho d'aquesta manera, i no dividint l'RMSECV per la mitjana de tots els valors, perquè, tot i que l'interval d'intensitats que podien utilitzar els tastadors en l'avaluació dels descriptors era de 0 a 10, en els resultats obtinguts de l'anàlisi sensorial s'observava que en realitat l'interval en que es trobaven les mesures de les mostres era molt més petit. Per exemple, les

intensitats del descriptor afruitat determinades pels tastadors es trobaven en un interval entre 2.9 i 5.8.

En el cas del descriptor fenol, la diferència d'intensitats entre la mostra que presentava un valor màxim i la que presentava un valor mínim era de tan sols 1.1. Tenint en compte que la incertesa de les intensitats d'aquest descriptor avaluades pels tastadors era de 0.34 i que la desviació estàndard mitjana dels valors d'intensitat de totes les mostres era de 0.36, es pot concloure que els tastadors no diferenciaven les mostres segons aquest descriptor ja que les diferències d'intensitat entre les diferents mostres eren degudes a la incertesa de les mesures dels tastadors.

La taula IV.12.a i IV.12.b mostra, per a cadascun dels descriptors, les intensitats aromàtiques avaluades pels tastadors i les predites pel model PLS en la validació creuada del mateix. Els mateixos resultats els mostra gràficament la figura IV.55, on es pot observar la bona correlació que hi ha entre aquests dos valors, la qual ja mostraven els coeficients de correlació (r) dels diferents models.

En una comparació dels dos mètodes mitjançant un test conjunt del pendent i l'ordenada a l'origen, es va obtenir que les intensitats predites pel nas electrònic i les avaluades pels tastadors eren estadísticament comparables a un nivell de confiança del 95%.

Mostra	Afruitada			Aiguardent envellit			Alcohol			Fenol		
	AS	NE	dif.	AS	NE	dif.	AS	NE	dif.	AS	NE	dif.
A	5.8	5.4	0.4	2.2	3.0	-0.8	6.0	6.0	0.0	1.8	1.9	-0.1
B	5.6	4.8	0.8	2.3	3.6	-1.3	6.2	5.9	0.3	0.3	1.7	2.0
C	4.7	5.1	-0.4	3.9	3.8	0.1	6.1	6.0	0.1	2.1	2.1	0.0
D	4.7	4.8	-0.1	4.2	4.4	-0.2	6.3	6.2	0.1	2.6	2.5	0.1
E	4.3	4.3	0.0	4.6	4.8	-0.2	5.4	5.4	0.0	2.1	2.1	0.0
F	4.1	4.3	-0.2	4.3	3.8	0.5	5.7	5.4	0.3	2.0	2.1	-0.1
G	4.1	3.9	0.2	5.2	5.3	-0.1	4.9	5.2	-0.3	2.4	2.5	-0.1
H	4.0	4.3	-0.3	5.7	5.2	0.5	4.9	5.0	-0.1	2.0	2.0	0.0
I	4.6	4.4	0.2	5.4	5.2	0.2	5.6	5.2	0.4	1.8	2.0	-0.2
J	4.3	4.3	0.0	5.1	5.3	-0.2	5.9	6.2	-0.3	2.0	1.9	0.1
K	4.6	4.7	-0.1	5.9	-	-	5.2	5.2	0.0	2.2	2.1	0.1
L	3.8	3.5	0.3	7.0	7.1	-0.1	4.7	4.6	0.1	2.4	2.5	-0.1
M	3.5	3.9	-0.4	7.4	6.6	0.8	4.9	5.2	-0.3	2.6	2.5	0.1
N	3.8	3.6	0.2	7.1	6.9	0.2	4.7	4.6	0.1	2.9	2.7	0.2
P	3.0	3.3	-0.3	6.4	7.1	-0.7	4.2	4.0	0.2	2.5	2.4	0.1
Q	3.2	3.6	-0.4	6.1	5.4	0.7	4.5	4.7	-0.2	2.8	2.5	0.3
R	2.9	2.9	0.0	7.4	8.5	-1.1	3.5	3.5	0.0	2.4	2.6	-0.2
S	2.9	3.0	-0.1	7.8	7.1	0.7	3.8	4.1	-0.3	2.8	2.6	0.2
T	2.9	3.0	-0.1	7.5	7.4	0.1	3.6	3.8	-0.2	2.9	2.9	0.0

Taula IV.11.a Intensitats avaluades en l'anàlisi sensorial (AS), les predites pel nas electrònic (NE) i diferència entre els dos valors (dif.) dels descriptors afruitat, aiguardent envellit, alcohol i fenol.

Mostra	Fusel			Fusta			Vainilla		
	AS	NE	dif.	AS	NE	dif.	AS	NE	dif.
A	5.9	5.8	0.1	2.6	3.2	-0.6	0.8	1.0	-0.2
B	6.0	5.5	0.5	3.0	4.5	-1.5	0.5	1.0	-0.5
C	5.4	5.0	0.4	4.2	4.1	0.1	0.8	0.8	0.0
D	5.5	5.6	-0.1	4.5	4.2	0.3	0.7	0.6	0.1
E	5.4	4.5	0.9	4.8	5.3	-0.5	1.8	1.9	-0.1
F	5.0	4.4	0.6	4.9	4.3	0.6	1.9	1.8	0.1
G	3.6	3.8	-0.2	5.5	5.8	-0.3	1.4	1.2	0.2
H	3.2	3.6	-0.4	5.8	5.7	0.1	1.7	1.7	0.0
I	4.0	3.9	0.1	5.9	5.6	0.3	1.3	1.7	-0.4
J	4.4	4.7	-0.3	5.9	5.6	0.3	1.7	1.4	0.3
K	3.6	4.3	-0.7	6.0	5.4	0.6	2.1	-	-
L	3.1	2.8	0.3	6.5	6.9	-0.4	1.8	1.9	-0.1
M	3.5	3.4	0.1	6.1	6.2	-0.1	1.9	-	-
N	2.7	2.7	0.0	6.7	7.1	-0.4	2.5	2.3	0.2
P	2.6	2.6	0.0	7.2	6.8	0.4	2.7	2.5	0.2
Q	2.9	3.2	-0.3	7.5	6.5	1.0	2.9	-	-
R	1.7	1.6	0.1	7.7	8.2	-0.5	2.6	2.8	-0.2
S	1.1	1.8	-0.7	8.1	7.8	0.3	3.4	3.0	0.4
T	1.4	1.8	-0.4	8.6	8.6	0.0	3.2	2.8	0.4

Taula IV.11.b Intensitats avaluades en l'anàlisi sensorial (AS), les predites pel nas electrònic (NE) i diferència entre els dos valors (dif.) dels descriptors fusel, fusta i vainilla.

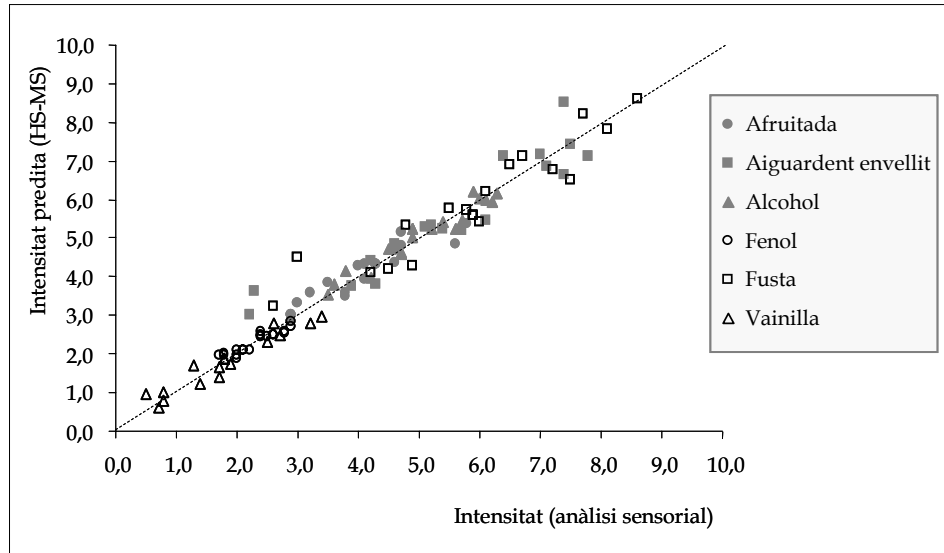


Figura IV.55. Intensitats dels diferents descriptors predites pels models PLS front les intensitats avaluades pel panel de tastadors.

Un altre paràmetre que es va comparar van ser les incerteses de les intensitats mesurades amb els dos mètodes. En el cas de l'anàlisi sensorial, es va considerar la incertesa com la desviació estàndard dels valors avaluats pels diferents tastadors. Les incerteses de les intensitats predites pels models PLS es van determinar utilitzant l'expressió matemàtica proposada per Faber i Bro [85].

El gràfic de la figura IV.56 mostra la mitjana de les incerteses de totes les mostres obtingudes amb l'anàlisi sensorial i amb el nas electrònic per a cadascun dels descriptors. Exceptuant alguns casos concrets com el del descriptor aiguardent envellit en el que la incertesa dels valors d'intensitat predits amb el model PLS són el doble que els valors avaluats pels tastadors, o també el descriptor afruitat on la incertesa dels valors dels tastadors és significativament més gran que la del nas electrònic, en general, es pot concloure que les incerteses dels dos mètodes són del mateix ordre.

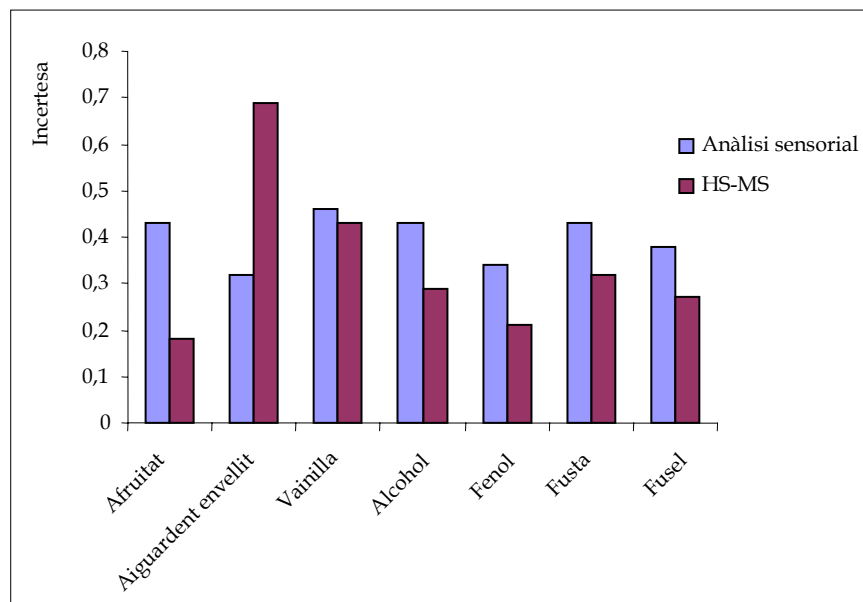


Figura IV.56. Incertesa de les intensitats avaluades pels tastadors i de les intensitats predites pel nas electrònic per a cadascun dels descriptors.

Tots aquests resultats mostren que el mètode desenvolupat amb el nas electrònic HS-MS permet avaluar en els aiguardents de canya de sucre les intensitats de diferents descriptors aromàtics de manera ràpida (10 minuts per mostra) i senzilla i, a més, amb una precisió molt semblant a la d'un panel de tastadors entrenats. Els resultats obtinguts en aquest treball són molt prometedors ja que mostren el potencial del nas electrònic HS-MS en dur a terme el mateix treball que un panel de tast sensorial en l'avaluació d'intensitats aromàtiques. Per tant, aquest instrument podria ser un bon complement a l'anàlisi sensorial ja que en les anàlisis s'estalviaria temps, a més de tots els problemes que comporta l'ús d'un panel de tast. No obstant això, l'anàlisi sensorial efectuat pels tastadors continuaria sent necessari per a construir els models PLS i anar calibrant-los amb el temps.

A continuació s'inclou l'article que porta per títol "*Modeling human sensory panels with an electronic nose. Application to sensory analysis of sugar cane spirits*", en el que s'hi troba recollit l'experimental dut a terme i els resultats obtinguts en aquest estudi.

*MODELING HUMAN SENSORY PANELS WITH AN ELECTRONIC NOSE.
APPLICATION TO SENSORY ANALYSIS OF SUGAR CANE SPIRITS*

Enviat per a la seva publicació a la revista
Journal of Agricultural and Food Chemistry

**MODELING HUMAN SENSORY PANELS WITH AN ELECTRONIC NOSE.
APPLICATION TO SENSORY ANALYSIS OF SUGAR CANE SPIRITS**

M. Pilar Martí,¹ Jorge Pino,² Ricard Boqué³, Olga Busto,¹ Josep Guasch^{1*}

¹Departament de Química Analítica i Química Orgànica.
Unitat d'Enologia (CeRTA). Facultat d'Enologia. Universitat Rovira i Virgili.
C/ Marcel·lí Domingo, s/n. E-43007 Tarragona, campus Sescelades, Catalonia, Spain.
E-mail: qaenol@urv.net

²Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia
Crta. Guatao, Km 3 ½. 19200 La Habana, Cuba

³Chemometrics and Qualimetrics Group
Rovira i Virgili University. Tarragona, Catalonia, Spain

ABSTRACT

Since immemorial time, the humanity has used its olfactory system to evaluate food quality. Nowadays, the human nose is still the most commonly used "instrument" in many industries for evaluating the aroma, which is an important factor in quality control and quality assurance of foods. However, sensory analysis by a panel of trained judges is a very time-consuming technique. In the last 20 years, there has been a constant research to achieve an instrument that could mimic the human sense of smell and provide rapid sensory information. As a consequence of this research, the electronic nose (e-nose) instruments have emerged. Even though a great number of applications have been developed using e-noses, the correlation between sensory analysis and instrumental analysis has not yet been well-established.

In this paper, we present a study that uses an e-nose based on coupling directly a headspace sampler to a mass spectrometer (HS-MS) and multivariate calibration to evaluate the intensities of several odor attributes defined in sensory analysis of sugar cane spirits. The results show that the method developed allows to predict the odor intensities evaluated by a panel of trained judges in a fast (5 min/sample) and simple way and with a suitable accuracy (<12%).

To the best of our knowledge, this is the first application where it has been shown that an instrument can emulate a human sensory panel in the sensory evaluation of real samples, in this case, sugar cane spirits.

KEYWORDS

Electronic nose, sensory analysis, HS-MS, alcoholic beverages, odor intensities

INTRODUCTION

Sensory analysis made by a panel of trained judges is the most commonly used technique in many industries for evaluating the quality of food odor. The complexity of most food aromas makes very difficult to carry out its quality control, in a fast and simple way, using conventional flavor analysis techniques such as gas chromatography (GC) or gas chromatography olfactometry (GCO). For this reason, sensory analysis is still the most appropriate technique for quality control purposes. However, it is a costly process for industries because it requires trained people who can only work for relatively short periods of time. There are also other problems such as the subjectivity of the human response to odors and the variability between individuals. As a consequence of the enormous demand for an instrument that could overcome the above cited problems, in the last two decades several instruments called “electronic noses” (e-noses) have emerged (1-4). Depending on their detection system, e-noses can be classified in two groups: classical instruments, which are based on solid state gas sensors, and new instruments, which are based on mass spectrometry (MS). Although they do not use the same technology, they have the same purpose: to differentiate and subsequently classify samples according to their volatile composition in a fast and simple way. E-noses do not provide information on the amounts of the individual aroma compounds; rather they provide a global and qualitative estimation of the aroma profile. In this respect, they resemble human olfactory perception.

The suitability of e-noses to differentiate food samples according to different parameters such as origin, freshness, age, variety, etc. has been proved in a great

number of applications (2, 3, 5-8). However, the correlation between sensory analysis and e-nose analysis has not yet been well-established. Some studies have shown that there is a relationship between sensory data and instrumental data because, applying unsupervised pattern recognition techniques -such as principal component analysis (PCA) or hierarchical cluster analysis (HCA)- to the data obtained by instrumental analysis (e-nose), samples cluster according to sensory properties, for example, the intensity of a certain odor (9-17). But very few studies have been conducted to study the correlation between sensory and instrumental data, which could make possible using e-noses for measuring odor intensity or, in other words, for emulating sensory analysis. In the environmental field, Hudon *et al.* (18) obtained a linear relationship between intensities evaluated by sensory analysis of mixtures of two odor compounds and averaged responses of conducting polymer sensors. Shen *et al.* (19) also showed that intensities of some conducting polymer sensors were well-correlated with the lipid oxidation of vegetable oils evaluated by sensory analysis.

The odor of most of the attributes defined in sensory analysis is due to several volatile compounds that contribute with their specific odors. Therefore, it is not possible to correlate the odor intensity of an attribute to a single variable such as the concentration of a volatile compound. For this reason, a multivariate approach is needed to correlate the compounds present in the headspace of the sample to the different attributes evaluated.

The purpose of the present study is to show that we can use an e-nose system, based on coupling a headspace sampler to a mass spectrometer (HS-MS), together with multivariate calibration, to evaluate the intensity of several odor attributes in sugar cane spirits.

EXPERIMENTAL

Samples

Twenty sugar cane spirits with different aging times in oak barrels (between 3 and 23 months) were obtained from a Cuban distillery. The sampling was carried out in two different years.

Sensory analysis

Sensory analysis was performed by a panel of seven trained judges from the Cuban distillery that supplied the samples. For each sample, seven odor attributes were evaluated using a 0-10 intensity scale. The attributes evaluated were: fruitiness, aged spirit (or *añejo*), vanilla, alcohol, phenol, wood and fusel. These are the attributes usually evaluated by the panelists of the distillery.

HS-MS analysis

The spirits had an ethanol content around 70% v/v and, before HS-MS analysis, they were diluted to 40% v/v which is the usual alcoholic grade of most alcoholic beverages.

Diluted samples were analyzed in triplicate by a HS-MS e-nose composed of a HP 7694 static headspace sampler, a HP 6890 gas chromatograph and a HP 5973 quadrupole mass spectrometer from Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany).

In the HS-MS analysis, 5 mL of the diluted spirit and 0.6 g of NaCl were placed in a 10 mL vial that was hermetically capped with a PTFE/silicone septum. The sample was thermostated at 65 °C for 1 hour under constant stirring. Afterwards, the headspace of the sample was introduced into the gas chromatograph injection port. The loop and transfer line temperatures were 90 °C and 105 °C, respectively, and the pressurization and injection times were 0.30 and 0.60, respectively. Chromatographic injection was made in splitless mode for 1.6 min at 200 °C using an inlet of 1.5 mm I.D. To transfer the volatile compounds to the MS we used a HP-5MS chromatographic column (30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness) with an oven temperature program of 70 °C (1 min), 70 °C/min, 180 °C (2.5 min). The carrier gas was helium with a flow-rate of 1.8 ml/min. With these strong temperature and flow conditions, the transfer of the volatile compounds to the MS detector was achieved in only 5 minutes, without chromatographic separation. Therefore, the global mass spectrum obtained was due to the fragmentation of the overall compounds that were introduced into the ionization chamber of the mass spectrometer for these 5 minutes. Mass spectra were recorded by electronic impact (EI) ionization at 70 eV. The mass-to-charge (m/z) ratio range used was 50-250 amu

(atomic mass units). The ion source and mass quadrupole temperatures were 230 °C and 150 °C, respectively.

The final data matrix of x variables was composed of the abundances of 20 spirits (every spectrum was the average of three replicates) and 201 variables (m/z ratios). The predicted variables (y) were composed of the odor intensities of the seven attributes evaluated by the sensory panel. Figure 1 shows a diagram with both matrices.

The software we used for multivariate analysis was Pirouette 2.6 from Infometrix, Inc. (Woodinville, WA) and Unscrambler 9.0 from CAMO (Oslo, Norway). We used the principal component analysis (PCA) method to recognize natural groups of the samples and the partial least squares (PLS) method to build the regression models.

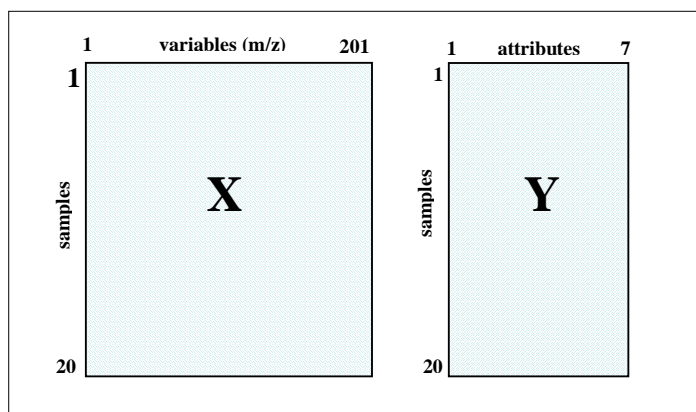


Figure 1. Data matrices used in this study. Matrix X contains the mass spectra of the 20 spirit samples (i.e. the abundances at 201m/z ratios). Matrix Y contains the values of the 7 attributes evaluated by the sensory panel for the 20 spirit samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the results of the sensory analysis. The intensity values correspond to the average of the intensities given by the seven panelists. For each attribute, the mean of the intensities of all the samples, the standard deviation (absolute and relative) and the range (difference between the maximum and minimum values) are shown. It can be observed that mean values differ considerably, two of them (vanilla and phenol) being clearly lower than the rest. More important are the ranges, which can tell us what variables show more variability. As the attributes have been measured on a 0-10 scale, the greater the range the greater the variability that PLS will be able to model. As we can see, phenol shows a very low range value. Finally and very related with the ranges, we have the standard deviations (both absolute and relative). These values can be used for comparison with the prediction errors of the PLS regression models. Prediction errors should be much lower than the standard deviation; otherwise it would mean we are not modeling at all the y variable. We applied PCA to the mean-centered data matrix to carry out an exploratory analysis of the sensory data.

Figure 2a shows the projection of the samples (scores plot) on the first two factors. It can be observed that samples follow a trend along the months they have been aged in oak barrels, which is given in brackets. This trend is captured by Factor 1, which accounts for 93% of the total variability of the samples. These results can be explained by the high correlation of the attributes evaluated by the panelists with the ageing time of the spirits in oak barrels. This fact can be observed in figure 2b, that shows the projection of the variables (attributes) on the first two factors (loading plot). The attributes that have positive values in factor 1 (aged spirit, wood, vanilla and phenol) increase with the ageing time, whereas the attributes that have negative values in factor 1 (fusel, fruitiness and alcohol) decrease with the ageing time.

sample*	fruity	aged spirit	vanilla	alcohol	phenol	wood	fusel
A (3)	5.8	2.2	0.8	6.0	1.8	2.6	5.9
B (3)	5.8	2.3	0.8	6.0	1.8	2.6	5.9
C (5)	4.7	3.9	0.8	6.1	2.1	4.2	5.4
D (5)	4.7	3.9	0.8	6.1	2.1	4.2	5.4
E (7)	4.3	4.6	1.8	5.4	2.1	4.8	5.4
F (7)	4.3	4.6	1.8	5.4	2.1	4.8	5.4
G (9)	4.1	5.2	1.4	4.9	2.4	5.5	3.6
H (9)	4.1	5.2	1.4	5.0	2.4	5.5	3.6
I (11)	4.6	5.4	1.3	5.6	1.8	5.9	4.0
J (11)	4.6	5.4	1.3	5.6	1.8	5.9	4.0
K (13)	4.6	5.9	2.1	5.2	2.2	6.0	3.6
L (15)	3.8	7.0	1.8	4.7	2.4	6.5	3.1
M (15)	3.8	7.0	1.8	4.9	2.4	6.5	3.1
N (17)	3.8	7.1	2.5	4.7	2.9	6.7	2.7
O (17)	3.8	7.1	2.5	4.7	2.9	6.7	2.7
P (19)	3.0	6.4	2.7	4.2	2.5	7.2	2.6
Q (19)	3.0	6.4	2.7	4.2	2.5	7.2	2.6
R (21)	2.9	7.4	2.6	3.5	2.4	7.7	1.7
S (23)	2.9	7.8	3.4	3.8	2.8	8.1	1.1
T (23)	2.9	7.8	3.4	3.2	2.8	8.1	1.1
Mean	4.1	5.6	1.9	5.0	2.3	5.8	3.6
SD	0.9	1.7	0.8	0.9	0.4	1.6	1.5
RSD (%)	21.4	29.8	44.1	17.3	15.8	27.4	41.8
range	2.9	5.6	2.6	2.9	1.1	5.5	4.8

Table 1. Results of sensory analysis. SD: standard deviation; RSD: relative standard deviation

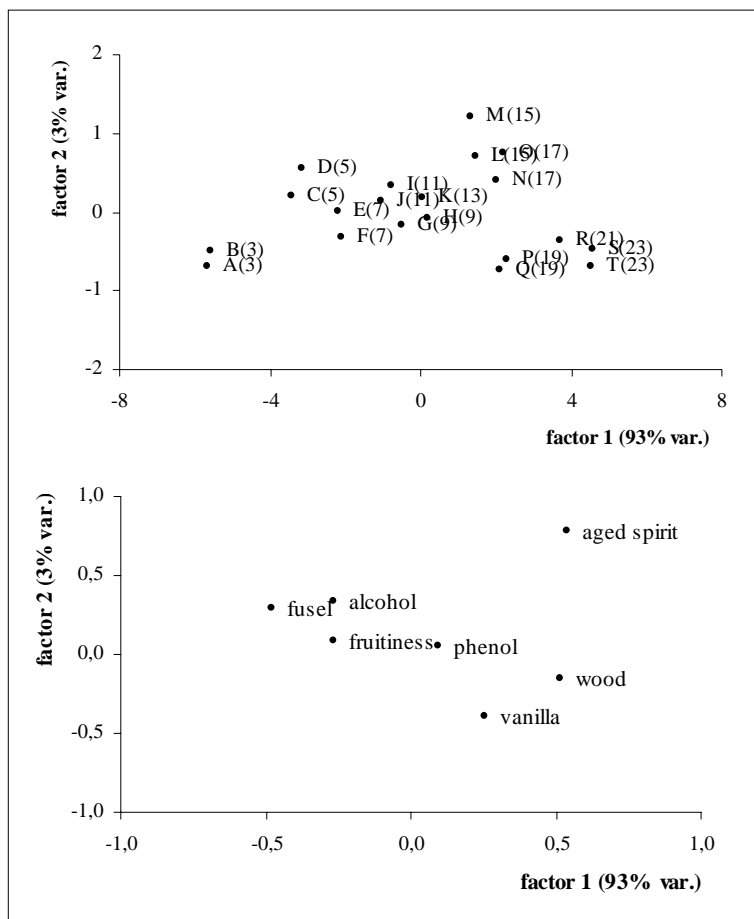


Figure 2. PCA of sensory data. (a) Scores plot and (b) loadings plot.

In the visualization of the HS-MS data, the histograms of the x variables showed that the frequency distributions were much skewed. Before mean-centering, we applied a logarithmic transformation to the data in order to reduce the skewness (20). Figure 3 shows the histograms of variable m/z 174 before and after applying the mathematical treatment. It can be observed that the skewness of the frequency distribution of this variable was reduced after applying the logarithmic transformation.

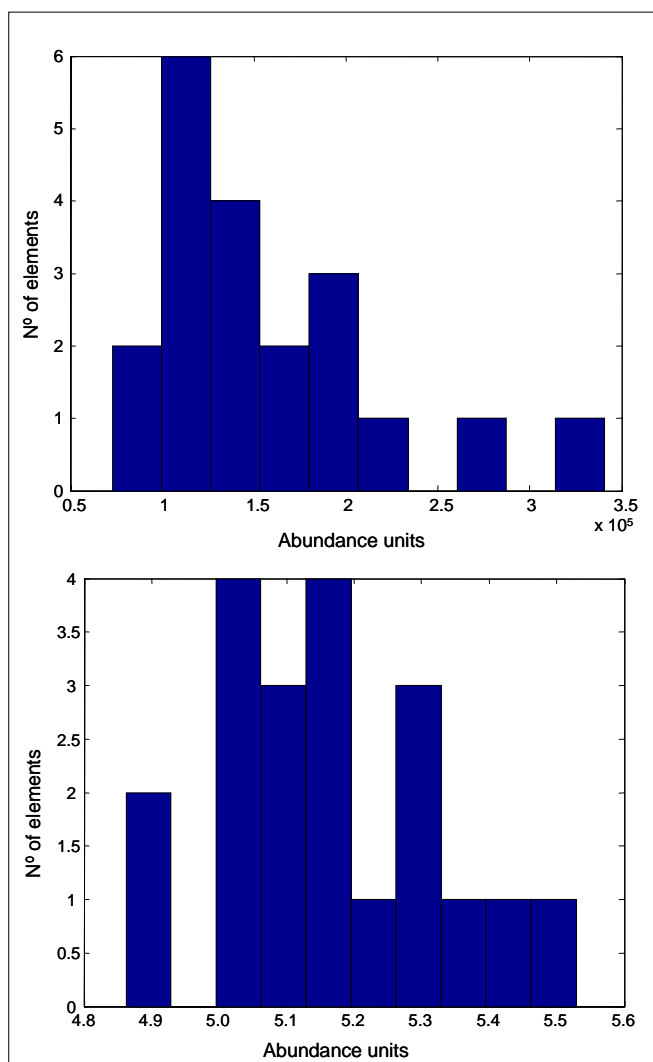


Figure 3. Histogram of variable m/z 174. (a) Before and (b) after logarithmic transformation.

In the preliminary PLS models of all the attributes, the spirit sample named “O” was detected as outlier and was, therefore, not considered any longer. However, the spirit sample “K” was detected as outlier only in the aged spirit model and in the vanilla model. In the rest it behaved as a normal sample. In the final PLS model of the vanilla attribute two additional samples (spirits “M” and “Q”) were removed. Finally,

the variables (m/z ratios) having coefficients in the PLS models lower than a threshold, that ranged between 10-20% of the maximum coefficient, were also removed. This threshold was different for each attribute and we chose, for each case, the threshold that provided better PLS prediction results. It seems that the variables that model the different attributes are not the same or, perhaps, they have not the same importance.

Table 2 shows the parameters of the optimal PLS model built for each odor attribute. The optimal number of factors of each model was found by cross-validation, using the leave-one-out procedure (21). It can be observed that the correlation coefficient between actual and predicted values was higher than 0.9 for all the models. The accuracy, expressed in terms of root mean squared error of cross-validation (RMSECV) changed according to the attribute but, in general, was quite fair. In relative terms, the lowest accuracy was around 10%, which is more than an acceptable value for this type of application. This parameter was determined for each attribute as the quotient between the RMSECV and the difference between the maximum and minimum intensity values evaluated by the panelists.

Attribute	Factors	Slope	Intercept	r	RMSECV
Fruitiness	3	0.77	0.90	0.90	0.33 (11.4%)
Aged spirit	3	0.80	1.13	0.93	0.55 (9.8%)
Vanilla	3	0.81	0.30	0.96	0.28 (8.2%)
Alcohol	4	0.89	0.54	0.97	0.22 (4.9%)
Phenol	4	0.73	0.62	0.94	0.14 (5%)
Wood	3	0.84	1.00	0.93	0.54 (9.8%)
Fusel	4	0.82	0.68	0.95	0.47 (9.8%)

Table 2. Parameters of the optimal PLS models. The relative accuracy is given between brackets.

It can also be observed that RMSECV were, in average terms, one third or less of the standard deviation of the values in Table 1, which means that PLS prediction results are good for this specific application.

Figure 4 shows the intensities predicted by the PLS models *vs* the intensities evaluated by the panelists for all the attributes. It can be observed that there is a good

fit between the intensity values obtained with the HS-MS e-nose method and those obtained with sensory analysis method. We statistically compared both methods by building a joint confidence interval of the slope and the intercept of the intensities found with HS-MS method *vs* the intensities evaluated by sensory panel (22). The methods were statistically comparable at a 95% confidence level.

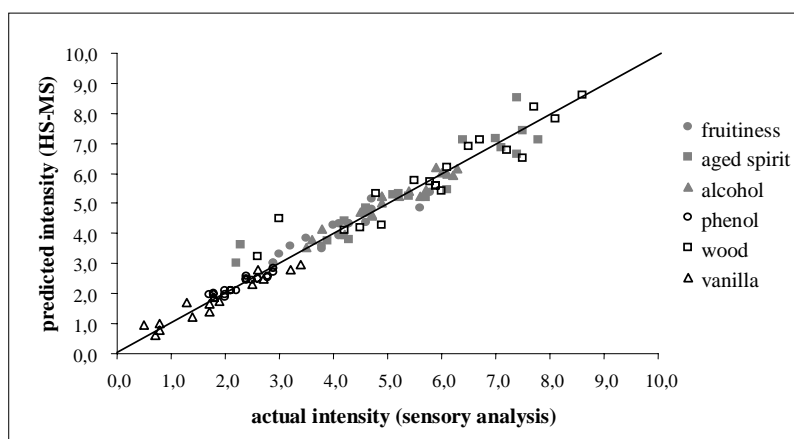


Figure 4. Intensities predicted by the PLS model *vs* intensities evaluated by the panelists.

We calculated the uncertainties of the intensities evaluated with both methods. The uncertainties of the intensities evaluated by sensory analysis were estimated as the standard deviation of the values given by the seven panelists. The uncertainties of the intensities predicted by the PLS models were determined using the expression proposed by Faber and Bro (23). Figure 5 shows the average of the uncertainties of both methods for each attribute. It can be observed that they are slightly better for the HS-MS e-nose method, excepting for the aged spirit attribute. But, in general, it can be concluded that the uncertainties of the odor intensities evaluated with both methods are of the same order. If we compare the uncertainties of the measurement of the panelists with the standard deviation of the intensities of all the samples (table 1) for each attribute, it can be observed that, excepting phenol, the uncertainties of the measurements are smaller than the variability between samples. However, in the case of phenol attribute, both values are very similar and, moreover, the intensity

range evaluated is very short (between 1.8 and 2.9 in a 0-10 intensity scale). This fact shows that the panelists can not differentiate the samples according to this attribute because the intensity differences among samples are due to the uncertainties of the measurements. For the rest of attributes results are satisfactory.

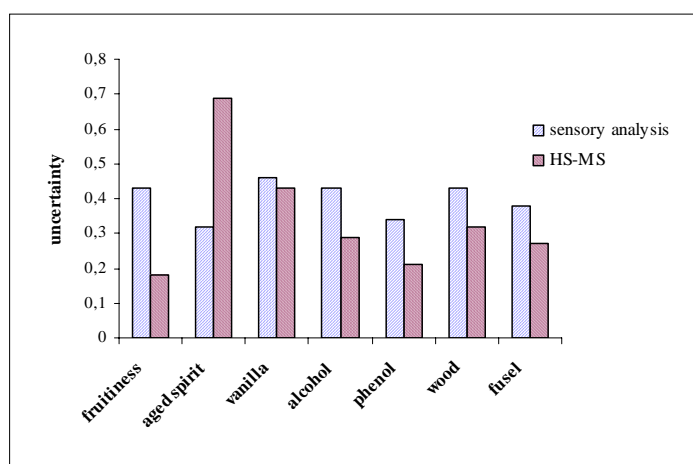


Figure 5. Uncertainties of the intensities evaluated by the panelists and uncertainties of the intensities predicted by the PLS models.

CONCLUSIONS

We have shown that the HS-MS e-nose can be used to quantify odor intensities of several attributes evaluated in sugar cane spirits in a fast (5 min/sample) and simple way and, moreover, with a precision very similar to the precision obtained by a panel of trained judges. These results are very promising because they show the potential of the HS-MS e-nose for modeling human sensory panels in the sensory analysis of sugar cane spirits. Although sensory analysis is required for developing the PLS models, once the PLS models have been developed, the objective evaluation of unknown samples can be accomplished using the HS-MS e-nose and without the need for time-consuming sensory evaluation. To the best of our knowledge, this is the first application where it has been shown that an instrument can emulate a human sensory panel in the sensory evaluation of real samples.

REFERENCES

- (1) Gardner, J.W.; Bartlett, P.N., *Sens. Actuators B* **1994**, 18-19, 211-220-
- (2) Strike, D.J.; Meijerink, M.G.H.; Koudelka-Hep, M., *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 364, 499-505.
- (3) García, C.; Fernández, M.E.; Pérez, J.L.; Moreno, B., *Química Analítica* **2001**, 20, 3-11.
- (4) Pèrés, C.; Begnaud, F.; Eveleigh, L.; Berdagué, J.L., *Trends Anal. Chem.* **2003**, 22, 858-866.
- (5) Dickinson, T.A.; White, J.; Kauer, J.S.; Walt, D.R., *Tibtech* **1998**, 16, 250-258.
- (6) Zubritsky, E., *Anal. Chem.* **2000**, 72, 421A-426A.
- (7) Gardner, J.W.; Persaud, K.C. *Electronic Noses and Olfaction*, IOP Publishing Ltd.: Bristol; 2001.
- (8) Martí, M.P.; Boqué, R.; Busto, O.; Guasch, J., *Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 57-66.
- (9) Eklöv, T.; Johansson, G.; Winqvist, F.; Lundström, I., *J. Sci. Food Agric.* **1998**, 76, 525-532.
- (10) Maul, F.; Sargent, S.A.; Sims, C.A.; Baldwin, E.A.; Balaban, M.O.; Huber, D.J., *J. Food Sci.* **2000**, 65, 1228-1237.
- (11) Gasperi, F.; Gallerani, G.; Boschetti, A.; Biasioli, F.; Monetti, A.; Boscaini, E.; Jordan, A.; Lindinger, W.; Iannotta, S., *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 81, 357-363.
- (12) Di Natale, C.; Macagnano, A.; Martinelli, E.; Proietti, E.; Paolesse, R.; Castellari, L.; Campani, S.; D'Amico, A., *Sens. Actuators B* **2001**, 77, 561-566.
- (13) Ampuero, S.; Zesiger, T.; Gustafsson, V.; Lundén, A.; Bosset, J.O., *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 214, 163-167.
- (14) Jelén, H.H.; Majcher, M.; Zawirska-Wotjasiak, R.; Wiewiórowska, M.; Wasowicz, E., *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 7079-7085.
- (15) Drake, M.A.; Gerard, P.D.; Kleinhenz, J.P.; Harper, W.J., *Lebens.-Wiss. U.-Technol.* **2003**, 36, 13-20.
- (16) Mildner-Szkudlarz, S.; Jelén, H.H.; Zawirska-Wojtasiak, R.; Wasowicz, E., *Food Chem.* **2003**, 83, 515-522.

- (17) Novák, I.; Zámboiri-Németh, E.; Horváth, H.; Seregél, Z.; Kaffka, K., *Acta Alimentaria* **2003**, 32, 141-150.
- (18) Hudon, G.; Guy, C.; Hermia, J., *J. Air & Waste Manage. Assoc.* **2000**, 50, 1750-1758.
- (19) Shen, N.; Moizuddin, S.; Wilson, L.; Duvick, S.; White, P.; Pollak, L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, 78, 937-940.
- (20) Martí, M.P.; Pino, J.; Boqué, R.; Busto, O.; Guasch, J., *Anal. Bioanal. Chem.*, *In press*
- (21) Osten, D.W., *J. Chemom.* **1988**, 2, 39-48.
- (22) Mandel, J.; Linning, F.J., *Anal. Chem.* **1957**, 29, 743-749.
- (23) Faber, N.M.; Bro, R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2002**, 61, 133-149.

IV.5 BIBLIOGRAFIA

- [1]. T.A. Dickinson, J. White, J.S. Kauer, D.R. Walt. *Current trends in "artificial-nose" technology*. *Tibtech*, 16 (1998) 250-258
- [2]. D.J. Strike, M.G.H. Meijerink, M. Koudelka-Hep. *Electronic noses - a mini-review*. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364 (1999) 499-505
- [3]. W.J. Hurst (ed). *Electronic noses and sensory array based systems. Design and applications*. Technomic Publishing Company, Lancaster (1999)
- [4]. J.W. Gardner, K.C. Persaud (eds). *Electronic noses and olfaction 2000*. IOP Publishing, Bristol (2000)
- [5]. C. García, M.E. Fernández, J.L. Pérez, B. Moreno. *Electronic olfactometry. A new tool in analytical chemistry*. *Química Analítica*, 20 (2001) 3-11
- [6]. J.E. Haugen. *Electronic nose in food analysis*. En: R.L. Rouseff, K.R. Cadwallader (eds). *Headspace analysis of foods and flavors*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2001) 43-58
- [7]. T. Aishima. *Discrimination of liquor aromas by pattern recognition analysis of responses from a gas sensor array*. *Anal. Chim. Acta*, 243 (1991) 293-300
- [8]. C. Di Natale, F.A.M. Davide, A. D'Amico, G. Sberveglieri, P. Nelli, G. Faglia, C. Perego. *Complex chemical pattern recognition with sensor array: the discrimination of vintage years of wine*. *Sens. Actuators B*, 24-25 (1995) 801-804
- [9]. C. Di Natale, F.A.M. Davide, A. D'Amico, P. Nelli, S. Groppelli, G. Sberveglieri. *An electronic nose for the recognition of the vineyard of a red wine*. *Sens. Actuators B*, 33 (1996) 83-88
- [10]. M.J. Atienza, M.D. Esteve, P. Aragón, M.D. Climent (eds). *La espectrometría de masas y el aroma del vino*. Ediciones y Promociones L.A.V., València (1999)
- [11]. J.W. Gardner, P.N. Bartlett. *A brief history of electronic noses*. *Sens. Actuators B*, 18-19 (1994) 211-220
- [12]. G.A. Bell. *Molecular mechanisms of olfactory perception: their potential for future technologies*. *Trends in Food Sci. Technol.*, 7 (1996) 425-431.
- [13]. B. Dittmann, S. Nitz, G. Horner. *A new chemical sensor on a mass spectrometric basis*. *Adv. Food Sci.*, 20 (1998) 115-121
- [14]. E. Schaller, S. Zenhäusern, T. Zesiger, J.O. Bosset, F. Escher. *Use of preconcentration techniques applied to a MS-based "Electronic Nose"*. *Analisis*, 28 (2000) 743-749
- [15]. C. Pérès, C. Denoyer, P. Tournayre, J.L. Berdagué. *Fast characterization of cheeses by dynamic headspace-mass spectrometry*. *Anal. Chem.*, 74 (2002) 1386-1392

- [16]. N. Boudaoud, L. Eveleigh. *A new approach to the characterization of volatile signatures of cork wine stoppers*. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 1530-1533
- [17]. R.T. Marsili. *SPME-MS-MVA as an electronic nose for the study of off-flavors in milk*. J. Agric. Food Chem., 47 (1999) 648-654
- [18]. R.T. Marsili. *Shelf-life prediction of processed milk by solid-phase microextraction, mass spectrometry, and multivariate analysis*. J. Agric. Food Chem., 48 (2000) 3470-3475
- [19]. C. Pérès, C. Viallon, J.L. Berdagué. *Solid-phase microextraction-mass spectrometry: a new approach to the rapid characterization on cheeses*. Anal. Chem., 73 (2001) 1030-1036
- [20]. V.R. Kinton, E.A. Pfannkoch. *Comparison of headspace sampling and stir bar sorptive extraction in the detection of whiskey adulteration with a mass-spectrometry based chemical sensor* [en línia]. Gerstel Application Note 9/2002, (2002). <http://www.gerstel.com> [Consulta 12/12/2002]
- [21]. E. Zubritsky. *E-noses keep an eye on the future*. Anal. Chem., 72 (2000) 421A-426A
- [22]. W.J. Harper. *The strengths and weaknesses of the electronic nose*. En: R.L. Rouseff, K.R. Cadwallader (eds). *Headspace analysis of foods and flavors*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2001) 59-72
- [23]. A.K. Deisingh, D.C. Stone, M. Thompson. *Application of electronic noses and tongues in food analysis*. Intl. J. Food Sci. Technol., 39 (2004) 587-604
- [24]. B. Dittmann, S. Nitz. *Strategies for the development of reliable QA/QC methods when working with mass spectrometry-based chemosensory systems*. Sens. Actuators B, 69 (2000) 253-257
- [25]. F. Begnaud, J.L. Berdagué. *Influence of ionisation energy on the quality of static headspace-mass spectrometry spectral fingerprints*. Sens. Actuators B, 81 (2002) 351-358
- [26]. R. Marsili. *Combining mass spectrometry and multivariate analysis to make a reliable and versatile electronic nose*. En: R. Marsili (ed). *Flavor, Fragrance and Odor Analysis*. Marcel Dekker Inc., New York (2002) 349-374
- [27]. M.P. Martí, R. Boqué, M. Riu, O. Busto, J. Guasch. *Fast screening method for determining 2,4,6-trichloroanisole in wines using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) system and multivariate calibration*. Anal. Bioanal. Chem., 376 (2003) 497-501
- [28]. C. Pérès, F. Begnaud, L. Eveleigh, J.L. Berdagué. *Standard Gas Addition: a calibration method for handling temporal drifts of mass spectrometry-based sensors*. Anal. Chem., 74 (2002) 2279-2283
- [29]. J.L. Pérez, M. del Nogal, C. García, M.E. Fernández, B. Moreno. *A method for the detection of hydrocarbon pollution in soils by headspace mass spectrometry and pattern recognition techniques*. Anal. Chem., 75 (2003) 2034-2041
- [30]. K. R. Beebe, R. J. Pell, M. B. Seasholtz (eds). *Chemometrics: a practical guide*. John Wiley & Sons, New York (1998)

- [31]. G. Ramis, C. García (eds). *Quimiometria. Síntesis*, Madrid (2001)
- [32]. T. Naes, T. Isaksson, T. Fearn, T. Davies (eds). *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR publications, Chichester (2002)
- [33]. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke (eds). *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*. Elsevier, Amsterdam (1997)
- [34]. B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke (eds). *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part B*. Elsevier, Amsterdam (1998)
- [35]. F. Brakstad. *The feasibility of latent variables applied to GC-MS data*. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 29 (1995) 157-176
- [36]. M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch. *El nas electrònic: una eina d'anàlisi per a l'aroma del vi*. *Diònyssos*, 2 (2002) 56-61
- [37]. E. Privat, S. Roussel, P. Grenier, V. Bellon-Maurel. *Techniques de désalcoolisation en vue de la discrimination de boissons alcoolisées par capteurs d'arômes*. *Sci. Aliments*, 18 (1998) 459-470
- [38]. I. Heberle, A. Liebming, U. Weimar, W. Göpel. *Optimised sensor arrays with chromatographic pre-separation: characterisation of alcoholic beverages*. *Sens. Actuators B*, 68 (2000) 53-57
- [39]. C. Pinheiro, C.M. Rodrigues, T. Schäfer, J.G. Crespo. *Monitoring the aroma production during wine-must fermentation with an electronic nose*. *Biotechnol. Bioeng.*, 77 (2002) 632-640
- [40]. A. Fort, N. Machetti, S. Rocchi, B. Serrano, L. Tondi, N. Ulivieri, V. Vignoli, G. Sberveglieri. *Tin oxide gas sensing: comparison among different measurement techniques for gas mixture classification*. *IEEE Trans. Instrum. Meas.*, 52 (2003) 921-926
- [41]. C. Di Nucci, A. Fort, S. Rocchi, L. Tondi, V. Vignoli, F. Di Francesco, M.B. Serrano Santos. *A measurement system for odor classification based on the dynamic response of QCM sensors*. *IEEE Trans. Instrum. Meas.*, 52 (2003) 1079-1086
- [42]. A. Guadarrama, J.A. Fernández, M. Isimniguez, J. Souto, J.A. de Saja. *Array of conducting polymer sensors for the characterisation of wines*. *Anal. Chim. Acta*, 411 (2000) 193-200
- [43]. A. Guadarrama, J.A. Fernández, M. Isimniguez, J. Souto, J.A. de Saja. *Discrimination of wine aroma using an array of conducting polymer sensors in conjunction with solid-phase micro-extraction (SPME) technique*. *Sens. Actuators B*, 3894 (2001) 1-8
- [44]. T. Nakamoto, A. Fukuda, T. Moriizumi, Y. Asakura. *Improvement of identification capability in an odor-sensing system*. *Sens. Actuators B*, 3 (1991) 221-226
- [45]. H.V. Shurmer, J.W. Gardner. *Odour discrimination with an electronic nose*. *Sens. Actuators B*, 8 (1992) 1-11

- [46]. T.C. Pearce, J.W. Gardner. *Predicting organoleptic scores of sub-ppm flavour notes. Part 1. Theoretical and experimental details.* Analyst, 123 (1998) 2047-2055
- [47]. C. Nicolas-Saint Denis, P. Visani, G. Trystam, J. Hossenlopp, R. Houdard. *Faisabilité de la détection d'odeurs défauts dans des liqueurs de cacao à l'aide de capteurs de gaz.* Sci. Aliments, 21 (2001) 537-554
- [48]. M. Penza, G. Cassano. *Recognition of adulteration of Italian wines by thin-film multisensor array and artificial neural network.* Anal. Chim. Acta, 509 (2004) 159-177
- [49]. M. Penza, G. Cassano. *Chemometric characterization of Italian wines by thin-film multisensors array and artificial neural networks.* Food Chem., 86 (2004) 283-296
- [50]. C. Di Natale, R. Paolesse, M. Burgio, E. Martinelli, G. Pennazza, A. D'Amico. *Application of metalloporphyrins-based gas and liquid sensor arrays to the analysis of red wine.* Anal. Chim. Acta, 513 (2004) 49-56
- [51]. J. Slater, J. Paynter, E. Watt. *Multi-layer conducting polymer gas sensor arrays for olfactory sensing.* Analyst, 118 (1993) 379-384
- [52]. B. Kolahgar, A.C. Heiden. *Discrimination of different beer sorts and monitoring of the effect of aging by determination of flavor constituents using SPME and a chemical sensor [en línia].* Gerstel Application Note 11/2002 (2002). <http://www.gerstel.com> [Consulta 12/12/2002]
- [53]. V.R. Kinton, E.A. Pfannkoch, M.A. Mabud, S.M. Dugar, A.C. Heiden, C. Gil. *Wine discrimination using a mass spectral based chemical sensor [en línia].* Gerstel Application Note 2/2003 (2003). <http://www.gerstel.com> [Consulta 24/04/2003]
- [54]. M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch. *Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing.* J. Chromatogr. A, 1057 (2004) 211-217
- [55]. M.P. Martí, J. Pino, R. Boqué, O. Busto, J. Guasch. *Determination of ageing time of spirits in oak barrels using a headspace-mass spectrometry system (HS-MS) and multivariate calibration.* Anal. Bioanal. Chem., en premsa
- [56]. M.P. Martí, J. Pino, R. Boqué, O. Busto, J. Guasch. *Modeling human sensory panels with an electronic nose. Application to sensory analysis of sugar cane spirits.* J. Agric. Food Chem., pendent de publicació
- [57]. C. Pérès, C. Viallon, J.L. Berdagué. *Solid-phase microextraction-mass spectrometry: a new approach to the rapid characterization on cheeses.* Anal. Chem., 73 (2001) 1030-1036
- [58]. C. Pérès, C. Denoyer, P. Tournayre, J.L. Berdagué. *Fast characterization of cheeses by dynamic headspace-mass spectrometry.* Anal. Chem., 74 (2002) 1386-1392
- [59]. C. Pérès, F. Begnaud, J.L. Berdagué. *Fast characterization of Camembert cheeses by static headspace-mass spectrometry.* Sens. Actuators B, 87 (2002) 491-497

- [60]. L. Pinllonel, S. Ampuero, R. Tabacchi, J.O. Bosset. *Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese: volatile compounds by GC/MS-FID and electronic nose*. Eur. Food Res. Technol., 216 (2003) 179-183
- [61]. I. Marcos, J.L. Pérez, M.E. Fernández, C. García, B. Moreno. *Detection of adulterants in olive oil by headspace-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 945 (2002) 221-230
- [62]. I. Marcos, J.L. Pérez, M.E. Fernández, C. García, B. Moreno, L.R. Henriques, M.F. Peres, M.P. Simoes, P.S. Lopes. *Application of headspace-mass spectrometry for differentiating sources of olive oil*. Anal. Bioanal. Chem., 374 (2002) 1205-1211
- [63]. K.L. Goodner, R.L. Rouseff. *Using an ion-trap MS sensor to differentiate and identify individual components in grapefruit juice headspace volatiles*. J. Agric. Food Chem., 49 (2001) 250-253
- [64]. F. Fenaille, P. Visani, R. Fumeaux, C. Milo, P.A. Guy. *Comparison of Mass spectrometry-based electronic nose and solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry technique to assess infant formula oxidation*. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 2790-2796
- [65]. Supriyadi, K. Shimizu, M. Suzuki, K. Yoshida, T. Muto, A. Fujita, N. Tomita, N. Watanabe. *Maturity discrimination of snake fruit (Salacca edulis Reinw.) cv. Pondoh based on volatiles analysis using an electronic nose device equipped with a sensor array and fingerprint mass spectrometry*. Flavour Fragr. J., 19 (2004) 44-50
- [66]. A. Z. Berna, J. Lammertyn, S. Saevels, C. Di Natale, B.M. Nicolaï. *Electronic nose systems to study shelf life and cultivar effect on tomato aroma profile*. Sens. Actuators B, 97 (2004) 324-333
- [67]. S. Ampuero, S. Bogdanov, J.O. Bosset. *Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose using different sampling modes SHS, SPME and INDEX*. Eur. Food Res. Technol., 218 (2004) 198-207
- [68]. M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. *Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma*. J. Chromatogr. A, 881 (2000) 569-581
- [69]. Consejo Regulador de la Denominación de Origen Ribera del Duero. *Vinos* [en línia]. Consejo Regulador de la Denominación de Origen Ribera del Duero. <http://www.riberadelduero.es> [Consulta 26/01/2005]
- [70]. Consejo Regulador del Brandy de Jerez. *Brandy de Jerez* [en línia]. Consejo Regulador del Brandy de Jerez (2004). <http://www.brandydejerez.es> [Consulta 11/02/2005]
- [71]. J. Blouin, G. Guimberteau (eds). *Maduración y madurez de la uva*. Mundi-Prensa, Madrid (2002)
- [72]. S. Saevels, J. Lammertyn, A.Z. Berna, E.A. Veraverbeke, C. Di Natale, B.M. Nicolaï. *An electronic nose and a mass spectrometry-based electronic nose for assessing apple quality during shelf life*. Postharvest Biol. Technol., 31 (2004) 9-19
- [73]. J.A. Cassey. *T'ain't necessary so*. Aust. NZ Wine Ind. J., 14 (1999) 49-56

- [74]. C. Silva, J. Figueredo, M.V. San Romao. *Cork taint in wine: scientific knowledge and public perception – a critical review*. Crit. Rev. Microb., 26 (2000) 147-162
- [75]. I. Hermosín, A.I. Peña. *Los tapones para botellas de vino: eficacia de cierre, control de calidad sensorial y microbiológica, y relación con el defecto de “gusto a corcho” del vino*. Tecnología del Vino, marzo/abril (2002) 64-78
- [76]. H.R. Buser, C. Zanier, H. Tanner. *Identification of 2,4,6-trichloroanisole as potent compound causing cork taint in wine*. J. Agric. Food Chem., 30 (1982) 359-362
- [77]. T.J. Evans, C.E. Butzke, S.E. Ebeler. *Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 786 (1997) 293-298
- [78]. J. Prescott, L. Norris, M. Kunst, S. Kim. *Estimating a “consumer rejection threshold” for cork taint in white wine*. Food Qual. Pref., 16 (2005) 345-349
- [79]. C. Fischer, U. Fischer. *Analysis of cork taint in wine and cork material at olfactory subthreshold levels by solid phase microextraction*. J. Agric. Food Chem., 45 (1997) 1995-1997
- [80]. G. Michel. *Dosage des chlorosanisoles dans les vins par la microextraction en phase solide (SPME) et chromatographie gazeuse avec détection en capture d'électrons*. Rev. Oenol., 82 (1996) 24-26
- [81]. M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. *Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection*. J. Chromatogr. A, 977 (2002) 1-8
- [82]. L.H. Aung, P.V. Smilanick, P.V. Vail, L.H. Preston, E. Gómez. *Investigations into the origin of chloroanisoles causing musty off-flavour of raisins*. J. Agric. Food Chem., 44 (1996) 3294-3296
- [83]. A.P. Pollnitz, K.H. Pardon, D. Liacopoulos, G.K. Skouromounis, M.A. Sefton. *The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and cork*. Aust. J. Grape Wine Res., 2 (1996) 184-190
- [84]. A. Hoffmann, W.R. Sponholz, F. David, P. Sandra. *Corkiness in wine-trace analysis of 2,4,6-trichloroanisole by stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC/MS* [en línia]. Gerstel Application Note 3/2000, (2000). <http://www.gerstel.com> [Consulta 12/12/2002].
- [85]. N.M. Faber, R. Bro. *Standard error of prediction for multiway PLS 1. Background and a simulation study*. Chemom. Intell. Lab. Syst., 61 (2002) 133-149
- [86]. M.J. Rodríguez-Cuesta, R. Bro, R. Boqué, K.M. Faber. *Standard error of prediction at low content levels and limit of detection. Estimation for multivariate and multilinear regression*. Analytica Chimica Acta, pendent de publicació
- [87]. M.P. Martí, R. Boqué, O. Busto, J. Guasch. *Electronic noses in the quality control of alcoholic beverages*. Trends Anal. Chem., 24 (2005) 57-66

- [88]. G. Hudon, C. Guy, J. Hermia. *Measurement of odor intensity by an electronic nose*. J. Air & Waste Manage. Assoc., 50 (2000) 1750-1758
- [89]. N. Shen, S. Moizuddin, L. Wilson, S. Duvick, P. White, L. Pollak. *Relationship of electronic nose analyses and sensory evaluation of vegetable oils during storage*. J. Am. Oil Chem. Soc., 78 (2001) 937-940

CONCLUSIONS

Tal i com s'ha comentat en els objectius de la present tesi doctoral i s'ha anat constatant al llarg d'aquesta memòria, l'anàlisi de l'aroma del vi és una tasca complexa a causa de la gran quantitat de compostos volàtils amb diferents propietats químiques i organolèptiques que la conformen, i els nivells tan baixos de concentració als que es troben molts d'ells. Amb tota aquesta problemàtica, l'etapa de pretractament de la mostra, és a dir, l'obtenció d'un extracte representatiu de l'aroma del vi, és encara avui en dia un repte important per als investigadors de l'aroma. És en aquesta línia que s'ha volgut avançar amb una part del treball realitzat en aquesta tesi, en la que s'ha estudiat l'aplicació de l'SPME en l'obtenció d'extractes aromàtics del vi adequats per a la seva caracterització mitjançant la GCO. Per altra banda, els treballs realitzats amb el nas electrònic pretenen ser també una petita contribució a aquest camp de la recerca en l'anàlisi de l'aroma del vi, en el que aquesta tècnica havia estat molt poc utilitzada a causa, principalment, de les dificultats tecnològiques que existeixen en els instruments basats en sensors de gasos.

A continuació es presenten les conclusions que es deriven de tot el treball experimental que s'ha dut a terme en aquesta tesi doctoral.

MICROEXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA

1. En la determinació dels èsters de l'aroma del vi mitjançant HS-SPME-GC-FID, les fibres d'SPME recobertes amb una fase estacionària de polidimetilsiloxà (PDMS) són les que presenten una millor eficiència en l'extracció d'aquests compostos així com també una millor repetitivitat (desviacions estàndard relatives entre el 0.3 i el 6.9%). Els valors de recuperació del mètode desenvolupat oscil·len entre un 80 i un 110% i els límits de detecció aconseguits es troben entre 0.001 i 20.3 mg/L en funció del compost.

2. En l'adaptació del mètode HS-SPME-GC-FID a l'anàlisi dels èsters de l'aroma del rom, s'ha constatat que l'elevat contingut d'etanol d'aquestes mostres (al voltant del 40%) afecta de manera important a l'eficiència d'extracció dels èsters. Per tant, cal diluir les mostres fins a un 12% en etanol abans de la seva anàlisi. Els valors de recuperació que s'obtenen amb el mètode desenvolupat es troben entre el 91 i el 105% i els límits de detecció oscil·len entre 0.007 i 0.027 mg/L depenent del compost.
3. El mètode desenvolupat per a la quantificació dels compostos olorosos mitjançant HS-SPME-GC-MS permet la determinació simultània de tots els compostos que contribueixen a l'aroma del vi. L'elevada capacitat d'extracció dels compostos olorosos de les fibres de DVB-CAR-PDMS combinada amb la detecció de l'MS en mode SIM, permeten obtenir un mètode amb elevades sensibilitat i selectivitat. Amb l'aplicació de la tècnica de les addicions estàndard és possible la determinació dels compostos d'interès amb una precisió intermitja del 4.7%.

CROMATOGRAFIA DE GASOS-OLFACTIMETRIA

4. En els treballs preliminars realitzats en els que s'ha estudiat l'aroma de vins monovarietals, s'ha constatat que la GCO és una tècnica indispensable en la caracterització de l'aroma. No obstant això, la utilització de la tècnica de l'extracció líquid-líquid per al pretractament de la mostra requereix de molt temps i de molts passos per a l'obtenció de l'extracte aromàtic, amb els inconvenients (pèrdua d'analits, contaminacions, etc.) que això suposa.
5. Les fibres d'SPME recobertes amb una fase estacionària de divinilbenzè-carboxen-polidimetilsiloxà (DVB-CAR-PDMS) permeten obtenir, de manera ràpida i senzilla, extractes aromàtics representatius de l'aroma del vi, amb un

rang ampli de compostos olorosos, aptes per a la seva caracterització mitjançant la GCO.

6. Amb la nova modalitat desenvolupada de la tècnica de dilució AEDA que utilitza l'SPME per a l'obtenció dels extractes aromàtics, s'obté una llista jerarquitzada dels compostos volàtils del vi segons la seva potència aromàtica.
7. El mètode de pretractament de la mostra desenvolupat per a l'anàlisi olfactimètrica es pot utilitzar també amb finalitats quantitatives, tot i la diversitat química dels compostos olorosos i els diferents nivells de concentració als que es troben.
8. En la caracterització del vi de Garnatxa s'han detectat 63 regions aromàticament actives, 38 de les quals presenten factors de dilució importants (entre 64 i 4096). En el càlcul dels valors d'aroma d'aquests 38 compostos, 13 presenten un valor superior a la unitat, els quals són, en ordre de major a menor importància, la β -damascenona, el 3-mercapto-1-hexanol, l'àcid isovalèric, l'isovaleriat d'etil, l'hexanoat d'etil, l'alcohol isoamílic, l'isobutirat d'etil, l'etilguaiacol, el butirat d'etil, el sotolon, el furaneol, el 2-metilbutirat d'etil i l'àcid isobutíric. Segons la teoria dels valors d'aroma, aquests són els compostos que realment contribueixen a l'aroma del vi de Garnatxa estudiat.

NAS ELECTRÒNIC

9. El mètode desenvolupat amb el nas electrònic HS-MS permet l'anàlisi de vins d'una manera ràpida (10 minuts/mostra) i senzilla. A causa dels problemes d'inestabilitat del senyal de l'MS amb el temps, però, cal analitzar totes les mostres d'un mateix estudi a la vegada (en dies consecutius).
10. En l'estudi de l'aplicació del nas electrònic HS-MS al control de qualitat dels vins, el mètode desenvolupat:

- permet diferenciar els vins segons el seu origen, fins i tot quan són vins de característiques similars com és el cas dels vins del Priorat i la Terra Alta, dues zones geogràficament molt properes.
 - permet diferenciar vins segons la varietat del raïm a partir de la qual s'han elaborat, tot i que la capacitat de diferenciació depèn de les anyades de les mostres.
 - permet diferenciar vins de la D.O. Ribera del Duero i brandies de Jerez segons el tipus d'envelliment a què se'ls ha sotmès, el qual ve determinat principalment pel temps.
11. El nas electrònic HS-MS permet dur a terme un seguiment de la vinificació a partir de l'evolució de l'aroma durant aquest procés. En l'etapa de la fermentació alcohòlica aquesta evolució ve determinada, principalment, per la formació d'etanol. Tanmateix, si no es tenen en compte els ions d'aquest compost volàtil majoritari, es poden detectar diferències en les mostres degudes a la resta de compostos volàtils. El nas electrònic permet diferenciar les mostres segons altres paràmetres de la vinificació com, per exemple, el tipus de tina en què s'ha dut a terme. Aquest fet el demostra la diferenciació que s'ha obtingut dels vins en rama i dels vins obtinguts després de la fermentació malolàctica, segons el tipus de tina on aquests han dut a terme la fermentació alcohòlica o la fermentació malolàctica respectivament.
 12. En l'anàlisi de mostos per al seguiment del procés de maduració dels raïms, tot i que s'observa una diferenciació de les mostres segons el grau de maduresa, el mètode desenvolupat és poc sensible a causa de la baixa concentració en la que es troben els compostos volàtils del raïm.
 13. Amb el nas electrònic HS-MS i utilitzant tècniques de calibratge multivariant, es poden dur a terme aplicacions quantitatives en les que, d'una manera ràpida i senzilla, es pot determinar la concentració de compostos que es troben a

nivells traça. És important analitzar varies rèpliques de cada mostra per tal de disminuir l'error de predicció del mètode.

14. En el desenvolupament del mètode per a la determinació de TCA amb el nas electrònic HS-MS, la utilització d'una columna cromatogràfica per a la transferència dels analits de l'HS a l'MS permet una mínima separació del TCA dels compostos majoritaris que són més volàtils, amb la qual cosa s'aconsegueix un augment de la sensibilitat del mètode.
15. Tot i que l'etanol no afecta al sistema de detecció, aquest compost volàtil majoritari té un efecte en el procés d'extracció del TCA a causa de la seva elevada concentració a l'espai de cap de la mostra.
16. El mètode desenvolupat amb el nas electrònic HS-MS per a la determinació de TCA en vins blancs presenta un error mitjà de predicció de 0.74 µg/L (25% en termes relatius). La repetitivitat de les mesures és de 0.31 µg/L (9.4% en termes relatius). Malgrat els paràmetres de qualitat aconseguits, els quals són adequats als baixos nivells de concentració en els que s'ha treballat, el límit de detecció del mètode (0.2 µg/L) és superior al llindar de percepció sensorial del TCA en vins blancs (0.01 µg/L).
17. La utilització de l'SPME com a sistema de mostreig del nas electrònic permet obtenir mètodes amb límits de detecció més baixos, i mantenint les característiques de senzillesa i rapidesa que se li exigeix a un nas electrònic. En el mètode desenvolupat amb el nas electrònic HS-SPME-MS per a la determinació de TCA en vins negres, s'ha obtingut un límit de detecció de 30 ng/L, el qual és inferior al llindar de percepció sensorial d'aquest compost en vins negres (50 ng/L). L'error mitjà de predicció del mètode és de 13 ng/L (22.3% en termes relatius) i la repetitivitat del 16%.
18. El nas electrònic HS-MS permet determinar el temps d'envelliment d'aiguardents de canya de sucre en bótes de roure. El mètode desenvolupat

permet predir el temps d'envelliment amb una exactitud aproximadament d'un mes.

19. El nas electrònic HS-MS permet emular el treball dut a terme per un panel de tastadors en l'anàlisi sensorial d'aiguards de canya de sucre. Amb el mètode desenvolupat es poden predir les intensitats de diferents descriptors aromàtics (afruitat, aiguardent envellit, vainilla, alcohol, fenol, fusta i fusel) amb una exactitud adequada (errors de predicció entre el 4.9 i el 11.4% depenent del descriptor) i una precisió del mateix ordre que la del panel de tastadors entrenats.

PERSPECTIVES DE FUTUR

Són escasses les vegades que un treball de recerca es pot considerar finalitzat ja que sempre van sorgint noves qüestions i nous camps per explorar. Els resultats obtinguts en el treball realitzat en aquesta tesi condueixen també a nous plantejaments que podrien constituir futurs treballs de recerca en aquest camp:

- La inestabilitat del senyal amb el temps que presenten els nassos electrònics basats en l'espectrometria de masses, és un problema que cal solucionar per tal de poder construir models amb mostres analitzades en dies diferents. Aquest fet permetrà obtenir models més robustos, així com també utilitzar-los durant un període de temps raonable i no haver de construir el model cada vegada que es volen analitzar noves mostres. La solució a aquest problema passa, probablement, per l'aplicació de tècniques de transferència de calibratge utilitzant mostres de referència. L'obtenció d'aquestes mostres de referència serà un repte important ja que cal que siguin estables amb el temps, i això, en el cas del vi i els aliments en general, no és un problema de fàcil solució.

- El control de la maduració aromàtica dels raïms mitjançant el nas electrònic és un estudi de gran interès per als enòlegs ja que disposarien d'una tècnica objectiva que els permetria determinar la data òptima de la verema pel que fa a la maduració aromàtica. En aquesta línia cal desenvolupar un nou mètode per a l'anàlisi de l'aroma dels raïms utilitzant una tècnica de pretractament en la que es dugui a terme una concentració important dels compostos volàtils. Una bona opció podria ser utilitzar l'SPME ja que com s'ha demostrat en aquesta tesi, és una tècnica adequada per a la seva utilització com a sistema de mostreig del nas electrònic.
- El defecte aromàtic del "gust de suro" és un problema que preocupa tant als enòlegs, ja que els vins que presenten aquest defecte no es poden comercialitzar, com als fabricants dels taps de suro, perquè, sovint, s'atribueix l'origen de la contaminació al tap, tot i que això no sigui sempre cert. En aquesta tesi s'han desenvolupat metodologies amb el nas electrònic per a la determinació del TCA en els vins. Tanmateix, un altre treball interessant seria el desenvolupament d'un mètode amb el nas electrònic que permetés, de manera ràpida i senzilla, dur a terme el control de qualitat dels suros pel que fa a la determinació d'aquest compost en els mateixos.
- A part del TCA, però, hi ha altres compostos que també s'associen amb el "gust de suro". L'aplicació de la GCO a l'estudi dels compostos volàtils del suro i de la seva migració al vi, permetria indagar sobre quins són els compostos del suro que passen al vi i li confereixen les olors de humitat, florit i cartró mullat, característiques dels vins que presenten aquest defecte.



Si sabéssim assaborir el vi, el pa, una amistat, sabríem assaborir de la mateixa manera cada instant de la nostra vida amb el respecte i l'escolta silenciosa del feliç moment que transcorre.

Jean Trémolières