

Treball final de grau

Estudi: Grau en Innovació i Seguretat Alimentària

Títol: Desenvolupament d'un mètode de cromatografia de gasos combinat amb espectrometria de masses (GC-MS/MS) per a la determinació de compostos aromàtics presents en els taps de suro.

Document: Memòria treball experimental de recerca

Alumne: Anna Pareras Niell

Tutor: Jesús Manuel Francés Ortega

Departament: EQATA

Àrea: PV

Director: Patrícia Jové Martín

Institució: Institut Català del Suro

Àrea: Responsable de R&D

Convocatòria (mes/any): Setembre, defensa desembre 2020

ÍNDIX

RESUM.....	4
Paraules clau	6
Agraïments.....	7
1. Introducció	8
1.1. Objectius	10
2. MATERIALS I MÈTODES	11
2.1. Patrons dels compostos volàtils.....	11
2.2. Preparació de les solucions	12
2.3. Cromatografia de gasos amb espectrometria de masses	12
2.3.1. Cromatògraf de gasos	12
2.3.2. Condicions cromatògraf	13
2.4. Optimització mètode SPME	14
2.5. Validació del mètode.....	16
2.5.1. Linealitat.....	16
2.5.2. Límit de detecció i límit de quantificació	16
2.5.3. Precisió	17
2.6. Preparació de les mostres	18
2.7. Tractament estadístic de les dades experimentals.....	18
2.7.1. Data analysis.....	18
2.7.2. Normalització de les àrees	18
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	19
3.1. Condicions SPME.....	19
3.1.1. Selecció de la fibra.....	19
3.1.2. Temps d'extracció	20
3.1.3. Temperatura d'incubació	21
3.1.4. Addició de NaCl	22
3.1.5. Temperatura d'injecció	24
3.1.6. Efecte matriu.....	25
3.2. Validació del mètode.....	26
3.2.1. Linealitat.....	26
3.2.2. Límits de detecció (LD) i quantificació (LQ).....	26
3.2.3. Precisió	27
4. APLICABILITAT	28

4.1. Aplicació del mètode en mostres reals	29
5. CONCLUSIONS	31
6. BIBLIOGRAFIA	33

RESUM

Els haloanisols són compostos aromàtics molt volàtils que es poden trobar presents en el suro, però també en la fusta, les bodegues o l'ambient. La seva presència està relacionada amb el gust o aroma a suro, un defecte comú en el vi i que té un efecte econòmic important. No només els haloanisols influeixen negativament a les propietats sensorials del vi, també s'hi poden trobar compostos com les pirazines, la geosmina, el guaiacol i altres amb descriptors aromàtics com terrosos, fúngics i florits. Tot i que no tots ells presenten una influència similar, són igual d'importants ja que el seu llindar de percepció és bastant baix.

En aquest treball es va portar a terme el desenvolupament d'un mètode simple i prou sensible per separar i determinar simultàniament onze compostos 2,4,6-tricloroanisol (TCA), 2,4,6-tetracloroabisol (TeCA), pentacloroanisol (PCA), tribromoanisol (TBA), 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP) i 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP); geosmina (GSM), 2-metilisoborneol (2MIB), guaiacol (GUAI) i 1-octen-3-ol dels taps de suro mitjançant la microextracció en fase sòlida (HS-SPME) acoblat a la cromatografia de gasos-espectrometria de masses (GC-MS/MS).

Per poder posar a punt el mètode primer de tot es van haver d'estudiar les condicions òptimes del SPME-GCMSMS, començant per la selecció de la fibra: es van estudiar quatre fibres diferents, les quals estaven recobertes per diferents polímers. Finalment l'escollida va ser la composta per divinilbenze-carboxe-polidimetilsiloxe (DVB/CAR/PDMS) ja que va proporcionar millors àrees per a la majoria dels compostos estudiats.

Un cop escollida la fibra òptima, es van estudiar els factors d'extracció òptims (el temps d'extracció i la temperatura d'incubació). Aquesta etapa és molt important ja que és quan es produeix la migració dels anàlits des de la mostra fins a la fibra. Un cop es van obtenir els resultats de l'estudi dels diferents temps d'extracció es va poder observar que les variacions entre 60 minuts i 80 minuts eren poc significatives. Doncs es va acabar seleccionant un temps de 60 minuts. Un cop determinat el temps es va procedir a estudiar la temperatura d'incubació. Es va avaluar un rang de temperatures de 30°C fins a 60°C. Tot i que es va observar una millor resposta a la temperatura més elevada es va acabar aplicant una temperatura de 50°C perquè temperatures elevades solen derivar en problemes.

El penúltim paràmetre que es va estudiar va ser l'addició o no de NaCl. La presència d'electròlits en un sistema d'adsorció ajuda a disminuir la solubilitat dels compostos hidrofòbics de la fase aquosa. Aquest efecte és conegut com "*salting out*" i s'utilitza per

incrementar la sensibilitat d'un mètode analític però aquesta addició no sempre és convenient. L'avaluació de l'efecte "salting out" en aquest estudi va demostrar ser prescindible la seva addició a la major concentració en tots els compostos tret de l'OCT3OL.

Per acabar es va avaluar l'efecte de la temperatura de desorció i es va poder observar com la temperatura que resultava àrees més elevades va ser la de 290°C.

Un cop es van recollir les condicions òptimes per l'aplicació de SPME es va procedir a realitzar un estudi sobre l'efecte matriu. En aquest es van tenir en compte quatre matrius diferents: dos solucions d'aigua destil·lada amb diferents concentracions d'etanol (12% i 4%) i dos begudes (vi blanc i vi negre). En els quatre casos es van introduir un mix dels onze compostos a quatre concentracions diferents (1, 5, 10 i 20 ng/L). Per poder comparar els resultats es van realitzar corbes de calibratge de cada una de les matrius.

La validació del mètode es considera una part essencial del desenvolupament d'un mètode analític, és a dir, s'ha d'avaluar per poder assegurar que és apropiat per l'anàlisi objectiu i que els resultats que s'obtenen són fiables i consistents.

El mètode desenvolupat es va validar en els termes de precisió (repetibilitat i reproductibilitat), linealitat, límits de detecció i quantificació. La linealitat del procés es va avaluar analitzant 3 rèpliques de les solucions estàndard preparades a 8 nivells de concentracions (0.01-50 ng/L). El coeficient de correlació (R^2) va ser l'indicador utilitzat per identificar una bona linealitat. El seu valor havia de ser igual o superior que 0.99 per tots els compostos estudiats. Els resultats van demostrar una bona linealitat en els onze compostos ($R^2 \geq 0.992$).

Els límits de detecció (LD) i quantificació (LQ) es van calcular manualment a partir de l'alçada del pic del compost i el soroll de fons abans i després del pic. Es van utilitzar solucions amb nivells baixos dels compostos d'interès tant per LD (concentració de la senyal/soroll = 3) com LQ (concentració de la senyal/soroll = 10). Els resultats de la repetibilitat i la reproductibilitat es van estudiar mitjançant (%RSD). En ambdós casos aquest valor no va superar el 10%.

Per finalitzar, es va aplicar el mètode desenvolupat a mostres reals de taps de suro, prèviament macerades, per avaluar l'anàlisi i així poder garantir la fiabilitat dels resultats obtinguts.

La validació del mètode va demostrar que aquest es podria aplicar satisfactòriament per a portar a terme la quantificació dels compostos assajats simultàniament en taps de suro. No es

pot afirmar el mateix en el cas del vi, tot i haver estudiat i validat l'estudi de l'efecte matriu, doncs faltaria portar a terme més anàlisis.

La capacitat per fer mesures a nivells inferiors al llindar de percepció podria ser important per controlar el procés de fabricació de taps de suro al llarg del temps. Per tant, l'enfocament proposat en aquest treball és una valuosa contribució al sector surer i, en un futur, per a la indústria vitivinícola, ja que en aquest estudi es va aconseguir proporcionar un mètode de selecció senzill i sensible per controlar la qualitat de les mostres en les diferents etapes del procés de fabricació.

PARAULES CLAU

Taps de suro, compostos aromàtics, haloanisols, pirazines, Guaiacol, Geosmina, 2-MIB, OCT3OL, microextracció en fase sòlida de l'espai de cap (HS-SPME), CG-Triple quadrupol MS.

AGRAÏMENTS

En primer lloc, voldria donar les gràcies a l'Institut Català del Suro per permetre'm realitzar el TFG a les seves instal·lacions.

A la Dra. Patrícia Jové per tutoritzar i orientar el meu treball i donar-me l'oportunitat de treballar amb ella i poder ampliar els meus coneixements.

Al Dr. Jesús Francés com a tutor del meu projecte.

1. INTRODUCCIÓ

Els taps de suro s'han utilitzat al llarg dels anys a la indústria del vi i encara avui en dia són molt importants ja que molts experts i consumidors els associen amb vins d'alta qualitat. Part d'aquesta importància ve donada per les seves propietats físiques úniques entre les quals s'hi troben l'alta flexibilitat, elasticitat, compressibilitat i recuperació, baixa densitat i una baixa permeabilitat als líquids (Anjos *et al.*, 2010).

Els boscos d'alzines sureres (*Quercus súber* L.) suposa una activitat econòmica important en la majoria de països mediterranis com és el cas de Portugal i Espanya. A més es relaciona amb la preservació de la biodiversitat i la reducció de CO₂. Per això, l'ús del suro té un impacte positiu sobre la protecció del medi ambient. A més a més, la utilització de taps de suro com a tancament per a l'envelliment en ampolla també ofereix un impacte positiu contribuint en el desenvolupament de compostos aromàtics de caràcter positiu. Tanmateix, en alguns casos, l'ús d'aquest material pot comportar el risc de l'aparició del defecte conegut com gust o aroma a suro.

L'aroma a suro és un dels problemes als quals s'enfronta la indústria vitivinícola i que afecta a la qualitat del vi, provocant pèrdues econòmiques a més de perjudicar la reputació del celler (Fontana, 2012). Aquest aroma és descrit com l'efecte de diferents compostos volàtils que influeixen negativament en les propietats sensorials del vi (Chantal *et al* 2008) aquests tenen descriptors aromàtics com terrosos, fúngics, i florits. Entre els compostos més comuns i responsables de l'aroma fúngic en els taps de suro s'hi troben els cloroanisols: 2,4,6-tricloroanisol (TCA), tetracloroanisol (TeCA), pentacloroanisol (PCA), 2,4,6-tribromoanisol (TBA), algunes pirazines com 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP) , 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP) i 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP); geosmina (GSM), 2-metilisoborneol (2MIB), guaiacol (GUAL) i 1-octen-3-ol (OCT3OL).

Els cloroanisols són els compostos responsables d'aquest defecte caracteritzat com a olor a suro. No obstant això, es poden identificar altres compostos en el suro capaços de desenvolupar aquestes alteracions negatives (Chatonnet *et al.*, 2010). La GSM i el 2MIB són responsables de l'aroma a terra, les pirazines causen olors vegetals o herbàcies i el GUAL és causant dels aromes a fum, medicaments o fenols. En el cas del MDMP és identificat com el segon compost més comú, després del TCA (Chatonnet *et al.*, 2010) capaç de causar l'olor a floridura o a suro en vins australians (Simpson *et al.*, 2004). La raó per la qual aquests compostos apareixen en les ampolles de vi són variades i inclouen grapes contaminades,

contaminació ambiental dels cellers, materials de fusta, barrils i taps de suro (Simpson *et al.*, 1990; Cravero, 2020).

La millor solució per evitar la presència dels “off-flavours” en el vi és la prevenció, donat que l’extracció no és una tècnica fàcil d’aplicar en aquest camp. Per aquesta raó, la indústria del vi i del suro haurien d’evitar possibles fonts de contaminació mitjançant la comprovació de la presència de compostos responsables d’aquests aromes indesitjables al llarg de les diferents etapes de producció. Per tant, la monitorització dels compostos d’interès en els taps de suro és un procés clau com a control de qualitat abans d’enviar ambdós productes al mercat. A més, els resultats identificarien la font de contaminació i possibilitarien la seva eliminació.

El llindar de percepció d’aquests compostos en aigua o en vi es troba al voltant dels ng/L però pot variar depenent de la matriu en la qual es troben dissoltes les molècules i de la seva concentració a la mostra. Per aquesta raó, són necessàries tècniques d’anàlisi amb una elevada sensibilitat per a poder identificar i determinar aquests compostos. Tenint en consideració l’elevada capacitat de volatilització d’aquestes molècules la cromatografia de gasos (CG) és la tècnica analítica més indicada per portar a terme la seva determinació (Fontana, 2012). Però aquesta tècnica no és suficient ja que la concentració dels compostos d’interès es solen trobar a nivells molt baixos tant en les mostres de vi com en les de suro. Doncs havent de treballar amb escales tan baixes obliga a aplicar una etapa de preconcentració. Hi ha molts mètodes eficients per a preparar les mostres com la microextracció (Martendal, *et al.*, 2007), extracció en fase sòlida (Schmarr *et al.*, 2012), microextracció líquid-líquid dispersiva (Pizarro *et al.*, 2011) i sistema de purga i trampa (Campillo *et al.*, 2004). Actualment la tendència és mou cap al desenvolupament de mètodes automatitzats, ràpids, sensibles, selectius, amb un consum baix de reactius que puguin perjudicar el medi ambient. És per això que la microextracció en fase sòlida (SPME) ha prevalgut per sobre de totes les altres tècniques de preconcentració a més de ser el mètode més utilitzat en productes com el vi i el suro (Martínez-Uruñuela *et al.*, 2004; Riu *et al.*, 2002; Campillo *et al.*, 2008). Doncs SPME ha evolucionat molt en els darrers anys i és capaç d’integrar el mostreig, l’extracció, la concentració i la introducció de les mostres en un procés simple, a més, de poder ser automatitzat fàcilment.

1.1. Objectius


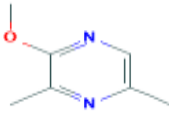
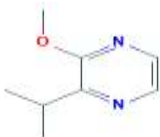

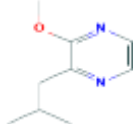

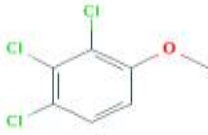

- Desenvolupar i optimitzar un mètode GC-MS/MS molt sensible que permeti la quantificació simultània d'onze compostos en mostres de suro.
- Portar a terme la validació del mètode desenvolupat mitjançant diferents variables com la linealitat, els límits de detecció i quantificació i precisió.
- Aplicar el mètode desenvolupat en mostres reals de taps de suro.

2. MATERIALS I MÈTODES



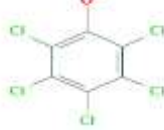
2.1. Patrons dels compostos volàtils

Els quatre haloanisols 2,4,6-tricloroanisol (TCA), tetracloroanisol (TeCA), pentacloroanisol (PCA) i 2,4,6-tribromoanisol (TBA) juntament amb el patró intern deuterat 2,4,6-tricloroanisol (dTCA) van ser subministrats per Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). La resta de compostos 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP) i 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP), geosmina (GSM), 2-metilisoborneol (2MIB), guaiacol (GUAI) i 1-octen-3-ol (OCT3OL) van ser subministrats per LGC Standards (Teddington, UK).

Taula 1. Estructura i aroma dels compostos d'interès. Font: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

<i>Compost</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>Estructura</i>	<i>Olor</i>
1-octen-3-ol	OCT3OL		Fúngic
2-metoxi-3,5-dimetilpirazina	MDMP		Herbàcies, patata, avellana madura o brutícia
2-metoxi-3-isopropilpirazina	IPMP		Terrosa
Guaiacol	GUAI		Fenòlic
2-isobutil-3-metoxipirazina	IBMP		Vegetal, pebrot verd
2-metilisoborneol	2MIB		Terrosa, ranci
2,4,6-tricloroanisol	TCA		Floridura
Geosmina	GSM		Terrosa, terra humida

Taula 1, continuació

Tetracloroanisol	TeCA		Floridura
2,4,6-tribromoanisol	TBA		Floridura
Pentacloroanisol	PCA		Floridura

2.2. Preparació de les solucions

Les dissolucions dels compostos individuals o també anomenades dissolucions mare es van preparar a una concentració de 100 mg/L en metanol. Com que tots els compostos es trobaven en fase líquida la preparació de les dissolucions es va realitzar mitjançant xeringues de vidre. Posteriorment es van emmagatzemar a 4°C en vials de vidre ambre a la foscor. A partir d'aquestes solucions es van preparar solucions mix estàndard de treball a varies concentracions diluïdes en metanol. En tractar-se de compostos volàtils fàcilment degradables les solucions estàndard de treball es preparaven cada setmana de nou.

2.3. Cromatografia de gasos amb espectrometria de masses

2.3.1. Cromatògraf de gasos

L'anàlisi cromatogràfic va ser realitzat en un cromatògraf de gasos Agilent 7890 A acoblat a un sistema d'espectrometria de masses 7000 amb triple quadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipat amb un injector Agilent Multimode. L'adquisició i el processament de dades es van realitzar mitjançant el software Agilent Mass Hunter Qualitative i Mass Hunter Quantitative Analysis B.08.00.

La separació cromatogràfica es va portar a terme mitjançant una columna capil·lar J&W HP-5MS UI (30 m x 0.25 mm I.D., df: 0.25 µm) subministrada per Agilent Technologies. El gas portador

utilitzat va ser l'heli (puresa 99.999%) a un flux constant 1,4 ml/min. La temperatura de l'injector va ser de 290°C durant 1 minut.

El programa de temperatura del forn utilitzat va ser el següent:



Es va començar amb una temperatura al forn de 50°C i es va mantenir durant un minut. Seguidament va augmentar fins a 220°C a 20°C per minut. Un cop arriba a la temperatura final es manté a aquesta durant un minut.

La temperatura de transferència va ser de 280°C i es va utilitzar nitrogen (1,5 ml/min) com a gas de col·lisió. L'espectòmetre de masses va operar en el mode d'ionització d'electrons a 70 eV amb el control de reaccions múltiples (MRM).

2.3.2. Condicions cromatògraf

Abans de posar a punt qualsevol mètode d'anàlisi, independentment de la tècnica escollida, és necessari realitzar assajos previs amb l'objectiu de poder conèixer el comportament dels compostos d'interès. Un cop finalitzat aquest estudi previ es procedeix a realitzar la optimització exhaustiva de tots els paràmetres que afecten a la determinació.

En aquest estudi es van estudiar prèviament el temps de retenció i els fragments de massa característics dels onze compostos objectiu.

Es va realitzar un anàlisi full scan (m/z 50-350) individual per a cada compost (10 mg/L). Els experiments full scan van mostrar els ions precursors i, a continuació, es van dur a terme experiments MS/MS sobre els ions precursors per determinar els seus ions producte. Per a la identificació de compostos es van utilitzar biblioteques mass spectral (espectrals de masses) NIST11 (versió 2.0, construïda el 19 de maig de 2011). Un cop establerta la selecció dels ions producte, també es van determinar les energies de col·lisió òptimes per a cada compost en diferents transicions (taula 2). Per minimitzar el nombre de transicions i, per tant, maximitzar la sensibilitat, els experiments de MS/MS es van agrupar en quatre segments de temps durant la prova GC-MS/MS.

Taula 2. Temps de retenció (TR) i condicions de control de reaccions múltiples per l'anàlisi dels onze compostos d'interès (transició espectral de masses i energies de col·lisió).

COMPOST	TR (min)	Primer ió de transició (m/z) ^a	Energia col·lisió (V) ^b	Segon ió de transició (m/z) ^a	Energia col·lisió (V) ^b
OCT3OL	6.04	57-29	5	57-31	10
MDMP	6.88	138-120	5	138-109	10
IPMP	7.52	152-137	5	152-124	5
GUAI	7.55	124-109	15	124-81	15
IBMP	8.83	124-94	15	124-81	15
2MIB	8.90	95-67	10	95-55	10
TCA	10.99	210-195	10	212-197	10
GSM	12.04	112-97	10	112-83	10
TeCA	13.57	231-203	15	246-203	20
TBA	14.64	344-329	10	346-303	25
PCA	15.85	280-237	30	265-237	10
dTCA	12.04	217-199	10	215-197	20

^arelació massa-càrrega ^bvolt, 1-octen-3-ol (OCT3OL), 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP), guaiacol (GUAI), 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP), 2-metilisborneol (2MIB), geosmina (GSM), 2,4,6-tricloroanisol (TCA), tetracloroanisol (TeCA), pentacloroanisol (PCA) i 2,4,6-tribromoanisol (TBA).

2.4. Optimització mètode SPME

La tècnica de microextracció en fase sòlida (SPME) fou desenvolupada per Pawliszyn *et al* (1997), es tracta d'una tècnica d'extracció que mostra diverses característiques molt atractives com són: la simplicitat, rapidesa, sensibilitat, selectivitat, fàcil integració a sistemes automatitzats, baix cost i un dels aspectes més importants: no es necessària la incorporació de cap dissolvent durant l'etapa d'extracció.

La microextracció en fase sòlida consta de dos passos: l'adsorció dels anàlits de la matriu a la fibra, seguit d'una desorció tèrmica dels compostos extrets dins del cromatògraf de gasos. A la figura 1 es mostra una il·lustració d'ambdós passos.

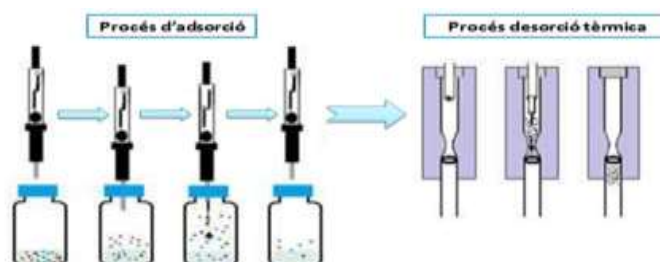


Figura 1. Procés d'adsorció mitjançant la tècnica en espai de cap, seguit del procés de desorció tèrmica. (Caballero, A. 2015)

La SPME es pot dur a terme de dues formes: introduint la fibra dins la mostra (extracció directa) o bé, situant la fibra a l'espai en cap de la mostra (headspace). En el cas d'aquest estudi la tècnica utilitzada va ser l'espai en cap (HS) ja que és molt utilitzada per l'extracció de compostos volàtils.

La fibra és una fase estacionària que actua d'esponja concentrant els anàlits de la matriu a la seva superfície durant l'etapa d'adsorció. La mostra es col·loca en un vial tancat amb un septum. Quan la xeringa de SPME el perfora i la fibra entra en el vial dona lloc a l'etapa d'extracció. Durant aquesta es produeix l'equilibri entre les diferents fases (matriu o mostra, fibra i fase gasosa). Per tant, és important estudiar el temps d'immersió i la temperatura d'incubació per arribar a assolir aquest estat. Tot i que també s'han de tenir en compte paràmetres bàsics com el pH o la concentració de sals ja que influeixen en la força iònica de la mostra. Un cop acabada l'extracció dels anàlits s'introdueix la fibra a l'injector del cromatògraf de gasos el qual es troba a una temperatura suficientment elevada perquè de forma instantània els compostos passin ha estar desorbitats en entrar a la columna cromatogràfica. Així doncs l'optimització de la temperatura de desorció és un paràmetre clau alhora de desenvolupar un mètode de SPME acoblat a CG.

Per portar a terme el desenvolupament del mètode amb SPME es van avaluar diferents variables com el tipus de fibra, el temps d'immersió, la temperatura d'incubació, l'addició de NaCl i la temperatura de desorció. Per desenvolupar l'avaluació es va utilitzar una solució del 12% aigua-etanol amb una concentració de 15 ng/L del mix dels components a estudiar. La selecció de les condicions òptimes es va realitzar mitjançant l'àrea acumulada dels pics per cada analit. Tots els assajos es van produir per triplicat.

En primer lloc es va avaluar l'eficiència de quatre recobriments de fibra: polidimetilsiloxà no polar (PDMS), polidimetilsiloxà/divinilbenzè (PDMS/DVB), divinilbenzè/carboxe/polimetilsiloxà (DVB/CAR/PDMS), poliacrilat (PA) i polidimetilsiloxà/divinilbenzè (PDMS/DVB). Un cop seleccionada la fibra, es va estudiar el temps d'extracció segons 5, 10, 20, 30, 40, 60 i 80 minuts i així elegir el temps òptim per l'adsorció dels components a la fibra. També es van realitzar assajos per determinar la temperatura d'incubació a 30°C, 40°C, 50°C i 60°C. L'eficiència del NaCl, i per tant, de l'efecte iònic es va estudiar mitjançant l'addició de NaCl en solucions aquoses, aquestes concentracions van ser 0, 50, 100 i 300 g/L. Seguidament, es va determinar la variació de la temperatura de l'injector entre 250°C i 300°C. Finalment es va portar a terme un estudi sobre l'efecte de la matriu. Les diferents matrius utilitzades van ser: una solució 12% aigua-etanol, una solució del 4% aigua-etanol, vi blanc i vi negre.

2.5. Validació del mètode

La validació d'un mètode analític és fonamental per la qualitat dels resultats, la qual és rellevant perquè moltes decisions importants es basen en els resultats dels anàlisis.

El mètode desenvolupat va ser validat mitjançant els paràmetres següents: linealitat, límits de detecció, límits de quantificació i precisió (repetibilitat i reproductibilitat).

2.5.1. Linealitat

El model de línia recta és el model més emprat en calibratge analític pel seu suport teòric (Llei de Lambert-Beer) però també per la seva simplicitat. Consisteix en trobar la recta de calibratge que millor s'ajusta a una sèrie de punts experimentals, on cada punt es troba definit per una variable x (variable independent) i una variable y (variable dependent).

La recta de calibratge ve definida per una ordenada en l'origen (n) i un pendent (m).

$$y = mx + n$$

La linealitat del procés es va avaluar analitzant 3 rèpliques de les rectes de calibratge per els compostos TCA, TeCA, TBA, PCA, OCT3OL, IPMP, IBMP, MDMP, GSM, 2MIB i GUA preparades mitjançant solucions al 12% aigua-etanol. Cada recta estava composta per 8 concentracions (0.01-50 ng/L). Utilitzant el TCA-d10 com a patró intern a una concentració de 5 ng/L.

La validació de les rectes de cada compost es va dur a terme mitjançant la comprovació del coeficient de determinació (R^2) el qual proporciona la correlació entre les variables x i y . Doncs és una eina que determina la linealitat de la recta de calibratge i el grau d'ajust dels punts experimentals. El valor d'aquest coeficient es troba comprès entre -1 i 1, considerant com a òptims els valors que es troben per sobre 0.99.

Tant les rectes com el coeficient de determinació es van calcular mitjançant les eines del paquet estadístic de MICROSOFT EXCEL.

2.5.2. Límit de detecció i límit de quantificació

El límit de detecció (LD) es pot definir com la concentració més baixa d'un anàlit que el procés analític detecta de forma fiable i es basa en càlculs estadístics.

La incertesa estadística s'expressa com el límit de confiança, doncs el límit de detecció de la senyal de l'anàlit es troba en el nivell de confiança del 99,7%, el que equival al triple de la desviació estàndard del soroll de fons.

El límit de quantificació (LQ) s'obté quan la senyal de l'anàlit és deu vegades la desviació estàndard de la senyal de fons.

La relació senyal-soroll (signal-to-noise ratio, S/N) es defineix com el marge que hi ha entre la potència del senyal que es transmet i la potència del soroll de fons. En cromatografia aquesta relació seria la relació que hi ha entre la intensitat del pic cromatogràfic de l'anàlit d'interès i el del soroll cromatogràfic que envolta aquest pic.

A la següent figura es pot observar la S/N per un pic cromatogràfic.

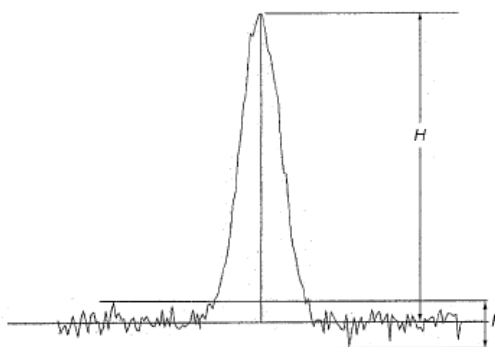


Figura 2. Relació S/N per un pic cromatogràfic.

On "H" és la altura del pic de l'anàlit d'interès i "h" és el rang del soroll.

En el cas d'aquest estudi el LD i LQ es van calcular manualment a partir de la proporció de l'altura del pic i el soroll mitjà produït abans i després de cada pic.

$$\text{LD Concentració del senyal / soroll (S/N) = 3}$$

$$\text{LQ Concentració del senyal / soroll (S/N) = 10}$$

2.5.3. Precisió

La precisió del mètode es va avaluar en termes de repetibilitat (precisió intradiària) i reproductibilitat (precisió interdiària) i expressada com la desviació estàndard relativa (RSD%).

La repetibilitat va ser determinada mitjançant cinc rèpliques de solucions mix a 20 ng/L de concentració analitzades al mateix dia.

Per avaluar la reproductibilitat es van realitzar anàlisis a solucions amb la mateixa concentració de 20 ng/L analitzades durant un període de 5 dies.

2.6. Preparació de les mostres

Les mostres es van preparar mitjançant la maceració de 20 taps de suro els quals es van submergir en 2 L de solució aigua-etanol (12%) durant 24 hores.

2.7. Tractament estadístic de les dades experimentals

2.7.1. Data analysis

La selecció dels ions precursors es va realitzar utilitzant Agilent MassHunter Qualitative Analysis Software (ver.B.07.00). Les àrees dels pics van ser integrades mitjançant Agilent MassHunter Quantitative Analysis Software (ver.B.07.00).

2.7.2. Normalització de les àrees

La normalització de les àrees es va calcular introduint el factor de resposta (factor de correcció) en els càlculs. Així doncs es va seleccionar per cada compost el seu factor de resposta, f_p , al qual se li va proporcionar el valor de 100. Seguidament es va calcular el factor de resposta relatiu de l'anàlit desconegut (f_x) mitjançant l'àrea del patró, A_p i l'àrea de l'anàlit desconegut, A_x , de la forma:

$$f_x = f_p (A_p/A_x) (m_x/m_p)$$

On, m_x/m_p és la concentració de l'anàlit desconegut respecte la del patró. En el cas d'aquest estudi la concentració va ser de 15 ng/L per ambdós. Cada àrea obtinguda es va multiplicar pel seu factor. I per tant el percentatge es va obtenir a partir del següent càlcul:

$$\%X = [(A_x f_x)/\sum(A_i f_i)] 100$$

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. Condicions SPME

3.1.1. Selecció de la fibra

El primer paràmetre que es va avaluar va ser el revestiment de la fibra SPME. Es van tenir en compte quatre revestiments diferents: polidimetilsiloxà no polar (PDMS), polidimetilsiloxà/divinilbenzè (PDMS/DVB), divinilbenzè/carboxe/polimetilsiloxà (DVB/CAR/PDMS), poliacrilat (PA) i polidimetilsiloxà/divinilbenzè (PDMS/DVB). Les dades es van extreure mitjançant la resposta de l'àrea dels pics dels anàlits segons una solució aquosa 15 µg/L de concentració durant un temps d'extracció de 30 minuts a 35°C.

A la figura 3 es pot observar com la fibra composta per PDMS va absorbir millor el compost PCA però pel que respecta a la resta de compostos no va tenir gaire bona eficiència. En el cas de la fibra amb revestiment de PA la seva capacitat d'absorció va significar bastant limitada en molts dels compostos. Doncs, les dos fibres amb millors resultats van ser la DVB/CAR/PDMS i la PDMS/DVB tot i que aquesta última tingués millors resultats en els compostos TeCA, TBA i PCA finalment es va optar per elegir la fibra recoberta amb DVB/CAR/PDMS ja que la seva capacitat per adsorbir les pirazines, terrosos, OCT3OL i 2MIB va resultar ser la més elevada.

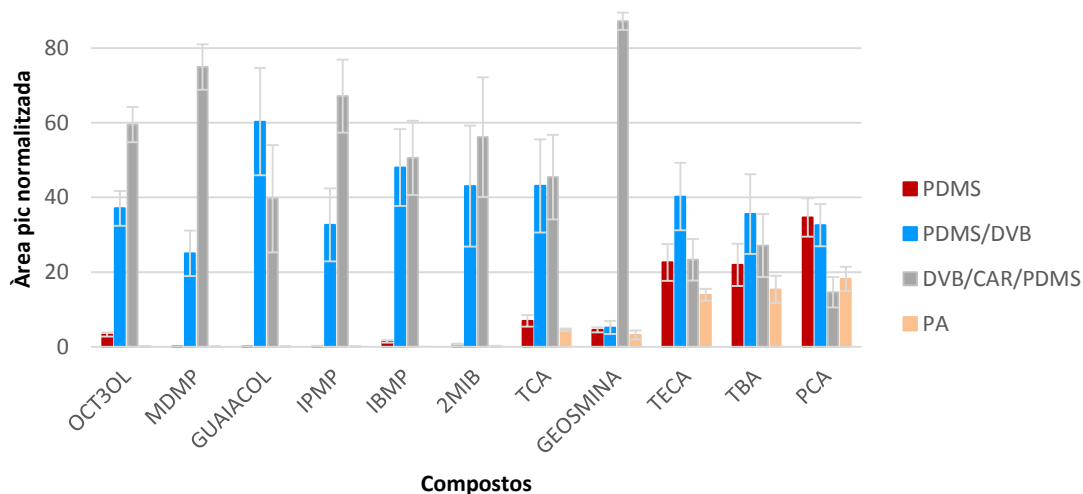


Figura 3. Influència del tipus de fibra en la determinació dels compostos a analitzar. (PDMS) Polidimetilsiloxà no polar, (PDMS/DVB) polidimetilsiloxà/divinilbenzè, (DVB/CAR/PDMS) divinilbenzè/carboxe/polimetilsiloxà, (PA) poliacrilat.

La fibra composta per DVB/CAR/PDMS s'ha utilitzat per a la determinació simultània d'una ampla gama de compostos terrosos-floridures, incloent haloanisols, halofenols, geosmina,

2MIB, alquil-metoxipirazines, 1-octen-3-ona i 1oct3ol d'aigua, suro, mostres de vi i altres begudes (Boutou, S., & Chatonnet, P. (2007), Sadoughi *et al.*, 2015, Martínez-Uruñuela *et al.*, 2005; Gómez-Ariza *et al.* 2006; Pizarro *et al.*, 2007; Riu *et al.*, 2007; Pizarro *et al.*, 2008; Slabizki, y Schmarr, HG (2013), Campillo *et al.*, 2010; Sung *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2014; Fontana, 2012).

3.1.2. Temps d'extracció

El temps d'extracció és una variable important a tenir en compte ja que s'ha de determinar el temps necessari per arribar a l'estat d'equilibri entre les fases aquoses i el recobriment de la fibra. L'estat d'equilibri es defineix com aquell a partir del qual la quantitat d'anàlit que s'extreu es manté constant tal com Pawliszyn (1997) assenyala.

Els diferents temps d'extracció 5, 10, 20, 30, 40, 60 i 80 minuts es van estudiar utilitzant la fibra seleccionada DVB/CAR/PDMS.

Els resultats obtinguts en aquest estudi es poden observar a la figura següent, on es mostra com les àrees normalitzades dels pics de tots els compostos van augmentar amb el temps, menys en el cas del 2MIB i OCT3OL on es va produir una disminució al punt de 80 minuts. Degut a que la variació de les àrees dels pics entre els temps d'extracció de 60 i 80 minuts són insignificants, es va acabar establint un temps d'immersió de 60 minuts. Tot i que es podria utilitzar un temps per sota de 60 minuts en experiments addicionals i així poder maximitzar el rendiment de les mostres sempre i quan sigui capaç de proporcionar una eficiència d'extracció suficient.

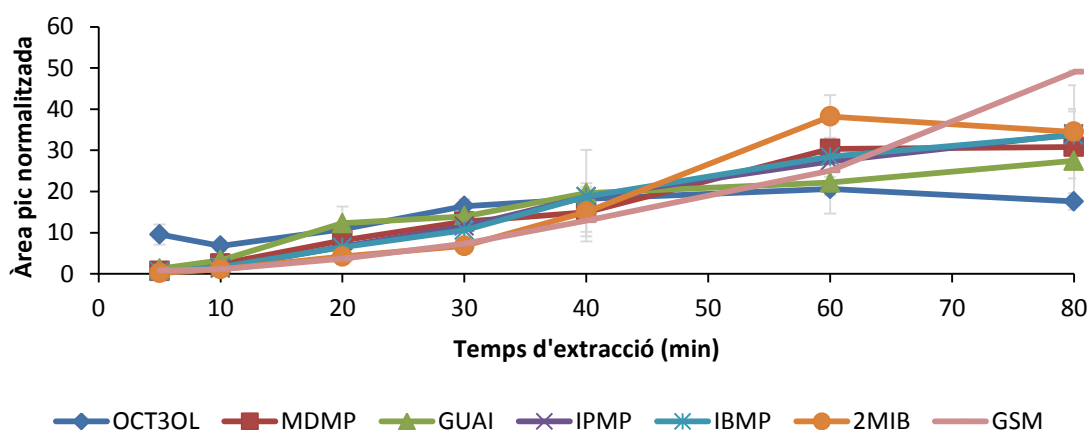


Figura 4.1. Efecte del temps d'extracció sobre l'equilibri dels diferents compostos entre la fase aquosa i el recobriment divinilbenzè/carboxe/polimetilsiloxà (DVB/CAR/PDMS). 1-octen-3-ol (OCT3OL), 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP), guaiacol (GUAI), 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP), 2-metilisoborneol (2MIB), geosmina (GSM).

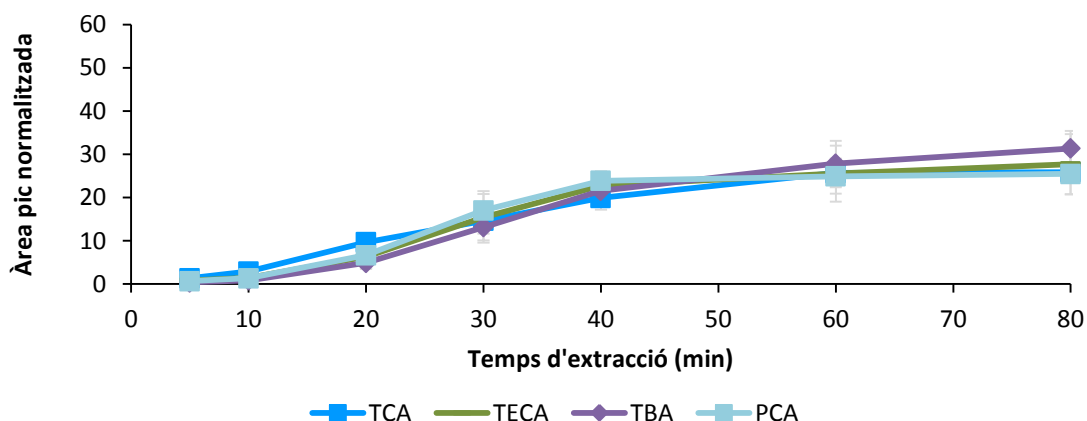


Figura 4.2. Efecte del temps d'extracció sobre l'equilibri dels diferents compostos entre la fase aquosa i el recobrint DVB/CAR/PDMS. 2,4,6-tricloroanisol (TCA), tetracloroanisol (TeCA), pentacloroanisol (PCA) i 2,4,6-tribromoanisol (TBA).

3.1.3. Temperatura d'incubació

Un altre paràmetre a tenir en compte és la temperatura d'incubació, aquest és també important alhora de desenvolupar un mètode SPME ja que la temperatura afecta la cinètica del procés entre el recobrint de la fibra i els compostos volàtils de la matriu (Ezquerro *et al.*, 2002).

Per portar a terme l'estudi de la temperatura d'incubació es van tenir en compte les següents temperatures: 30, 40, 50 i 60°C. Com es pot veure a la figura 5.1. i 5.2., l'evolució dels pics va ser progressiva en quasi tots els compostos donant una major àrea normalitzada a la temperatura de 60°C. Menys en el cas dels dos compostos MDMP i GUA1 on la seva temperatura òptima era a 50°C i 40°C respectivament. No obstant, la temperatura elegida va ser a 50°C ja que una temperatura elevada pot comportar efectes negatius a les constants de distribució fibra-gas.

Altres estudis també opten per elegir la temperatura de 50°C ja que una temperatura més elevada sol comportar problemes freqüents de ruptura de fibra o una disminució de les àrees dels compostos (Žnideršič *et al.*, 2019).

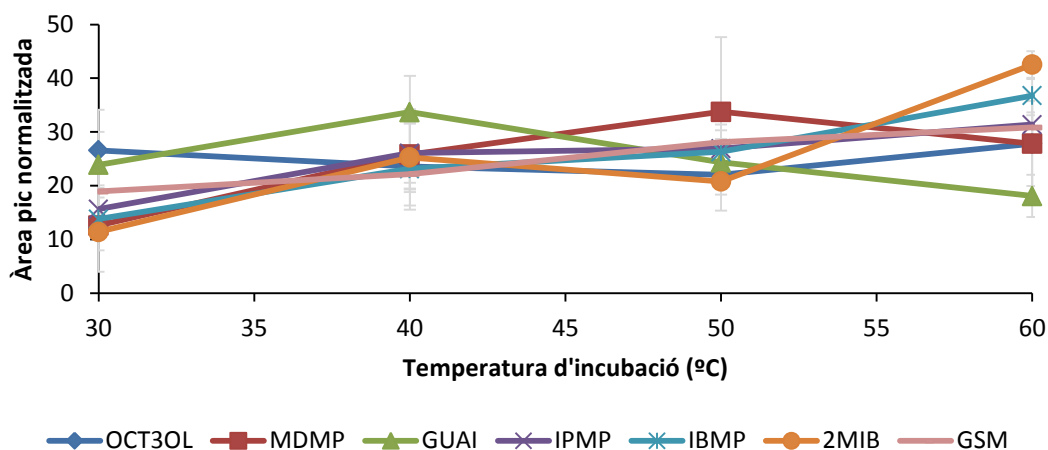


Figura 5.1. Efecte de la temperatura d'incubació. 1-octen-3-ol (OCT3OL), 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP), guaiacol (GUAJ), 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP), 2-metilisoborneol (2MIB), geosmina (GSM).

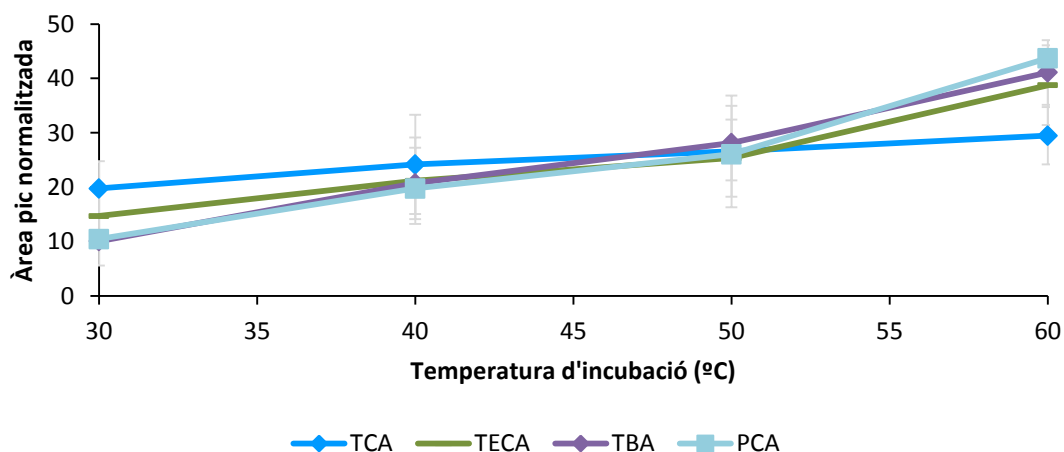


Figura 5.2. Efecte de la temperatura d'incubació. 2,4,6-tricloroanisol (TCA), tetracloroanisol (TeCA), pentacloroanisol (PCA) i 2,4,6-tribromoanisol (TBA).

3.1.4. Addició de NaCl

La presència d'electròlits en un sistema basat en la adsorció ajuda a disminuir la solubilitat dels compostos hidrofòbics de la fase aquosa. Aquest efecte s'anomena "salting out" i s'utilitza per incrementar la sensibilitat del mètode. A més ajuda a augmentar la quantitat d'anàlit extret ja que augmenta el coeficient de distribució dels anàlits que es troben en forma no ionitzada. L'electròlit més utilitzat per analitzar una ampla gamma de compostos per SPME és el NaCl, també conegut com sal comuna, (Bärtäk i Cap, 1997, Llompart *et al.*, 1998, Yang y Peppard, 1994).

Els resultats obtinguts, adjunts a la figura 6.1. i 6.2., van mostrar com l'addició de sal ajuda a adsorbir els compostos volàtils, ja que com més elevada la concentració de sal més elevat va ser el pic dels compostos. Tret del cas de l'OCT3OL que es va veure afectat negativament, a partir dels 0.5g la seva àrea va anar decreixent progressivament. Com que per la majoria dels compostos una concentració de 3g va significar una millora va ser la elegida com a òptima.

S'ha pogut veure com l'addició de NaCl ajuda a incrementar la concentració dels compostos TCA, IPMP, 2-MIB i GEOSM a l'espai de cap (Sung *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2000). Aquest augment significatiu demostra l'eficiència d'aquest efecte en aquests mètodes.

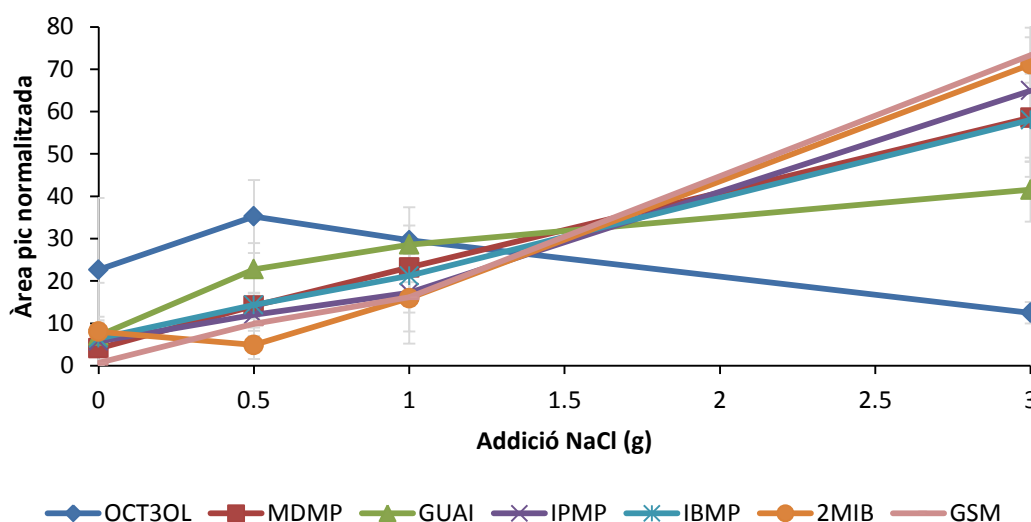


Figura 6.1. Influència de l'addició de NaCl en la determinació dels compostos seleccionats. 1-octen-3-ol (OCT3OL), 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP), guaiacol (GUAI), 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP), 2-metilisoborneol (2MIB), geosmina (GSM).

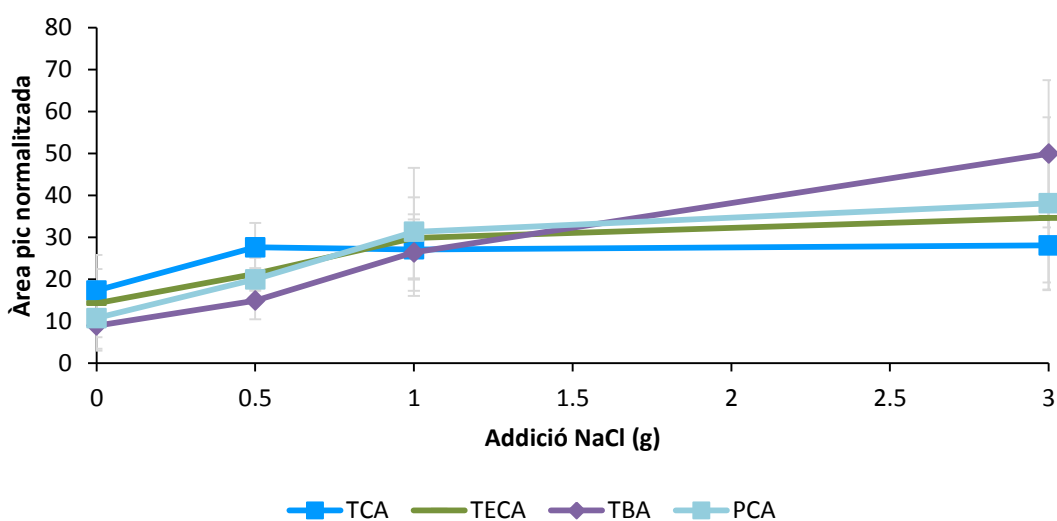


Figura 6.2. Influència de l'addició de NaCl en la determinació dels compostos seleccionats. 2,4,6-tricloroanisol (TCA), tetracloroanisol (TeCA), pentacloroanisol (PCA) i 2,4,6-tribromoanisol (TBA).

3.1.5. Temperatura d'injecció

A la zona d'injecció la temperatura ha de ser suficientment alta com per vaporitzar completament la mostra i, a la vegada, suficientment baixa perquè no es porti a terme la descomposició tèrmica de la mateixa.

L'efecte de la temperatura de desorció va ser estudiada a les temperatures 250, 270, 280, 290 i 300°C. Com es pot veure a la figura 7.1. i 7.2. les àrees obtingudes dels haloanisols no van obtenir un grau de variació significatiu. A diferència dels haloanisols, el GUAI, GSM i MDMP sí que es van veure afavorits per l'increment de la temperatura. Pel contrari, els compostos IPMP, IBMP i 2MIB es van veure afectats en arribar a la temperatura màxima de 300°C, disminuint les seves àrees, segurament a causa de la degradació tèrmica.

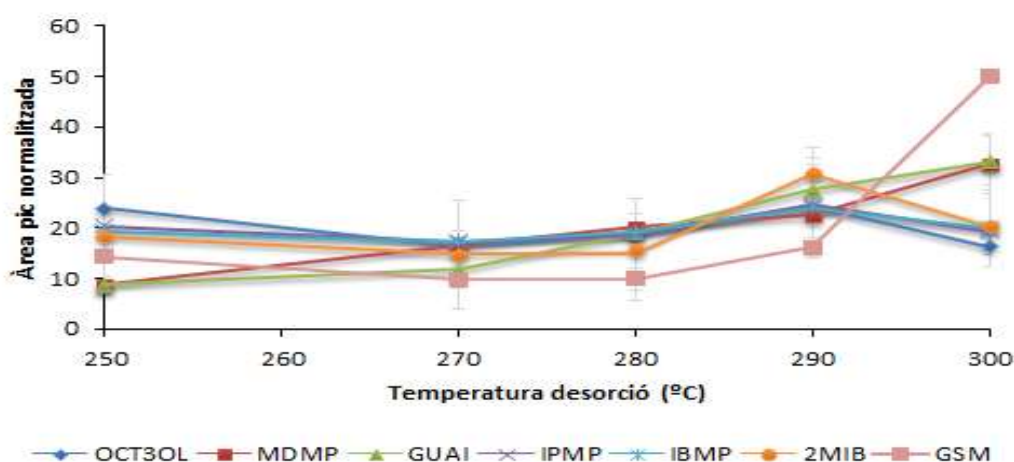


Figura 7.1. Evolució de l'estudi de la temperatura de desorció respecte els diferents compostos. 1-octen-3-ol (OCT3OL), 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP), guaiacol (GUAI), 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP), 2-metilisoborneol (2MIB), geosmina (GSM).

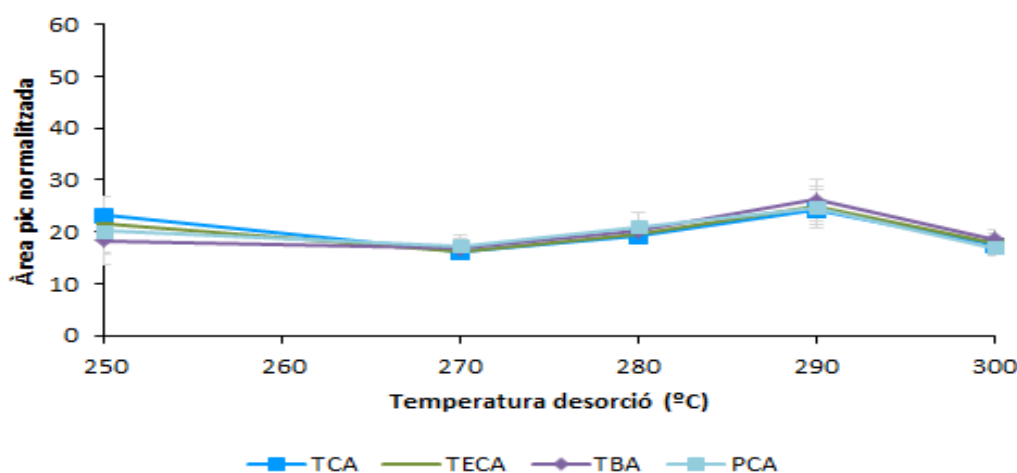


Figura 7.2. Evolució de l'estudi de la temperatura de desorció respecte els diferents compostos. 2,4,6-tricloroanisol (TCA), tetracloroanisol (TeCA), pentacloroanisol (PCA) i 2,4,6-tribromoanisol (TBA).

3.1.6. Efecte matriu

Les constants de distribució entre la fase líquida i el recobriment de la fibra depèn molt de la matriu. En el vi, a més de l'etanol, hi ha molts compostos que poden interferir durant SPME.

Per comprovar l'efecte potencial de la matriu juntament amb la influència de l'etanol es van avaluar diferents matrius: aigua destil·lada amb un contingut del 12%, aigua destil·lada amb una concentració del 4% d'etanol, vi blanc i vi negre. En els quatre casos es van enriquir amb el mix dels onze compostos a quatre concentracions diferents (1, 5, 10 i 20 ng/L).

Els pendents de les funcions lineals de calibratge obtingudes per a les diferents begudes es comparen a la figura 8 per TCA (els altres compostos tenen patrons similars). El percentatge d'etanol a la matriu té una influència important en l'avaluació de l'efecte de la matriu. Quan es comparen els pendents de begudes amb diferents concentracions d'etanol, es pot observar que el pendent de la beguda que conté un 4% d'etanol és superior al del 12%. Tanmateix, es pot observar que el pendent de la beguda alcohòlica simulada al 12% és molt inferior al del vi real i els pendents d'ambdós vins són similars. La matriu del vi està formada per un nombre significativament més gran de compostos volàtils, que poden provocar interaccions competitives a la superfície de la fibra i contribuir a l'efecte de la matriu (Ruiz-Delgado *et al.*, 2016; Sadoughi *et al.*, 2015). Per tant, la presència d'etanol i altres compostos del vi pot influir en el procés HS-SPME perquè en aquest procediment les constants de distribució entre la fase líquida, l'espai de cap i el recobriment depenien fortament de la matriu. Tot i que sembla que abans d'utilitzar aquest mètode optimitzat i validat en mostres de vi, calen més anàlisis.

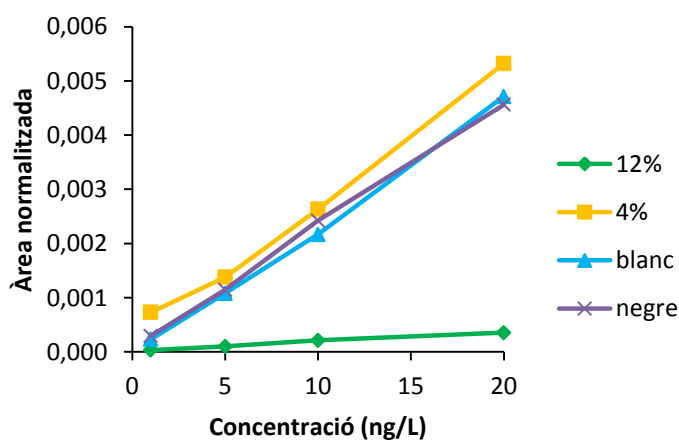


Figura 8. Rectes de calibratge de les diferents matrius per el compost TCA. Solució aigua-etanol 12%, solució aigua-etanol 4%, vi blanc, vi negre.

Taula 3. Taula resum de les condicions del cromatògraf i SPME per el mètode estudiat.

CONDICIONS CROMATÒGRAF i SPME	
Fibra	DVB/CAR/PDMS
Temps d'extracció	60 minuts
Temperatura d'incubació	50°C
Addició de NaCl	3g
Temperatura de desorció	290°C

En aquesta taula es pot observar el recull de les condicions òptimes per al desenvolupament del mètode.

3.2. Validació del mètode

La validació del mètode per l'anàlisi dels compostos OCT3OL, MDMP, IPMP, GUA, IBMP, 2MIB, GSM, TCA, TeCA, TBA i PCA utilitzant HS-SPME-GC/MSMS es va avaluar segons les estimacions de la linealitat, precisió i sensibilitat.

3.2.1. Linealitat

La linealitat és la capacitat d'un mètode d'anàlisi per proporcionar una resposta instrumental proporcional a la quantitat d'anàlit que es detecta en una mostra de laboratori. En primer lloc és necessari determinar l'abast de les concentracions d'anàlits sobre les quals es pot aplicar el mètode (Romero *et al.* 2015). A més, el rang de treball del mètode hauria d'estar en línia amb el qualificat per una resposta lineal, el que significa que el mètode dona resultats proporcionals a la concentració d'anàlits.

Segons els resultats obtinguts (taula 4) les corbes de calibratge van expressar una bona linealitat segons els rangs de concentració objectius. També es van obtenir bones regressions lineals per a l'extracció i la quantificació mitjançant el mètode HS-SPME amb valors de $R^2 > 0.99$ per a tots els compostos estudiats.

3.2.2. Límits de detecció (LD) i quantificació (LQ)

En aquest estudi els LD i els LQ dels compostos es van trobar per sota el llindar sensorial de matrius com aigua i vi (taula 4). Els LQ per al compost 2MIB van donar valors superiors perquè els ions precursors m/z utilitzats eren més petits i per tant menys específics del compost. En el

cas dels haloanisols els LD i LQ obtinguts van ser lleugerament inferiors als descrits per Hjelmeland *et al.*, (2012) en vins utilitzant un mètode GC-MS/MS.

3.2.3. Precisió

El terme de precisió es defineix per la ISO en el Vocabulari Internacional de Termes Bàsics i Generals en Metrologia (ISO-VIM) com la proximitat de la concordança entre els valors de quantitat obtinguts mitjançant rèpliques en condicions específiques.

La determinació d'aquest paràmetre es va fer mitjançant la repetibilitat i la reproductibilitat. L'avaluació de la precisió implica expressar numèricament l'error aleatori d'un conjunt de mesures individuals mitjançant la desviació estàndard relativa (%RSD). Com es pot veure a la taula 4 el rang de la repetibilitat va oscil·lar entre 1.8 al 9.0% per als diferents compostos, mentre que el rang de la reproductibilitat va variar entre 3.6 i 9.3%. Doncs tots els resultats es van trobar per sota al 10%, aquests valors són similars a altres publicats a la literatura per mostres de taps de suro (Prat *et al.* 2008). Els RSD considerats més comuns són els que es troben per sota el valor de 15% (Kruve *et al.*, 2015; Gonzalez *et al.*, 2014) o fins al 20% per mostres d'aliments (Huber, 1998).

Taula 4. Dades de calibratge i validació del mètode HS-SPME-GCMS/MS optimitzat: rangs lineals, coeficient de determinació (R^2), límits de detecció i quantificació (LD i LQ) i precisió (%RSD) per als onze anàlisis d'interès en una solució 12% aigua-etanol.

Compost	Rang calibratge (ng ^a /L)	m ^b	n ^c	R ^{2d}	LD (ng/L)	LQ (ng/L)	Repetibilitat (%RSD ^e)	Reproductibilitat (%RSD ^e)
OCT3OL	1-50	715.85	248.38	0.993	0.5	1	8.9	9.1
MDMP	10-50	0.04	0.44	0.993	5	10	4.9	3.8
IPMP	0.5-20	1.47	1.29	0.993	0.05	0.5	2.5	8.7
GUAI	5-20	475.04	-195.76	0.999	0.05	0.5	7.0	5.5
IBMP	1-20	361.51	59.27	0.992	0.5	1	5.9	9.3
2MIB	10-50	1.26	0.70	0.993	5	10	4.1	6.7
GSM	0.5-20	1.99	1.07	0.996	0.1	0.5	8.6	7.4
TCA	0.1-20	3.89	0.30	0.997	0.05	0.1	1.8	4.0
TeCA	0.1-20	9.16	-0.12	0.998	0.05	0.1	8.2	4.6
TBA	0.1-20	2.12	0.009	0.997	0.05	0.1	9.0	5.8
PCA	0.1-20	1.27	-0.03	0.997	0.05	0.1	7.4	3.6

^a nanograms ^b pendent ^c ordenada en l'origen ^d coeficient de determinació ^e desviació estàndard relativa en tant per cent. 1-octen-3-ol (OCT3OL), 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP), guaiacol (GUAI), 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP), 2-metilisoborneol (2MIB), geosmina (GSM), 2,4,6-tricloroanisol (TCA), tetracloroanisol (TeCA), pentacloroanisol (PCA) i 2,4,6-tribromoanisol (TBA).

4. APLICABILITAT

Com ja s'ha comentat anteriorment l'aparició de defectes organolèptics en el vi és un dels problemes més importants en el sector vitivinícola, un dels més destacats és el sabor o aroma a floridura. Aquestes alteracions sensorials afecten negativament al vi a més de provocar el rebuig per part dels consumidors. En suposar una de les principals pèrdues econòmiques per a la indústria, l'interès en poder determinar l'origen del problema i les causes ha augmentat amb el temps, juntament amb el desenvolupament de noves metodologies analítiques.

Un dels reptes més importants que té el sector és la obtenció de vins de qualitat que siguin capaços de destacar en un mercat altament competitiu. La qualitat d'un vi es troba principalment relacionada amb les seves característiques organolèptiques però al mateix temps també es troba unida als defectes. Doncs és important afegir un control de qualitat que pugui ajudar a evitar l'arribada de vins amb aromes o gust defectuosos a mans dels consumidors.

Tant per a la indústria del vi com per a la del suro, poder tenir a l'abast un mètode capaç de determinar i quantificar directament els compostos responsables de l'aparició d'aromes no desitjats és molt important, ja que això els ajudaria a retirar el producte contaminat abans de que aquest arribés al mercat.

El mètode de microextracció en fase sòlida (SPME) és ràpid, senzill i molt útil per identificar i quantificar aromes de les mostres de suro o vi. Així doncs, l'aplicació d'un mètode com el que s'ha desenvolupat en el treball es podria incorporar fàcilment en una indústria ja que funciona molt bé en anàlisis de rutina.

Incorporar un anàlisi SPME combinat amb CG-MS/MS per a completar els mètodes de control de qualitat als dos sectors, tant del vi com del suro, ajudaria a millorar la prevenció de riscos potencials, a més de poder identificar les possibles fonts de contaminació del procés. També es reduiria la venda de productes finals defectuosos, i al mateix temps les pèrdues econòmiques que provoca aquest problema actualment.

El mètode estudiat en aquest treball, comparat amb altres que també utilitzen HS-SPME en mostres d'aigua i taps de suro, és capaç d'analitzar al mateix temps més anàlisis a part dels cloroanisols, a més de proporcionar uns límits de detecció més baixos dels compostos d'interès. Doncs, amb un sol anàlisi proporciona informació sobre onze compostos capaços de provocar aromes indesitjables fet que amplia la caracterització d'aquests en una sola mesura.

4.1. Aplicació del mètode en mostres reals

Un cop validat el mètode es va procedir a aplicar-lo a mostres de taps de suro que ja s'havien seleccionat per la presència de desviacions sensorials detectades per un anàlisi sensorial, prèviament macerades, per avaluar l'anàlisi dels onze compostos aromàtics estudiats i per garantir la fiabilitat del mètode quan s'aplica a mostres reals.

Mitjançant les equacions de les rectes obtingudes per a cada compost es van poder sotmetre al procediment les mostres reals dels taps de suro a les quals se'ls hi va afegir el patró intern dTCA a la concentració coneguda de 5 ng/L. A partir dels resultats obtinguts es va calcular la relació $\text{Àrea}_{\text{compost}}/\text{Àrea}_{\text{patró intern}}$, seguidament es van interpolar a les rectes per obtenir la concentració del compost. Es van obtenir els resultats de la taula 5.

Taula 5. Quantificació dels onze compostos en ng/L mitjançant el mètode desenvolupat. (<LD<LQ: no detectat)

NºM	OCT3OL	MDMP	GUAI	IPMP	IBMP	MIB	TCA	GSM	TeCA	TBA	PCA
M1	<LD <LQ	<LD <LQ	1.15	3.26	<LD <LQ	<LD <LQ	0.05	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M2	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	1.41	<LD <LQ	<LD <LQ	0.50	<LD <LQ	0.27	<LD <LQ	<LD <LQ
M3	<LD <LQ	<LD <LQ	1.03	2.23	<LD <LQ	<LD <LQ	1.22	<LD <LQ	0.23	<LD <LQ	<LD <LQ
M4	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	1.90	<LD <LQ	<LD <LQ	0.45	<LD <LQ	0.34	<LD <LQ	<LD <LQ
M5	<LD <LQ	<LD <LQ	1.81	2.85	<LD <LQ	<LD <LQ	1.54	<LD <LQ	0.25	0.06	<LD <LQ
M6	<LD <LQ	<LD <LQ	1.26	1.42	<LD <LQ	<LD <LQ	0.43	<LD <LQ	0.13	<LD <LQ	<LD <LQ
M7	<LD <LQ	177.87	<LD <LQ	21.37	<LD <LQ	<LD <LQ	1.01	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M8	<LD <LQ	333.29	<LD <LQ	35.40	<LD <LQ	<LD <LQ	0.53	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M9	<LD <LQ	191.84	<LD <LQ	22.29	<LD <LQ	<LD <LQ	0.10	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M10	<LD <LQ	168.97	<LD <LQ	18.00	<LD <LQ	<LD <LQ	0.33	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M11	<LD <LQ	326.75	<LD <LQ	18.91	<LD <LQ	<LD <LQ	0.37	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M12	<LD <LQ	7.94	<LD <LQ	2.22	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M13	<LD <LQ	246.64	<LD <LQ	17.28	<LD <LQ	<LD <LQ	7.29	<LD <LQ	13.06	13.75	10.75
M14	<LD <LQ	14.93	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	11.39	<LD <LQ	30.80	30.31	28.36
M15	<LD <LQ	48.70	<LD <LQ	5.70	<LD <LQ	<LD <LQ	9.29	<LD <LQ	22.37	20.38	22.52
M16	<LD <LQ	56.03	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	2.37	<LD <LQ	6.68	6.56	6.53
M17	<LD <LQ	489.47	<LD <LQ	17.22	<LD <LQ	<LD <LQ	3.60	<LD <LQ	8.47	8.42	5.90
M18	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	0.92	<LD <LQ	0.46	0.06	<LD <LQ
M19	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	0.47	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M20	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	3.05	<LD <LQ	<LD <LQ	14.37	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M21	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	4.61	<LD <LQ	<LD <LQ	0.43	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M22	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	0.26	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	6.78
M23	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	0.78	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M24	<LD <LQ	12.95	<LD <LQ	3.93	<LD <LQ	<LD <LQ	3.79	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M25	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	3.99	<LD <LQ	<LD <LQ	2.15	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M26	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	3.25	<LD <LQ	<LD <LQ	1.93	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M27	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	1.09	<LD <LQ	<LD <LQ	2.99	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M28	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	1.73	<LD <LQ	<LD <LQ	3.58	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M29	<LD <LQ	22.42	<LD <LQ	3.43	<LD <LQ	<LD <LQ	13.70	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M30	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	1.13	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M31	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	0.48	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M32	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	1.25	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M33	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	2.61	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M34	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	3.43	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ
M35	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	0.93	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ

Taula 5, continuació

M36	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	1.95	<LD <LQ	<LD <LQ	0.92	<LD <LQ	0.29	1.63	<LD <LQ
M37	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	2.46	<LD <LQ	0.10	0.74	<LD <LQ
M38	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	2.77	<LD <LQ	<LD <LQ	0.51	<LD <LQ	<LD <LQ	1.12	<LD <LQ
M39	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	2.89	<LD <LQ	<LD <LQ	4.25	<LD <LQ	0.73	1.52	<LD <LQ
M40	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	1.54	<LD <LQ	<LD <LQ	0.71	<LD <LQ
M41	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	2.20	<LD <LQ	<LD <LQ	1.36	<LD <LQ	0.42	1.61	<LD <LQ
M42	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	3.50	<LD <LQ	<LD <LQ	1.11	<LD <LQ	0.30	3.36	<LD <LQ
M43	<LD <LQ	247.68	<LD <LQ	8.04	<LD <LQ	<LD <LQ	9.08	<LD <LQ	16.48	16.66	15.30
M44	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	1.45	<LD <LQ	0.65	0.19	0.06
M45	<LD <LQ	<LD <LQ	<LD <LQ	1.98	<LD <LQ	<LD <LQ	1.54	<LD <LQ	0.26	<LD <LQ	<LD <LQ

Número de mostra (NºM), 1-octen-3-ol (OCT3OL), 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP), guaiacol (GUA), 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP), 2-metilisoborneol (2MIB), geosmina (GSM), 2,4,6-tricloroanisol (TCA), tetracloroanisol (TeCA), pentacloroanisol (PCA) i 2,4,6-tribromoanisol (TBA).

5. CONCLUSIONS

L'objectiu principal d'aquest treball era desenvolupar un estudi sobre l'optimització de diferents tipus de recobriments i altres paràmetres HS-SPME-GCMSMS per a l'extracció dels compostos seleccionats. Per tant, les conclusions principals que es poden extreure sobre cada objectiu són:

- Desenvolupar i optimitzar un mètode GC-MS/MS molt sensible que permeti la quantificació simultània d'onze compostos en mostres de suro.
- El mètode desenvolupat va mostrar que les condicions més adequades eren: fibra DVB / CAR / PDMS, temps d'adsorció de 60 min, temperatura d'incubació de 50°C, NaCl concentració de 300 g/L i una temperatura de desorció de 290 °C. Aquestes condicions analítiques permeten quantificar els soluts per sota del seu respectiu llindar de percepció organolèptica tant en aigua com en vi.
 - El mètode desenvolupat es podria aplicar satisfactòriament per la quantificació dels compostos MDMP, IPMP, GUA, 2MIB, GSM, TCA, TeCA, TBA i PCA assajats simultàniament en taps de suro. Però l'OCT3OL s'hauria d'analitzar per separat de la resta de compostos.
 - Els resultats obtinguts de l'estudi de l'efecte de la matriu mostren com la presència d'etanol i altres compostos del vi influeixen en el procés HS-SPME ja que el pendent entre la solució del 12% és molt diferent a la del vi negre i blanc. Doncs en el cas de voler aplicar aquest mètode en mostres de vi en un futur, s'haurien de portar a terme més anàlisis.
 - En aquest mateix estudi de l'efecte de les matrius, es va poder observar com el compost 2-MIB quan es troba en una matriu de vi blanc queda emmascarat per un pic, amb una àrea més gran, proper al seu temps de retenció, aquest fet dificulta la seva quantificació. Com ja s'ha comentat anteriorment abans d'aplicar aquest mètode en mostres de vi s'haurien de fer més anàlisis. Una possible solució seria la d'allargar la rampa del cromatògraf d'aquesta manera els pics sortirien més separats i no hi hauria el problema de solapament.
- Portar a terme la validació del mètode desenvolupat mitjançant diferents variables com la linealitat, els límits de detecció i quantificació i precisió.
- La validació del mètode es va aconseguir mitjançant l'estudi de la linealitat, límits de detecció i quantificació i la precisió (repetibilitat i reproductibilitat). Aquests paràmetres van donar els resultats següents: en la linealitat es va aconseguir $R^2 > 0.99$ per a tots els compostos,

els límits de detecció i quantificació van demostrar valors per sota el llindar de percepció i durant la precisió del mètode es van obtenir %RSD < 10%.

- Aplicar el mètode desenvolupat en mostres reals de taps de suro
- Els resultats obtinguts en la validació del mètode permeten assegurar que és fiable i precís, ja que aquest compleix amb els criteris de validació.

CONCLUSIÓ FINAL

- Per tant, en aquest treball s'ha aconseguit desenvolupar i validar un mètode ràpid, precís, fàcil d'automatitzar i sensible per a l'anàlisi de deu compostos capaços de produir aromes no desitjats en taps de suro.

6. BIBLIOGRAFIA

Acevedo, M. (2014). *Estandarización y validación del método por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (GC-MS), para el análisis de tres benzodiazepinas y sus metabolitos en muestras biológicas de interés forense en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses*. (Trabajo de grado, Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia). <https://core.ac.uk/download/pdf/71397735.pdf>

Alonso, M., Godayol, A., Anticó, E., Sánchez, J. M. (2012). Noves metodologies d'anàlisi de compostos volàtils mitjançant trampes d'agulla. Aplicació a l'anàlisi d'alè, atmosfèrica i d'aigües. *Revista de la Societat Catalana de Química*, 11, 21-29. <https://dugi-doc.udg.edu/handle/10256/7754>

Anjos, O., Pereira, H., Rosa, E. (2010). Tensile properties of cork in the tangential direction: Variation with quality, porosity, density and radial position in the cork plank. *Materials and Design*, 31(4) 2085-2090. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2009.10.048>

Berták, P., Čáp, L. (1997). Determination of phenols by solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 767(1), 171-175. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)01090-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)01090-4)

Boutou, S., & Chatonnet, P. (2007). Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. *Journal of Chromatography A*, 1141(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.106>

Caballero, A. (2015). *Tratamiento de la muestra: Extracciones*. <https://es.slideshare.net/arturo.caballero/tratamiento-de-muestra-extracciones>

Callejón, M. R., Ubeda, C., Rios-Reina, R., Morales, M. L., Troncoso, A. M. (2016). Recent developments in the analysis of musty odour compounds in water and wine: A review. *Journal of Chromatography A*, 1428(8), 72-85. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.008>

Campillo, N., Aguinaga, N., Viñas, P., López-García, I., & Hernández-Córdoba, M. (2004). Purge-and-trap preconcentration system coupled to capillary gas chromatography with atomic emission detection for 2, 4, 6-trichloroanisole determination in cork stoppers and wines. *Journal of Chromatography A*, 1061(1), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.005>

Campillo, N., Peñalver, R., & Hernández-Córdoba, M. (2008). Solid-phase microextraction for the determination of haloanisoles in wines and other alcoholic beverages using gas

chromatography and atomic emission detection. *Journal of Chromatography A*, 1210(2), 222-228. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.095>

Campillo, N., Viñas, P., Cacho, J. I., Peñalver, R., & Hernández-Córdoba, M. (2010). Evaluation of dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(47), 7323-7330. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.058>

Cedrón, M. T. (2004). *Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen.* (Tesis doctoral, Universidad de La Rioja, La Rioja). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=103>

Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S., Labadie, M. D. (2004). Identification and responsibility of 2, 4, 6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1255-1262. <https://doi.org/10.1021/jf030632f>

Chatonnet, P., Fleury, A., Boutou, S. (2010). Origin and Incidence of 2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a Compound with a “Fungal” and “Corky” Aroma Found in Cork Stoppers and Oak Chips in Contact with Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12481-12490. <https://doi.org/10.1021/jf102874f>

Chen, X., Luo, Q., Yuan, S., Wei, Z., Song, H., Wang, D., & Wang, Z. (2013). Simultaneous determination of ten taste and odor compounds in drinking water by solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Environmental Sciences*, 25(11), 2313-2323. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60290-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60290-3)

Cravero, M. C. (2020). Musty and Moldy Taint in Wines: A review. *Beverages*, 6(2), 41. <https://doi.org/10.3390/beverages6020041>

Eisert, R., Levsen, K. (1996). Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: A new method for the analysis of organics in water. *Journal of Chromatography A*, 733(1), 143-157. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00875-6](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00875-6)

Ezquerro, O., Pons, B., Tena, T. (2002). Development of a headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry method for the identification of odour-causing volatile compounds in packaging materials. *Journal of Chromatography A*, 963(1), 381-392. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00211-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00211-X)

Fontana, M. C. (2012). Analytical methods for determination of cork-taint compounds in wine. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37, 135-147. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.012>

Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., & Beltrán, R. (2006). Use of multiple headspace solid-phase microextraction and pervaporation for the determination of off-flavours in wine. *Journal of Chromatography A*, 1112(1), 133-14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.093>

Gomez-Ariza, J. L., Garcia-Barrera, T., & Lorenzo, F. (2005). Optimisation of a two-dimensional on-line coupling for the determination of anisoles in wine using ECD and ICP-MS after SPME-GC separation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20(9), 883-888. <https://doi.org/10.1039/B505003K>

González, O., Blanco, M. E., Iriarte, G., Bartolomé, L., Maguregui, M. I., & Alonso, R. M. (2014). Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *Journal of Chromatography A*, 1353, 10-27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.077>

Hjelmeland, A. K., Collins, T. S., Miles, J. L., Wylie, P. L., Mitchell, A. E., & Ebeler, S. E. (2012). High-throughput, sub ng/L analysis of haloanisoles in wines using HS-SPME with GC-triple quadrupole MS. *American journal of enology and viticulture*, 63(4), 494-499. <https://www.ajevonline.org/content/63/4/494.short>

Huber, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC-CG Int.* 1998, 11, 96–105.

International Organization for Standardization. Dguide 99999: International Vocabulary of basic and General Terms in Metrology (VIM). ISO, 2004. <http://www.ntmdt.ru/download/vim.pdf>

Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M. L., Evard, H., Herodes, K., Leito, I. (2015). Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica chimica acta*, 870, 29-44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>

Llompart, M., Li, K., Fingas, M. (1998). Headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile and semi-volatile pollutants in water and air. *Journal of Chromatography A*, 824(1), 53-61. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00613-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00613-X)

Ma, J., Lu, W., & Chen, L. (2012). Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for organic compounds analysis in environmental water: a review. *Current Analytical Chemistry*, 8(1), 78-90. <https://doi.org/10.2174/157341112798472170>

Ma, K., Zhang, J. N., Zhao, M., & He, Y. J. (2012). Accurate analysis of trace earthy-musty odorants in water by headspace solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of separation science*, 35(12), 1494-1501. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200029>

Martendal, E., Budziak, D., & Carasek, E. (2007). Application of fractional factorial experimental and Box-Behnken designs for optimization of single-drop microextraction of 2, 4, 6-trichloroanisole and 2, 4, 6-tribromoanisole from wine samples. *Journal of Chromatography A*, 1148(2), 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.079>

Martínez-Uruñuela, A., González-Sáiz, J. M., & Pizarro, C. (2004). Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. *Journal of Chromatography A*, 1056(1), 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.136>

Martínez-Uruñuela, A., Rodríguez, I., Cela, R., González-Sáiz, J. M., & Pizarro, C. (2005). Development of a solid-phase extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in red wine using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 549(1), 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.06.016>

Martínez, A. (2011). *Estudio de los límites de confirmación en cromatografía de gases espectrometría de masas en tándem*. (Trabajo fin de máster, Universidad de Almería, Andalucía). <http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/1602/TFM%20Adelaida%20Mart%C3%ADnez%20Casas.pdf?sequence=1>

Mestres, M., Martí, M. P., Busto, O., Guasch, J. (2000). Analysis of low-volatility organic sulphur compounds in wines by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881(1), 583-590. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00326-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00326-5)

Pawlisyn, J. (1997). *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. <https://books.google.es/books?hl=ca&lr=&id=314NFMn6WQ8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Solid+P+hase+Microextraction:+Theory+and+Practice.+&ots=BgNmwrqL&sig=2Jl1c->

[d7rQtOsNfSmegbLrdaGhE#v=onepage&q=Solid%20Phase%20Microextraction%3A%20Theory%20and%20Practice.&f=false](https://doi.org/10.1007/s10337-014-2676-y)

Peng, S., Ding, Z., Zhao, L., Fei, J., Xuan, Z., Huang, C., & Chen, X. (2014). Determination of seven odorants in purified water among worldwide brands by HS-SPME coupled to GC–MS. *Chromatographia*, 77(9-10), 729-735. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2676-y>

Pizarro, C., Sáenz-González, C., Pérez-del-Notario, N., & González-Sáiz, J. M. (2011). Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the simultaneous determination of the main compounds causing cork taint and Brett character in wines using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(12), 1576-1584. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.055>

Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., & González-Sáiz, J. M. (2007). Optimisation of a headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatisation method for the direct determination of haloanisoles and halophenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 1143(12), 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.023>

Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., & González-Sáiz, J. M. (2007). Multiple headspace solid-phase microextraction for eliminating matrix effect in the simultaneous determination of haloanisoles and volatile phenols in wines. *Journal of Chromatography A*, 1166(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.031>

Pizarro, C., Martínez-Uruñuela, A., Pérez-del-Notario, N., & González-Sáiz, J. M. (2008). Robustness test of a headspace solid-phase microextraction method for the determination of chloroanisoles and chlorophenols related to cork taint in wine using experimental design. *Journal of Chromatography A*, 1208(1), 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.110>

Riu, M., Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. (2002). Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 977(1), 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01276-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01276-1)

Riu, M., Mestres, M., Busto, O., & Guasch, J. (2007). Comparative study of two chromatographic methods for quantifying 2, 4, 6-trichloroanisole in wines. *Journal of Chromatography A*, 1138(1), 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.035>

Romero, I., García-González, D. L., Aparicio-Ruiz, R., & Morales, M. T. (2015). Validation of SPME–GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects. *Talanta*, *134*, 394-401. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.032>

Ruiz-Delgado, A., Arrebola-Liébanas, F. J., Romero-González, R., López-Ruiz, R., & Garrido Frenich, A. (2016). Headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of haloanisoles in sparkling (cava and cider) and non-sparkling (wine) alcoholic beverages. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *33*(10), 1535-1544. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1229870>

Sadoughi, N., Schmidtke, L. M., Antalick, G., Blackman, J. W., & Steel, C. C. (2015). Gas chromatography–mass spectrometry method optimized using response surface modeling for the quantitation of fungal off-flavors in grapes and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(11), 2877-2885. <https://doi.org/10.1021/jf505444r>

Schmarr, H. G., Koschinski, S., Sang, W., & Slabizki, P. (2012). Trace level analysis of corky off-flavor compounds: Development of a new analytical method based on solid phase extraction and analysis by multidimensional gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, *1226*, 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.033>

Simpson, R. F. (1990). *Wine Ind J* *5*, 286-296.

Simpson, R. F., Capone, L., Sefton, M. A. (2004). Isolation and Identification of 2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a Potent Musty Compound from Wine Corks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(17), 5425-5430. <https://doi.org/10.1021/jf049484z>

Slabizki, P., & Schmarr, H. G. (2013). Analysis of corky off-flavour compounds at ultra trace level with multidimensional gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, *1271*(1), 181-184. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.020>

Sung, Y., Li, T., Huang, S. (2005). Analysis of earthy and musty odors in water samples by solid phase microextraction coupled with gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Talanta*, *65*(2), 518-524. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.07.014>

Swinehart D. F. (1962). The Beer-Lambert law. *Journal of Chemical Education*, *39*(7), 333. <https://doi.org/10.1021/ed039p333>

Vlachos, P., Kampioti, A., Kornaros, M., Lyberatos, G. (2007). Matrix effect during the application of a rapid method using HS-SPME followed by GC-ECD for the analysis of 2,4,6-TCA in wine and cork soaks. *Food Chemistry*, 105(2), 681-690.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.056>

Watson, S. B., Brownlee, B., Satchwill, T., Hargesheimer, E. E. (2000). Quantitative analysis of trace levels of geosmin and MIB in source and drinking water using headspace SPME. *Water Research*, 34(10), 2818-2828. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00027-0)

Weingart, G., Schwartz, H., Eder, R., & Sontag, G. (2010). Determination of geosmin and 2, 4, 6-trichloroanisole in white and red Austrian wines by headspace SPME-GC/MS and comparison with sensory analysis. *European Food Research and Technology*, 231(5), 771-779.

<https://doi.org/10.1007/s00217-010-1321-8>

Yang, X., Peppard, T. (1994). Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(9), 1925-1930. [10.1021/jf00045a018](https://doi.org/10.1021/jf00045a018)

Yu, S., Xiao, Q., Zhu, B., Zhong, X., Xu, Y., Su, G., & Chen, M. (2014). Gas chromatography–mass spectrometry determination of earthy–musty odorous compounds in waters by two phase hollow-fiber liquid-phase microextraction using polyvinylidene fluoride fibers. *Journal of Chromatography A*, 1329, 45-51. [10.1016/j.chroma.2014.01.002](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.002)

Žnideršič, L., Mlakar, A., & Prosen, H. (2019). Development of a SPME-GC-MS/MS method for the determination of some contaminants from food contact material in beverages. *Food and Chemical Toxicology*, 134, 110829. [10.1016/j.fct.2019.110829](https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110829)

Zou, P., Wang, L., Yang, Z. G., Lee, H., & Li, H. P. (2016). Rapid and simultaneous determination of ten off-flavor compounds in water by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Central South University*, 23(1), 59-67.

[10.1007/s11771-016-3049-5](https://doi.org/10.1007/s11771-016-3049-5)